



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
*Escola Nacional de Saúde Pública*

# **Universidade Nova de Lisboa**

## **Escola Nacional de Saúde Pública**

**Exposição Ocupacional a Citostáticos e Efeitos sobre a Saúde em  
duas Unidades Hospitalares Portuguesas**

**Maria Alexandra Canena Ribeiro Suspiro**

**Fevereiro de 2017**



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
*Escola Nacional de Saúde Pública*

# **Universidade Nova de Lisboa**

## **Escola Nacional de Saúde Pública**

Exposição Ocupacional a Citostáticos e Efeitos sobre a Saúde em duas  
Unidades Hospitalares Portuguesas

**Tese apresentada para cumprimentos dos requisitos necessários à  
obtenção do grau de Doutor em Saúde Pública na Especialidade de  
Saúde Ambiental e Ocupacional realizada sob a orientação científica  
do Professor Doutor João Prista**

**Fevereiro de 2017**

## RESUMO

**Introdução:** Os citostáticos são fármacos com utilização crescente, que têm em comum inibirem o crescimento tumoral atuando sobre o genoma celular. Afetam não apenas as células neoplásicas mas também as células normais, pelo que determinados grupos profissionais, expostos a estes agentes pelas exigências da sua atividade laboral, se encontram em risco de desenvolver efeitos adversos para a saúde. Os estudos de avaliação ambiental referem uma contaminação generalizada do ambiente de trabalho que as múltiplas normas de segurança não têm conseguido eliminar. Mais preocupante ainda, é referida uma frequência aumentada de diversos indicadores de genotoxicidade nos profissionais expostos quando comparados com indivíduos não expostos.

**Objetivos e Metodologia:** Este projeto visou estudar esta exposição em: a) profissionais de enfermagem de hospitais de dia, responsáveis pela administração de citotóxicos em regime ambulatorio; b) profissionais de farmácias hospitalares, envolvidos na preparação destes fármacos. Como fase inicial, caracterizou-se detalhadamente a atividade de trabalho recorrendo à metodologia de análise ergonómica das situações de trabalho. De seguida procedeu-se à avaliação ambiental por estudo da contaminação de superfícies. Finalmente colheu-se material para a determinação de alguns indicadores biológicos de efeito nos profissionais expostos (teste de micronúcleos e teste do cometa em linfócitos de sangue periférico).

**Resultados:** O estudo da atividade de trabalho revelou várias discordâncias entre procedimentos recomendados e atividade real de trabalho e permitiu identificar diversos pontos críticos que devem ser alvo de intervenção. A análise da contaminação de superfícies confirmou a presença de citotóxicos em diversos pontos do ambiente de trabalho, muitos dos quais tocados sem luvas. Os indicadores biológicos apresentaram valores superiores nos trabalhadores expostos face ao grupo controlo, no caso do teste de micronúcleos atingindo significado estatístico. **Conclusões:** Foi demonstrado existir exposição cutânea dos trabalhadores estudados nas duas unidades hospitalares e que esta tem um efeito biológico significativo. A alteração das diversas práticas de trabalho estudadas bem como a implementação de medidas organizacionais e de proteção, coletiva e individual, sugeridas pelo presente estudo, podem contribuir para reduzir a exposição e assim evitar o aparecimento de efeitos biológicos no organismo dos trabalhadores.

**Palavras chave:** exposição; ocupacional; citostáticos; genotoxicidade

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Cytotoxic agents are increasingly used and have in common the ability to inhibit tumor growth by affecting the cellular DNA and so also damage normal cells. Patients with cancer suffer side effects of treatment but in addition health care professionals who treat them are also exposed to these genotoxic drugs as an inherent part of their labor activity. Several studies demonstrate a widespread contamination of working surfaces and equipment despite the multiple safety regulations published over the last decades. Even more concerning is the increased frequency of biological indicators of genotoxicity in exposed workers when compared with non-exposed ones.

**Aims and Methods:** This project pretends to study occupational exposure to cytotoxics in: a) nurses from units responsible for the administration of cytotoxics in ambulatory regimen; b) pharmacy workers in charge of the preparation of these drugs. In an initial phase we characterize in detail work activity using methods adopted from ergonomic work analysis. Subsequently an environmental study was performed measuring the contamination of working surfaces and equipment. Finally, blood samples were collected from exposed workers for the measurement of some biological indicators of genotoxicity (micronuclei test and *comet* assay both in peripheral blood lymphocytes) for comparison with a non-exposed control group. **Results:** Work analysis revealed several discrepancies between recommended procedures and real work activity, identifying critical points who should be targeted for intervention. The study on environmental contamination by wipe sampling confirmed widespread presence of cytotoxics in surfaces and equipment, frequently touched without protective gloves. Biological indicators of genotoxicity had higher values in exposed workers, reaching statistical significance for the micronuclei test. **Conclusions:** Our results demonstrate that cutaneous exposure of workers does indeed occur and has significant biological effect. The modification of several work practices observed as well as the improvement of some aspects of work organization and of collective and individual protective measures might contribute to lessen exposure and prevent the development of biological effects on the workers.

**Key words: occupational; exposure; cytotoxics; genotoxicity**



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor João Prista, o melhor orientador que se poderia desejar

À Sara, que me ensinou tanto sobre a atividade de uma farmácia

Ao Miguel, ao João Pedro, à Catarina e ao André, pela paciência das longas horas  
sem lhes dar atenção

Ao Zé, pelo apoio e incentivo constante e pela revisão cuidadosa de tudo o que fiz

*Quem caminha sózinho pode até chegar mais rápido,  
mas quem vai acompanhado com certeza vai mais longe*

Clarise Lispector

## **ÍNDICE**

### **1. Enquadramento teórico**

1.1 O cancro ocupacional.....	11
1.2 Os mecanismos de carcinogenicidade química.....	19
1.2.1 Eventos genotóxicos	
1.2.1.1 Mutações.....	20
1.2.1.2 Lesões cromossómicas.....	23
1.2.2 Eventos não genotóxicos	
1.2.2.1 Interferência com a transcrição genética.....	26
1.2.2.2 Interferência com a reparação do ADN.....	31
1.2.2.3 Desregulação da morte celular programada.....	35
1.2.3 Modelos gerais de carcinogenicidade.....	36
1.3 Os indicadores biológicos no cancro ocupacional.....	41
1.3.1 Indicadores biológicos de dose interna.....	47
1.3.2 Indicadores biológicos de dose efetiva	
1.3.2.1 Aductos proteicos.....	48
1.3.2.2 Aductos de ADN.....	49
1.3.3 Indicadores de efeito biológico	
1.3.3.1 Detecção de mutações.....	52
1.3.3.2 Aberrações cromossómicas.....	53
1.3.3.3 Teste de micronúcleos.....	55
1.3.3.4 Troca de cromátides irmãs.....	57
1.3.3.5 Teste do cometa.....	58
1.4 A exposição ocupacional a agentes citostáticos	
1.4.1 Os citostáticos como agentes genotóxicos e cancerígenos.....	60
1.4.2 Exposição ocupacional a citostáticos em profissionais de saúde...63	
1.4.3 Efeitos sobre a saúde nos profissionais expostos a citostáticos...68	
1.4.4 Indicadores biológicos nos profissionais expostos a citostáticos...70	

<b>2. Objetivos.....</b>	<b>80</b>
--------------------------	-----------

### **3. Metodologia**

3.1 Tipo de estudo.....	81
3.2 População.....	81
3.3 Análise ergonómica do trabalho.....	82
3.4 Avaliação ambiental.....	86
3.5 Avaliação biológica.....	87
3.6 Enquadramento ético.....	89
3.7 Análise estatística.....	96

### **4. Resultados**

4.1 Análise das situações de trabalho.....	97
4.1.1 Breve descrição dos espaços de trabalho.....	97
4.1.2 Estudo da atividade de trabalho.....	102
4.1.2.1 Resultados mais relevantes da aplicação da ISOPP Audit Tool.....	104
4.1.2.2 Resultados mais relevantes do registo na grelha de observação.....	107
4.2 Estudo da contaminação ambiental.....	109
4.3 Determinação dos indicadores biológicos	
4.3.1 Caracterização da população estudada.....	113
4.3.2 Frequência de células micronucleadas.....	117
4.3.3 Lesão do ADN medida pelo teste do cometa.....	120

### **5. Discussão**

5.1 Indicadores biológicos de efeito.....	122
5.1.1 Teste de micronúcleos.....	123
5.1.2 Teste do cometa.....	127

5.2 Contaminação de superfícies.....	131
5.3 Análise do trabalho.....	134
5.3.1 Preparação.....	134
5.3.2 Administração.....	136
5.3.3 Outros pontos críticos	
5.3.3.1 Transporte.....	136
5.3.3.2 Educação e treino.....	137
5.3.3.3 Limpeza e destino dos itens contaminados.....	138
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>142</b>
<b>7. Recomendações/Propostas.....</b>	<b>144</b>
<b>8. Referências bibliográficas.....</b>	<b>147</b>

(Norma Portuguesa – NP 405-1)

## **Anexos**

1 – Questionário aplicado na caracterização das populações de expostos e não expostos

2 – Questionário de autopreenchimento da ISOPP (ISOPP Audit Tool)

3 – Grelha de observação

4 – Resultados da aplicação do questionário da ISOPP

5 – Resultados do registo na grelha de observação

6 – Resultados individuais do teste de micronúcleos

7 – Resultados individuais do teste do cometa

## Lista de Quadros

Quadro 1 – Agentes químicos e atividades ocupacionais com carcinogenicidade comprovada para o Homem (Grupo 1 da IARC).....	14
Quadro 2 – Fármacos citostáticos classificados pela IARC quanto à sua carcinogenicidade.....	61
Quadro 3 – Estudos de contaminação de superfícies e ar do ambiente de trabalho...	64
Quadro 4 – Estudo com indicadores biológicos de dose na urina de profissionais de saúde expostos a citostáticos.....	72
Quadro 5 – Estudos com indicadores biológicos de efeito em profissionais de saúde expostos a citostáticos.....	75
Quadro 6 – Resultados da contaminação de superfícies no Hospital A.....	111
Quadro 7 – Resultados da contaminação de superfícies no Hospital B.....	112
Quadro 8 – Características da população incluída no estudo.....	113
Quadro 9 – Carga tabágica dos fumadores incluídos no estudo.....	116
Quadro 10 – Frequência global de células micronucleadas em linfócitos de sangue periférico de trabalhadores expostos e não expostos.....	117
Quadro 11 – Frequência de células micronucleadas acima e abaixo dos 40 anos de idade.....	118
Quadro 12 – Percentagem de ADN na cauda do cometa em linfócitos de sangue periférico de trabalhadores expostos e não expostos.....	120
Quadro 13 – Tipo de controlos utilizados e respectiva frequência média de células micronucleadas em linfócitos de sangue periférico.....	124
Quadro 14 – Frequência média de células micronucleadas em linfócitos de sangue periférico nos respetivos grupos de expostos e resultado do estudo.....	125
Quadro 15 – Número de trabalhadores expostos a cistostáticos e indivíduos controlo avaliados em estudos usando o teste de micronúcleos.....	129
Quadro 16 - Número de trabalhadores expostos a cistostáticos e indivíduos controlo avaliados em estudos usando o teste do cometa.....	130

## Lista de Figuras

Figura 1 – Circuito seguido pelos citostáticos na Unidade Hospitalar A.....	98
Figura 2 – Circuito de medicamentos e ar recomendado para a zona de preparação de medicamentos citotóxicos.....	100
Figura 3 – Representação esquemática da unidade de preparação de medicamentos citotóxicos do hospital estudado.....	102
Figura 4 – Distribuição da população estudada por género.....	114
Figura 5 – Distribuição da população estudada consoante os hábitos tabágicos.....	115
Figura 6 – Tempo de exposição a citostáticos no grupo de expostos.....	117
Figura 7 – Correlação entre tempo de exposição a citostáticos e frequência de células micronucleadas em linfócitos de sangue periférico.....	119
Figura 8 – Correlação entre tempo de exposição a citostáticos e percentagem de ADN na cauda do cometa.....	121

## **Lista de Siglas**

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ALARA – As Low As Reasonably Achievable (tão baixo quando razoavelmente possível)

ARN – Ácido ribonucleico

ASHP – American Society for Health System Phamacist

BER – Base Excision Repair (Sistema de reparação do ADN por excisão de bases)

CBMN – Cytokinesis Block Micronuclei Test

CFALV – Câmara de Fluxo Aéreo Laminar Vertical

DSB – Double Strand Break (quebra da dupla cadeia do ADN)

FISH – Fluorescence In Situ Hybridization (Hibridização in situ visualizada por fluorescência)

GRC – Global Genoma Repair (Reparação Global do Genoma)

HEPA – High Efficiency Particulate Arrestance

HFC – High Frequency Cells (Células com frequência elevada de SCE)

HPLC – High Precision Liquid Chromatography (cromatografia líquida de alta precisão)

HPRT – Hypoxantin-guanin-Phospho-Ribosil Tranferase (enzima codificada por gene “repórter” usado no estudo de mutações)

HR – Homologous Repair (Sistema de reparação homólogo do ADN)

HUMN – Human MicroNuclei Project (projecto europeu que constituiu base de dados incluindo os resultados de vários estudos publicados oriundo de 25 laboratórios de diferentes países europeus)

IARC – International Agency for Research on Cancer

IPCS – International Program on Chemical Safety

ISOPP – International Society of Oncology Pharmacy Practitioners

Local AP – Local apurínico e apirimidínico

LP-BER – Long Patch Base Excision Repair (Sistema de reparação por excisão de bases de segmentos longos de ADN)

MGMT – O<sup>6</sup>-metilguanina-ADN-metiltransferase (enzima envolvida na reparação do ADN)

MMR – Mismatch Repair (Sistema de reparação de erros no emparelhamento de bases do ADN)

MN – Micronúcleos

NER – Nucleotide Excision Repair (Sistema de reparação do AND por excisão de nucleótidos)

NHEJ – Non Homologous End Joining (Sistema de reparação não homólogo do ADN)

OIT – Organização Internacional do Trabalho

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAHs – Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos)

PIC/S – Pharmaceutical Inspection Cooperative Scheme

ROS – Radical Oxygen Species (Radicais Livres de Oxigénio)

SCE – Sister Chromatid Exchange (Troca de Cromátides Irmãs)

SCGE – Single Cell Gel Electrophoresis

SP-BER – Short Patch Base Excision Repair (Sistema de reparação por excisão de bases de segmentos curtos de ADN)

TCR – Transcription Coupled Repair (reparação acoplada à transcrição)

WMA – World Medical Association



# **1 ENQUADRAMENTO TEÓRICO**

## **1.1 O cancro ocupacional**

A Saúde Ocupacional, enquanto uma das grandes áreas de intervenção em Saúde Pública, vem merecendo um particular reconhecimento por parte da Organização Mundial de Saúde (OMS), facto bem documentado e valorizado a partir de meados dos anos 80 do século XX.

A Carta de Otawa, emitida aquando da 1ª Conferência Internacional sobre Promoção da Saúde que decorreu em Otawa em 1986 (WHO, 1986), reconhece o trabalho como importante fonte potencial de saúde para as populações e considera que a maneira como a sociedade organiza o trabalho deveria ajudar a criar uma sociedade saudável. Promover saúde, preocupação estratégica fundamental em Saúde Pública, deve assim incluir a criação quer de condições de vida quer de condições de trabalho seguras e satisfatórias, sendo assumido o compromisso de centrar a atenção da Saúde Pública nos riscos ocupacionais.

A Declaração “Saúde Ocupacional para Todos” aprovada na Conferência de Beijing, na China, em 1994 (WHO, 1994), vem reconhecer o grande impacto dos acidentes de trabalho e doenças profissionais sobre o bem-estar dos trabalhadores, suas famílias e dependentes, bem como sobre a produtividade e a economia. É afirmado que se à força de trabalho formal ou oficial, que constitui 50-60% da população total de um país, somarmos o trabalho não formal e o trabalho doméstico, a maior parte da população está envolvida em situações de trabalho.

O nível de saúde e segurança ocupacionais, o desenvolvimento socioeconómico de um país e a qualidade de vida dos trabalhadores são considerados parâmetros intimamente ligados, pelo que o investimento na Saúde Ocupacional tem um impacto positivo e produtivo sobre a economia das empresas e dos países. A Saúde Ocupacional assume, assim, um importante papel como fator para o desenvolvimento socioeconómico sustentado.

Em 1997 a Declaração de Luxemburgo cria, ao nível europeu, a Rede de Promoção da Saúde no Local de Trabalho (EU, 1997), e a Declaração de Barcelona (EU, 2001) valoriza esta rede como parte do modelo social europeu e reconhece que o local de trabalho é um dos campos de acção mais importantes para a Saúde Pública. A importância da Saúde Ocupacional está, assim, balizada e reconhecida.

A Saúde Ocupacional visa, de acordo com a definição conjunta da Organização Internacional do Trabalho (OIT) e OMS, alcançar a promoção e manutenção do mais elevado grau de bem-estar físico, mental e social dos trabalhadores, prevenindo desvios de saúde causados pelas condições de trabalho e protegendo-os no seu emprego contra riscos resultantes de fatores adversos para a saúde. Nesta perspectiva, o conhecimento das inter-relações entre trabalho e saúde constitui o foco central da Saúde Ocupacional.

As modificações dos processos de trabalho verificadas nas últimas décadas, quer a nível macroeconómico (terciarização progressiva da economia com declínio do sector secundário e crescimento do sector terciário), quer a nível microeconómico (automação e informatização crescentes), provocaram uma alteração do perfil da morbilidade associada ao trabalho. Num contexto como este, as doenças profissionais clássicas tendem a desaparecer e a preocupação desloca-se para as “doenças relacionadas com o trabalho”, de etiologia multifatorial, como as lesões músculo-esqueléticas, os distúrbios mentais e o cancro.

O trabalho passa, assim, a participar na matriz etiológica de muitas patologias de natureza multifatorial, desempenhando um papel mais ou menos preponderante consoante os casos. De entre estas patologias avulta, pela sua incidência crescente e pela sua grave repercussão em termos quer de saúde individual, quer de Saúde Pública, o cancro e, para o presente propósito, o designado cancro profissional ou de origem ocupacional.

O cancro é efetivamente a segunda causa de morte a nível mundial: as últimas estimativas da International Agency for Research on Cancer (IARC) relativas à incidência e mortalidade por cancro em todo o mundo, publicadas em 2008 através do projecto GLOBOCAN, referem 12.677 novos casos de cancro e 7.571

mortes por cancro, anualmente, por cada 100.000 habitantes (Ferlay et al., 2010). Na União Europeia verificaram-se em 2012, de acordo com o Eurostat (EU, 2016), 267 mortes por 100.000 habitantes e em Portugal 244 mortes por esta entidade, também por 100.000 habitantes

Embora exista um pequeno número de síndromes raros, hereditários, associados a cancro, na generalidade dos casos este é uma doença de natureza genética, mas não hereditária, resultante da interacção entre factores endógenos e factores exógenos ambientais (Zaridze, 2008). A esmagadora maioria dos casos de cancro tem etiologia multifatorial, com um impacto preponderante de factores resultantes de exposições ambientais. Dado que a generalidade dos indivíduos trabalha durante cerca de 2/3 da sua vida, as exposições ocupacionais desempenharão sem dúvida, de entre os factores ambientais, um papel relevante.

A primeira relação comprovada entre cancro e atividade profissional remonta à descrição, em 1775, do cancro da bolsa escrotal em limpa-chaminés por Percival Pott, a que se seguiu a identificação, por Rhen, de cancro da bexiga em trabalhadores expostos a corantes (Boffetta et al., 1995). Desde então, múltiplas substâncias presentes em ambientes de trabalho específicos foram associadas a doenças cancerígenas, com particular relevância para o período entre 1950 e 1975 (Boffetta et al., 1995).

A classificação da IARC relativamente ao potencial carcinogénico dos factores de risco, constitui, indubitavelmente, a principal referência internacional e a mais reconhecida pela comunidade científica. As substâncias químicas representam, dentre estes factores de risco, o grupo de maior dimensão, superior a 90%, sendo atualmente classificados pela IARC 118 agentes como “Carcinogénicos” para o Homem - Grupo 1-, 75 como “Provavelmente Carcinogénicos” - Grupo 2A - e 288 como “Possivelmente Carcinogénicos - Grupo 2B (IARC, 2016).

Para além destas substâncias químicas, a classificação da IARC inclui ainda outros tipos de factores de risco e a identificação de determinadas atividades profissionais nas quais considera haver evidência suficiente de associação com cancro para serem colocadas também no Grupo 1, sem que tenha sido possível,

no entanto e até à data isolar o agente ou agentes específicos responsáveis (Quadro 1).

<b>Quadro 1 – Agentes químicos e atividades ocupacionais com carcinogenicidade comprovada para o homem (Grupo 1 IARC)</b>		
<b>Agente ou Atividade</b>	<b>Cancro(s) associado(s)</b>	<b>Referência IARC</b>
Ácido isopropílico (fabrico usando ácidos fortes)	Cavidade nasal e seios perinasais	Sup 7, 100F (2012)
Alcatrão (destilação, gaseificação emissões da combustão)	Pulmão	Vol 92, 100F (2012)
4-aminobifenil	Bexiga	Vol 1, Sup 7 (2012)
Anilinas	Bexiga	Vol 57 (2012)
Arsénico	Pulmão, pele, bexiga	Vol 23, Sup 7 (2012)
Asbestos	Laringe, pulmão, mesotelioma, ovário	Vol 14, Sup 7 (2012)
Azatioprina	Pele, linfoma	Vol 26, Sup 7 (2012)
Benzeno	Leucémia	Vol 29, Sup 7 (2012)
Benzidina	Bexiga	Vol 29, Sup 7 (2012)
Benzopireno	Pulmão	Vol 92 (2012)
Berílio	Pulmão	Vol 58 (2012)
Bis-cloro-metil-eter	Pulmão	Vol 4, Sup 7 (2012)
Busulfan	Leucémia	Vol 4, Sup 7 (2012)
1,3-Butadieno	Leucémia	Vol 97 (2012)
Cádmio	Pulmão	Vol 58 (2012)
Carvão (gaseificação, emissões de combustão)	Pulmão	Vols 92 e 05, 100F (2012)
Ciclofosfamida	Bexiga, Leucémia	Vol 26, Sup 7 (2012)
Ciclosporina	Pele, linfoma	Vol 26, Sup 7 (2012)
Cinza (limpa-chaminés)	Pele	Vol 35, Sup 7 (2012)
Clorambucil	Leucémia	Vol 26, Sup 7 (2012)

<b>Quadro 1 – Agentes químicos e atividades ocupacionais com carcinogenicidade comprovada para o homem (Grupo 1 IARC) - Continuação</b>		
<b>Agente ou Atividade</b>	<b>Cancro(s) associado(s)</b>	<b>Referência IARC</b>
Cloreto de vinilo monómero	Fígado	Vol 97 (2012)
Clornafazina	Bexiga	Vol 4, Sup 7 (2012)
Compostos crómio hexavalente	Pulmão	Vol 49 (2012)
Compostos de níquel	Cavidade nasal e seios perinasais, pulmão	Vol 49 (2012)
1,2-Dicloropropano	Fígado e vias biliares	Vol 41, Sup 7 (em preparação)
Etoposido	Leucémia	Vol 76 (2012)
Etoposido+cisplatina+bleomicina	Leucémia	Vol 76 (2012)
Fluoro-edenite	Mesotelioma	Vol 111 (em preparação)
Formaldeído	Nasofaringe, leucémia	Vol 88 (2012)
Fumos exaustão diesel	Pulmão	Vol 46 (em prep)
Indústria da borracha	Estômago, pulmão, bexiga, leucémia	Vol 28, Sup 7 (1987)
Melfalan	Leucémia	Vol 9, Sup 7 (2012)
Minas de hematite	Pulmão	Vol 1, Sup 7 (2012)
MOPP	Pulmão, leucémia	Vol 53 (2012)
2-naftilamina	Bexiga	Vol 75 (2012)
Óleos minerais não refinados	Pele	Vol 55, Sup 7 (2012)
Orto-toluidina	Bexiga	Vol 77 (2012)
Óxido de etileno	Linfoma	Vol 15, Sup 7 (1999)
PCBs	Melanoma	Vol 41, Sup 7 (em prep)
Pintores	Pulmão, bexiga, mesotelioma	Vol 47 (2012)
Pó de couro	Cavidade nasal e seios perinasais	Vol 100C (2012)

<b>Quadro 1 – Agentes químicos e atividades ocupacionais com carcinogenicidade comprovada para o homem (Grupo 1 IARC) - Continuação</b>		
<b>Agente ou Atividade</b>	<b>Cancro(s) associado(s)</b>	<b>Referência IARC</b>
Pó de madeira	Nasofaringe, cavidade nasal e seios perinasais	Vol 62 (2012)
Processo de Acheson	Pulmão	Vol 111 (em preparação)
Produção de alumínio	Pulmão, bexiga	Vol 34, Sup 7 (2012)
Produção de auramina	Bexiga	Vol 1, Sup 7 (2012)
Produção de coque	Pulmão	Vol 92 (2012)
Produção de magenta	Bexiga	Vol 57 (2012)
Semustina	Leucémia	Vol 1, Sup 7 (2012)
Sílica cristalina	Pulmão	Vol 68 (2012)
Tiotepa	Leucémia	Vol 50 (2012)
Treosulfan	Leucémia	Vol 26, Sup 7 (2012)
Tricloroetileno	Rim	Vol 63 (em preparação)

A estimativa de Doll e Peto, desenvolvida na parte final do século XX, sobre a fração de cancro atribuível a exposições ocupacionais, continua a ser a mais consensualmente aceite pela comunidade científica e situa-se nos 4% (Doll; Peto, 1981) (Blot; Tarone, 2015).

Nos Estados Unidos da América, por exemplo, calcula-se que ocorram anualmente 12.698 a 26.244 mortes por cancro relacionadas com a atividade profissional, representando 2,3 a 4,8% de todas as mortes por cancro, sendo mais salientes o cancro do pulmão, em que as exposições ocupacionais (arsénico, asbestos, sílica, berílio, cádmio, crómio, níquel, fumos de diesel e radão) representam cerca de 8% dos casos, e o cancro da bexiga, em que as exposições ocupacionais (2-naftilamina, fabrico de magenta, benzidina, fabrico de auramina e 4-aminobifenil) representam entre 5,6 e 19% dos casos (Steenland et al., 2003).

Também no Reino Unido foi estimado que num ano ocorrem mais de 7.000 mortes atribuíveis à exposição ocupacional a agentes carcinogénicos, correspondentes a 4,9% do total de mortes por cancro (Rushton; Hutchings; Brown, 2008).

Na Finlândia, um estudo de Nurminen refere como fração global do cancro atribuível a exposições ocupacionais um valor de 8%, mas atingindo os 24% no caso do cancro do pulmão (Nurminen; Karjalainen, 2001).

Em Portugal não existe nenhum sistema de informação sistematizado que permita a colheita de dados sobre a morbilidade e mortalidade das situações de cancro profissional. Existem alguns estudos isolados sobre determinadas exposições ocupacionais e certos tipos de cancro (Bento; Barros, 1997; Viegas; Prista, 2007), mas não dados globais.

Independentemente do número ou da sua relevância epidemiológica, a questão importante de salientar é a de que todos estes casos de cancro e todas estas mortes são teoricamente evitáveis, conhecendo-se as exposições em causa e atuando sobre elas.

A prevenção primária (redução ou eliminação da exposição a fatores de risco conhecidos de modo a prevenir a ocorrência de doença) é sem dúvida a forma mais custo-efetiva de prevenir o cancro, embora tenha nas últimas décadas sido negligenciada em favor da prevenção secundária (diagnóstico precoce e tratamento), por esta ter maior impacto individual e efeitos visíveis a mais curto prazo. O objetivo da prevenção primária é reduzir a mortalidade e morbilidade reduzindo a incidência de doença, pelo que será particularmente eficaz para doenças letais como o cancro, em que a redução da mortalidade depende em grande parte de se conseguir uma redução na incidência.

Apesar dos enormes esforços e fundos aplicados na investigação e prevenção do cancro, poucos benefícios têm sido conseguidos na melhoria da sobrevivência e na redução da incidência: enquanto a mortalidade por doença cardiovascular se tem vindo a reduzir progressivamente, a mortalidade por cancro continua a aumentar (Tomatis et al., 1997). Tal contrasta flagrantemente com a estimativa de que pelo menos um terço de todos os casos de cancro poderia ser evitado se

os atuais conhecimentos sobre a etiopatogenia desta doença fossem aplicados (Espina et al., 2013).

O cancro de origem ocupacional apresenta-se efetivamente como uma doença de eleição onde a prevenção primária pode ter um impacto notório e decisivo. Com efeito, é mais fácil controlar uma fonte comum de exposição afetando um grande número de indivíduos do que persuadir esses mesmos indivíduos a alterar os seus comportamentos individuais (Tomatis et al., 1997).

As exposições ocupacionais são exposições involuntárias e que podem ser reduzidas ou eliminadas por forma a evitar os cancros a elas associadas. Exemplos da eficácia desta prevenção são a redução de cancro da bexiga em trabalhadores da indústria de corantes após eliminação da exposição a aminas aromáticas (Tomatis et al., 1997) e a diminuição de cancros nasais em trabalhadores da indústria de madeiras após redução da exposição a poeiras de madeira (Hayes et al., 1986).

Embora o cancro profissional represente uma proporção modesta de todas as causas de cancro, ele representa uma proporção substancial dos casos de cancro em determinados grupos de indivíduos com uma certa exposição ocupacional (Espina et al, 2013). O cancro profissional directamente relacionado com a exposição a um dado carcinogénio ocorre de forma concentrada em grupos relativamente pequenos de trabalhadores que apresentam um risco individual de cancro elevado. Estes cancros são quase inteiramente evitáveis reduzindo ou eliminando a exposição causal, pelo que medidas destinadas ao controlo dos riscos profissionais devem ter uma elevada prioridade em qualquer programa de Saúde Pública destinado à prevenção do cancro.

As estimativas globais da proporção de cancro atribuível a exposições ocupacionais podem, portanto, ser enganadoras, sendo preferível sempre que possível adotar uma abordagem específica, dirigida a grupos populacionais partilhando as mesmas exposições.

Os trabalhadores expostos a agentes químicos cangerígenos constituem certamente, dentro destes grupos populacionais, um alvo prioritário. Por um lado, como vimos, as substâncias químicas representam o grupo de maior dimensão



dentro dos fatores de risco profissionais para cancro, superior a 90% (Doll; Peto, 1981). Por outro lado, os mecanismos de carcinogenicidade química têm sido dos mais intensamente estudados nas últimas décadas e sobre eles existe uma quantidade de conhecimento substancial, susceptível de diversas aplicações práticas em investigações dirigidas a grupos concretos de trabalhadores expostos a determinados agentes químicos cancerígenos.

## **1.2 OS MECANISMOS DE CARCINOGENICIDADE QUÍMICA**

A maior parte dos agentes químicos apresentam como fator crucial no seu efeito carcinogénico a capacidade para alterarem a estrutura do ácido desoxirribonucleico (ADN), ao nível dos genes ou dos cromossomas – efeito genotóxico (Loeb; Harris, 2008).

Existem, contudo, também, agentes que administrados cronicamente induzem o desenvolvimento de neoplasias, mas não apresentam nenhuma genotoxicidade direta – atuam por mecanismos não genotóxicos (Loeb; Harris, 2008).

Se o mecanismo de carcinogenicidade dos agentes genotóxicos é compreensível com relativa facilidade, já a explicação para o modo de atuação dos agentes não genotóxicos tem sido de mais difícil esclarecimento, existindo provavelmente mais do que um mecanismo envolvido.

Uma possível explicação será eles atuarem apenas como promotores sobre clones de células já iniciadas de forma espontânea, levando à sua expansão. Tal explicação é, no entanto, simplista, pois a presença da maior parte dos agentes não genotóxicos no organismo associa-se a citotoxicidade direta e/ou inflamação crónica que podem levar ao aumento da produção de radicais livres de oxigénio (ROS) e outros produtos reativos com lesão secundária do ADN e apresenta, portanto, genotoxicidade indireta (Hernandez et al, 2009) (Lonkar; Dedon, 2011).

## 1. 2.1. Eventos genotóxicos

### 1.2.1.1 Mutações:

O principal mecanismo de carcinogénese associado aos agentes químicos é a indução de mutações (Loeb; Harris, 2008).

As mutações consistem em pequenas alterações na sequência do ADN confinadas a um único gene; as alterações envolvendo maiores segmentos de ADN enquadram-se nas aberrações cromossómicas.

As mutações podem consistir em substituições de bases, pequenas adições ou pequenas deleções. As substituições de bases ocasionam a substituição de um nucleótido correto por um incorreto; quando a substituição é de uma purina por uma pirimidina ou vice-versa, denomina-se transversão; quando é de uma purina por outra purina ou de uma pirimidina por outra pirimidina denomina-se transição. As mutações de tipo *frameshift* consistem na adição ou deleção de um pequeno número de pares de bases (que não um múltiplo de 3) em regiões que codificam proteínas, alterando assim a sequência de leitura do ADN.

Os agentes químicos que ocasionam alterações genéticas com eficácia semelhante ao longo de todas as fases do ciclo celular são denominados ciclo-independentes ou radio-miméticos porque atuam de forma semelhante às radiações. Os que ocasionam alterações genéticas com maior eficácia na fase S são denominados S-dependentes ou não-radiomiméticos. A esmagadora maioria dos agentes químicos são não radiomiméticos; os raros químicos radiomiméticos incluem por exemplo a bleomicina (Hagmar et al., 2004).

Nas células somáticas os alvos de mutação mais estudados pertencem a duas grandes categorias:

- Proto-oncogenes: São genes envolvidos no crescimento e proliferação celular, transdução de sinais e transcrição de outros genes. Podem ser ativados por mutações pontuais, pequenas inserções e deleções (mutações de tipo *frameshift*) ou alteração do estado de metilação de regiões promotoras (mecanismo não genotóxico), transformando-se

então em oncogenes. Os oncogenes causam a transformação de células normais em células neoplásicas de forma dominante – basta haver expressão de um único oncogene mesmo na presença do alelo normal.

A este grupo pertence, por exemplo, a família de oncogenes *ras* que codifica proteínas com função de guanosina trifosfatases que atuam como interruptores moleculares na transdução de vias de sinalização envolvidas no controlo do crescimento e diferenciação celulares (van der Weyden; Adams, 2007). A substituição de um par de bases nos proto-oncogenes da família *ras* transformando-os em oncogenes é frequente em diversos tumores humanos (van der Weyden; Adams, 2007).

Adicionalmente, os proto-oncogenes podem também ser convertidos em oncogenes por alterações cromossómicas mais grosseiras, embora este seja um fenómeno mais raro. O linfoma de Burkitt, por exemplo, envolve uma translocação entre o braço longo do cromossoma 8, onde se localiza o oncogene *c-myc*, e os cromossomas 14, 22 ou 2. A translocação pode ativar o proto-oncogene movendo-o para uma nova localização associada a transcrição ativa, sendo o exemplo mais frequente um gene que codifica o recetor de imunoglobulinas das células T; alternativamente a translocação pode juntar os dois genes originando uma proteína de fusão que contribui para a carcinogénese (Petrich; Nabham; Smith, 2014).

- Genes supressores tumorais: São genes envolvidos na regulação do ciclo celular, que quando são inativadas as duas cópias ou alelos levam à transformação neoplásica: são, portanto, genes recessivos – não são expressos quando há heterozigotia.

A sua inativação resulta na cessação da ação inibitória normal sobre a proliferação celular. Podem ser inativados por mutação, deleção, perda cromossómica ou recombinação mitótica. São necessários dois eventos para a carcinogénese, dado ser necessário inativar ambos os alelos normais. Nas formas esporádicas de cancro estes dois eventos ocorrem de forma independente; nas formas familiares um dos eventos

(geralmente uma mutação) é herdado fazendo com que apenas seja necessária a ocorrência de mais um evento.

O gene supressor tumoral mais frequentemente inativado nos tumores humanos é o *p53*, o que é facilmente compreensível se tivermos em conta o papel preponderante que a proteína por ele codificada desempenha na defesa contra os mais variados tipos de agressão tanto endógena como exógena (Olivier; Hollstein; Hainaut, 2010).

O principal mecanismo de carcinogénese química envolve como já foi referido a indução de mutações.

Os agentes químicos originam predominantemente alterações de bases por formação de aductos ou por intercalação do químico entre os pares de bases (Loeb; Harris, 2008).

Muitos agentes electrofílicos reagem com o ADN formando produtos covalentes (aductos). A base do ADN envolvida pode ser específica para determinado agente químico, resultando num espectro de alterações genéticas característico.

A probabilidade de um aducto ser convertido numa mutação vai depender da capacidade de reparação do ADN: quando maior a quantidade de aductos que permanecer no ADN aquando da replicação deste, maior a probabilidade de se originarem mutações. A frequência de mutações vai assim depender do equilíbrio entre as taxas de mutações, replicação e reparação. Os *checkpoints* do ciclo celular como a proteína *p53*, ao atrasar a entrada da célula na fase S, vão permitir que exista um intervalo de tempo maior para reparação de danos antes da entrada na fase de replicação.

Os aductos químicos covalentes do ADN podem ser lesivos por 3 mecanismos (Shrivastav; Li; Essigmann, 2010).

- A replicação de locais com aductos ou a sua reparação errada podem gerar mutações:

As bases alquiladas podem ser alvo de emparelhamento incorreto aquando da replicação do ADN, originando mutações, ou podem ocasionar alterações

secundárias do ADN. Por exemplo, o grupo alquil do aducto N<sup>7</sup>-alquilguanina, formado por muitos agentes alquilantes, torna mais lábil a ligação da base à desoxirribose fazendo com que facilmente ocorra perda da base deixando um local apúrinico e apirimidínico (local AP).

- A sua presença pode alterar o programa epigenético estabelecido (efeito que será abordado mais à frente)
- Eles podem bloquear as ADN polimerases levando a quebras na cadeia do ADN.

Os aductos volumosos, como por exemplo os originados pelos metabolitos do benzopireno, quando não reparados, levam a bloqueio da ADN polimerase durante a replicação (Stone., et al, 2011).

Tem sido difícil estabelecer uma relação direta entre tóxicos, aductos e efeitos biológicos. Muitos agentes originam múltiplos aductos diferentes e é muitas vezes difícil estabelecer quais têm ou não relevância biológica.

É importante ter a noção de que a maior parte das mutações não surge por ação de agentes químicos exógenos, mas sim de forma espontânea durante os processos normais do metabolismo e replicação celulares (Venitt, 1996), (Maynard et al., 2009). Diversos químicos endógenos produzidos como parte do metabolismo normal ocasionam diariamente centenas de lesões do ADN. Os exemplos mais frequentes e bem estudados são a ação de radicais livres de oxigénio sobre o ADN com formação de 8-oxoguanina (Nakabeppu, 2004) e a desaminação espontânea de 5-metilcitosina em timina em locais CpG originando transições C:C→A:T (Lindahl, 1993). O próprio processo de replicação do ADN apresenta uma certa taxa de erros potencialmente ocasionadora de mutações (Preston; Albertson; Herr, 2010).

#### 1.2.1.2 Lesões cromossómicas

As aberrações cromossómicas podem ser ocasionadas por diversos tipos de lesões grosseiras ao nível do ADN. As radiações ionizantes e os agentes

químicos radio-miméticos tendem a originar lesões graves e de difícil reparação como quebras de cadeia dupla.

As consequências são variadas, desde a justaposição incorreta de fragmentos cromossômicos originando inversões, translocações, deleções intersticiais ou terminais e formação de cromossomas dicêntricos. Fragmentos acêntricos podem ser originados por deleções intersticiais ou terminais ou pela formação de dicêntricos e anéis. A incapacidade para incorporar estes fragmentos acêntricos nos núcleos das células filhas quando da divisão celular ou a impossibilidade de segregar cromossomas inteiros durante a anáfase para os dois polos opostos dos núcleos das células filhas leva à formação de micronúcleos (MN) contendo material cromossômico e residentes no citoplasma, independentes do núcleo principal da célula (Thompson; Compton, 2011).

A replicação de moldes do ADN contendo erros pode originar uma série de aberrações cromossômicas. A maior parte consiste em deleções ou trocas de cromátides individuais (aberrações de tipo cromatídico). O cromossoma em fase G1 é constituído por uma única cadeia de ADN e as aberrações originadas nesta fase são replicadas na fase S afetando apenas uma das duas cromátides filhas. Neste tipo de aberração uma das cromátides permanece intacta e geneticamente inalterada (Natarajan,1993). Os agentes químicos não-radiomiméticos apenas podem induzir aberrações de tipo cromatídico.

As radiações e os agentes radio-miméticos podem induzir aberrações de tipo cromatídico quando atuam na fase S ou na fase G1 mas também aberrações de tipo cromossômico quando atuam na fase G2, afetando ambas as cromátides.

As alterações cromossômicas numéricas (monossomias, trissomias, alterações da ploidia) podem ser causadas por erros na segregação cromossômica. Os mecanismos de controlo do processo mitótico são complexos e qualquer alteração num deles pode levar a falha na segregação das cromátides irmãs entre as duas células filhas ou na segregação de cada cromossoma para um dos polos (Grade; Difillipantoni; Camps, 2015).

Existe um conjunto limitado de agentes químicos capazes de causar aneuploidia por interferência com os componentes que controlam o movimento

cromossômico, afetando a polimerização da tubulina ou a estabilidade do fuso de microtúbulos. Exemplos são a griseofulvina, a colchicina, a vinblastina e o paclitaxel (Wilson; Panda; Jordan, 1999).

Os linfócitos do sangue periférico são as células mais usadas para monitorizar a exposição a agentes genotóxicos causadores de anomalias cromossômicas. A estabilidade das anomalias provocadas é um factor crucial quer nesta monitorização de efeitos quer nas possíveis consequências das anomalias a longo prazo. Por exemplo, os cromossomas dicêntricos formados por erros na reparação de quebras de dupla cadeia, são aberrações instáveis eliminadas durante a divisão celular. Embora sejam importantes como indicadores biológicos de dose não são importantes em termos de risco genético (efeito). Já as aberrações estáveis como as translocações equilibradas são muito importantes em termos de risco genético uma vez que não são eliminadas durante a divisão celular e assim podem transmitir-se às células-filhas (Natarajan, 1993).

Os cromossomas dicêntricos são fáceis de detetar daí a sua frequente utilização como indicadores biológicos quando há exposição a agentes genotóxicos causadores de quebras de cadeia dupla, como por exemplo as radiações ionizantes.

Já as translocações podem ser difíceis de ver com técnicas mais rotineiras. As técnicas de hibridização *in situ* permitem corar cromossomas ou zonas cromossômicas específicas usando sondas marcadas e permitem detetar translocações de forma muito mais eficiente, incluindo translocações envolvendo segmentos muito pequenos, e todo o tipo de translocações (recíprocas, intersticiais, terminais). Com estas técnicas verificou-se que a frequência de translocações em linfócitos irradiados é cerca de duas vezes superior à de dicêntricos, pelo que, pelo menos no respeitante à exposição a radiações ionizantes, podem representar um método mais sensível de medir a exposição e seus efeitos biológicos (Natarajan et al., 1992).

Outra anomalia cromossômica frequente após exposição a agentes genotóxicos é a fragmentação do ADN. Como já referido, muitos dos fragmentos cromossômicos que se soltam durante o movimento da anafase originam

micronúcleos (MN). Os MN podem surgir também espontaneamente, pelo que existe uma frequência basal de MN que é “normal” mesmo na ausência da exposição a agentes genotóxicos exógenos conhecidos (Bonassi et al., 2001).

Os MN podem conter cromossomas inteiros ou apenas fragmentos acêntricos. Estes dois tipos de MN podem ser distinguidos usando sondas centrómero-específicas. A maior parte dos MN induzidos por agentes químicos contém fragmentos acêntricos. Os MN induzidos por agentes que interferem com a segregação cromossômica (colchicina, vincristina) originam sobretudo MN centroméricos (Norppa; Falck, 2003).

## **1.2.2 Eventos não genotóxicos**

### **1.2.2.1 Interferência com a transcrição genética:**

A cromatina é um composto altamente organizado de ADN, ARN e proteínas que tem duas grandes funções:

- Funciona como sistema de compactação do ADN, permitindo acomodar o grande genoma eucariota no pequeno volume do núcleo;
- Atua como barreira física em processos como a replicação e a reparação, sendo que os vários graus de compactação distribuídos pelo genoma determinam a acessibilidade da maquinaria de transcrição a regiões específicas do genoma (Orlowski et al., 2011).

Esta maleabilidade seletiva da arquitetura da cromatina, que divide o genoma em ativo (eucromatina) e inativo (heterocromatina) é responsável pelo controlo da expressão genética, podendo orquestrar de forma dinâmica o perfil desta.

A arquitetura da cromatina é ditada por regulação epigenética, permitindo que exista para o mesmo genoma uma grande variedade potencial de epigenomas cada qual com o seu perfil específico de expressão genética definidor da identidade e função celulares.



A unidade básica de empacotamento do ADN na cromatina é o nucleossoma, constituído por um octâmero de histona em torno do qual se enrolam cerca de 147 pb de ADN. O octâmero é constituído por 2 cópias de cada uma das 4 histonas H2A, H2B, H3 e H4. Os nucleossomas individuais estão ligados por estruturas de ADN tomando um aspeto semelhante a um colar de contas, com a histona H1 em contacto com os locais em que o ADN de ligação entra e sai do nucleossoma.

A deposição seletiva de marcadores epigenéticos como a metilação do ADN ou a modificação de histonas proporciona uma forma adicional da informação genética ser herdada. Durante a transcrição servem como plataformas de interação para proteínas não histónicas que promovem a atividade transcricional ou, pelo contrário, mantêm a repressão da transcrição em locais específicos do genoma.

Assim, por exemplo, a acetilação da lisina N-terminal das histonas associa-se a domínios transcricionalmente ativos enquanto a metilação de lisinas pode ter papel ativador ou silenciador dependendo do resíduo que é modificado. A metilação da lisina 4 da histona H3 associa-se a transcrição enquanto a metilação das histonas H3K9 e H3K27 marca regiões transcricionalmente inativas (Martin; Zhang, 2005).

A preservação de estados transcricionais essenciais à identidade e função celulares ao longo da mitose requer uma propagação correta e de alta fidelidade do padrão epigenético da célula mãe para a célula filha. A deterioração desta memória epigenética pode levar a ativação ectópica de genes que deveriam estar silenciados ou, pelo contrário, à inativação de genes que deveriam estar ativos.

Disrupções graves na estrutura da cromatina como as quebras de cadeia dupla do ADN podem ocasionar um grande número de alterações epigenéticas como modificações de histonas, alteração do padrão de metilação do ADN e remodelação da cromatina (Orlowski., et al 2011). Tais lesões graves podem levar a erros nos processos de reparação que visam reproduzir fielmente a informação epigenética, introduzindo defeitos na regulação epigenética transmissíveis através de múltiplas gerações celulares e potencialmente

carcinogénicos. É o conceito de epimutação que pode, tal como a mutação, ter graves implicações sobre a expressão de genes ativando-os ectopicamente ou silenciando-os.

Quando as células normais se transformam em células neoplásicas ocorre uma série de lesões quer genéticas quer epigenéticas que favorecem o crescimento celular descontrolado. As alterações epigenéticas constituem um dos mecanismos não genotóxicos de carcinogenicidade, porventura o mais importante.

Dentro destas alterações epigenéticas, avulta a metilação do ADN, que é um regulador crucial de diferentes processos biológicos como o desenvolvimento embrionário, a transcrição, a estrutura da cromatina, a inativação do cromossoma X e o *imprinting* e um importante mecanismo envolvido na manutenção da estabilidade genómica (Cheung., et al 2009).

A metilação do ADN ocorre exclusivamente ao nível da 5-citosina. A maior parte da metilação de citosinas ocorre em dinucleótidos CpG; a metilação não-CpG é rara e provavelmente restrita a células embrionárias.

Muitas regiões do genoma contêm grandes *clusters* de dinucleótidos CpG (ilhas CpG). Estas estão presentes em 70% dos promotores genéticos. As regiões transcricionalmente ativas do genoma são ricas nestas ilhas CpG e a metilação destas zonas é um dos fatores críticos que afectam a transcrição genética.

O padrão de metilação do ADN é dinâmico durante o desenvolvimento, tornando-se estático nas células já diferenciadas e sendo transmitido às células filhas. Representa um dos mecanismos epigenéticos de regulação da transcrição genética mais importantes.

Assim, nas células somáticas normais a maior parte das ilhas CpG não estão metiladas, significando que os genes que lhes estão associados estão transcricionalmente ativos. A hipermetilação aberrante de ilhas CpG de alguns genes, nomeadamente de genes supressores tumorais, é um processo adquirido durante a tumorigénese representando um mecanismo não genotóxico de alteração da expressão genética.

Muitos fatores de transcrição ligam-se a promotores de dinucleótidos CpG não metilados, mas não são capazes de se ligar a sequências CpG metiladas. Por exemplo, os complexos de proteínas ligadoras a grupos CpG MECP1 e MECP2 ligam-se preferencialmente a locais CpG metilados e inibem a transcrição. A ligação dos complexos MECP a promotores metilados evita o acesso de fatores de transcrição e recruta desacetilases das histonas, outro marcador epigenético repressivo associado a silenciamento genético (Nan; Meehan; Bird, 1993).

Como vimos, em circunstâncias normais o padrão de metilação do ADN nas células somáticas altera-se durante o desenvolvimento embrionário até que as células adquirem a sua diferenciação definitiva e o seu padrão específico de metilação tecidual (Cheung., et al 2009). A este epigenoma normal corresponde um determinado padrão de transcrição do ADN ou transcriptoma normal.

As alterações do epigenoma associadas ao processo de carcinogénese e que desregulam o transcriptoma normal por alteração do padrão de metilação do ADN podem tomar duas grandes formas (Cheung., et al 2009):

- Hipermetilação localizada de ilhas CpG localizadas nas regiões promotoras de genes supressores tumorais, inibindo a transcrição destes genes e interferindo com a sua função normal de inibição da tumorigénese (Gopalakrishnan; Emburgh; Robertson, 2008).

As ilhas CpG associadas a promotores desempenham com efeito um papel importante na regulação da transcrição genética. Nas células somáticas normais a maior parte das ilhas CpG não estão metiladas. A aquisição de metilação nalgumas ilhas CpG observa-se em quase todos os tipos de cancro e atinge muitos genes envolvidos em diferentes vias bioquímicas relacionadas com o desenvolvimento e progressão tumorais.

Genes frequentemente silenciados por este processo de metilação aberrante incluem reguladores do ciclo celular (*p16*, *p15* e *Rb1*), da reparação do ADN (*MGMT*, *BRCA1*, *MLH1*), da apoptose (*DAPK*, *TMS1*, *p73*), da metastização (*CDH1*, *CDH13*), da destoxificação (*GSTP1*), da resposta hormonal (*ESR1*, *ESR2*), o gene *ras* e genes da via *Wnt* (*APC*, *DKK1*). A hipermetilação de alguns genes (*p16*, *MGMT*) é frequente em

múltiplos cancros enquanto a de outros é relativamente específica de alguns (por exemplo, *Bex1* e *Bex2* no glioma).

- Hipometilação global com conseqüente instabilidade genómica.

A hipometilação global é um aspecto característico do cancro (Gopalakrishnan; Emburgh; Robertson, 2008), ocorrendo precocemente no processo de tumorigénese e correlacionando-se com a progressão tumoral e a metastização. A hipometilação global em sequências repetitivas de ADN desestabiliza os cromossomas e aumenta a taxa de rearranjo genómico.

Não é ainda claro se a hipometilação global presente nos tumores é uma consequência ou uma causa da tumorigénese. A heterocromatina pericentromérica contém sequências repetitivas de ADN densamente agrupadas. Nas células normais a heterocromatina está altamente metilada e, portanto, epigeneticamente silenciada. No cancro a hipometilação global é frequente e associa-se a perda de metilação das sequências *LINE-1* (*long interspersed nucleotide elements*) que ajudam a manter a estabilidade e integridade genómica. Como resultado surge instabilidade e aumento da recombinação mitótica.

A desmetilação genética específica aparece mais tarde, atingindo oncogenes como o *c-myc*, o gene *MAGE* (*melanoma antigen*), o *CDH3* e o *C-Ha-ras*.

A análise do padrão global de metilação do ADN no cancro revelou centenas de zonas desmetiladas das quais <3% correspondem a promotores genéticos conhecidos (Cheung., et al 2009). A maior parte localiza-se em regiões intergénicas e intrões não reguladores cuja função se desconhece. Uma possível função das regiões hipermetiladas intergénicas e intrónicas será regular a expressão de RNAs não codificantes que funcionam como supressores tumorais regulando negativamente a actividade de diversos genes (por exemplo o miRNA-127 funciona como regulador negativo do proto-oncogene *Bcl6* e o miRNA-124 como regulador negativo da *CDK6*). A desmetilação destas regiões impedirá

estes RNAs de exercerem a sua função supressora tumoral, favorecendo assim a carcinogénese.

#### 1.2.2.2 Interferência com a reparação do ADN:

O facto de o ADN estar continuamente a ser alvo da acção de agentes genotóxicos, endógenos e exógenos, torna essencial a existência de mecanismos de defesa que garantam a fidelidade do património genético. Se o grau de lesão é excessivo e não pode ser alvo de reparação, desencadeia-se o processo de morte celular programada (apoptose). Se o grau de lesão é menor, entram em acção uma série de processos de reparação que fazem parte da denominada “rede de resposta celular ao dano do ADN” e que inclui diversos mecanismos de reparação (Fleck; Nielsen, 2004), nomeadamente:

- O sistema de reparação por excisão de bases (BER) – Envolve uma glicosilase que remove a base danificada levando à formação de um local AP (apurínico e apirimidínico) que é posteriormente preenchido por uma base adequada através da acção de uma ADN polimerase que a liga à cadeia molde não danificada de ADN. O tipo de polimerase envolvido depende do tamanho do local lesado (*short or long patch polymerase: SP-BER e LP-BER*, respetivamente). As lesões causadas por radicais livres de oxigénio são primariamente reparadas por este mecanismo (Maynard et al., 2009).
- O sistema de reparação por excisão de nucleótidos (NER) – Remove aductos e lesões volumosas do ADN. Utiliza cerca de 30 proteínas que removem um oligonucleótido lesado do ADN através de uma série de passos sequenciais: reconhecimento → incisão → excisão → reparação por síntese → ligação.

O primeiro passo do NER consiste numa incisão no lado 3' da lesão pela proteína XPG; segue-se uma incisão no lado 5' pelo complexo XPF-ERRC1. A lesão é removida num segmento de 27-30 nucleótidos e o intervalo preenchido pelas polimerases na presença do factor de replicação C e de PCNA. O processo fica completo com a ligação pela ADN ligase (Shuck S; Short EA; Turchi JJ, 2008).

As lesões que ocorrem em segmentos de ADN sob transcrição ativa e especificamente na cadeia que está a sofrer transcrição são reparadas muito mais rapidamente pelo NER do que as lesões que ocorrem no restante genoma. Este acoplamento entre transcrição e reparação parece ser mediado por dois fatores: a) quando uma lesão volumosa se localiza numa cadeia em transcrição de um gene ativo ocorre um bloqueio da ARN polimerase II, originando um sinal para recrutamento do complexo NER; b) um dos componentes principais do NER é o fator de transcrição TFII H que proporciona alguma especificidade quando ao segmento de ADN a remover.

- A reparação de quebras de cadeia dupla (*Double Strand Breaks* ou DSB) - As quebras de cadeia dupla são consideradas a forma mais letal de lesão do ADN e são muito difíceis de reparar, sendo mais frequente que desencadeiem apoptose ou necrose (Bernstein; Rothstein, 2009). Existem, no entanto, duas vias de reparação deste tipo de lesão:
  - A recombinação homóloga (HR) – as células eucariotas usam a recombinação homóloga em atividades fisiológicas quer ao nível das células somáticas (recombinação mitótica) quer nas células germinais (recombinação meiótica). O passo inicial é a produção duma cauda de cadeia com uma extremidade 3' por acção de uma exonuclease e de uma helicase. De seguida esta cauda de cadeia única invade a molécula de ADN homóloga não lesada formando um complexo de junção (chamado complexo Holliday). Este complexo de junção é então clivado e são produzidas duas moléculas de ADN nenhuma das quais contém qualquer quebra. A HR é um mecanismo de elevada fidelidade mas que existe apenas durante as fases S e G2 do ciclo celular quando está presente uma cromátide irmã. Não funciona, portanto, em células que não estão em divisão.
  - A junção de extremidades não homóloga (NHEJ) – O principal componente deste complexo de reparação é a proteína cinase ADN-dependente ADN-PK, uma serina-treonina cinase com uma unidade catalítica e uma proteína de ligação à extremidade do ADN com 2 subunidades distintas. A ADN-PK alinha as extremidades quebradas do ADN de modo a facilitar a sua ligação e serve como molécula de

recrutamento para outras proteínas de reparação. O passo de ligação final é levado a cabo pela ADN ligase IV (Hiom, 2010).

A NHEJ, portanto, simplesmente reúne as extremidades quebradas do ADN, previamente tornadas compatíveis por várias nucleases. A NHEJ está ativa durante todas as fases do ciclo celular e é a via predominante de reparação das DSB.

A HR tem um papel protetor contra a citotoxicidade induzida pelas quebras de cadeia dupla em células em proliferação, não funcionando nas células pós-mitóticas, onde a NHEJ é o mecanismo de eleição. A NHEJ desempenha assim um papel crucial nas células diferenciadas e de vida prolongada (Fortini; Dogliotti, 2010).

- O sistema de *mismatch repair* (MMR) – Corrige os erros de emparelhamento de bases que ocorrem normalmente durante o processo de replicação do ADN, durante a recombinação genética ou como resultado da lesão do ADN por agentes químicos ou físicos. Inicia-se pelo reconhecimento do erro por uma proteína específica que se liga à base incorretamente emparelhada, estabilizando a ligação a esta de uma ou mais proteínas. Segue-se o corte do ADN a uma certa distância do *mismatch*, a excisão dum segmento de ADN após o *mismatch*, a ressíntese e a ligação. O corte do ADN é direcionado para a cadeia que contém a base incorreta usando o facto do ADN recentemente replicado não estar metilado na N<sup>6</sup>-metiladenina (Li 2008).
- Reparação pela enzima O<sup>6</sup>-metilguanina-ADN metiltransferase (MGMT) – A MGMT protege as células contra os efeitos tóxicos de agentes alquilantes. Os grupos metil são transferidos da C<sup>6</sup>-metilguanina do ADN para um resíduo de cisteína da MGMT. A base com aducto é revertida ao normal e a enzima é inativada como resultado da reação (Pegg, 2011).

Revistos estes mecanismos básicos de reparação do ADN, é preciso ter em conta que a resposta ao dano do ADN das células que proliferam e se diferenciam é diferente consoante se tratem de células progenitoras multipotenciais (*stem cells*), de células já com algum comprometimento de linhagem ou de células completamente diferenciadas (Fortini; Dogliotti, 2010).

Em condições de stress as *stem cells* favorecem a apoptose (morte programada) acima da reparação do ADN, enquanto as células diferenciadas restringem a apoptose e procuram limitar a reparação do ADN aos seus domínios transcripcionais. Células com semividas curtas como as células sanguíneas ou as células da pele lidam melhor com a acumulação de lesões do ADN do que células diferenciadas como os neurónios ou os adipócitos que se perdidas não podem ser substituídas.

A capacidade de reparação do ADN em células terminalmente diferenciadas é essencial para a preservação da integridade do genoma transcrito e a protecção contra a morte celular, garantias da homeostase tecidual.

Nestas células, o NER é um mecanismo versátil de reparação do ADN, responsável pela remoção dos fotoprodutos induzidos pela radiação ultravioleta (UV), aductos químicos volumosos e ligações cruzadas entre as duas cadeias do ADN. Existem duas vias de NER:

- via da reparação global do genoma = *GGR* (reconhece e remove lesões de todo o genoma)
- via acoplada à transcrição = *TCR* (reconhece e remove lesões apenas em genes ativos).

Nas células terminalmente diferenciadas a *GGR* está geralmente atenuada e os genes em transcrição (não apenas a cadeia transcrita, mas também a não transcrita) são eficazmente reparados pela *TCR*. A manutenção da reparação eficiente do genoma transcrito é essencial para a preservação da especificidade tecidual, sobretudo em células terminalmente diferenciadas que nunca sofrem divisão celular (Fortini; Dogliotti, 2010).

O *BER* é o principal mecanismo de reparação de lesões estruturais que não ocasionam distorção da dupla cadeia tais como bases oxidadas, resíduos alquil e locais abásicos. É uma via multienzimática com diversos passos sequenciais.

É a principal via envolvida na reparação de lesões oxidativas (Fortini; Dogliotti, 2010). Em doses moderadas os radicais livres de oxigénio funcionam como segundos mensageiros em vias de sinalização envolvidas no crescimento e diferenciação celulares, promovendo a diferenciação. A sua produção excessiva,



no entanto, ameaça seriamente a integridade celular, podendo levar a oxidação de diversos constituintes das células como lípidos, proteínas e ácidos nucleicos.

O *MMR* desempenha também um papel essencial nas células normais, nomeadamente nas células terminalmente diferenciadas. Estas não replicam o seu ADN mas mesmo assim podem ocorrer erros de emparelhamento por desaminação espontânea ou como consequência de tentativas de reparação do ADN por polimerases com maior risco de erro. Estes erros são corrigidos pelo sistema *MMR* que assim é essencial para manter a sua integridade genómica. Os neurónios, por exemplo, possuem um sistema *MMR* cuja atividade de reparação é intensa, idêntica à das células não diferenciadas (Fortini; Dogliotti, 2010).

#### 1.2.2.3 Desregulação da morte celular programada (apoptose e autofagia):

Em resposta a lesão irreparável do ADN, e dependendo do contexto celular, pode ocorrer morte celular programada ou apoptose. O evento crucial na apoptose é a ativação das proteases caspases. A lesão do ADN ativa a via intrínseca da apoptose, levando a libertação de citocromo c das mitocôndrias. Este liga-se à Apaf-1 que por sua vez induz a formação do complexo apoptossoma. Este complexo desencadeia a ativação da caspase 9 e depois das caspases a jusante, responsáveis pela morte celular.

A proteína p53 regula a libertação de citocromo c diretamente ou por indução da transcrição das proteínas Bcl2 (Bax, Puma e Noxa). As células terminalmente diferenciadas são caracterizadas pela resistência à apoptose, importante para assegurar a sua sobrevivência prolongada (Fortini; Dogliotti, 2010).

Outro processo regulado pela proteína p53 é a autofagia, uma via lisossómica de autodigestão celular. A autofagia desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase celular normal e ocorre a níveis basais na maior parte dos tecidos. A autofagia é outro tipo de morte celular programada que se verifica como resposta a vários tipos de stress como a lesão oxidativa por radicais livres de oxigénio (ROS) ou a exposição a agentes genotóxicos. Durante a autofagia, porções do citoplasma são encapsuladas numa dupla membrana

formando uma estrutura chamada autofagossoma. Os autofagossomas fundem-se com os lisossomas e o seu conteúdo é degradado pelas hidrólases lisossómicas.

A autofagia é um processo de controlo intracelular constitutivamente ativo em muitos tecidos. Um mediador importante da autofagia é a LC3, uma proteína *ubiquitina-like* ativada por diversas proteases (ATG4, ATG7, ATG3).

A proteína p53 é um regulador importante da autofagia basal e desencadeada por lesão do ADN. Actua como regulador negativo na ausência de stress (níveis basais de p53 inibem a autofagia). Em resposta a stress genotóxico a transdução de sinal entre o núcleo (onde ocorre a lesão) e o citoplasma (onde ocorre a autofagia) envolve a proteína p53 que neste caso estimula a autofagia por ativação da AMP cinase e inibição da serina/treonina cinase mTor ou por activação de inibidores da mTor (PTEN, TSC1) ou do gene de morte celular *DRAM* (Meijer; Codogno, 2009).

### **1.2.3 Interação entre eventos genotóxicos e não genotóxicos - modelos globais de carcinogenicidade:**

Classicamente a biologia do desenvolvimento tumoral é dividida em 3 processos, que abordaremos de seguida de forma simplificada (Pitot; Dragan, 1991):

- Iniciação:

Aparecimento de alterações genéticas irreversíveis transmissíveis às células filhas. Os agentes iniciadores ou seus metabolitos são mutagénicos para o ADN. Apesar da natureza irreversível das alterações, a lesão constituída por células iniciadas não progride necessariamente para neoplasia, podendo as células iniciadas serem removidas pelos mecanismos de defesa normais do organismo.

As células iniciadas são difíceis de distinguir fenotipicamente das células normais. As alterações genéticas presentes na fase de iniciação são subtis e muitas vezes não se associam a alterações cromossómicas óbvias e grosseiras;

correspondem geralmente à presença de mutações pontuais específicas induzidas pela presença de aductos resultantes da acção dos agentes químicos mutagénicos. Para funcionarem como iniciadoras do processo de carcinogénese estas mutações têm que ocorrer em genes específicos (proto-oncogenes e genes supressores tumorais).

- Promoção:

Fase associada a agentes que não interagem diretamente com o ADN e de natureza essencialmente reversível. A regressão de células iniciadas aquando da retirada dos agentes promotores pode ocorrer devido à acção dos mecanismos de defesa normais do organismo (ex: apoptose). As células em fase de promoção dependem assim da administração continuada do agente promotor.

Outro aspeto característico da promoção é ser suscetível de modulação por fatores fisiológicos como a dieta ou alterações hormonais. A relação dose-efeito dos agentes promotores tem uma forma sigmoide, com um limiar e um efeito máximo.

Os agentes promotores induzem o seu efeito pela sua capacidade de alterar a expressão genética que é sensível à acção de factores ambientais. A sua acção é mediada por interação com recetores localizados na superfície celular ou no citosol. Os recetores de membrana podem apresentar na sua porção intracelular um domínio com atividade tirosina proteína cinase ou múltiplos domínios transmembrana sendo a sinalização intracelular transduzida por proteínas G e nucleótidos cíclicos (ex: adenilciclase). Os recetores citossólicos interagem com o ligando (geralmente uma molécula lipossolúvel que se difundiu através da membrana celular). O complexo recetor-ligando entra para o núcleo e exerce a sua acção interagindo com sequências específicas de ADN (elementos de resposta). Em ambos os casos vão ser ativadas cascatas de proteínas cinases levando a alteração da transcrição genética ao nível do núcleo.

A necessidade de interação prévia com recetores explica a especificidade tecidual apresentada por diversos agentes promotores. Explica também a forma sigmoide da curva dose efeito. O efeito do agente é diretamente proporcional ao número de recetores ocupados pelo agente químico sendo o efeito máximo

atingido quando todos os recetores se encontram ocupados. A retirada do ligando reverte as alterações provocadas explicando a sua reversibilidade. Tal contrasta com a ação de tipo genotóxico dos agentes iniciadores que é considerada como um efeito sem limiar de dose e irreversível. Na progressão não existem alterações mutacionais ou estruturais do genoma, mas apenas uma alteração reversível da expressão genética.

- Progressão:

Corresponde à maior parte da vida biológica conhecida do tumor, caracterizada por instabilidade genómica e pelo acumular progressivo de lesões genéticas. Corresponde já a uma fase de irreversibilidade, não susceptível de ser detida pelas defesas naturais do organismo. As células são fenotipicamente anormais e podem expressar proteínas anormais, como por exemplo antigénios fetais ou hormonas ectópicas.

O aspecto molecular mais característico da progressão é a instabilidade cromossómica que se pensa ser um fenómeno secundário a determinados efeitos iniciadores (disrupção do aparelho mitótico; alteração da função dos telómeros; hipometilação global do ADN).

Em resumo:

- a iniciação resultará de mutações pontuais num ou mais genes controlando as vias reguladoras da célula;
- a promoção resultará do aumento seletivo da função de determinadas vias de transdução de sinal induzido nas células iniciadas e na sua descendência pela exposição contínua a um agente promotor;
- a progressão resultará da evolução contínua de células com instabilidade genómica de base.

Ao longo de todas estas etapas, as células neoplásicas são caracterizadas por diversos aspectos estruturais, moleculares e comportamentais que numa hipótese unificadora recentemente proposta se podem resumir a 6 alterações essenciais da fisiologia celular que, quando presentes simultaneamente conferem à célula o fenótipo maligno (Vineis; Schatzkin; Potter, 2010):

- auto-suficiência em relação aos estímulos normais de crescimento e proliferação;
- insensibilidade aos estímulos normais inibitórios do crescimento e proliferação;
- capacidade de se evadir à morte celular programada (apoptose);
- potencial replicativo ilimitado;
- angiogénese sustida;
- capacidade para invasão e metastização.

Vários modelos têm surgido ao longo dos anos para tentar explicar como os eventos genotóxicos e não genotóxicos anteriormente descritos interagem de forma a conferir às células estas características. Seguindo as sugestões dos mesmos autores (Vineis; Schatzkin; Potter, 2010), consideramos que estes modelos se podem enquadrar em 4 grandes categorias:

- Modelo mutacional:

O primeiro modelo que surgiu foi o modelo mutacional, muito influenciado por estudos conduzidos acerca dos mecanismos de carcinogénese do tabaco e alguns químicos ocupacionais como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) que formavam complexos ou aductos com o ADN, indutores de mutações.

Foi fortalecido pela descoberta de alguns modelos virais em que a mutação de um proto-oncogene celular resultava no aparecimento de um oncogene dominante com ação suficiente para causar por si só a transformação neoplásica.

Trata-se um modelo simplista (uma mutação crítica → desenvolvimento de cancro) mas ainda largamente usado.

- Modelo da instabilidade genómica:

Surgiu com base em duas linhas de investigação concorrentes. Uma delas foi a hipótese *two-hit* de Knudson, baseada no retinoblastoma familiar, e que resultou na descoberta dos genes supressores tumorais.

A segunda linha de investigação derivou das formas de cancro colo-retal familiar caracterizadas pela presença de instabilidade de microssatélites e causadas pela inativação de ambas as cópias dos genes de reparação do ADN por *mismatch repair* e foi fortalecida pela descoberta da responsabilidade da inativação dos genes *BRCA1*, também reguladores da reparação do ADN, no cancro da mama familiar.

Alterações em determinados genes reguladores da estabilidade cromossómica ou dos processos de reparação das lesões do ADN desencadeariam uma cascata de eventos que provocariam um aumento enorme do número de mutações e lesões genéticas a jusante (instabilidade genómica).

Trata-se de um modelo mais complexo, que prevê já a existência de múltiplas mutações na génese do cancro, embora esta resulte da inativação (por mutação ou outro mecanismo genético) de um único gene regulador.

- Modelo não genotóxico:

Trata-se de um modelo mais recente que dá ênfase aos eventos que, não sendo diretamente genotóxicos, podem modular e nalguns casos até causar o aparecimento de cancro. Estes eventos não provocam alterações estruturais ao nível do ADN, mas atuam sobre este por outros mecanismos (por exemplo, epigenéticos).

Para além dos eventos genéticos já conhecidos (mutações, instabilidade genómica), contempla a ação de diversos mecanismos não genéticos (seja de natureza epigenética seja relacionados com a reparação do ADN ou a regulação da morte celular) como parte integrante do mecanismo de desenvolvimento do cancro.

- Modelo Darwiniano:

Neste modelo é atribuído um papel chave à expansão clonal (seleção) de células portadoras de alterações que, em determinados ambientes, lhes conferem uma vantagem proliferativa e/ou de sobrevivência.

Coloca, portanto, uma importante ênfase no ambiente (macro e micro) que vai selecionar as células portadoras de algum tipo de vantagem para sofrerem expansão clonal.

Para além dos fatores celulares (genotóxicos e não genotóxicos) engloba fatores relacionados com o ambiente extra-celular procurando não apenas descrever as alterações fenotípicas presentes na célula neoplásica, mas também a razão pela qual elas são selecionadas e sobrevivem com vantagem sobre as células normais.

Estes modelos não são mutuamente exclusivos, antes complementares, apresentando aliás várias zonas de sobreposição.

O esquema clássico descrito da iniciação → promoção → progressão já referido (com as mutações representando os fenómenos iniciadores mais precoces e os estímulos conducentes à proliferação celular actuando como agentes promotores mais tardios) continua a ser bastante usado e a apresentar um elevado poder explicativo e preditivo e pode ser facilmente integrado nestes diversos modelos explicativos.

### **1.3 OS INDICADORES BIOLÓGICOS NO CANCRO OCUPACIONAL**

O cancro ocupacional apresenta algumas características próprias que o distinguem das restantes doenças profissionais e dificultam o reconhecimento da sua relação com exposições profissionais.

Existe um longo período de latência entre a exposição e as manifestações clínicas, que frequentemente só surgem após a cessação da atividade profissional.

Por outro lado, na esmagadora maioria dos casos (a única exceção sendo talvez a associação entre mesotelioma pleural ou peritoneal e exposição a asbestos) há uma ausência de especificidade do tumor, que é em tudo semelhante ao cancro não profissional correspondente.

Acrescem a estas dificuldades a natureza multifatorial do cancro, com um importante componente de suscetibilidade individual cujos factores determinantes se desconhecem, e a concorrência de múltiplos factores etiopatogénicos exógenos, profissionais e extraprofissionais (Uva, 1988).

Todas estas dificuldades inerentes ao reconhecimento de um caso de cancro como profissional, têm levado a que em Saúde Ocupacional se tenha atribuído uma importância preponderante à vigilância epidemiológica no âmbito da oncologia, através de estudos sobre a morbidade e mortalidade diferenciais por patologia neoplásica em função das profissões e atividades profissionais, conduzindo a que a caracterização da relação etiológica seja feita habitualmente numa fase tardia.

Tendo em conta que o cancro é, no momento do diagnóstico, irreversível e que a vigilância médica dos trabalhadores deverá ter como principal objectivo a identificação tão precoce quanto possível de efeitos reversíveis sobre a saúde, o recurso a indicadores biológicos, relacionados com o processo neoplásico, mas de desenvolvimento mais precoce e numa fase de reversibilidade, representa sem dúvida um método de eleição para a vigilância da saúde dos trabalhadores expostos a agentes cancerígenos.

Para além desta aplicação na vigilância da saúde, estes indicadores têm também um enorme potencial de aplicação no campo da epidemiologia do cancro profissional. A doença é o principal alvo de estudo da epidemiologia tradicional, mas a aplicação desta estratégia no caso do cancro profissional, caracterizado por um longo período de latência, pela irreversibilidade no momento do diagnóstico e pelo elevado grau de letalidade, leva a que os conhecimentos nesta área surjam numa fase tardia acarretando atrasos muitas vezes extremamente acentuados na implementação de medidas preventivas (Fenech, 2002b).

A epidemiologia tem, no entanto, uma larga tradição histórica de incorporar medições de valores biológicos nas suas avaliações, como por exemplo a utilização de anticorpos como indicadores de doenças infecciosas ou a medição dos lípidos séricos como indicadores de risco de doença cardiovascular. É, portanto, um passo lógico que progressivamente dados moleculares e genéticos



venham a ser incorporados como indicadores nos estudos epidemiológicos relativos ao cancro ocupacional.

Em 1982 Perera e Weinstein propuseram o termo epidemiologia molecular para designar o resultado da junção de conhecimentos e metodologias da área da biologia molecular e da área da epidemiologia, aplicadas ao estudo da etiologia e prevenção do cancro (Perera; Weinstein, 1982). A utilização crescente de indicadores biológicos originou o rápido desenvolvimento desta nova área de conhecimento, em que o alvo de estudo não é a doença propriamente dita, mas sim os indicadores biológicos com ela relacionados (Albertini et al., 1996).

Os indicadores biológicos podem definir-se genericamente como todas as substâncias, estruturas ou processos passíveis de ser quantificados no organismo ou nos seus meios biológicos e que influenciam ou predizem a incidência de um acontecimento ou doença (IPCS 2003, na tradução de Prista; Uva, 2006). Podem ser quantificados nos tecidos ou em fluidos biológicos e caracterizam a exposição, o efeito biológico da exposição ou a suscetibilidade genética para o desenvolvimento de doença. Podem ser agentes exógenos (por exemplo, químicos ou seus metabolitos) ou representar alterações de substâncias endógenas que surgem como resultado da exposição a factores extrínsecos ao organismo. Podem ser utilizados na vigilância da saúde ou na avaliação precoce dos processos conducentes ao desenvolvimento de patologia em diversas exposições ocupacionais.

Na área do cancro tem-se assistido nas últimas décadas a uma verdadeira explosão de aplicações dos diversos tipos de indicadores biológicos, o que conduziu a rápidos e importantes avanços nesta área do conhecimento, impossíveis apenas com recurso aos estudos de base epidemiológica.

O cancro resulta, pensa-se, de múltiplos eventos genéticos sequenciais ocorrendo numa única célula ou num pequeno número de células iniciadas. No caso do cancro de natureza ocupacional, estes eventos são provocados pela exposição a agentes cancerígenos genotóxicos presentes no ambiente de trabalho. Mesmo os agentes não genotóxicos atuam aumentando a frequência de eventos genéticos espontâneos ou interferindo com a sua reparação. Como tal, as alterações genotóxicas são larga e crescentemente utilizadas como

marcadores intermédios do risco de cancro, com os objectivos de diagnóstico precoce e/ou prevenção e constituem os indicadores biológicos utilizados pela epidemiologia molecular oncológica.

Esta utilização baseia-se no modelo de cancro como resultado de um acumular progressivo de alterações genéticas envolvendo eventos moleculares mensuráveis que podem ser usados como indicadores biológicos, modelo este que tem sido confirmado por diversas evidências experimentais e epidemiológicas (Vineis; Perera, 2007).

De acordo com o International Program on Chemical Safety da OMS (IPCS 2000a) podemos considerar que existem três grandes classes de indicadores biológicos:

- Indicador biológico de dose: substância exógena ou seu metabolito ou o produto da interação entre um xenobiótico e uma molécula-alvo ou célula que é medido num compartimento orgânico;
- Indicador biológico de efeito: alteração bioquímica, fisiológica, comportamental ou de outra natureza, quantificável, que, dependendo da magnitude, pode ser reconhecida como associada a uma possível alteração de saúde ou doença;
- Indicador biológico de suscetibilidade: indica uma capacidade inata ou adquirida de um organismo para responder ao impacto da exposição a uma substância xenobiótica.

O conceito de indicador biológico de suscetibilidade não levanta grandes dúvidas e a sua aplicação é consensual na literatura e nos diversos estudos publicados, embora tenha em Saúde Ocupacional uma utilização bastante reduzida e limitada a estudos científicos sobre os mecanismos de ação dos agentes químicos.

Já as definições de indicador biológico de dose e indicador biológico de efeito têm sido interpretadas de diversas formas por diferentes autores, criando alguma confusão terminológica. Tal confusão reduz-se se considerarmos que estas definições têm mais a ver com o tipo de informação que podemos recolher de um determinado indicador do que com a natureza do indicador *per si*.

Efetivamente, o mesmo indicador pode dar simultaneamente informação sobre a dose e refletir um efeito, o que tem contribuído para muita da discordância relativa à categoria em que determinado indicador se deve enquadrar. Se em vez de considerarmos o indicador em si considerarmos o tipo de informação que dele podemos extrair e classificarmos não o indicador, mas o tipo de informação obtido, grande parte da confusão desvanece-se e as definições adoptadas pelo IPCS tornam-se claras e são suficientemente flexíveis para acomodar sem dificuldade todo o tipo de informação fornecida pelos indicadores biológicos.

A este propósito, Perera e Weinstein, de forma muito coerente com a sucessão de eventos biológicos que acaba, no final, por poder ocasionar um efeito adverso para a saúde, distinguem dois tipos de indicadores de dose:

- os indicadores de dose interna (agentes químicos e seus metabolitos), que não dão informação sobre a interação do agente com alvos celulares críticos;
- os indicadores de dose molecular ou bioquímica, que medem a dose biológica efetiva, ou seja, a quantidade de agente presente no organismo que efetivamente reage com macromoléculas celulares críticas como o ADN (Perera; Weinstein, 2000).

Este conceito de indicador de dose biológica efetiva pode ser estendido a todos os indicadores que resultam da reação do agente com macromoléculas endógenas que, embora não envolvidas no efeito biológico do agente químico, dele podem ser consideradas indicativas (caso da hemoglobina e da albumina, por exemplo).

Juntando estes conceitos com as definições do IPCS (entendidas como relativas ao tipo de informação obtida a partir do indicador e não como definições rígidas e estanques do indicador em si) podemos considerar que existem, fora os de suscetibilidade, três grandes categorias de indicadores biológicos:

- Os indicadores de dose interna, correspondentes à medição do próprio agente químico ou de metabolitos dele derivados. Exemplos: doseamento da ciclofosmida urinária ou da  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanina urinária, um metabolito do 5-fluoruracilo (dois agentes citostáticos).

- Os indicadores de efeito bioquímico ou de dose biológica efetiva, correspondentes à quantificação do resultado da interação entre o agente químico ou seus metabolitos e macromoléculas endógenas, directamente relacionadas com o efeito em estudo ou dele indicativas. Exemplo: doseamento de aductos proteicos com o ADN ou com proteínas como a albumina ou a hemoglobina.
- Os indicadores de efeito biológico, correspondentes a qualquer alteração fisiológica, comportamental ou de outra natureza que não puramente bioquímica, quantificável, que, dependendo da magnitude, pode ser reconhecida como associada a uma possível alteração de saúde ou doença. Exemplos: estudo de aberrações cromossómicas ou da frequência de células micronucleadas em linfócitos do sangue periférico. Esta definição implica necessariamente, de modo a que o indicador seja utilizável no âmbito da Saúde Ocupacional, que a informação obtida reflita uma fase pré-patológica e potencialmente reversível caso cesse a exposição. Esta reversibilidade não obriga, no entanto, a que o evento biológico em si seja reversível, mas sim que o seu efeito sobre o organismo possa ser revertido, por exemplo por acção dos mecanismos de defesa e reparação endógenos, uma vez cessada a exposição causal.

Para além destas questões de terminologia, a aplicação dos indicadores biológicos na área do cancro ocupacional, levanta questões muito próprias e particulares relacionadas com a sensibilidade e especificidade do indicador.

A sensibilidade do indicador utilizado deve ser adequada a detetar os ligeiros aumentos de genotoxicidade resultantes da exposição ocupacional a agentes genotóxicos, que caracteristicamente ocorre em baixas doses e durante períodos prolongados de tempo.

Por outro lado, os eventos genotóxicos são fenómenos ubiqüitários no nosso organismo, resultantes tanto de causas endógenas como exógenas, ambientais, de natureza não ocupacional. A especificidade do indicador, ou melhor, as limitações inerentes à especificidade deste tipo de indicadores, são, portanto, fatores cruciais a ter em conta: os fenómenos genotóxicos são, com raras exceções, eventos inespecíficos que podem estar relacionados com uma

multiplicidade de factores tanto endógenos como exógenos. Atribuir os dados obtidos utilizando um determinado indicador de genotoxicidade a uma exposição específica é sempre uma tarefa difícil e que deve ser feita com precaução.

Outra questão crítica na utilização deste tipo de indicadores é a relevância do tecido usado para medir os indicadores (geralmente um tecido facilmente acessível, como o sangue periférico) face ao tecido alvo do agente carcinogénico em estudo (Fenech, 2002b). É habitualmente assumido que a lesão genética detectada em células do sangue periférico como os linfócitos, que circulam por todo o organismo, reflete um grau similar de lesão nas células do tecido alvo que sofre o risco de carcinogénese (Boffetta et al., 2007), mas tal não está completamente comprovado. O ideal seria medir o grau de lesão genética nas células do tecido em risco de sofrer carcinogénese, mas tal é na maior parte dos casos de difícil implementação prática.

O passo crítico na indução de cancro por agentes químicos é como vimos a interação covalente entre o agente ou um seu metabolito e macromoléculas endógenas (Pitot; Dragan, 2001). A partir daqui desencadeia-se uma série de efeitos bioquímicos e biológicos, cujo resultado final será o desenvolvimento da neoplasia. Com base nesta sequência de eventos, que se pensa que seja comum a todos os agentes químicos carcinogénicos, foram desenvolvidos uma série de indicadores biológicos de genotoxicidade que se passarão a descrever brevemente, de acordo com a classificação e enquadramento que definimos e defendemos.

### **1.3.1 Indicadores de dose interna:**

Trata-se aqui da medição direta do agente químico ou dum metabolito dele derivado num compartimento biológico, geralmente sangue ou urina. Fornece informação sobre a quantidade de agente químico que foi efetivamente absorvida pelo organismo e se encontra disponível para exercer os seus efeitos, sejam de natureza bioquímica sejam de natureza biológica.

Como exemplos temos a medição direta de agentes citostáticos na urina (ciclofosfamida, ifosfamida, metotrexato, paclitaxel, entre outros) ou a medição também na urina de metabolitos deles derivados (metabolito  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanina, derivado da biotransformação do citostático 5-fluoruracilo).

### **1.3.2 Indicadores de dose bioquímica ou dose biológica efetiva:**

Representam, como referido, a quantidade de agente que reage com macromoléculas celulares críticas como o ADN ou outras macromoléculas endógenas indicativas como a albumina e a hemoglobina, originando a formação de aductos (Perera; Weinstein, 2000).

Os aductos macromoleculares resultam da ligação covalente do carcinogénio químico ou de um seu metabolito a macromoléculas endógenas, sendo os exemplos mais estudados os aductos carcinogénio-proteína e carcinogénio-ADN. São alterações reversíveis, uma vez que o organismo possui diversos sistemas enzimáticos capazes de reconhecer a sua presença e proceder à sua remoção. A sua presença depende assim não apenas da exposição, mas também da capacidade endógena de reparação do ADN e das proteínas. A sua persistência é considerada um indicador precoce do processo de carcinogénese, podendo os aductos ser inespecíficos ou carcinogénio-específicos (Angerer; Ewers; Wilhelm, 2007).

#### **1.3.2.1 Aductos proteicos:**

São entidades químicas ligadas de forma covalente a proteínas endógenas. As proteínas mais estudadas são a hemoglobina (que tem semivida de 120 dias) e a albumina (que tem semivida de 28 dias).

A sua existência indica que o agente se ligou a moléculas endógenas, podendo, portanto, potencialmente exercer o seu efeito carcinogénico. A existência de aductos com a hemoglobina, em particular, indica que a molécula reativa foi capaz de atravessar membranas celulares e apresenta estabilidade suficiente para interagir com o seu alvo final, o ADN. Como tal, os aductos de hemoglobina

são considerados como indicativos da formação de aductos de ADN, o passo inicial da maior parte dos casos de carcinogénese química (Angerer; Ewers; Wilhelm, 2007).

Estes aductos não são, no entanto, indicadores diretos de genotoxicidade dado as proteínas indicadoras estudadas não estarem regra geral envolvidas no processo de carcinogénese. Os aductos de hemoglobina foram usados em estudos populacionais como indicadores indiretos de genotoxicidade para agentes químicos carcinogénicos como o óxido de etileno (Angerer; Bader; Krämer 1998), a acrilamida (Hagmar et al., 2005), a anilina (Bergmark, 1997) e o estireno (Vodicka et al., 2003) entre outros.

Dado o tempo de semivida das moléculas em causa, sobretudo da hemoglobina, podem ser usados como indicadores de exposições prolongadas ou repetidas, ao contrário do que sucede, como veremos, com os aductos de ADN.

#### 1.3.2.2 Aductos de ADN:

São entidades químicas ligadas de forma covalente ao ADN. Grande número de carcinogénios químicos ou seus metabolitos têm propriedades electrofílicas e, portanto, apresentam afinidade para o núcleo, de carga negativa, exercendo o seu efeito biológico ao ligar-se de forma covalente ao ADN e induzir alterações ao nível deste. A presença destes agentes químicos vai levar a que ocorram erros durante a replicação, podendo ocasionar o aparecimento de mutações e de outros tipos de dano genético.

Para estudar estes aductos, o ADN pode ser isolado a partir de linfócitos periféricos, sangue total ou tecido. A formação de aductos de ADN é considerada o passo inicial da maior parte dos casos de carcinogénese química. Das substâncias químicas classificadas como carcinogénicas para o Homem pela IARC, estima-se que 90% exerça o seu efeito biológico através da formação de aductos de ADN (Arlt; Frei; Schmeiser, 2007). A presença destes aductos demonstra que o agente carcinogénico atingiu a sua molécula-alvo última, o ADN.

Os aductos podem ser específicos ou inespecíficos e podem ser medidos por diversas técnicas, sendo que as de base imunológica são as mais sensíveis e as mais específicas, embora tenham a desvantagem de exigir o conhecimento prévio do aducto a estudar (Albertini; Nicklas; O'Neill, 1996).

Em alternativa a estas técnicas de medição directa, podem ser também medidos na urina metabolitos resultantes do processamento dos aductos, técnica de muito menor especificidade uma vez que os mesmos metabolitos podem, regra geral, ser produzidos por processos endógenos.

A medição de aductos do ADN informa sobre a dose biológica efetiva e incorpora já as diferenças individuais na absorção, distribuição e biotransformação, bem como os mecanismos de defesa endógenos capazes de os remover.

Devido ao facto de existirem mecanismos de reparação, bem como renovação tecidual, os níveis de aductos de ADN refletem a exposição recente, durante os últimos meses, e não a exposição mais distante no passado (Perera; Weinstein, 2000).

Diversos estudos avaliaram a presença de aductos de ADN em trabalhadores expostos a agentes químicos genotóxicos, incluindo por exemplo o estireno (Vodicka et al., 2003), agentes químicos na indústria da borracha (Talaska et al., 2011) e os pesticidas (Gómez-Martins et al., 2012).

A presença de determinado tipo de aductos de ADN parece, pelo menos em termos teóricos, ser um fenómeno relevante para a carcinogénese. E efetivamente temos como exemplos a demonstração da presença de aductos ADN-aflatoxina em células alvo de carcinoma hepatocelular associado a este agente químico (Chen et al., 2002) e a ligação preferencial do benzopireno a um segmento de ADN que corresponde a um *hot spot* mutacional do gene *p53* (Denissenko et al., 1996).

Não existe, no entanto, por enquanto, demonstração da associação entre aductos de ADN e efeitos para a saúde, neste caso risco aumentado de cancro. Diversos estudos prospectivos não conseguiram demonstrar esta associação de forma convincente, razão pela qual os aductos de ADN não devem ser



considerados indicadores de risco para a saúde embora sejam excelentes indicadores da dose biológica efetiva (Au, 2007).

### **1.3.3 Indicadores de efeito biológico**

De acordo com a definição do IPCS, serão alterações quantificáveis, que, dependendo da magnitude, possam ser reconhecidas como associadas a uma possível alteração de saúde ou doença.

A maior parte dos indicadores de efeito biológico no caso do cancro profissional são alterações do genoma, geralmente inespecíficas (aberrações cromossómicas, troca de cromátides irmãs, aumento da frequência de micronúcleos). Raramente podem ser detectadas alterações carcinogénio-específicas, como por exemplo a transversão G:C→T:A no codão 249 do gene *p53* característica do carcinoma hepatocelular associado à aflatoxina B.

Como regra geral, portanto, estes indicadores detetam exposições relacionadas com uma multiplicidade de agentes genotóxicos, sendo difícil atribuir as alterações a um agente em particular.

Au sugere classificar estes indicadores em 2 subtipos: indicadores de efeitos biológicos precoces e indicadores de risco de saúde (Au, 2007). Distingue estas duas categorias com base em pressupostos teóricos de que algumas alterações podem não ter impacto final no processo de carcinogénese por representarem alterações biológicas toleráveis ou representarem fenómenos reversíveis, enquanto outras serão mais relevantes por representarem alterações irreversíveis que podem teoricamente levar ao desenvolvimento de cancro. Na nossa perspetiva o termo "indicador de risco de saúde" deve ser reservado para o pequeno número de indicadores que mostrou efetivamente em estudos prospetivos associar-se a um risco aumentado de cancro.

Neste caso específico estamos a falar de indicadores de genotoxicidade e cancro, pelo que o efeito para a saúde relevante será o aumento de risco de cancro humano adequadamente demonstrado por estudos científicos de natureza epidemiológica.

A mesma noção, no entanto, pode ser transposta para outros indicadores biológicos não relacionados com genotoxicidade e outros efeitos sobre a saúde que não o cancro: um indicador de efeito biológico poderá ser considerado um indicador de risco de saúde quando estudos científicos adequados tiverem demonstrado uma associação entre a sua presença e a ocorrência de determinado efeito sobre a saúde.

É essencial que haja esta demonstração ao nível populacional para que possa ser defendida em Saúde Pública a implementação de medidas preventivas.

Como tal ao descrever brevemente os indicadores de efeito biológico mais utilizados, procuraremos tecer no final breves considerações sobre o que existe de demonstrado relativamente ao seu impacto em termos de risco para a saúde.

#### 1.3.3.1 Deteção de mutações:

Diversos agentes químicos carcinogénicos levam ao aparecimento de mutações ao nível do ADN, pelo que é natural que estas tenham sido estudadas como indicadores biológicos de genotoxicidade na carcinogénese química. Podem ser estudadas mutações específicas, mas mais frequentemente, são estudadas mutações em “genes repórter”.

Estes são genes utilizados para caracterizar e quantificar eventos mutacionais, mas que não apresentam relevância em processos patológicos *in vivo*. O teste usando o gene repórter *HPRT* (*Hypoxantin-guanin Phospho Ribosil Transferase*) em linfócitos do sangue periférico é considerado atualmente pelo IPCS como o único teste mutacional suficientemente padronizado para ser usado como indicador biológico (Albertini; Anderson; Douglas, 2000).

O gene *HPRT* codifica a enzima hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase, envolvida no metabolismo das purinas. Adicionalmente esta enzima catalisa a conversão de análogos das purinas como a 6-tioguanina em compostos citotóxicos. Quando ocorre mutação neste gene, as células mutantes são deficientes na atividade da enzima e assim sobrevivem quando expostas à 6-tioguanina. O teste HPRT mais usado identifica a presença de mutações com

base no fenótipo expresso pelas células quando expostas a 6-tioguanina. Um aumento na frequência de células deficientes em HPRT por comparação com um controlo adequado indica a presença de um efeito mutagénico.

Um aspecto importante a ser esclarecido quando se utilizam genes repórter, é se os eventos mutacionais que estão a ser detectados ao nível destes genes traduzirão mecanismos provavelmente conducentes a mutações patogénicas nos genes alvo. Permanece ainda por determinar se a demonstração de mutações usando genes repórter é representativa de mutações de interesse patogénico conhecido em genes alvo específicos envolvidos nos processos de carcinogénese. Embora tenham indiscutível interesse como indicadores de efeito biológico precoce, a sua relevância como factores preditivos do risco de cancro continua por estabelecer (Au, 2007).

#### 1.3.3.2 Aberrações cromossómicas:

Este termo designa quer alterações numéricas quer alterações estruturais dos cromossomas. São avaliadas em linfócitos de sangue periférico, após cultura, paragem em metafase e coloração, classicamente pelo método de Giemsa.

Os linfócitos do sangue periférico são as células mais utilizadas porque são de recolha fácil, apresentam um tempo de semivida razoável e circulam por todo o corpo, pelo que teoricamente acumularão lesões genéticas ao passar pelos tecidos alvo dos diversos agentes genotóxicos.

O recurso a técnicas de hibridização *in situ* usando anticorpos marcados por fluorescência e sondas cromossómicas específicas (*Fluorescence In Situ Hybridization - FISH*), proporciona não apenas uma maior sensibilidade na detecção de aberrações, permitindo detectar alterações subtis não visíveis pela técnica de bandas G, mas também consegue verificar quais os cromossomas ou fragmentos cromossómicos envolvidos nas aberrações.

Com base no seu aspecto morfológico e no mecanismo subjacente, as aberrações cromossómicas podem ser classificadas em dois grandes grupos (Mateuca; Kirsch-Volders, 2011):

- Aberrações de tipo cromossómico, que envolvem o mesmo *locus* em ambas as cromátides irmãs de um ou mais cromossomas. Reflectem quebras da cadeia dupla do ADN ocorrendo em linfócitos em repouso (fase G0-G1). Durante a fase de replicação, a duplicação cromossómica transforma estas quebras em lesões simétricas das duas cromátides filhas. Este tipo de lesão é produzido, por exemplo, pela exposição a radiações ionizantes; mais raramente, alguns tipos de agentes químicos podem também originá-la.
- Aberrações de tipo cromatídico, que afectam apenas uma das cromátides irmãs de um ou mais cromossomas. Podem ser causadas por diversos tipos de lesão do ADN (alterações de bases, ligações cruzadas, quebras de cadeia única) associadas a agentes que atuam na fase S, como sucede com a maioria dos agentes químicos.

Um exemplo clássico da aplicação do estudo das aberrações cromossómicas ao cancro ocupacional é o caso do benzeno: Zhang e colaboradores descrevem aberrações cromossómicas específicas não apenas em trabalhadores com leucemia e pré-leucemia, mas também em trabalhadores expostos a benzeno e aparentemente saudáveis (Zhang et al., 2005).

Trata-se sem dúvida do indicador biológico mais largamente estudado e mais validado em populações expostas a agentes genotóxicos (Albertini; Anderson; Douglas, 2000; Boffetta et al., 2007). A sua associação com um risco aumentado de cancro foi demonstrada por vários estudos prospectivos independentes publicados nas últimas duas décadas (Brogger et al., 1990; Hagmar et al., 1994, Bonassi et al., 2000; Hagmar et al., 2004; Boffetta et al., 2007).

Apesar da excelente sensibilidade e do valor preditivo demonstrado relativamente ao risco de cancro, as aberrações cromossómicas são um indicador biológico cuja medição é morosa, cara, tecnicamente difícil e exige quantidades relativamente grandes de material biológico, pelo que a sua aplicação alargada em contexto ocupacional se tem revelado difícil. Por este motivo, têm sido desenvolvidos e progressivamente testados em contexto ocupacional alguns indicadores alternativos, dos quais se referem de seguida os mais relevantes.

### 1.3.3.3 Teste de micronúcleos:

Os micronúcleos são pequenas colecções de material nuclear rodeadas de membrana que se separam do núcleo principal durante a divisão celular e permanecem no citoplasma. A formação de micronúcleos pode resultar quer de quebras cromossómicas (clastogénese) quer de deficiente segregação cromossómica por disfunção do fuso mitótico (aneugénese). Consequentemente, o conteúdo dos micronúcleos pode corresponder quer a fragmentos cromossómicos acêntricos quer a cromossomas inteiros, com centrómero, respetivamente (Norppa; Falck, 2003)

O teste mais utilizado para a detecção de micronúcleos baseia-se na estimulação de células em cultura (geralmente linfócitos do sangue periférico) na presença de um agente químico que inibe a divisão celular, mas permite a divisão nuclear (*Cytokinesis Block Micronuclei test* ou *CBMN*). Os micronúcleos são contados nas células binucleadas formadas, sendo a sua frequência expressa como número de micronúcleos por cada 1000 células binucleadas (Fenech, 2002a; Norppa; Falck, 2003).

Tal como foi referido, o teste de micronúcleos permite detectar dois tipos diferentes de lesão genética, que podem ser distinguidos executando concomitantemente *FISH* com sondas pancentroméricas:

- Fragmentação cromossómica resultante da acção de agentes clastogénicos. Os fragmentos cromossómicos acêntricos que se originam não podem ser incorporados no núcleo principal após a divisão celular pelo que permanecem no citoplasma como micronúcleos cujo conteúdo é centrómero-negativo;
- Anomalias da segregação e migração dos cromossomas durante a mitose, resultantes da acção de agentes aneugénicos. Estas anomalias associam-se a alterações no número de cromossomas das células filhas (aneuploidia) e originam micronúcleos de conteúdo centrómero-positivo.

A execução simultânea de *FISH* com *CBMN* permite ainda verificar quais os cromossomas ou fragmentos cromossómicos específicos presentes nos micronúcleos. Tal revelou-se importante, por exemplo, na compreensão dos

mecanismos subjacentes à diferença na frequência de micronúcleos que se verifica entre os sexos. As mulheres têm frequência basal de micronúcleos superior aos homens; o recurso a *FISH* com sondas dirigidas contra os cromossomas sexuais revelou que esta diferença é devida à presença nas mulheres de micronúcleos centrómero-positivos contendo cromossomas X.

De modo semelhante, verificou-se que o aumento de micronúcleos que ocorre com a idade é devido, em ambos os sexos, à frequência aumentada de micronúcleos contendo cromossomas sexuais, X na mulher e Y no homem (Norppa; Falck, 2003).

Para além do sexo e idade, a frequência basal de micronúcleos é influenciada também pelos níveis séricos de folato e vitamina B12 e, nalguns estudos, pelo índice de massa corporal e pelo nível e tipo de actividade física (Battershill; Burnett; Bull, 2008).

O *CBMN* é um teste rápido, de fácil execução e interpretação, que requer pouca quantidade de material biológico e que pode ser aplicado a quase todos os tipos de células. O grande número de células analisado (1000 a 2000 por amostra) confere-lhe adicionalmente um elevado poder estatístico (Pedersen-Bjegaard et al., 2002).

Apesar de ser um indicador biológico mais recente que as aberrações cromossómicas, várias linhas de evidência suportam que existe associação entre a frequência de micronúcleos em linfócitos do sangue periférico e o risco de cancro.

Foi descrita uma frequência aumentada deste indicador biológico em portadores de síndromes genéticas de cancro (Rosin; German, 1985), na maior parte das células neoplásicas de diversos tipos de tumores malignos (Gisselson et al., 2001) e em linfócitos do sangue periférico de indivíduos com cancro (Duffaud et al., 1997; Acar et al., 2001; Elsendoorn et al., 2001; Torres-Bugarin et al., 2003; Padjas et al., 2005).

Os primeiros estudos prospectivos suportando esta associação, entre frequência elevada de micronúcleos em linfócitos do sangue periférico e risco de cancro,

foram publicados recentemente pelo grupo de Bonassi e colaboradores (Bonassi et al., 2007; Murgia et al, 2008).

#### 1.3.3.4 Troca de cromátides irmãs (*Sister Chromatid Exchange – SCE*)

A troca de cromátides irmãs consiste na permuta simétrica de produtos da replicação do ADN entre as duas cromátides irmãs num determinado *locus* genético. Não ocasionam qualquer alteração no número ou estrutura dos cromossomas. Podem ser visualizadas em cultura de células quando a divisão celular é induzida na presença de 5-bromodeoxiuridina (5-BRDU), um nucleósido sintético análogo da timidina que é incorporado no ADN replicante em vez desta e pode ser posteriormente detetado usando anticorpos específicos.

Foi sugerido que a frequência de *SCE* constitui um marcador muito sensível, capaz de detectar efeitos genotóxicos a concentrações menores do que as necessárias para levar ao aparecimento de aberrações cromossómicas (Chia; Lee, 2001). O conceito de *High Frequency Cells (HFC)* foi introduzido com o objectivo de aumentar ainda mais a sensibilidade deste teste: em vez de ser valorizada a frequência global de *SCE*, apenas a percentagem de células com *SCE* acima do percentil 95 (as *HFC*) é contabilizada. Estas células representariam um subgrupo de linfócitos de vida prolongada que teriam acumulado várias lesões genéticas indutoras de *SCE* ao longo do tempo (Testa et al., 2007).

Existe um elevado grau de incerteza quanto ao significado do aumento da frequência de *SCE*. Por um lado, o mecanismo biológico subjacente a este fenómeno foi durante muito tempo desconhecido; por outro, o valor preditivo de uma frequência aumentada de *SCE* relativamente ao risco de cancro não foi ainda estabelecido.

Dados preliminares divulgados pelo Grupo de Estudo Nórdico revelaram ausência de correlação entre a frequência de *SCE* e a incidência de cancro (Brogger et al., 1990; Hagmar et al, 1994).

Estes resultados foram subsequentemente confirmados pelo Estudo Cooperativo da Europa Central (Hagmar et al, 1998) e mais recentemente por

um estudo específico conduzido por Bonassi e colaboradores (Bonassi et al, 2004). Trata-se de um estudo prospectivo de coorte incluindo 1621 indivíduos testados entre 1991 e 1993 onde foram analisadas não apenas a frequência global de SCE como a frequência de HFC. Não foi encontrada nenhuma associação entre níveis aumentados destes dois parâmetros e risco de cancro.

A utilização das SCE como indicador biológico tem, portanto, vindo a decrescer em favor de métodos mais recentes e prometedores como o já descrito teste de micronúcleos.

#### 1.3.3.5 Teste do cometa (Comet assay ou Single Cell Gel Electrophoresis SCGE):

Neste teste uma suspensão de células isoladas é suspensa em gel de agarose e submetida a lise, com o objectivo de libertar o seu conteúdo de ADN. De seguida procede-se a electroforese em condições alcalinas e o produto resultante é visualizado ao microscópio após coloração com um reagente fluorescente.

As células com ADN lesado (fragmentado) apresentam uma maior migração do produto de lise, adquirindo um aspecto semelhante a um cometa com uma cauda cuja dimensão e intensidade de coloração são diretamente proporcionais ao grau de lesão do ADN da célula correspondente.

Este teste permite detectar uma mistura de vários tipos de lesão do ADN, incluindo quebras primárias na cadeia, locais alcali-lábeis (quebras secundárias geradas pelo meio alcalino da electroforese) e locais de reparação incompleta pelo sistema de reparação do ADN por excisão de bases (BER). Para uma avaliação correta e representativa devem ser analisadas pelo menos 100 células por indivíduo (Moller et al., 2000).

Existem diversos sistemas que permitem graduar a intensidade da lesão do ADN detectada por este teste e que incluem quer scores visuais quer parâmetros quantitativos como o comprimento da cauda, a percentagem de ADN migrado (fração do ADN total presente na cauda) e o momento da cauda – *tail moment* -



comprimento da cauda vezes percentagem de ADN migrado (Albertini; Anderson; Douglas, 2000).

O teste do cometa apresenta diversas vantagens: tem elevada sensibilidade para a detecção de baixos níveis de lesão do ADN, exige apenas um pequeno número de células viáveis por amostra, tem custo relativamente baixo e é de rápida execução e simples interpretação, podendo ser efetuado em vários tipos de células e tecidos (Moller et al., 2000; Brendler-Schwaab et al., 2005).

A sua interpretação deve, no entanto, ser feita com alguma precaução. A lesão do ADN detetada por este teste pode representar quer a ação de agentes genotóxicos quer a degradação que ocorre como consequência de processos de morte celular como a necrose e a apoptose resultantes da ação de agentes citotóxicos (Anderson; Plewa, 1998). É expectável que a frequência deste tipo de eventos seja muito baixa em linfócitos do sangue periférico, mas tal não se aplica a células com diferenciação terminal como por exemplo as células bucais exfoliadas, em que são um fenómeno frequente (Albertini; Anderson; Douglas, 2000). Neste último caso deve ser utilizado concomitantemente um corante vital que garanta que a amostra tem uma percentagem de células viáveis suficiente para excluir um resultado falsamente positivo (Anderson; Plewa 1998).

As quebras de cadeia detectadas pelo teste do cometa podem não corresponder a efeitos diretos de genotoxicidade, mas antes a respostas normais da célula perante uma agressão do ADN, quer sob a forma de apoptose quer sob a forma de mecanismos de reparação do ADN.

Adicionalmente, os agentes genotóxicos que atuam originando a formação de ligações cruzadas ao nível do ADN (como a maior parte dos agentes alquilantes) retardam a migração do ADN e podem originar resultados falsamente negativos neste teste (Albertini; Anderson; Douglas, 2000)

O significado a longo prazo da lesão do ADN detectada pelo teste do cometa é ainda incerto. Existe evidência de que a maior parte das lesões detectadas pode ser corretamente reparada pela célula e não ocasiona, portanto, alterações genéticas permanentes. Esta natureza transitória das lesões leva a que a altura escolhida para a colheita do material biológico a estudar adquira uma grande

importância: as lesões de reparação mais rápida, como por exemplo quebras de cadeia única do ADN, podem ser reparadas se o tempo que medeia entre a exposição e a colheita for superior a algumas horas (2 a 6) (Brendler-Schwaab et al., 2005).

No estado atual dos conhecimentos há quem defenda, como Moller que este teste deve ser usado apenas como indicativo de exposição recente a agentes genotóxicos e constitui na realidade mais um indicador de dose bioquímica do que um indicador de efeito biológico (Moller, 2006), traduzindo o resultado duma interação bioquímica reversível entre o agente e a sua molécula alvo: o ADN. Dada a incerteza ainda existente quando ao significado a longo prazo deste tipo de lesão, optámos por mantê-lo nos indicadores de efeito biológico dado em nossa opinião traduzir mais do que uma simples interação bioquímica, embora se deva ter a noção de que é uma alteração reversível, indicativa apenas de exposição recente, e cujo significado em termos de risco de efeitos adversos para a saúde é ainda desconhecido.

## **1.4 A EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A AGENTES CITOSTÁTICOS**

### **1.4.1 Os citostáticos como agentes genotóxicos e cancerígenos**

Os citostáticos são fármacos com utilização crescente, quer na terapêutica de doenças malignas quer num espectro crescente de doenças benignas, que incluem por exemplo doenças auto-imunes e doenças inflamatórias crónicas do foro gastroenterológico ou reumatológico, entre outras.

Como tal existe um número substancial de profissionais de saúde que se encontram de forma diária e regular expostos, por inerência da sua atividade ocupacional, a estes agentes químicos.

Como parte do seu mecanismo de ação praticamente todos estes fármacos lesam, de forma direta ou indireta, o genoma humano. Embora as células neoplásicas sejam mais sensíveis a este efeito, o que constitui a base da sua

utilização terapêutica em oncologia, as células normais são também afetadas, facto atestado pelos efeitos secundários bem conhecidos sofridos, em maior ou menor grau, pelos doentes submetidos a quimioterapia.

É a capacidade para afectar o genoma das células normais (genotoxicidade) que está na base dos seus potenciais efeitos adversos para os trabalhadores a eles expostos.

Esta genotoxicidade tem sido evidenciada por múltiplos estudos experimentais *in vitro* utilizando diversos tipos de células, quer animais (Boos; Stopper, 2000), quer humanas (Aydemir; Celikler; Bilaloglu 2005) e também *in vivo*, em modelos de ratinho (Aydemir; Bilaloglu, 2003; Choudhury; Palo; Padhy, 2004; Marchetti et al., 2006).

Adicionalmente, existem estudos conduzidos em doentes com cancro tratados com quimioterapia, demonstrando também a sua genotoxicidade para o Homem (Acar et al., 2001; Elsendoom et al., 2001; Torres-Bugarin et al., 2003; Padjas et al., 2005; Kopjar et al., 2006).

Para além destes estudos, para diversos citostáticos a IARC considera que existe evidência suficiente de que são carcinogénicos ou provavelmente carcinogénicos para o Homem, com base na incidência aumentada de cancro em doentes tratados (Quadro 2).

<b>Quadro 2 – Fármacos citostáticos classificados pela IARC quanto à sua carcinogenicidade (vols 1-100, revisto em Agosto de 2010)</b>			
<b>Fármaco</b>	<b>Classif IARC</b>	<b>Referência</b>	<b>Tumores (Grupo 1)</b>
Actinomicina D	3	Vol 10 (1987)	
Doxorrubicina	2A	Vol 10 (1987)	
Amsacrina	2B	Vol 76 (2000)	
Azacitadina	2A	Vol 50 (1990)	
Bleomicina	2B	Vol 26 (1987)	
Busulfan	1	Vol 4 (em prep)	Leucémia Mielóide Aguda
Clorambucil	1	Vol 26 (em prep)	Leucémia Mielóide Aguda

<b>Quadro 2 – Fármacos citostáticos classificados pela IARC quanto à sua carcinogenicidade (vols 1-100, revisto em Agosto de 2010) - cont</b>			
<b>Fármaco</b>	<b>Classif IARC</b>	<b>Referência</b>	<b>Tumores (Grupo 1)</b>
Cisplatina	2A	Vol 26 (1987)	
Ciclofosfamida	1	Vol 26 (1987)	Neoplasia da bexiga
Dacarbazina	2B	Vol 26 (1987)	
Daunomicina	2B	Vol 10 (1987)	
Etoposido	1	Vol 76 (em prep)	Leucémia Mielóide Aguda
5-fluoruracilo	3	Vol 26 (1987)	
Hidroxiureia	3	Vol 76 (2000)	
Isofosfamida	3	Vol 26 (1987)	
Melfalan	1	Vol 9 (em prep)	Leucémia Mielóide Aguda
Merfalan	2B	Vol 9 (1987)	
Metotrexato	3	Vol 26 (1987)	
Mitomicina C	2B	Vol 76 (2000)	
Mitoxantrona	2B	Vol 76 (2000)	
MOPP; outros regimes com alquilantes	1	Vol 7 (1987)	Leucémia Mielóide Aguda
Teniposido	2A	Vol 76 (2000)	
Treossulfan	1	Vol 26 (em prep)	Leucémia Mielóide Aguda
Vinblastina	3	Vol 26 (1987)	
Vincristina	3	Vol 26 (1987)	
Grupo 1-carcinogénico para o homem; Grupo 2A-provavelmente carcinogénico para o homem; Grupo 2B-possivelmente carcinogénico para o homem; Grupo 3-não classificável quando à sua carcinogenicidade para o homem			

#### **1.4.2 Exposição ocupacional a citostáticos em profissionais de saúde:**

Embora os profissionais de saúde estejam submetidos a uma exposição em dose muito inferior à dos doentes tratados e tenha sido feito um esforço enorme nas últimas décadas, através da implementação de regras e procedimentos de segurança normalizados, para reduzir esta dose de exposição ao mínimo, o facto é que ela continua a acontecer em todos os locais de trabalho onde este fenómeno foi estudado.

Os diversos estudos ambientais efetuados nos locais de trabalho destes profissionais, cujos principais resultados se encontram resumidos no Quadro 3, revelam que existe uma contaminação generalizada das superfícies e equipamentos (podendo conduzir a absorção dos citostáticos por via dérmica) e nalguns casos também níveis detectáveis destes agentes químicos no ar ambiente (podendo conduzir a absorção por via inalatória).

Os valores de contaminação obtidos são extremamente discrepantes, o que pode ser parcialmente explicado pelos diferentes contextos profissionais em que os estudos foram conduzidos, mas também pela diferente sensibilidade dos métodos de doseamento adotados.

Dado o tipo de relação dose-resposta aceite para os agentes cancerígenos, de natureza linear e sem limiar de dose abaixo do qual não seja possível ocorrer o efeito alvo (neste caso o cancro) optou-se por apresentar os resultados destes estudos apenas em termos de positivos (deteção de citostáticos nas superfícies e equipamentos estudados) ou negativos (ausência desta deteção).

<b>Quadro 3 – Estudos de contaminação de superfícies e ar do ambiente de trabalho</b>					
<b>Autor</b>	<b>País</b>	<b>Ano</b>	<b>Fármacos estudados</b>	<b>Parâmetros avaliados</b>	<b>Resultado</b>
Sessink	Holanda	1992	CF,IF,5-Fu,MTX	Ar ambiente (amostras estacionárias e individuais) Superfícies/objectos de trabalho incluindo luvas	- +
Sessink	Holanda	1997	CF,IF,5-Fu,MTX	Ar ambiente (amostras estacionárias e individuais) Superfícies/objectos de trabalho EPIs (luvas,máscaras)	+ + +
Nygren	Suécia	1997	Derivados da platina	Ar ambiente (amostras individuais) Superfícies de trabalho	- +
Minoia	Itália	1998	CF, IF	Ar ambiente Superfícies de trabalho Luvas,batas,máscaras	+ + +
Connor	EUA, Canadá	1999	CF,IF,5-Fu	Superfícies e objectos de trabalho Pavimentos	+ +
Fransman	Alemanha	2004	CF	Luvas Contaminação cutânea	+ +(mãos)
Connor	EUA	2005	CF,IF,5-Fu	Superfície exterior dos frascos de citostáticos	+

Quadro 3 – Estudos de contaminação de superfícies e ar do ambiente de trabalho - continuação					
Autor	País	Ano	Fármacos estudados	Parâmetros avaliados	Resultado
Mason	Reino Unido	2005	CF,IF,MTX	Ar ambiente	-
				Superfícies de trabalho	+
				Luvas	+
Roberts	Reino Unido	2006	CF,5-Fu,Doxorrubicina	Superfícies de trabalho	+
Ursini	Itália	2006	CF,IF,5-Fu,CIT,GEM	Superfícies de trabalho	+
				EPis (luvas, batas, máscaras)	+
Brouwers	Holanda	2007	Derivados da platina	Superfícies de trabalho e pavimentos	+
Fransman	Holanda	2007	CF,IF,5-Fu,MTX, CIT,GEM,Clorambucil	Roupas de cama	+
Hedmer	Suécia	2008	CF,IF	Superfícies de trabalho e pavimentos	+
Castiglia	Itália	2008	CF,IF,5-Fu	Superfícies e objectos de trabalho, pavimentos	+
Touzin	Canadá	2008	CF	Superfície externa dos frascos contendo citostáticos	+
Schierl	Alemanha	2009	5-Fu,derivados platina	Superfícies de trabalho e pavimentos	+

<b>Quadro 3 – Estudos de contaminação de superfícies e ar do ambiente de trabalho - continuação</b>					
<b>Autor</b>	<b>País</b>	<b>Ano</b>	<b>Fármacos estudados</b>	<b>Parâmetros avaliados</b>	<b>Resultado</b>
Connor	EUA	2010	CF,IF,5-Fu	Ar ambiente (amostras individuais e estacionárias)	+
				Superfícies de trabalho	+
Villarini	Itália	2010	CF	Superfícies de trabalho	+
				Contaminação cutânea	+
Maeda	Japão	2010	CF,IF	Superfícies de trabalho	+
Yoshida	Japão	2011	CF,5-Fu,GEM, derivados da platina	Ar ambiente	+
				Superfícies e objectos de trabalho	+
Naito	Japão	2012	derivados da platina	Superfície exterior dos frascos de citostáticos	+
Sottani	Itália	2012	CF, IF, GEM	Superfícies de trabalho	+
Chu	Canadá	2012	CF, MTX	Superfícies de trabalho (antes/depois da limpeza)	+/+
Kopp	Alemanha	2013	CF,IF,5-Fu,GEM,MTX	Superfícies de trabalho	+
			Derivados da platina Docetaxel, Paclitaxel		
Wakui	Japão	2013	CF	Ar ambiente (durante esmagamento comprimidos)	+
Merger	Canadá	2014	CF,IF,MTX	Superfícies de trabalho	+

Legenda: CF-ciclofosfamida; IF-ifosfamida; 5-Fu – 5-fluoruracilo; MTX-metotrexato; CIT-citosina arabinosido; GEM-gemcitabina



A exposição ocupacional parece, portanto, ocorrer sobretudo por via dérmica, por contacto directo com os fármacos ou com superfícies e equipamentos contaminados (Sessink; Bos, 1999; Fransman et al, 2007b), hipótese reforçada pelos múltiplos estudos demonstrando que em todos os locais de trabalho avaliados existe contaminação generalizada das paredes, pavimentos, superfícies de trabalho e equipamentos (Quadro 3).

Os doentes tratados eliminam importantes quantidades de citostáticos pelas secreções e excreções e constituem uma fonte adicional de exposição, quer directamente quer através das roupas em contato com a sua pele (Sessink; Bos, 1999; Fransman; Vermeulen; Kromhout, 2004; Fransman et al, 2007b).

A via inalatória é considerada pela maior parte dos autores como menos importante, mas é concebível que nalgumas circunstâncias possa desempenhar também um papel significativo, sobretudo para citostáticos que, como a ciclofosfamida, podem vaporizar à temperatura ambiente ou quando ocorrem determinados tipos de manipulação, suscetíveis de gerar a formação de aerossóis ou poeiras inaláveis (Sessink; Bos, 1999; Wakui et al., 2013). Existem efetivamente alguns estudos que demonstram a presença de citostáticos no ar, embora este achado não seja tão frequente como o da contaminação de superfícies (Sessink et al., 1997; Minoia et al., 1998; Yoshida et al., 2011; Wakui et al, 2013).

Por outro lado, existem dados indicativos de que as medidas de proteção mais utilizadas têm eficácia limitada.

A capacidade protetora das câmaras de fluxo laminar vertical tem sido contestada por alguns autores, particularmente para a ciclofosfamida que pode vaporizar à temperatura ambiente passando através dos poros dos filtros *HEPA* – *High Efficiency Particulate Air* - (Sessink; Bos, 1999; Wakui et al, 2013).

Também a proteção oferecida pelas luvas parece apresentar limitações, uma vez que em trabalhos experimentais estas têm revelado ser permeáveis a diversos citostáticos (Connor et al., 1984; Laidlaw et al., 1984; Colligan; Horstman, 1990; Wallemacq et al., 2006).

Os resultados destes estudos experimentais são apoiados por vários estudos que demonstram a presença de níveis significativos de citostáticos na superfície interior das luvas, em contato direto com a pele (Sessink et al., 1992; Sessink et al., 1997; Minoia et al., 1998; Fransman; Vermeulen; Kromhout, 2004; Mason 2005 et al., Ursini 2006).

De modo similar, foram também detetados citostáticos no interior das máscaras e batas usadas pelos profissionais de saúde expostos a estes agentes (Sessink et al., 1997; Minoia et al., 1998; Ursini et al., 2006).

Esta contaminação generalizada de superfícies e equipamentos bem como a insuficiência dos equipamentos de proteção utilizados, resultam em exposição cutânea dos profissionais envolvidos, como é evidenciado por estudos em que foi demonstrada a presença de citostáticos na pele de diversas regiões do corpo, sobretudo as mãos (Minoia et al., 1998; Fransman; Vermeulen; Kromhout, 2004; Villarini et al., 2010).

Todos estes dados indicam que os procedimentos de segurança e os equipamentos de proteção vigentes são insuficientes para evitar a exposição cutânea dos profissionais que manipulam citostáticos, com a consequente possibilidade de absorção dos agentes por esta via.

#### **1.4.3 Efeitos sobre a saúde nos profissionais expostos a citostáticos**

É indiscutível, face à literatura publicada, que os citostáticos são agentes mutagénicos e cancerígenos e que a exposição ocupacional de profissionais de saúde a estes agentes existe em praticamente todos os ambientes de trabalho estudados.

Uma questão diferente e ainda controversa é se esta exposição se traduzirá, ao longo do tempo, numa frequência aumentada de efeitos adversos para a saúde. Dados as ações conhecidas dos citostáticos sobre o genoma celular, os efeitos a longo prazo que maiores investigações têm merecido são a incidência aumentada de determinados tipos de cancro e as repercussões sobre a reprodução e o desenvolvimento embrionário.

Como já referido, a IARC considera que para sete fármacos citostáticos existe evidência suficiente de carcinogenicidade para o Homem, quer com base em experiências animais quer com base em estudos humanos (risco aumentado de cancro em doentes tratados) - Quadro 2, página 61.

Está efetivamente bem estabelecida pela IARC a associação entre a terapêutica com agentes alquilantes ou inibidores da topoisomerase II e leucemia mieloide aguda e entre a terapêutica com ciclofosfamida e neoplasia da bexiga.

Uma questão diferente e ainda em aberto é se a exposição ocupacional a estes citostáticos (que ocorre a níveis muito inferiores à dos doentes tratados) se associa também a um risco aumentado de cancro nos profissionais. Existem alguns dados publicados que sugerem associação entre risco aumentado de leucemia e exposição ocupacional a citostáticos (Skov et al., 1992; Peipins et al., 1997; Petralia et al., 1999; Burnett; Robinson; Walker, 1999; Blair et al, 2001), embora se esteja ainda longe de uma relação comprovada. Não existe, do nosso conhecimento, nenhum estudo sugerindo incidência aumentada de neoplasia da bexiga em profissionais expostos a ciclofosfamida.

Alguns autores sugerem adicionalmente a existência de um risco aumentado de outros tipos de cancro, nomeadamente cancro da mama (Gunnarsdottir et al, 1997; Ratner et al, 2010), embora neste caso o efeito de confundimento causado pela maior parte dos profissionais de saúde estudados serem enfermeiras, submetidas a trabalho por turnos, que é considerado pela IARC como um carcinogénio do Grupo 2A para este tipo de neoplasia, não possa ser excluído (IARC, 2016).

Os agentes citostáticos são simultaneamente citotóxicos e genotóxicos para as células germinais femininas e masculinas e para as células embrionárias e fetais.

Nos doentes tratados estão descritos esterilidade e anomalias genéticas das células germinais, que são transitórias e não se parecem traduzir em efeitos adversos sobre futuras gravidezes (Arnon et al., 2001; Meirow; Schiff, 2005).

Em mulheres tratadas durante a gravidez, a maior parte dos citostáticos atingem o embrião/feto em concentrações significativas, uma vez que a placenta não constitui uma barreira eficaz contra estes agentes (Arnon et al., 2001). Esta

exposição *in utero* pode resultar em aumento da frequência de aborto espontâneo e de malformações congénitas (Bawle; Conard; Weiss, 1998; Enns et al., 1999; Arnon et al., 2001; Paskulin et al., 2005; Delatycki, 2005).

Se a exposição crónica a baixos níveis de citostáticos, em contexto profissional, resulta também em efeitos adversos sobre a reprodução e o desenvolvimento embriofetal permanece ainda um assunto em discussão. Alguns estudos sugerem existir uma frequência significativamente aumentada de aborto espontâneo (Selevan et al, 1985; Stucker et al., 1990; Valanis; Vollmer; Steele, 1999), mas existem igualmente estudos negativos (Hemminki; Kyyrönen; Lindbohm, 1985; Skov et al., 1992). De forma similar, existem autores sugerindo um risco aumentado de malformações congénitas (Hemminki; Kyyrönen; Lindbohm, 1985; McDonald et al., 1988; Lorente et al., 2000; Ratner et al, 2010) bem como autores que não encontraram esta associação (Skov et al., 1992).

Dranitsaris publica em 2005 a única meta-análise disponível sobre efeitos para a saúde relacionados com a exposição profissional a citostáticos e conclui que não existem dados suficientes para concluir por um risco aumentado de cancro, que existe uma associação fraca com aborto espontâneo e que não existe evidência de associação significativa com malformações congénitas (Dranitsaris et al., 2005).

#### **1.4.4 Indicadores biológicos nos profissionais expostos a citostáticos**

Diversas linhas de evidência comprovam que os profissionais de saúde responsáveis pela preparação e administração de citostáticos apresentam um nível significativo de exposição a estes agentes químicos.

Como vimos, apesar das melhorias introduzidas nas últimas décadas em termos de equipamentos de proteção coletiva e individual, bem como da adoção de procedimentos de segurança normalizados e cada vez mais rigorosos, praticamente todos os estudos efetuados revelam que a contaminação de superfícies e equipamentos de trabalho é ubiqüitária em todos os ambientes de trabalho e que se estende ao interior dos equipamentos de proteção individual utilizados (luvas, batas e máscaras).

O impacto desta exposição sobre a saúde dos profissionais é difícil de avaliar, tendo em conta as características da exposição (doses baixas durante períodos de tempo prolongados por oposição às doses elevadas durante curtos períodos de tempo registadas nos doentes tratados) e as características dos agentes químicos em causa (cujo principal efeito adverso é a cancerigénese, efeito que se manifesta após período de latência prolongado e que não é específico desta exposição). Tal é atestado pela dificuldade encontrada pelos estudos epidemiológicos em estabelecer associações significativas entre exposição a citostáticos e efeitos sobre a saúde como o cancro ou alterações da reprodução e desenvolvimento embrio-fetal.

A utilização de indicadores biológicos permitiu superar algumas destas dificuldades, fornecendo informação extremamente importante sobre os efeitos desta exposição profissional no organismo dos trabalhadores.

Os estudos usando indicadores biológicos demonstraram que os profissionais de saúde expostos a citostáticos quer por via dérmica quer por via inalatória, absorvem com frequência quantidades significativas destes agentes. A comprová-lo indicam-se no Quadro 4 múltiplos estudos utilizando indicadores biológicos de dose interna, cujos resultados demonstram consistentemente a presença de citostáticos ou de metabolitos deles derivados ao nível da urina dos trabalhadores expostos.

**Quadro 4 – Estudos com indicadores biológicos de dose na urina de profissionais de saúde expostos a citostáticos**

Estudo	Nº estudado	Profissionais estudados	Indicadores biológicos	Método de colheita	Resultados	
Sessink 1992	25	Enfermeiros, Prof. farmácia	Ciclofosfamida, Ifosfamida	Colheita 24 horas	8+/25	32%
Ensslin 1994	21	Enfermeiros, Prof farmácia	Ciclofosfamida, Ifosfamida	Colheita 24 horas	12+/21	57%
Sessink 1995	28	Enfermeiros	Ciclofosfamida	Colheita 24 horas	11+/28	39%
Ensslin 1997	13	Prof. farmácia	Ciclofosfamida, Ifosfamida Platina	Colheita 24 horas	3+/13	23%
Nygren 1997	31	Enfermeiros, Prof. farmácia	Platina	Amostras pré e pós turno	31+/31*	100%
Minoia 1998	24	Enfermeiros, Prof. farmácia	Ciclofosfamida, Ifosfamida	Amostras pré e pós turno	12+/24	50%
Burgaz 2002	25	Enfermeiros	Ciclofosfamida	Colheita 24 horas	20+/25	80%
Turci 2002	16	Enfermeiros Técnicos farmácia	Ciclofosfamida, Ifosfamida Metotrexato, Platina	Amostras pré, pós e a meio do turno	22+/62	36%
Pethran 2003	100	Enfermeiros, Prof. farmácia	Ciclofosfamida, Ifosfamida Doxorrubicina, Epirubicina Platina	Colheita 24 horas	40+/100	40%

Quadro 4 – Estudos com indicadores biológicos de dose na urina de profissionais de saúde expostos a citostáticos – cont.						
Estudo	Nº estudado	Profissionais estudados	Indicadores biológicos	Método de colheita	Resultados	
Mason 2005	50	Prof. farmácia	Ciclofosfamida; Ifosfamida Metotrexato, Platina	Amostras pré e pós turno	50-/50	0%
Cavallo 2005	25	Enfermeiros, Prof. farmácia	$\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanina	Amostras pré turno	3+/30	10%
Ursini 2006	30	Enfermeiros, Prof. farmácia	$\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanina	Amostras pré turno	3+/30	10%
Rekhadevi 2007	60	Enfermeiros	Ciclofosfamida	Amostras pré turno	42+/60	70%
Hedmer 2008	22	Enfermeiros, Prof. farmácia	Ciclofosfamida, Ifosfamida	Amostras pré e pós turno	22-/22	0%
Connor 2010	119	Enfermeiros, Prof. farmácia	Ciclofosfamida, Ifosfamida Paclitaxel, Citarabina $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanina	Colheita 8 horas (4 final turno e 4 pós-turno)	3+/119	2,5%
Pieri 2010	56	Enfermeiros, Prof farmácia	Doxorrubicina. Epirubicina	Amostras pós turno	10+/56	18%
Villarini 2010	40	Enfermeiros, Prof farmácia	Ciclofosfamida	Amostras pós turno	7+/40	17,5%
Maeda 2010	8	Enfermeiros, Prof farmácia	Ciclofosfamida, Ifosfamida	Colheita 24 horas	8-/8	0%
Ndaw 2010	19	Enfermeiros, Prof. farmácia	$\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanina	Amostras pré turno	14+/19*	74%
Yoshida 2011	17	Enfermeiros	Ciclofosfamida, Gemcitabina Platina	Colheita 24 horas	3+/17	18%

\*Método de doseamento ultra-sensível

Da análise do Quadro 4 é evidente que, ao longo das últimas décadas, se tem registado uma tendência progressiva para uma redução na percentagem de profissionais com indicadores biológicos de dose positivos na maior parte dos locais de trabalho estudados, facto corroborado por uma análise da tendência de exposição em enfermeiros conduzida por Fransman (Fransman, 2007a). Dois factos importantes, no entanto, devem ser tidos em conta:

- A redução na percentagem de positividade não é uniforme para todos os locais estudados, existindo estudos recentes, como o de Rekhadevi, conduzido na Índia e publicado em 2007, que revelam percentagens ainda muito elevadas (70%) (Rekhadevi et al., 2007).
- Mais significativo ainda, dado estarmos a falar de valores extremamente baixos, a sensibilidade do método usado para medição é determinante. Estudos recentes utilizando métodos ultrassensíveis, como o de Ndaw, conduzido em França e publicado em 2010, continuam a evidenciar positividade numa percentagem muito elevada das amostras estudadas (74%), não detectada por métodos de menor sensibilidade (Ndaw et al., 2010). Tal sugere que as medidas instituídas têm apresentado alguma eficácia na redução do nível de exposição e, conseqüentemente, de absorção, mas de forma alguma as eliminaram.

A estes dados, fornecidos pelos estudos utilizando indicadores biológicos de dose interna, somam-se dados indicativos de que esta absorção sistémica de citostáticos se associa, nos profissionais de saúde expostos, a efeitos relevantes traduzidos por um aumento significativo da frequência de diversos indicadores de efeito biológico (genotoxicidade), quando comparados com indivíduos não expostos.

O primeiro estudo demonstrando uma associação entre exposição ocupacional a citostáticos e genotoxicidade foi publicado por Falck no final dos anos setenta recorrendo ao teste de Ames (Falck et al., 1979). Nos anos subsequentes, múltiplos estudos verificaram associação entre este tipo de exposição e aumento da frequência de diversos indicadores biológicos de genotoxicidade, dos quais os que consideramos mais relevantes estão referidos no Quadro 5.



**Quadro 5 – Estudos com indicadores biológicos de efeito em profissionais de saúde expostos a citostáticos**

<b>Indicador utilizado</b>	<b>Estudo</b>	<b>Nº trabalhadores avaliado</b>	<b>Resultado global</b>
Aberrações cromossômicas	Burgaz 2002	20	+
	Musak 2006	72	+
	Tompa 2006	500	+
	Testa 2007	76	+
	Kopjar 2009	50	+
	McDiarmid 2010	63	+
	El-Ebiary 2013	30	+
Teste de micronúcleos	Thiringer 1991	60	-
	Maluf 2000	10	-
	Pilger 2000	39	-
	Hessel 2001	100	-
	Cavallo 2007	23	+
	Rekhadevi 2007	60	+
	Cornetta 2008	83	+
	Cavallo 2009	30	+
	Rombaldi 2009	20	+
	Moretti 2013	52	-
	El-Ebiary 2013	30	+
Teste do cometa	Undeger 1999	30	+
	Maluf 2000	10	+
	Kopjar 2001	50	+
	Ursini 2006	25	-
	Yoshida 2006	19	+
	Rekhadevi 2007	60	+
	Sasaki 2008	121	+
	Cornetta 2008	83	+
	Izdes 2009	19	+
	Cavallo 2009	30	-
	Rombaldi 2009	20	+
	Connor 2010	68	-
	Villarini 2010	52	+
	Buschini 2013	63	-
Moretti 2013	52	+	

Em termos globais, dos 33 estudos referidos, 24 (73%) foram positivos, sugerindo que a exposição ocupacional a estes agentes tem efetivamente um efeito biológico detetável.

Relativamente às aberrações cromossómicas, todos os estudos encontraram um aumento significativo da frequência de aberrações em trabalhadores expostos a citostáticos, apoiando a noção de que este é um indicador biológico muito sensível, adequado para avaliar baixos níveis de lesão do ADN como os que surgem em contexto ocupacional. Trata-se para além disso de um marcador já validado por estudos prospectivos em termos da sua associação com um risco acrescido de cancro (Brogger et al., 1990; Hagmar et al., 1994; Bonassi et al., 2000; Hagmar et al., 2004; Boffetta et al., 2007), pelo que a positividade destes estudos fornece uma indicação extremamente importante sobre possíveis efeitos para a saúde nos profissionais expostos.

A sua morosidade e dificuldade técnica dificultam de certo modo a sua utilização em larga escala e de forma repetida no tempo, como estaria indicado em contexto ocupacional, de modo que nas últimas décadas se têm multiplicado os estudos com marcadores de utilização mais simples como o teste de micronúcleos e o teste do cometa.

Os estudos que analisaram a frequência de micronúcleos no contexto da exposição ocupacional a citostáticos foram maioritariamente positivos. A sua menor taxa de positividade (dos 11 estudos analisados, 5 foram negativos) poderá ser devida ao facto de, nos estudos iniciais, a contagem de micronúcleos não estar restrita apenas às células binucleadas; tal pode ocasionar efeitos de confundimento causados por alterações da cinética da divisão celular que reduzem a sensibilidade do teste (Fenech, 2002a). Praticamente todos os estudos negativos são da fase inicial da aplicação da técnica, anteriores a 2002; dos estudos mais recentes apenas um foi negativo (Moretti et al., 2013).

A associação demonstrada deste teste com o risco aumentado de cancro bem com a sua simplicidade técnica e o grau de informação que pode fornecer sobre os mecanismos subjacentes de genotoxicidade tornam-no num teste extremamente atrativo. Nos estudos em que foi usado concomitantemente *FISH* verificou-se que a maior parte dos micronúcleos que surgem neste contexto são centrómero-negativos, o que está de acordo com as propriedades clastogénicas da maior parte dos agentes

químicos genotóxicos. Nalguns casos individuais, no entanto, foi verificado existir uma percentagem apreciável (até 50%) de micronúcleos centrómero-positivos, achado que os autores associaram à manipulação do citostático vinorelbina, um reconhecido agente aneugénico, inibidor do fuso mitótico (Cavallo et al., 2007).

Há também diversos estudos utilizando o teste do cometa em trabalhadores expostos a agentes citostáticos. Dos 15 estudos analisados, apenas 3 foram negativos. Os resultados apresentam, no entanto, uma enorme disparidade de valores, em parte relacionada com a metodologia adotada e com os parâmetros escolhidos para medir o grau de lesão do ADN e em parte devida à elevada variabilidade intra e inter-individual inerente ao próprio teste. Tal torna a comparação dos resultados difícil, mas a maior parte dos estudos evidencia como já referido, de forma consistente, a existência de níveis de lesão do ADN nos profissionais expostos significativamente superiores aos de indivíduos não expostos.

Tendo em conta a natureza transitória de grande parte das lesões detetada pelo teste do cometa e a ausência de estudos prospectivos indicando associação entre os seus resultados e o risco futuro de cancro, um resultado positivo deve ser interpretado apenas como indicativo de uma exposição recente a um agente genotóxico (Moller 2007).

Embora seja um excelente indicador de exposição recente, não deve ser feita uma correlação direta entre o seu resultado e dose externa, por diversos motivos: pela sua inespecificidade, uma vez que tal como todos os indicadores deste tipo é influenciado por uma multiplicidade de agentes genotóxicos endógenos e exógenos não profissionais; pela enorme disparidade de resultados, condicionada pela elevada variabilidade inter- e intra-individual do teste; finalmente, porque se verificou que o nível de lesão do ADN detetado nos profissionais, expostos durante períodos longos a baixas doses de agentes genotóxicos, é semelhante ao verificado em doentes com cancro submetidos a quimioterapia, expostos durante curtos períodos de tempo a doses elevadas destes mesmos agentes (Moller, 2006).

Tal indica que, embora constitua um excelente indicador de exposição recente, não pode ser estabelecida uma correspondência direta entre a intensidade do efeito medido pelo teste do cometa e a intensidade da exposição. Será um indicador útil para estabelecer uma exposição recente, mas não permitirá avaliar a sua

intensidade nem tirar ilações relativamente ao futuro risco para a saúde a ela associada.

Deverá, portanto, ser encarado como um teste complementar à pesquisa de aberrações cromossómicas e ao teste de micronúcleos, fornecendo informação diferente: genotoxicidade relacionada com exposição recente no primeiro caso versus lesão genética acumulada ao longo do tempo no caso dos outros dois.

Pelo exposto, pode concluir-se que os fármacos citostáticos são agentes químicos reconhecidamente mutagénicos e cancerígenos, com efeitos adversos sobre a saúde bem demonstrados em doentes com eles tratados.

Os profissionais de saúde encontram-se indubitavelmente expostos a estes agentes no decurso da sua actividade profissional, sobretudo por via dérmica, dado a contaminação das superfícies e equipamentos de trabalho ser ubiqüitária e os equipamentos de protecção existentes terem uma eficácia limitada.

Esta exposição associa-se efetivamente a absorção dos citostáticos pelos profissionais, conforme demonstrado pelos estudos utilizando indicadores de dose interna.

A existência de efeitos adversos para a saúde nos trabalhadores tem sido difícil de demonstrar em estudos epidemiológicos, dadas as características da exposição (doses baixas durante longos períodos de tempo) e a natureza desses mesmos efeitos adversos (longo período de latência e inespecificidade).

Os estudos com indicadores de efeito biológico, no entanto, mostram que os profissionais expostos apresentam maior frequência de efeitos genotóxicos quando comparados com indivíduos não expostos. Alguns destes efeitos foram associados por estudos prospectivos a um risco aumentado de desenvolver diversos tipos de cancro no futuro.

Estas conclusões tiradas da revisão da literatura levaram-nos a querer conhecer melhor a realidade das unidades hospitalares portuguesas que manipulam estes fármacos. Em termos das práticas de trabalho que podem influenciar a exposição e do nível de contaminação ambiental presente (factores determinantes da absorção e da conseqüente exposição interna dos trabalhadores). E também em termos do seu

impacto sobre a saúde dos profissionais expostos, avaliado através da determinação de alguns dos indicadores biológicos disponíveis.

## **2. OBJETIVOS**

O presente estudo teve como objetivo geral caracterizar a exposição profissional a citostáticos e seus efeitos biológicos em dois grupos de profissionais de saúde de unidades hospitalares portuguesas:

- (a) profissionais de enfermagem de hospital de dia, responsáveis pela administração de citostáticos em regime ambulatorio, e
- (b) profissionais de farmácias hospitalares, responsáveis pela preparação destes agentes.

Definiram-se como objetivos específicos:

- 1.** Caracterizar a exposição a citostáticos e os factores que a determinam nos grupos profissionais definidos (análise do trabalho).
- 2.** Estimar a exposição através da quantificação de citostáticos ao nível das superfícies e equipamentos de trabalho (avaliação ambiental).
- 3.** Contribuir para conhecer melhor os efeitos biológicos associados a esta exposição através da medição de indicadores biológicos de genotoxicidade (uma vez que os danos do genoma se associam tanto aos efeitos carcinogénicos como aos efeitos sobre a reprodução, os dois principais efeitos adversos para a saúde focados neste contexto ocupacional).

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Tipo de estudo**

Conduzimos um estudo de tipo transversal comparando expostos com não expostos, dado ser este o desenho adotado pela maior parte dos estudos publicados nesta área e permitir, portanto, uma mais fácil comparação de resultados.

#### **3.2 População**

A população alvo do estudo foi constituída pelos profissionais de saúde de duas Unidades Hospitalares portuguesas da região de Lisboa, designadas como A e B, cuja atividade de trabalho implicava a manipulação de fármacos citostáticos. Neste contexto foram considerados especificamente dois grupos:

- a) Enfermeiros de hospital de dia, responsáveis pela administração de citostáticos a doentes oncológicos em regime ambulatorio.
- b) Técnicos da farmácia hospitalar responsáveis pela preparação das misturas de citostáticos para administração.

Foi definido como critério de inclusão terem manipulado citostáticos durante pelo menos os 3 meses anteriores ao início do estudo.

Como critérios de exclusão foram estabelecidos:

- Ter sido submetido a quimioterapia ou radioterapia prévias;
- Ser portador de doença crónica ativa;
- Ter um diagnóstico prévio ou atual de neoplasia.

Os indivíduos de ambos os grupos foram caracterizados quanto aos seguintes parâmetros:

- Género
- Idade
- Hábitos tabágicos

Estes parâmetros foram selecionados dado ter sido sugerido, em diversos outros estudos, que poderiam influenciar o comportamento dos indicadores biológicos em causa na presente investigação:

- o género e a idade parecem condicionar significativamente a frequência de micronúcleos em linfócitos de sangue periférico (Norppa; Falck, 2003; Battershill; Burnett; Bull, 2008)
- os hábitos tabágicos parecem poder influenciar o grau de lesão do ADN detetado pelo teste do cometa (Moller et al., 2000).

Como grupo controlo foi escolhida uma população voluntária de trabalhadores não expostos constituída por docentes universitário, alunos universitários e pessoal administrativo pertencente a um dos centros de investigação que conduziu o presente estudo (Escola Superior de Tecnologias de Saúde de Lisboa). Este grupo foi ajustado para o género, tendo em conta a importância deste fator na frequência de células micronucleadas em linfócitos de sangue periférico. Por limitação inerente ao número de voluntários que foi possível angariar, foi adoptada uma relação expostos/não expostos de 1/1.

A caracterização foi feita em ambos os grupos por entrevista direta e individual conduzida por um dos investigadores da equipa e incluiu o preenchimento de um questionário normalizado já testado e utilizado num estudo prévio realizado pela mesma equipa de investigação (Ladeira et al., 2011 – Anexo 1).

### **3.3 Análise ergonómica do trabalho**

O risco para a saúde derivado da exposição a uma substância química não pode ser devidamente esclarecido ou estimado sem uma adequada clarificação da exposição em si mesma, entendida com o contato entre a substância e o organismo do(s) indivíduo(s) exposto(s) (Peña; Carter; Ayala-Fierro, 2001).

A clarificação da exposição implica a sua caracterização quer do ponto de vista quantitativo quer qualitativo.

Esta caracterização global da exposição exige, necessariamente, o estudo das situações de trabalho. Para responder às necessidades da qualificação. Mas,



igualmente, para permitir que a quantificação seja efetuada em função de locais e tempos mais representativos da exposição real.

A análise (ou o estudo) das situações de trabalho representa, assim, uma etapa essencial para o estudo da exposição ocupacional e, por via disso, para a avaliação dos riscos ocupacionais relacionados com essa mesma exposição etapa que, por sua vez, suporta uma adequada estratégia preventiva a delinear ou corrigir.

A designada Ergonomia da Atividade Humana, considerando a ergonomia como o estudo específico do trabalho humano tendo em vista melhorá-lo, e entendendo como trabalho humano a atividade concreta dos trabalhadores quando confrontados com as tarefas concretas que lhes são atribuídas, preconiza uma metodologia de análise e interpretação das situações de trabalho que responde plenamente e com rigor, a esta necessidade de apreciação da exposição.

No essencial, esta perspectiva postula que (Faria, 1987; Prista, 1987; Kapitaniak, 1994):

- O centro de uma situação de trabalho se situa na designada atividade real de trabalho (aquilo que o trabalhador faz e como o faz);
- Esta atividade não é um acontecimento ocasional, derivando o seu desenvolvimento de um diverso número de elementos que lhe são prévios e representam o seu condicionamento. Estes fatores são, no seu conjunto, designados por condicionantes da atividade (humanas, ambientais, técnicas e organizacionais), esta representando a resposta que o trabalhador (com as suas características) dá ao que necessita fazer nas condições facultadas ou impostas (e que se designa por tarefa);
- Finalmente, a atividade não se esgota em si própria, dela resultando sempre consequências, quer para o sistema quer para o trabalhador (as que importam à Saúde Ocupacional), nas quais se incluem os riscos para a saúde que a exposição a um agente químico pode comportar.

Pode, deste modo, considerar-se que as características essenciais da análise do trabalho na perspetiva da ergonomia da atividade humana são: a sua incidência sobre o trabalho real; a abordagem das situações de trabalho na sua globalidade; o facto de tornar inteligíveis as inter-relações existentes entre os três níveis de análise,

conduzindo ao diagnóstico e, por fim, permitir a intervenção corretiva sobre os condicionantes do trabalho (Prista, 1987).

O estudo do trabalho vai assim incidir preferencialmente sobre a atividade concreta dos trabalhadores e não sobre o trabalho prescrito ou tarefa (neste caso concreto as normas e procedimentos recomendados), ou seja, a exposição é estudada em função daquilo que necessariamente ocorre e não a partir de pressupostos teóricos frequentemente afastados (e por vezes muito) da realidade.

Nas últimas décadas têm sido publicadas diversas normas e procedimentos (trabalho prescrito ou tarefa) que visam a manipulação segura de medicamentos citotóxicos. Dentre as mais divulgadas podemos indicar as seguintes:

- 2 Guia de Boas Práticas para a Preparação de Medicamentos em Estabelecimentos de Saúde (*Pharmaceutical Inspection Cooperation Scheme – PIC/S*, 2010);
- 3 Orientação para a Manipulação de Fármacos potencialmente tóxicos (*American Society of Health System Pharmacists – ASHP*, 2010);
- 4 Boas Práticas para a manipulação segura de medicamentos citotóxicos (*International Society of Oncology Pharmacy Practitioners – ISOPP*, 2007).

Estas normas têm sido implementadas, de forma adaptada, pela esmagadora maioria das farmácias que manipulam citostáticos e é indiscutível que têm contribuído para uma redução do risco e uma maior segurança na manipulação destes fármacos. Não têm sido, no entanto, suficientes para eliminar quer a contaminação ambiental (que continua a ser verificada por praticamente todos os estudos) quer a absorção de citostáticos pelos trabalhadores que os manipulam, embora os níveis detetados de indicadores biológicos de dose interna se tenham vindo a reduzir progressivamente ao longo das últimas décadas.

Até que ponto esta eficácia incompleta tem a ver com incapacidades inerentes às próprias normas ou com limitações relacionadas com as colocar integralmente em prática é uma questão de evidente interesse prático que interessa analisar.

A abordagem ergonómica pode oferecer uma mais-valia importante no sentido de compreender por que razão as normas e procedimentos recomendados têm tido uma eficácia limitada em reduzir quer a contaminação ambiental quer a exposição interna dos trabalhadores.

O instrumento metodológico essencial e mais característico da ergonomia é, portanto, a análise das situações de trabalho, entendida como o estudo das situações concretas de trabalho real (Faria, 2009). O estudo da atividade e dos modos operatórios dos trabalhadores, ou seja, o estudo do trabalho humano deve ser considerado uma parte integrante de qualquer tentativa para compreender as exposições profissionais e as suas repercussões sobre a saúde.

Não é possível tirar ilações sobre a exposição profissional, neste caso a fármacos citostáticos e seus eventuais efeitos sobre a saúde sem conhecer a atividade real de trabalho de quem os manipula: quem o faz, como o faz e por que razão o faz de determinada maneira. Do estudo desta atividade e suas consequências sobre a saúde humana podem também ser tiradas importantes conclusões sobre por que razão a exposição ocupacional a citostáticos continua a ter efeitos inegáveis e incontornáveis sobre os profissionais de saúde e definir estratégias que os permitam reduzir ao mínimo possível com a tecnologia e os conhecimentos de que atualmente dispomos.

A procura e recolha da informação necessária para a análise do trabalho nesta perspectiva ergonómica foi feita utilizando os seguintes instrumentos metodológicos:

- Aplicação de um questionário padronizado e realização de entrevistas semiestruturadas;
- Observação da atividade real de trabalho e das suas condicionantes.

Num primeiro passo, foi aplicado o questionário de autopreenchimento normalizado concebido pela International Symposium on Oncology Pharmacy Practice - ISOPP (ISOPP Audit Tool, 2007 – Anexo 2).

A aplicação deste questionário destinou-se a avaliar até que ponto as normas e procedimentos recomendados para a manipulação de fármacos citostáticos são adotados e cumpridos pelas unidades de farmácia participantes e foi preenchido em ambos os casos pelo elemento da unidade de farmácia diretamente responsável pela área de citostáticos. A informação recolhida através deste questionário foi completada e clarificada através de entrevistas dirigidas e semiestruturadas quer com o elemento da unidade de farmácia responsável pelo seu preenchimento quer com os trabalhadores envolvidos diretamente na manipulação de citostáticos. O

objetivo foi perceber quais das normas recomendadas eram efetivamente seguidas e quais não o eram e, no caso de não o serem, a razão para tal suceder.

A observação da actividade de trabalho e suas condicionantes com maior relevo para o processo da exposição em causa, foi efectuada tendo por fundamento a metodologia de análise das situações de trabalho preconizada pela Ergonomia da Actividade Humana, tendo como objetivo caracterizar a exposição e as variáveis que a influenciam.

O registo da informação foi efectuado em grelha de observação própria adaptada para este efeito com base nas normas e procedimentos de segurança recomendados pela ISOPP (Anexo 3).

### **3.4 Avaliação ambiental**

A quantificação da contaminação ambiental por citotóxicos incluiu o estudo da contaminação de superfícies e equipamentos de trabalho, para o que foram utilizadas bandas de papel de filtro impregnadas com acetato etílico. As amostras obtidas foram posteriormente analisadas por HPLC (*High Precision Liquid Chromatography* - cromatografia líquida de alta precisão). Os métodos de colheita e processamento das amostras colhidas a nível ambiental foram os descritos nos artigos de Larson (Larson; Khazaeli; Dillon, 2003a; Larson; Khazaeli; Dillon, 2003b) e encontram-se publicados de forma detalhada por Viegas e colaboradores (Viegas et al., 2014).

Foram escolhidos como indicativos 3 citotóxicos pertencentes à lista dos fármacos deste tipo mais utilizados em ambas as unidades hospitalares: 5-fluoruracilo, ciclofosfamida e paclitaxel.

Estes fármacos foram, acresce, alvo de investigação em estudos previamente publicados (Sessink et al., 1992; Sessink et al., 1997; Minoia et al., 1998; Connor 1999; Fransman; Vermeulen; Kromhout, 2004; Mason et al., 2005; Cavallo et al, 2005; Connor et al, 2005; Ursini et al, 2006; Fransman et al, 2007b; Castiglia 2008; Connor et al, 2010; Kopp; Schierl; Nowak, 2012), pelo que a sua escolha teve também o objectivo de permitir alguma comparação de resultados.

As superfícies e equipamentos a amostrar foram escolhidos tendo como base quer uma breve identificação do circuito que os medicamentos percorrem dentro das duas

unidades hospitalares quer os resultados da análise da atividade de trabalho efectuada previamente aos profissionais que os manipulam, tendo por base os seguintes dois critérios:

- Mais elevado nível de contaminação (teórico) por citotóxicos;
- Maior frequência do contato/manipulação pelos profissionais de saúde.

### **3.5 Avaliação biológica**

A avaliação biológica da exposição foi efectuada através da realização de dois indicadores biológicos de genotoxicidade: o teste de micronúcleos e o teste do cometa.

As amostras de sangue periférico necessárias foram colhidas no início do turno de trabalho e após pelo menos 3 dias consecutivos de manipulação de citotóxicos e processadas para obtenção dos dois indicadores biológicos escolhidos.

#### **3.5.1 Teste de micronúcleos**

O teste de micronúcleos em linfócitos de sangue periférico foi efectuado de acordo com metodologia previamente descrita (Ladeira et al, 2011).

De forma resumida, a cada elemento do grupo de estudo e do grupo de controlo foram recolhidos 10 cm<sup>3</sup> de sangue periférico para tubos Falcon contendo heparina (10 U por ml de sangue). A partir do sangue periférico foram isolados linfócitos com recurso a um gradiente de concentrações usando Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences), cultivados em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino (10%) e antibióticos (estreptomicina 50 µg/ml e penicilina 50 U/ml), estimulados com um agente mitogénico (fito-hemaglutinina 10 µl/ml) e incubados em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 44 horas. Após este período de estimulação a citocinese foi bloqueada com um agente inibidor da polimerização dos filamentos de actina (citolasina 6 µl/ml) durante 28 horas. Finalmente os linfócitos foram recolhidos e projectados em lâminas de vidro com recurso a *cytospin* (Cyto-Tek® Sakura), corados com a técnica de May-Grünwald Giemsa e observados por Axioskp40 com óleo de imersão e ampliação 1000x por um único elemento da equipa de

investigação. Foram analisadas 1000 células por cada indivíduo estudado, sendo o sistema de contagem adotado o descrito por Fenech e colaboradores (Fenech et al, 1999).

### 3.5.2 Teste do cometa

O teste do cometa foi executado de acordo com o método descrito por Singh e colaboradores (Singh et al., 1988).

Após isolamento dos linfócitos de sangue periférico conforme o descrito na secção anterior, foi recolhido 1 ml de suspensão e submetido a nova centrifugação seguida de re-suspensão em solução de criopreservação (soro fetal bovino 90% e DMSO 10%) e colocação imediata em gelo seco até ao armazenamento em arca frigorífica a -80°C. Posteriormente as amostras foram submetidas a um processo de descongelamento em banho-maria a 37°C seguido de homogeneização e re-suspensão em volume igual de PBS. De seguida foram centrifugadas a 1500 rpm a 4°C durante 5 minutos, re-suspendidas em PBS e contadas com recurso a um hemocítmetro e microscópio invertido (Zeiss Axiovert 40 CFL). De cada amostra foram retirados 30 µl de células em suspensão aos quais foram adicionados 140 µl de agarose de baixo ponto de fusão. 70 µl desta mistura foram colocados em dois locais de lâminas de vidro previamente adesivadas com agarose normal a 1%. Após as lâminas estarem a 4°C foram removidas as lamelas e colocadas em solução de lise (NaCl 2.5M, EDTA 0.1M, Tris 10mM e Triton X-100 1% a pH 10) durante 40 minutos. De seguida procedeu-se a electroforese na mesma solução durante 20 minutos a 20V, as lâminas foram lavadas em PBS, água destilada e etanol absoluto e secas ao ar. Para visualização as lâminas foram coradas com DAPI 1 µg/ml e montadas em lamelas 22x22 mm em cada gel. Foram estudadas 150 células por cada indivíduo incluído no estudo utilizando um microscópio de fluorescência (Zeiss Axio Scope A1, HXP 120C) e software adequado (Comet Assay IV da Perceptive Instruments®). Como parâmetro indicativo do grau de lesão do ADN foi usada a percentagem de ADN na cauda do cometa (Albertini et al., 2000).

## 3.6 Enquadramento Ético

### 3.6.1 Respeito pela autonomia e pelos princípios da beneficência e não maleficência – o consentimento informado

A experimentação feita com seres humanos, a despeito de ter contribuído para melhorar a qualidade de vida do homem e a sua relação com o ambiente, foi exercida, desde os primórdios, muitas vezes de forma abusiva e atingiu um extremo no século XX, nos campos de concentração nazis, onde os prisioneiros raciais, políticos e militares foram colocados à disposição dos médicos para todo e qualquer tipo de experimentação. O choque das imagens da Segunda Guerra Mundial produziu efeito ímpar sobre a comunidade científica e a população e conduziu aos famosos julgamentos do Tribunal Militar Internacional de Nuremberga em 1946. Como consequência deste processo foi elaborado em 1947 um documento, que ficou conhecido como Código de Nuremberga (Tribunal Internacional de Nuremberga, 1947).

O Código de Nuremberga é um conjunto de princípios éticos que regem a pesquisa com seres humanos e tem constituído, para além do primeiro documento deste tipo, a grande fonte inspiradora de muita da posterior regulamentação na área da pesquisa envolvendo seres humanos. A força legal deste documento não foi no entanto imediatamente estabelecida e incorporada pela comunidade dedicada à pesquisa médica pelo que muitos dos princípios nele expressos só passaram a integrar de forma efetiva a investigação médica muito mais tarde, nas décadas de 1960, através da Declaração de Helsínquia redigida em 1964 pela World Medical Association (WMA).

A Convenção sobre Direitos Humanos e Biomedicina adoptada pelo Conselho Europeu em Oviedo (Conselho Europeu, 1997) inclui também alguns pontos relevantes para o presente estudo nos aspectos referentes ao respeito pela autonomia, nomeadamente:

*“Artigo 2 – O interesse e bem-estar de um ser humano devem prevalecer sobre os interesses da sociedade ou da ciência.*

*Artigo 5 – Qualquer intervenção no âmbito da saúde só pode ser levada a cabo após consentimento livre e informado da pessoa. Esta deve ser previamente informada sobre os objetivos e natureza da intervenção bem como sobre as suas consequências e riscos. A pessoa pode livremente retirar o seu consentimento em qualquer altura.”*

A Declaração Universal sobre Bioética e Direitos Humanos (Unesco, 2005) reconhece que os rápidos progressos da ciência e suas aplicações tecnológicas suscitam questões éticas que devem ser examinadas com o devido respeito pela dignidade da pessoa humana e o respeito universal e efectivo dos direitos humanos e das liberdades fundamentais e proclama uma série de princípios que afirmam de forma idêntica que:

*“Artigo 3º nº 2 - Os interesses e o bem-estar do indivíduo devem prevalecer sobre o interesse exclusivo da ciência ou da sociedade.*

*Artigo 6º nº 2 - Só devem ser realizadas pesquisas científicas com o consentimento prévio, livre e esclarecido da pessoa em causa. A informação deve ser suficiente, fornecida em moldes compreensíveis e incluir as modalidades de retirada do consentimento.”*

Também a legislação portuguesa prevê através da nº Lei 12/2005, de 26 de janeiro, no seu Artigo 18º que *“1. A colheita de sangue e outros produtos biológicos ... devem ser objeto de consentimento informado separado ... para fins de investigação, em que conste a finalidade da colheita e tempo de conservação das amostras e produtos deles derivados.”*

Um consentimento informado pressupõe que o investigador deve fornecer aos participantes no estudo informação sobre os seus objetivos, duração esperada, procedimentos envolvidos e todas as utilizações que se pretendem dar ao material recolhido. Esta informação deve ser o mais específica possível e não consistir apenas em elementos genéricos.

Deve haver uma descrição adequada dos potenciais riscos e dos benefícios esperados. Deve ser especificamente descrita de que modo e até que ponto será mantida a confidencialidade dos dados que identificam os participantes. Deve ser tornado claro que a participação é inteiramente voluntária e que o indivíduo se pode retirar do estudo em qualquer momento que o deseje.



Foram estes os principais aspetos tidos em conta no desenho da metodologia adotada relativamente à obtenção do consentimento informado por parte dos profissionais envolvidos, nomeadamente no enfoque cuidadoso que se procurou dar ao fornecimento de informação suficiente e adequada e à possibilidade de discutir e tirar dúvidas por contacto direto entre os trabalhadores e os investigadores envolvidos neste estudo.

Apesar de este projeto não envolver propriamente experimentação em seres humanos, envolve colheita de material biológico humano contendo ADN o que, como discutido mais adiante, levanta sempre algumas questões éticas particulares e atualmente ainda controversas.

Para além do consentimento informado, a execução deste projeto esteve obviamente dependente do parecer positivo fornecido pelas comissões de ética das unidades hospitalares envolvidas.

### 3.6.2 A colheita de material biológico humano

Segundo Allen (Allen et al., 2010), o material humano para fins de pesquisa pode ser obtido em 4 grandes contextos: a) tecidos colhidos prospetivamente no âmbito de um projecto de investigação (que corresponderá ao presente caso); b) tecidos remanescentes de amostras retiradas com objetivos clínicos; c) material de cadáver; d) tecidos com potencial reprodutivo (esperma, oócitos embriões, tecido fetal).

Um dos assuntos mais controversos na atualidade tem a ver com os direitos relacionados com a privacidade e a propriedade da informação genética, obtida a partir de ADN colhido dos indivíduos. O material genético, com as particularidades que apresenta em termos de potencial fonte de informação, que o distinguem de todos os outros tipos de material biológico, deverá sem dúvida ser alvo de especial atenção e proteção.

Em termos de direito de propriedade, tem sido considerado controverso se este deverá ser aplicado, já que existe um receio fundamentado de que tal possa interferir com a livre pesquisa e o progresso científico e em última análise com o bem comum.

No caso da privacidade, o respeito pelo princípio ético da autonomia exige que a informação seja tratada como confidencial, respeitando o direito de o indivíduo

determinar como quer que a informação proveniente do seu material genético seja utilizada. A escolha do modo como esta confidencialidade será mantida, no entanto, poderá ser variável consoante a situação em causa.

O direito à privacidade e o respeito pela autonomia podem efetivamente ser assegurados por outros meios que não o direito de propriedade, como sejam o consentimento informado, que garante que o indivíduo é informado e autoriza o modo como é utilizado o seu material genético (Spinello, 2004). Com efeito, a necessidade de obter consentimento informado reconhece implicitamente algum tipo de direito de propriedade e confere algum grau de proteção, perspetiva que foi adotada no presente estudo.

A inclusão no estudo dos profissionais de saúde bem como dos voluntários do grupo de controlo foi precedida em todos os casos pelo fornecimento de informação detalhada e pela obtenção de consentimento informado escrito.

### 3.6.3 A confidencialidade dos dados recolhidos e a garantia de acesso aos dados por parte dos indivíduos envolvidos no estudo

A Lei nº 12/2005, de 26 de janeiro, contem diversos artigos relevantes que consagram o direito à confidencialidade dos dados obtidos e regulamentam o modo pelo qual estes podem ser acedidos ou não (quer por terceiros quer pelos próprios titulares dos dados), nomeadamente:

*“Artigo 2º - Informação de saúde - ... abrange todo o tipo de informação directa ou indirectamente ligada à saúde, presente ou futura, de uma pessoa ... e a sua história clínica e familiar.*

*Artigo 3º - Propriedade da informação de saúde – 1. A informação de saúde, incluindo os dados clínicos registados, resultados de análises e outros exames subsidiários, intervenções e diagnósticos, é propriedade da pessoa ... 2. O titular da informação de saúde tem o direito de, querendo, tomar conhecimento de todo o processo clínico que lhe diga respeito ... 3. O acesso à informação de saúde por parte do seu titular ... é feito através de médico com habilitação própria ...*

*Artigo 4º - 4. O acesso a informação de saúde pode, desde que anonimizada, ser facultado para fins de investigação. 5. A gestão dos sistemas que organizam a*

*informação de saúde deve garantir a separação entre a informação de saúde e genética e a restante informação pessoal, designadamente através da definição de diversos níveis de acesso.*

*Artigo 6º - 3. A informação genética reveste natureza médica apenas quando se destina a ser utilizada nas prestações de cuidados ou tratamentos de saúde, no contexto da confirmação ou exclusão de um diagnóstico clínico, no contexto de diagnóstico pré-natal ou diagnóstico pré-implantatório ou no da farmacogenética ...*

*7. A utilização de informação genética é um acto entre o seu titular e o médico, que é sujeito às regras deontológicas de sigilo profissional dos médicos e dos restantes profissionais de saúde.”*

De acordo com esta noção, o material biológico humano recolhido neste projecto não entrará no âmbito do que é considerado “informação genética de natureza médica” pelo que não será, abrangido pelo artigo 7º da Lei nº 67/98 sobre tratamento de dados sensíveis, que obriga a notificação à Comissão Nacional de Protecção de Dados. Os resultados obtidos, no entanto, configuram uma base de dados abrangida pela Lei nº 67/98, de 26 de outubro, (Lei de Protecção de Dados Pessoais) que contém diversos pontos importantes relativos e aplicáveis a esta matéria, nomeadamente:

*“Artigo 3º - a) Dados pessoais: qualquer informação de qualquer natureza e independentemente do respectivo suporte ... relativa a uma pessoa singular identificada ou identificável (titular dos dados) ... b) Tratamento de dados pessoais: qualquer operação ou conjunto de operações sobre dados pessoais ... c) Ficheiro de dados pessoais: qualquer conjunto estruturado de dados pessoais ... d) Responsável pelo tratamento: a pessoa singular ou colectiva ... ou qualquer outro organismo que, individualmente ou em conjunto ... determine as finalidades e os meios de tratamento dos dados pessoais ... h) Consentimento do titular dos dados: qualquer manifestação de vontade livre, específica e informada nos termos da qual o titular aceita que os seus dados pessoais sejam objeto de tratamento.*

*Artigo 5º - 1. Os dados pessoais devem ser: b) recolhidos para finalidades determinadas, explícitas e legítimas ... c) Adequados, pertinentes e não excessivos relativamente às finalidades para que são recolhidos ... e) Conservados de forma a permitir a identificação dos seus titulares apenas durante o período necessário para a prossecução das finalidades da recolha ou do tratamento posterior. 3. Cabe ao*

*responsável pelo tratamento assegurar a observância do disposto nos números anteriores.*

*Artigo 6º - Condições de legitimidade do tratamento de dados: O tratamento de dados pessoais só pode ser efectuado se o seu titular tiver dado de forma inequívoca o seu consentimento ...*

*Artigo 10º - Confere ao titular dos dados o direito de informação sobre a) identidade do responsável pelo tratamento ... b) finalidades do tratamento ... c) destinatários dos dados, carácter obrigatório ou facultativo da resposta, condições do direito de acesso e retificação.*

*Artigo 11º - Confere ao titular o direito de acesso a informação sobre os seus dados, por parte do responsável pelo tratamento, livremente e sem restrições, com periodicidade razoável e sem demoras ou custos excessivos.*

*Artigo 14º - 1. O responsável pelo tratamento deve pôr em prática as medidas técnicas e organizativas adequadas para proteger os dados pessoais ...*

*Artigo 17º - Sigilo Profissional – 1. Os responsáveis do tratamento de dados pessoais bem como as pessoas que, no exercício das suas funções tenham conhecimento dos dados pessoais tratados ficam obrigados a sigilo profissional, mesmo após o termo das suas funções.”*

A Convenção sobre Direitos Humanos e Biomedicina adoptada pelo Conselho Europeu em Oviedo (Conselho Europeu, 1997) inclui também alguns pontos relevantes sobre aspeto nomeadamente:

*“Artigo 10 – 1. Todos os indivíduos têm direito ao respeito pela sua vida privada relativamente á informação respeitante à sua saúde. 2. Todos têm o direito a conhecer qualquer informação recolhida sobre a sua saúde, mas o desejo de não ser informado também deve ser respeitado.”*

Também a Constituição da República Portuguesa reconhece no Artigo 35º que *“Todos os cidadãos têm o direito de acesso aos dados informatizados que lhes digam respeito, podendo exigir a sua retificação e atualização, e o direito de conhecer a finalidade a que se destinam, nos termos da lei”.*

Tendo em conta estes aspetos, todos os dados obtidos no âmbito do estudo foram mantidos estritamente confidenciais, nos termos previstos na legislação.

Os resultados sobre as medições ambientais e os resultados dos exames biológicos de grupo foram livremente fornecidos aos profissionais envolvidos bem como às entidades hierarquicamente competentes, de modo a servirem de orientação em termos de avaliação correta dos riscos e tomada de medidas preventivas.

#### 3.6.4 A difusão e partilha dos resultados

O progresso científico é uma atividade cumulativa, em que cada nova descoberta tem como ponto de partida os dados obtidos por investigadores anteriores. Tal implica que os investigadores têm, perante as gerações futuras, uma responsabilidade acrescida. A descrição dos procedimentos adotados deve ser suficientemente precisa e detalhada para permitir não apenas avaliar a validade dos resultados obtidos, mas também reproduzi-los. Qualquer investigador tem a obrigação de manter um registo preciso, correto, detalhado e acessível que permita a outros investigadores verificar e, se necessário, reproduzir os resultados obtidos. O dever de partilha é um dos fundamentos básicos da comunidade científica.

Os benefícios do trabalho científico devem estender-se para além da comunidade científica e abranger a sociedade em geral. Os resultados obtidos podem ter um impacto direto e imediato sobre os profissionais incluídos e sobre outros exercendo atividades afins. Podem ser (e é nosso objetivo que sejam) utilizados para tomar decisões informadas sobre a melhor maneira de reduzir o risco para a saúde associado à exposição ocupacional a fármacos citostáticos.

A inclusão no projeto das unidades hospitalares foi precedida de um contato formal prévio por escrito com a respetiva Administração, através de uma carta de apresentação contendo uma nota informativa sobre o estudo, seus objetivos, metodologia e resultados esperados. Adicionalmente foi contactado pessoalmente o elemento/equipa responsável pela Saúde Ocupacional da respetiva unidade hospitalar a quem foi pedida a participação no projeto e entregue uma versão resumida do mesmo.

Após a sua conclusão os resultados globais não individualizados foram fornecidos à administração de ambas as unidades hospitalares incluídas bem como ao serviço de higiene e segurança, responsável pela vigilância ambiental, e ao médico do trabalho, responsável pela vigilância da saúde dos trabalhadores estudados.

### **3.7 Análise estatística**

Os dados recolhidos foram analisados usando o software PASW, versão 18.0 para Windows® da Microsoft International®.

Foi efectuada primeiro a estatística descritiva, sendo as variáveis categóricas caracterizadas com recurso a tabelas de frequências e gráficos de barras e as variáveis numéricas através de medidas de tendência central (média e mediana), medidas de dispersão (desvio padrão) e histogramas.

De seguida procedeu-se à análise bivariável. A normalidade de distribuição dos dados foi testada com recurso ao teste de Kolmogorov-Smirnoff. As variáveis categóricas foram comparadas entre si com recurso ao teste do Qui quadrado ou ao teste exacto de Fisher. Para comparação entre variáveis categóricas e variáveis numéricas recorreu-se ao teste t de student ou ao teste de Mann Whitney, de acordo com a normalidade ou não da distribuição dos dados. De modo similar as variáveis numéricas foram comparadas entre si recorrendo aos testes de correlação de Pearson ou de Spearman, consoante a distribuição dos dados era ou não normal. A aplicação destes testes incluiu sempre uma análise gráfica da distribuição dos dados a ser apresentada juntamente com os mesmos.

O nível de significância considerado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Análise das situações de trabalho (unidade A)**

A análise de trabalho efetuada conjugou conhecimentos da área da Medicina do Trabalho e da área de Farmacologia. Implicou diversas deslocações conjuntas de dois elementos da equipa de investigação (médico do trabalho e elemento da equipa de investigação ligada à área da farmácia), um inquérito específico sobre as actividades de preparação e administração de citostáticos e o preenchimento independente pelos 2 elementos da grelha de observação da atividade de trabalho, registando aspetos diferentes e complementares.

Por perda do elemento da equipa ligado à área de farmácia não foi possível reproduzir a análise efectuada na segunda unidade hospitalar estudada. Os resultados da análise na primeira unidade (unidade A) são no entanto ricos e informativos, fornecendo dados extremamente importantes para o objetivo deste trabalho e ilustrando bem a utilidade desta metodologia na caracterização de qualquer exposição ocupacional.

#### **4.1.1 Breve descrição dos espaços de trabalho**

A manipulação de citotóxicos na unidade hospitalar estudada inclui diversas etapas: receção → transporte interno → armazenamento → preparação → administração → limpeza e lavagem de superfícies, equipamentos e roupas contaminadas → eliminação de resíduos (Figura 1).

Embora as áreas da preparação e administração sejam as mais críticas em termos de risco de exposição dos trabalhadores, ao longo de todo o circuito pode existir contaminação e outros grupos profissionais que não os diretamente ligados a estas duas atividades podem estar expostos a citostáticos. Esta exposição ocorre de modo desconhecido, dado este circuito não ter sido delineado nem alvo de nenhum estudo específico.

Numa primeira fase procurámos assim delinear qual o circuito seguido dentro da unidade hospitalar pelos fármacos citostáticos e recorreremos à ISOPP Audit Tool que

inclui um inquérito dirigido e sistematizado sobre como decorre a manipulação dos fármacos citotóxicos através de todas estas etapas.

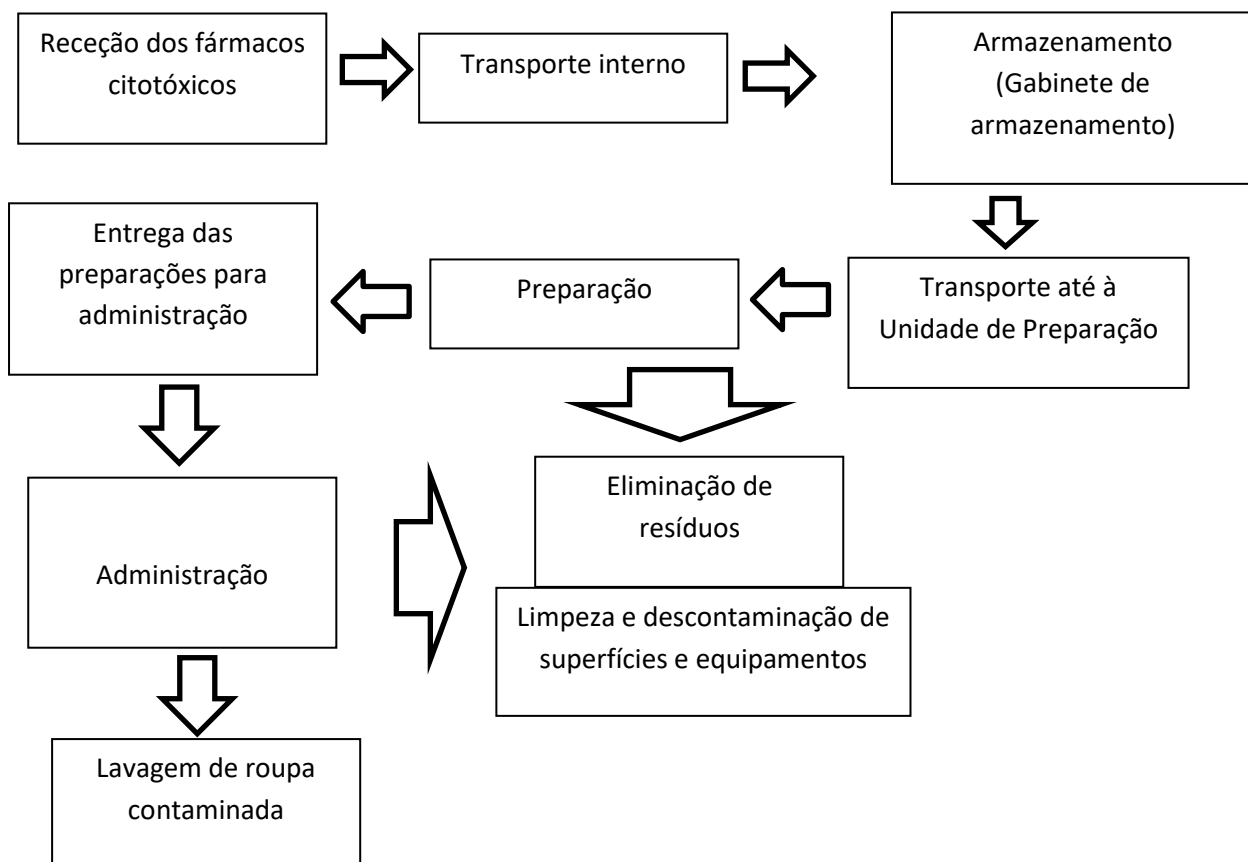
Engloba itens que procuram avaliar:

- As normas e procedimentos de segurança visando a proteção da saúde dos trabalhadores;
- O cuidado posto na qualidade e no controlo do produto final visando a proteção da saúde do doente que vai receber os fármacos citotóxicos.

Estes itens são analisados desde a fase inicial de receção destes agentes até à fase final de eliminação de resíduos. Incluem também os procedimentos para limpeza de superfícies e equipamentos e lavagem da roupa contaminada.

O circuito encontra-se esquematizado na figura abaixo:

**Figura 1 - Circuito seguido pelos fármacos citostáticos na unidade hospitalar A**



A ISOPP Audit Tool avalia cada um destes passos e permite detetar pontos críticos em termos de potencial exposição dos trabalhadores, merecedores de intervenções preventivas.



Dentro deste circuito, a preparação é sem dúvida a etapa mais crítica do ponto de vista de exposição dos trabalhadores a estes agentes químicos. É também, no entanto, aquela que é alvo de maior regulamentação e de maiores medidas de proteção coletiva.

De acordo com as normas recomendadas pela ISOPP:

- A preparação deve ser realizada em áreas limpas com entrada controlada por zonas estanques (*air lock*) destinadas aos profissionais e materiais utilizados;
- As zonas de preparação devem ser mantidas com um padrão de limpeza adequado e o ar fornecido deve ser filtrado por filtros de eficiência adequada;
- Os vários procedimentos associados à preparação devem ser realizados em áreas separadas dentro da área limpa, cada uma com as características requeridas – cada procedimento exige um nível adequado de limpeza ambiental de modo a minimizar o risco de contaminação por partículas e microbiológica dos produtos e materiais que estão a ser manipulados.

Os vários procedimentos envolvidos na preparação assética de medicamentos (preparação do material, colocação do equipamento de proteção individual e preparação propriamente dita) devem ser realizados em áreas separadas. Estas áreas são classificadas de acordo com as características requeridas para o meio ambiente. Para a preparação de medicamentos estéreis podem ser distinguidos 4 níveis:

**Nível A:** local para operações de alto risco. Condições atingidas por fluxo de ar laminar homogéneo de 0,45m/s  $\pm$  20%. Destina-se a:

- Preparação de medicamentos (reconstituição, diluição, medição de volumes, expulsão de ar de seringas contendo medicamentos);
- Rotulagem primária;
- Eliminação de resíduos (tipo IV)

**Nível B:** *Background* para zona de nível A, destinado a apoio.

**Níveis C e D:** Áreas semilimpas para executar etapas menos críticas da produção de medicamentos estéreis nomeadamente:

No Nível C:



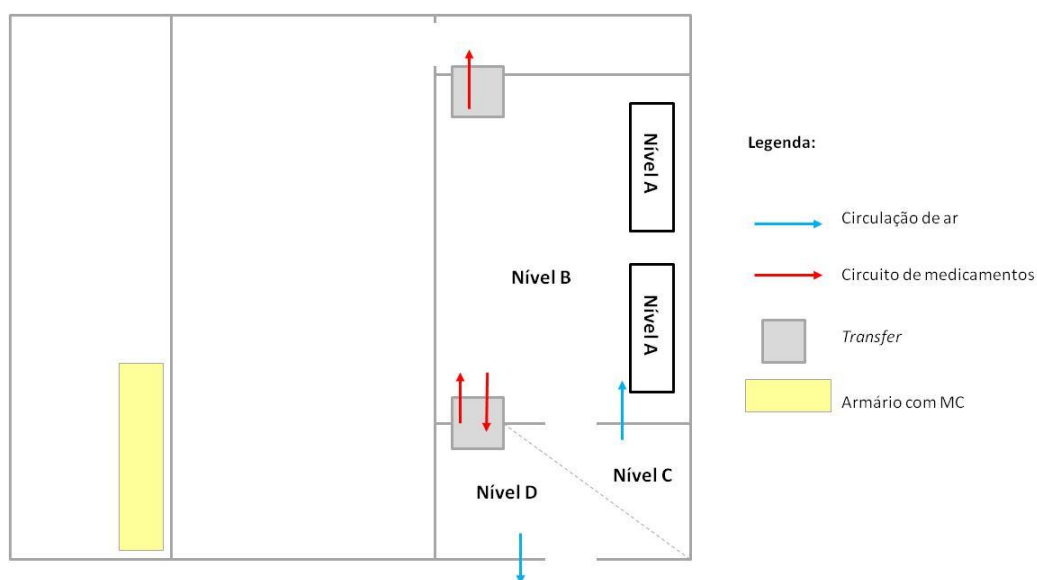
adjacente a este, num espaço fisicamente separado da farmácia hospitalar, reduzindo o risco de contaminação cruzada e possibilitando a preparação dos fármacos mais próxima do local de administração aos doentes.

A unidade de preparação é constituída por 4 zonas distintas:

- Zona suja (Nível D) – área onde são armazenadas as bolsas e bombas de perfusão e os frascos de soluções de diluição e solventes. Está equipada com 2 frigoríficos para armazenamento de citotóxicos que necessitem de refrigeração. Existem 2 *kits* de emergência para extravasão de citotóxicos. Os citotóxicos que não necessitam de refrigeração são armazenados num gabinete de apoio que não apresenta nenhum gradiente de pressão relativamente ao ambiente circundante. Neste gabinete existe um posto de trabalho com uma secretária e um computador.
- Zona semilimpa (Nível C) – área onde são guardados e colocados os EPIs. Ajuda a garantir a manutenção do diferencial de pressões entre a zona limpa e a zona suja uma vez que se encontra entre ambas e uma das suas portas só deve ser aberta se a outra estiver fechada, evitando o deslocamento de ar entre as zonas. Para garantir este procedimento, as portas possuem um código de abertura e um sinal luminoso vermelho ativado enquanto decorre a preparação de citotóxicos na zona limpa impedindo que a porta seja aberta em plena manipulação.
- Zona limpa (Nível B) – sala circundante às duas CFALV (câmaras de fluxo aéreo laminar vertical). Equipada com uma bancada de inox serve para armazenamento de algum material de apoio à preparação, elaboração dos tabuleiros e rotulagem secundária dos medicamentos preparados. Existe uma grande movimentação de pessoas podendo perturbar o fluxo de ar. Nesta área são monitorizados continuamente os valores de pressão, temperatura e humidade. Possui dois *transfers*: um destinado à transferência de material e medicamentos entre a zona semi-limpa e a zona limpa (*transfer 1*) e outro à transferência dos medicamentos já preparados para a sala de administração (*transfer 2*). Os recipientes de resíduos são retirados da zona limpa pelo mesmo *transfer* pelo qual entram (*transfer 1*).
- CFALV = Câmaras de Fluxo Aéreo Laminar Vertical (Nível A) - Existem duas câmaras de segurança biológica classe II tipo B2 (Galvão H, 2005). A desinfecção é realizada diariamente, mas a limpeza (descontaminação) é

apenas semanal. A preparação é efetuada com recurso a *spikes* (sistemas de libertação de pressão usados para a reconstituição e extração seguras de citotóxicos, reduzindo o gradiente de pressão entre o frasco e a seringa).

**Figura 3 - Representação esquemática da unidade de preparação de medicamentos citotóxicos do hospital estudado**



Relativamente à área de administração, existem duas salas interligadas de administração de citotóxicos por via endovenosa em regime ambulatorio, uma contendo camas e outra contendo cadeirões. As duas são interligadas por um corredor a meio do qual se situa o sistema de *transfer* que permite a entrega das misturas para infusão da sala de preparação para a zona de administração. O *transfer* possui duas portas, uma interna através da qual os profissionais de farmácia colocam a mistura preparada na prateleira do *transfer*, e outra externa através da qual os enfermeiros a retiram. As duas portas nunca são abertas em simultâneo.

#### 4.1.2 Estudo da atividade de trabalho

##### Preparação:

Na unidade hospitalar em que foi efetuada análise do trabalho são preparadas cerca de 60 misturas de citotóxicos por dia sendo os citostáticos mais utilizados o 5-fluoruracilo, a ciclofosfamida, a doxorubicina, a oxaliplatina e o irinotecano.

A preparação é assegurada por uma equipa de 5 técnicos de farmácia e dois farmacêuticos no horário entre as 7.30h e as 19.00h, existindo para além de um intervalo de uma hora para almoço, três pausas de 20-30 minutos às 10.00h, às 15.00h e às 17h. Os profissionais rodam na função de preparação de citotóxicos de 6 em 6 meses, estando envolvidos no total na manipulação destes fármacos 14 técnicos de farmácia e farmacêuticos.

### **Administração:**

A administração de citotóxicos aos pacientes é assegurada por uma equipa de 11 profissionais de enfermagem que trabalham em 2 turnos rotativos de 8 horas cada, estando presentes em cada turno 5 enfermeiros.

Embora teoricamente seja uma atividade de menor risco quando comparada com a preparação, a regulamentação e os cuidados em termos de equipamentos de proteção coletiva e individual são muito menos rigorosos. Não existem procedimentos nem regulamentos escritos nem é dada a mesma atenção à formação e informação dos profissionais de enfermagem que à dos técnicos de farmácia.

### **Limpeza:**

Outra atividade particularmente importante a ter em conta é a descontaminação e desinfeção das zonas de manipulação, quer seja a zona de preparação quer seja a zona de administração. A eficácia da remoção de resíduos citotóxicos durante a limpeza de superfícies é poucas vezes questionada. Idealmente, a descontaminação deve envolver a remoção física das partículas de uma superfície bem como a decomposição do fármaco em compostos menos tóxicos. Devido à diversidade de estruturas químicas e ao facto de nenhum agente único ser conhecido por desativar todos os fármacos citotóxicos, em muitos casos a descontaminação está limitada à remoção mecânica das partículas de uma superfície não descartável para uma superfície descartável, ou seja, à limpeza da superfície de trabalho com um agente de limpeza.

O National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) recomenda que todas as superfícies sejam descontaminadas de acordo com um protocolo, que inclui

um agente de desativação apropriado (NIOSH, 2004). O agente usado deve, de preferência, demonstrar remoção/degradação da contaminação química e biológica.

Atualmente, a prática mais comum consiste em limpar a superfície com água e detergente, fazendo uma lavagem completa, seguida de desinfecção com álcool a 70%.

Na unidade hospitalar A apenas as CFAVL e as bancadas da zona limpa são desinfetadas e descontaminadas pelos técnicos de farmácia. As restantes superfícies e equipamentos da zona de preparação bem como todas as áreas da zona de administração são limpas por profissionais de limpeza de uma empresa externa contratada para este efeito.

Os resultados pormenorizados da aplicação da ISOPP Audit Tool e da observação da atividade de trabalho com registo em grelha própria encontram-se discriminados nos anexos 6 e 7, respectivamente. Os resultados considerados mais relevantes para efeito deste estudo serão de seguida descritos de forma sumária.

#### **4.1.2.1 Resultados mais relevantes da aplicação da *ISOPP Audit Tool* do ponto de vista da Saúde Ocupacional**

Os resultados detalhados podem ser consultados no anexo 4; foram revelados achados que consideramos particularmente importantes em 9 dos 17 itens:

##### **Transporte**

Os citotóxicos não são adquiridos preferencialmente a fabricantes com recipientes protegidos ou inquebráveis, pelo que há risco de quebra com fuga do produto quer durante o transporte externo, quer durante a receção, quer durante o transporte interno e manipulação inicial.

Porque os citotóxicos são transportados internamente na embalagem original, seria interessante testar o exterior destas embalagens dado existirem diversos estudos publicados a demonstrar contaminação a este nível.

Durante o transporte interno não existe *kit* para extravasão de citotóxicos, o que aumenta o risco de contaminação para os trabalhadores em caso de quebra dos recipientes.

Adicionalmente, os trabalhadores responsáveis pelo transporte interno não recebem qualquer formação nem treino específico para lidar com citotóxicos.

### **Educação e treino**

Só existe um programa de formação específico e documentado para os profissionais da farmácia, não existindo nada semelhante dirigido a médicos, enfermeiros, auxiliares e pessoal responsável pela limpeza. Não é feita a avaliação da capacidade de cada trabalhador para manipular fármacos sem ocasionar contaminação de si próprio e do meio circundante (teste de validação com fluoresceína).

### **Condições para garantir a esterilidade das preparações**

Embora a maior parte dos aspetos focados neste item diga respeito a garantir a qualidade e esterilidade do produto e assim a segurança do doente que o vai receber, alguns aspetos relacionam-se também com a saúde dos trabalhadores que fazem as preparações.

Assim, o facto de na zona de preparação não ser efetuada nenhuma monitorização regular da contagem de partículas no ar, da velocidade do ar e da integridade do filtro HEPA favorece a contaminação aérea e de superfícies e equipamentos de trabalho ao nível da própria câmara.

### **CFALV**

Não existe tubagem independente para entrada e saída de ar da câmara. A câmara não está ligada 24h por dia 7 dias por semana. Tais factos mais uma vez favorecem a contaminação das próprias superfícies internas da câmara.

## **Preparações não estéreis**

Não são feitas em local próprio, destinada apenas a este fim, o que favorece a contaminação cruzada com outros locais de trabalho. Não são efetuadas numa BSC (Biological Safety Cabinet) de tipo II e o local onde são feitas não tem pressão negativa relativamente ao ambiente circundante. O risco de contaminação dos trabalhadores durante a manipulação deste tipo de preparações é, portanto, elevado.

## **Limpeza**

A limpeza é feita por uma empresa externa, utilizando pessoal com elevada rotatividade e sem formação específica sobre citostáticos. É feita sem a utilização de todos os equipamentos de proteção necessários nomeadamente máscara, luvas e óculos. Os trabalhadores da limpeza, que não são alvo do presente estudo dado não pertencerem aos quadros das unidades hospitalares, estarão assim sujeitos a um risco elevado de contaminação.

## **Resíduos**

Existem circuitos e contentores próprios para resíduos resultantes da quimioterapia, mas não para lidar com fluidos corporais ou roupas da cama dos doentes tratados. Não existem procedimentos específicos para lidar quer com os fluidos corporais quer com as roupas dos cadeirões e camas contaminadas com as secreções dos doentes a quem foram administrados citostáticos.

## **Lavandaria**

A roupa dos doentes tratados com citostáticos não é separada nem identificada, seguindo juntamente com a restante roupa do hospital e não sofrendo nenhum programa de pré-lavagem específico na lavandaria. Os trabalhadores que lidam com estas roupas, desde a recolha até ao processamento na lavandaria fazem-no sem luvas e sem sequer terem conhecimento de que estão a lidar com roupas contaminados por citostáticos.



## **Gestão do risco**

Não estão identificadas nem assinaladas todas as áreas da instituição que possam eventualmente ser alvo de contaminação, desde a receção até à eliminação de resíduos. Não são feitas regularmente nem *wipe samples* nem colheitas de ar para pesquisa de citostáticos em nenhum ponto do circuito de citotóxicos, incluindo as áreas mais críticas como a preparação e a administração.

Para além da aplicação da ISOPP Audit Tool, que corresponde a um questionário preenchido por entrevista direta entre um dos investigadores e quer o responsável hierárquico da farmácia designado para a área de citostáticos, quer a enfermeira chefe responsável pelo hospital de dia, recorreremos como já referido à observação directa da atividade de trabalho em ambas as áreas com registo numa grelha construída para o efeito pela equipa de investigação, complementada sempre que necessário com entrevistas diretas aos trabalhadores observados. As observações constantes desta grelha podem ser consultadas no anexo 5.

### **4.1.2.2 Resultados mais relevantes do registo na grelha de observação**

Os trabalhadores da zona de preparação usam dois pares de luvas durante a preparação das misturas de citotóxicos, mas não os trocam de 30 em 30 minutos mudando-os apenas na altura das pausas programadas (aproximadamente de duas em duas horas).

A CFALV não é usada exclusivamente para a preparação de citotóxicos, mas também para a preparação de anticorpos monoclonais, o que pode originar contaminação cruzada para diversas partes do hospital, tanto mais que não é feita regularmente descontaminação nem validação química da câmara.

Na zona de administração, antes de retirar a mistura de citotóxicos o enfermeiro coloca um par duplo de luvas de nitrilo, abre a porta externa do *transfer*, pega no saco de infusão e liga-o à linha endovenosa do paciente, regulando a bomba infusora para a velocidade de administração pretendida. Imediatamente após, o duplo par de luvas é descartado para um contentor próprio para resíduos do tipo IV.

É relativamente frequente, no entanto, enquanto decorre a infusão, ser necessário executar ajustes no painel de controlo da bomba infusora e este procedimento é efectuado sem luvas.

Quando termina a infusão, o enfermeiro volta a colocar um par duplo de luvas de nitrilo e retira a preparação juntamente com a linha endovenosa, descartando todo o conjunto para o contentor de resíduos já mencionado, após o que retira as luvas usadas e as coloca no mesmo contentor.

Tanto na zona de preparação como na zona de administração a limpeza é assegurada por uma empresa externa prestadora de serviços; a única exceção são a CFALV e as bancadas da zona limpa, cuja limpeza e desinfeção está a cargo dos próprios profissionais de farmácia.

Os trabalhadores responsáveis pela limpeza não recebem nenhuma formação específica relativa aos fármacos citotóxicos nem aos procedimentos corretos a adotar para a limpeza de superfícies e equipamentos onde estes são manipulados.

A desinfeção da CFAVL é feita diariamente, mas a descontaminação apenas uma vez por semana. A parte inferior da CFALV não é limpa regularmente.

As prateleiras e armários de armazenamento não são limpos de forma regular, sendo as embalagens retiradas destes locais sem luvas ou outro equipamento de proteção.

Os baldes e esfregonas usados na limpeza diária dos pavimentos das zonas de preparação e administração não são usadas exclusivamente para este fim, levantando a possibilidade de disseminação da contaminação por citostáticos ao limpar outras zonas do hospital.

Não é feita validação química dos procedimentos de limpeza, nem na zona de preparação (incluindo CFAVL) nem na de administração.

Na zona de administração os trabalhadores descartam os dois pares de luvas logo após o contacto directo com as misturas de citostáticos, mas tocam posteriormente em diversas superfícies potencialmente contaminadas sem luvas.

O facto de não serem usadas batas descartáveis nem protetores para os sapatos associa-se a risco de contaminação de outros locais do hospital.

Os procedimentos de limpeza são apesar de tudo mais exigentes na área de preparação quando comparados com os da área de administração. Nesta última todos os procedimentos de limpeza são assegurados pela empresa externa que apenas limpa de forma regular (diariamente) os pavimentos. Não há limpeza regular de paredes, tetos, bancadas, cadeiras, portas ou equipamentos.

A roupa dos cadeirões e das camas é removida por auxiliares sem luvas e segue, sem nenhuma identificação, juntamente com a restante roupa do hospital, sendo sujeita aos mesmo processos de lavagem que esta.

Todas estas observações indicam que, caso exista contaminação de superfícies consoante demonstrado em estudos similares ao nosso, há seguramente exposição cutânea dos trabalhadores quer na área de preparação quer, sobretudo, na área de administração de citostáticos com o conseqüente risco de absorção e de efeitos biológicos.

#### **4.1.2 Estudo da contaminação ambiental**

O estudo da contaminação ambiental foi efetuado por *wipe sampling* nos hospitais A e B. Embora como vimos na secção anterior exista todo um percurso passível de contaminação por estes agentes dentro de qualquer unidade hospitalar, neste estudo inicial procurámos concentrar a avaliação nas zonas de maior risco e mais estudadas por outros autores - as áreas da preparação e da administração.

No hospital A os citotóxicos para administração são preparados numa pequena unidade de farmácia distinta da farmácia central e localizada em contiguidade física com o hospital de dia onde é feita a administração aos pacientes. A unidade de preparação foi detalhadamente descrita como parte da análise do trabalho feita inicialmente e está ligada à zona de administração por um sistema de *transfer* com duas portas, sendo os sacos de infusão colocados na prateleira do *transfer* pelos técnicos de farmácia. Depois de fechada a porta interna, um profissional de enfermagem abre a porta externa e retira o saco transportando-o num tabuleiro até ao local de administração ao paciente. O hospital A é um hospital geral, sendo a oncologia uma das diversas especialidades que o integram.

No hospital B os citotóxicos são preparados na farmácia central e transportados até ao hospital de dia em contentores. A unidade de preparação da farmácia central tem basicamente as mesmas características descritas para o hospital A, mas possui três câmaras classe II em vez de duas. Adjacente à unidade de preparação existe um gabinete de verificação, inexistente no hospital A, contendo algumas bancadas de apoio, secretárias, cadeiras, um computador e uma calculadora onde as preparações finalizadas são verificadas antes de serem embaladas para expedição para o hospital de dia. Os procedimentos adotados pelos profissionais de enfermagem no hospital de dia são semelhantes aos descritos para o hospital A, com a diferença de que as preparações não são recolhidas através de um sistema de *transfer*, mas sim retiradas dos contentores de transporte. O hospital B é um hospital oncológico, dedicado exclusivamente ao tratamento e seguimento de pacientes com cancro, pelo que apresenta muito maior volume de preparações efetuadas e de doentes tratados por unidade de tempo, justificando o número muito superior de amostras colhidas a este nível.

Foram recolhidas no total 327 amostras (67 no hospital A e 260 no hospital B) ao nível das superfícies consideradas mais relevantes das áreas de preparação e administração, de acordo com os critérios definidos, após uma análise preliminar dos espaços e da atividade de trabalho dos diferentes profissionais.

Para efeitos deste estudo, considerou-se positiva qualquer amostra em que fosse detetável a presença de pelo menos um dos 3 citotóxicos usados como indicativos (5-fluoruracilo, ciclofosfamida ou paclitaxel); nalguns casos apenas se conseguiu detetar a presença do fármaco (ALQ – Abaixo do Limiar Quantificável); noutros este existia em quantidade suficiente para ser quantificado.

De acordo com este critério foram positivas 238 das 327 amostras (73%), das quais 121 (37%) contendo citotóxico em quantidade suficiente para quantificação. Na apresentação dos resultados indica-se, para cada superfície/equipamento, o valor mais elevado de citotóxico detetado.

**Quadro 6 -Resultados da contaminação de superfícies no hospital A (67 amostras)**

<b>Unidade</b>	<b>Superfície/Equipamento</b>	<b>Resultado</b>
<b>Preparação</b> (40 amostras)	<b>Armazenamento</b>	
	- prateleiras	78,8 ng/cm <sup>2</sup>
	- maçanetas das portas	ND
	<b>Sala semilimpa</b>	
	- bancadas de trabalho	ALQ
	- tabuleiros	15,8 ng/cm <sup>2</sup>
	<b>Sala limpa</b>	
	- bancadas de trabalho	ND
	- tabuleiros	ND
	- maçanetas das portas	ND
	<b><i>Transfer</i></b>	
	- maçaneta da porta interna	13,7 ng/cm <sup>2</sup>
	- prateleira	ND
Administração (27 amostras)	<b><i>Transfer</i></b>	
	- <i>maçaneta da porta externa</i>	ALQ
	- <i>prateleira</i>	15,2 ng/cm <sup>2</sup>
	<b>Mesas de trabalho</b>	60,5 ng/cm <sup>2</sup>
	<b>Bombas infusoras</b>	5,8 ng/cm <sup>2</sup>

ND = Não Detectável; ALQ = Abaixo do Limiar Quantificável; para as quantidades quantificáveis usou-se o maior valor detetado

**Quadro 7 -Resultados da Contaminação de Superfícies no Hospital B (260 amostras)**

<b>Unidade</b>	<b>Superfície/Equipamento</b>	<b>Resultado</b>
<b>Preparação</b> (145 amostras)	<b>Armazenamento</b>	
	- prateleiras	13,6 ng/cm <sup>2</sup>
	- maçanetas das portas	ALQ
	<b>Sala semilimpa</b>	
	- bancadas de trabalho	ALQ
	<b>Sala limpa</b>	
	- bancadas de trabalho	20,4 ng/cm <sup>2</sup>
	- tabuleiros	ALQ
	- maçanetas das portas	12,4 ng/cm <sup>2</sup>
	- superfície frontal da CFALV	14,6 ng/cm <sup>2</sup>
	- cadeiras	ND
	<b>Sala de apoio</b>	
- secretárias	11,9 ng/cm <sup>2</sup>	
- telefones	21,3 µg/cm <sup>2</sup>	
- cadeiras	14,4 ng/cm <sup>2</sup>	
- calculadoras e computador	13,4 ng/cm <sup>2</sup>	
<b>Administração</b> (115 amostras)	- contentor de transporte	46,7 ng/cm <sup>2</sup>
	- saco de infusão	14,6 ng/cm <sup>2</sup>
	- bancadas de trabalho	260,9 ng/cm <sup>2</sup>
	- carrinhos de apoio	497,7 ng/cm <sup>2</sup>
	- cadeirões (braços)	1,1 ng/cm <sup>2</sup>
	- camas	ND
	- bombas infusoras	1131,4 ng/cm <sup>2</sup>

ND = Não Detectável; ALQ = Abaixo do Limiar Quantificável; para as quantidades quantificáveis usou-se o maior valor detetado

Os resultados foram comparados, para os dois hospitais, entre as áreas de preparação e administração com recurso ao teste de Mann Whitney, tendo em ambos os casos a zona de administração apresentando valores significativamente superiores aos da zona de preparação – no hospital A  $U=276.0$ ,  $p=0,001$  para o 5-fluoruracilo e  $U=344,5$ ,  $p=0,003$  para o paclitaxel e no hospital B  $U=6706.0$ ,  $p=0.035$  para a ciclofosfamida e  $U=4747.5$ ,  $p=0,000$  para o paclitaxel (Viegas, 2014).

### 4.3 Aplicação dos indicadores biológicos

#### 4.3.1 Caracterização da população estudada

Foram estudados no total 92 indivíduos, incluindo 46 trabalhadores das duas unidades hospitalares expostos a citostáticos (17 profissionais de farmácia, 27 enfermeiros, 2 auxiliares de enfermagem) e 46 indivíduos não expostos a estes fármacos. O número da amostra traduz todos os profissionais que, nas unidades hospitalares estudadas preenchem os critérios de inclusão.

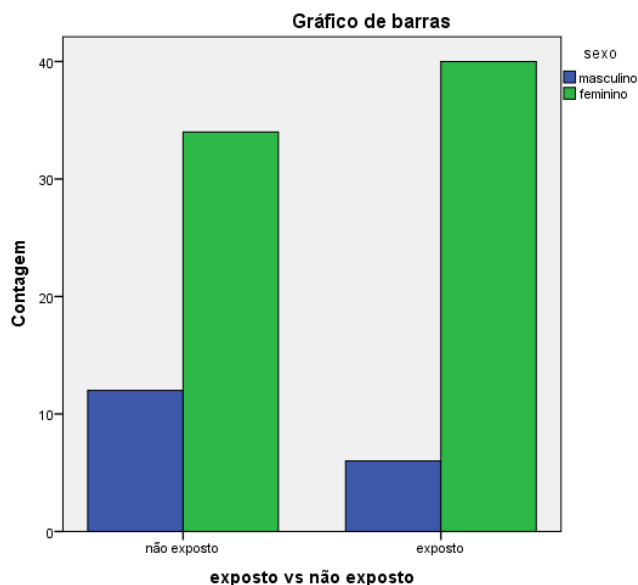
As principais características dos indivíduos estudados encontram-se resumidas no Quadro 8, tendo os grupos sido comparados para as variáveis categóricas com o teste de Qui<sup>2</sup> e para as numéricas com o teste t de Student.

**Quadro 8 – Características da população incluída no estudo**

Variável	Grupo de estudo (n=46)	Grupo controlo (n=46)	p
Género	6 homens 40 mulheres	12 homens 34 mulheres	0,110
Média de idades	33,85±8,18 anos	39,17±9,65 anos	0,005
Fumadores	9% (4/46)	22% (10/46)	0,082
Grupos profissionais	Enfermeiros – 27 Técnicos farmácia – 17 Auxiliares – 2		
Tempo médio acumulado de exposição a citostáticos	6,62±6,40 anos (6 meses-30 anos)		

Ambos os grupos apresentaram predomínio do género feminino, sem diferença significativa entre os dois ( $p=0,115$ ).

**Figura 4 – Distribuição da população estudada por género**

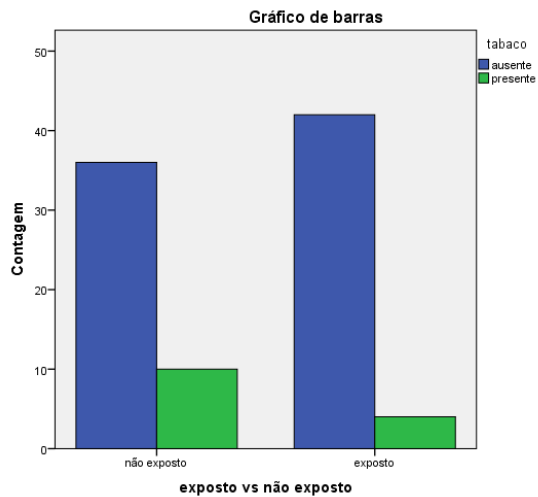


Os indivíduos não expostos apresentaram uma média etária significativamente superior à do grupo de expostos ( $39,17 \pm 9,65$  anos versus  $33,85 \pm 8,18$  anos, respetivamente,  $p=0,005$ ). Nos indivíduos expostos, a média etária foi semelhante entre o género masculino e o género feminino ( $35,67 \pm 11,21$  versus  $36,72 \pm 8,84$  anos, respetivamente,  $p=0,67$ ).

A percentagem de fumadores incluídos no estudo foi baixa (15%, correspondendo a 14 indivíduos), existindo mais fumadores no grupo de não expostos do que no grupo de expostos, mas sem atingir significado estatístico ( $p=0,082$ ).



**Figura 5 – Distribuição da população consoante os hábitos tabágicos**



A percentagem de fumadores no género masculino (16,7%) foi semelhante à do género feminino (14,9%),  $p=0,85$ .

A carga tabágica dos 14 indivíduos fumadores, expressa em número de cigarros por dia, encontra-se referida no quadro seguinte:

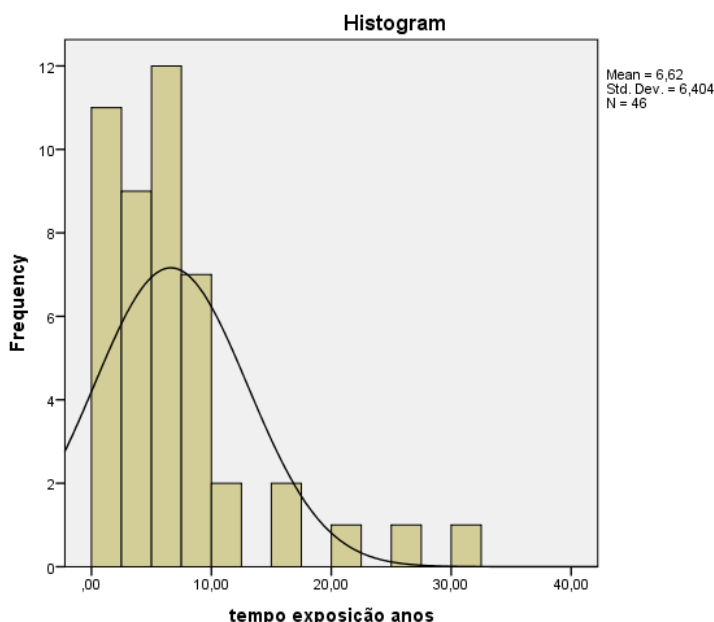
**Quadro 9 – Carga tabágica dos fumadores incluídos no estudo**

Nº código	Grupo	Género	Idade (anos)	Carga tabágica (nº cigarros por dia)
12	Exposto	Masculino	29	6
15	Exposto	Feminino	31	2
41	Exposto	Feminino	42	8
43	Exposto	Masculino	25	2
7C	Não exposto	Feminino	43	3
12C	Não exposto	Feminino	42	10
13C	Não exposto	Feminino	28	10
15C	Não exposto	Feminino	27	5
19C	Não exposto	Feminino	30	12
20C	Não exposto	Feminino	44	10
21C	Não exposto	Feminino	47	20
22C	Não exposto	Feminino	25	2
33C	Não exposto	Feminino	52	15
39C	Não exposto	Masculino	26	16

Como se pode observar, a carga tabágica do grupo de fumadores é relativamente baixa, com uma média de cerca de 8 cigarros/dia, variando entre os 2 e os 20; apenas um indivíduo fumava um maço por dia.

O tempo médio de exposição a citostáticos no grupo de estudo foi de  $6,62 \pm 6,40$  anos, com uma mediana de 5 anos e variando entre 6 meses e 30 anos.

**Figura 6 – Tempo de exposição a citostáticos no grupo de expostos**



Como se pode observar no gráfico a maior parte dos trabalhadores (87% - 40/46) apresentavam uma exposição inferior a 10 anos.

#### 4.3.2 Frequência de células micronucleadas em linfócitos do sangue periférico

Os resultados individuais do estudo da frequência de células micronucleadas em indivíduos expostos e não expostos encontram-se indicados no anexo 6. Os resultados globais encontram-se resumidos no quadro seguinte:

**Quadro 10 – Frequência global de células micronucleadas em linfócitos de sangue periférico de trabalhadores expostos e não expostos**

Análise global da frequência de células micronucleadas		Análise da frequência de células micronucleadas excluindo fumadores	
Expostos	Não expostos	Expostos	Não expostos
9,83 ± 8,65	5,09 ± 6,00	10,07 ± 9,02	5,56 ± 6,51
p=0,003		p=0,015	
Prof farmácia	Enfermeiros	Prof farmácia	Enfermeiros
8,88 ± 4,70	10,11 ± 10,67	8,88 ± 4,70	10,61 ± 11,51
p=0,66		p=0,56	

Globalmente, verificou-se existir uma frequência significativamente superior de células micronucleadas nos trabalhadores expostos quando comparados com os não expostos.

Os enfermeiros apresentaram maior frequência de células micronucleadas quando comparados com os profissionais de farmácia (para efeitos desta análise os dois auxiliares de enfermagem foram incluídos no grupo dos enfermeiros), sem atingir, no entanto, significado estatístico.

Registou-se também uma diferença significativa na frequência média de células micronucleadas entre fumadores e não fumadores: a frequência foi superior no grupo dos não fumadores ( $7,99 \pm 8,23$  versus  $4,50 \pm 3,37$  nos não fumadores –  $p=0,01$ ) motivo pelo qual se efectuou uma análise separada dos resultados não incluindo o pequeno grupo de fumadores estudado.

Excluindo o grupo dos fumadores da análise, as diferenças observadas entre expostos e não expostos e entre os dois grupos profissionais estudados não só não se alteram de forma significativa como se acentuam, consoante se pode verificar no Quadro 10.

Não houve correlação entre frequência média de células micronucleadas e idade (coeficiente de correlação de Pearson = 0,25;  $p=0,16$ ).

No entanto se, de acordo com o sugerido pela análise dos dados acumulados do projeto HUMN (Bonassi et al., 2001) dividirmos os indivíduos testados em 2 grupos etários, acima e abaixo dos 40 anos, verificamos que no grupo com 40 anos ou mais a frequência de células micronucleadas é substancialmente superior, quase atingindo significado estatístico:

**Quadro 11 – Frequência média de células micronucleadas acima e abaixo dos 40 anos de idade**

<b>idade em anos</b>	<b>N</b>	<b>Frequência média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Erro padrão da média</b>
<b>&gt;= 40</b>	31	9,58	11,304	2,030
<b>&lt; 40</b>	61	6,38	4,933	,632
$p=0.061$				



#### 4.3.2 Lesão do ADN em linfócitos de sangue periférico medida pelo teste do cometa

Os resultados individuais obtidos nos dois grupos estudados utilizando o teste do cometa encontram-se detalhadamente descritos no anexo 7.

Os resultados globais são sumariamente apresentados no quadro seguinte:

**Quadro 12 – Percentagem de ADN na cauda do cometa em linfócitos de sangue periférico de trabalhadores expostos e não expostos**

Percentagem média de ADN na cauda do cometa	
Expostos	Não expostos
15,18±9,50	12,38±8,42
p=0,14	
Prof farmácia	Enfermeiros
13,03±9,89	16,43±9,43
p=0,26	

Globalmente, o grupo exposto apresentou maior grau médio de lesão do ADN, indicada pela percentagem de ADN na cauda do cometa, quando comparado com o não exposto, mas sem que a diferença atingisse significado estatístico (15,18 ± 9,50 nos expostos versus 12,38 ± 8,42 nos não expostos, p=0,14).

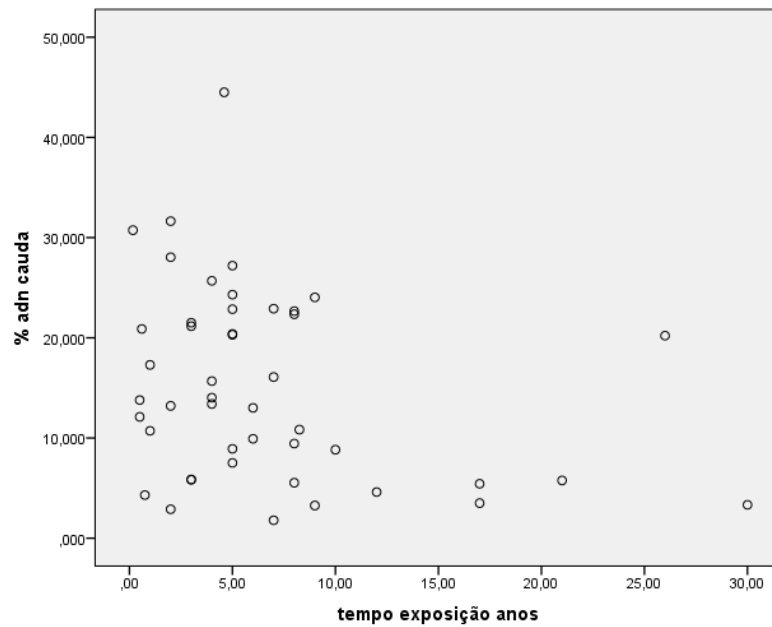
O grau de lesão do ADN também não foi significativamente diferente entre os dois géneros (14,52 ± 10,20 no género feminino versus 10,73 ± 8,65, p=0,11) e entre fumadores e não fumadores (14,29 ± 8,22 versus 13,69 ± 9,23, respetivamente, p=0,82).

De novo os profissionais de enfermagem apresentaram valores superiores aos de farmácia, mas sem atingir significado estatístico (16,43 ± 9,43 versus 13,03 ± 9,89, respetivamente, p=0,26).

Não se registou nenhuma correlação significativa entre a percentagem de ADN na cauda e a idade (coeficiente de correlação de Pearson = -0,05, p=0,6), mas houve uma correlação negativa com a duração da exposição: os profissionais com maior

antiguidade apresentaram valores mais baixos de lesão quando comparados com os de menor antiguidade (coeficiente de correlação de Pearson = -0,30, p=0,042).

**Figura 8 – Correlação entre tempo de exposição a citostáticos e percentagem de ADN na cauda do cometa**



## **5. DISCUSSÃO**

Com os resultados obtidos, o nosso estudo demonstrou que na realidade hospitalar concreta das duas unidades portuguesas estudadas existem efeitos biológicos mensuráveis indicativos de genotoxicidade ao nível dos linfócitos do sangue periférico tanto de profissionais de farmácia como de enfermagem que manipulam fármacos citostáticos.

Tal efeito pode estar relacionado com a contaminação generalizada das superfícies e equipamentos de trabalho por estes agentes químicos, frequentemente em locais e utensílios tocados sem luvas, que foi também demonstrada pelo nosso estudo, levando a que ocorra exposição cutânea dos trabalhadores.

O facto da contaminação ambiental se associar a efeitos biológicos nos profissionais expostos tem indubitavelmente a ver com, entre outros fatores, as práticas de trabalho adoptadas por estes. A análise do trabalho detalhada efetuada numa das unidades revelou diversos pontos susceptíveis de intervenção e melhoria e sugeriu ainda que a contaminação e a exposição cutânea a citostáticos pode ocorrer a diversos níveis dentro da unidade hospitalar, para além dos diretamente relacionados com a preparação e administração destes fármacos

### **5.1 Indicadores biológicos de efeito**

A aplicação dos indicadores biológicos de efeito escolhidos evidenciou a presença de genotoxicidade aumentada ao nível dos linfócitos do sangue periférico dos trabalhadores expostos aos agentes químicos em estudo, quando comparados com um grupo de trabalhadores não expostos.

A mesma observação foi feita já em diversos trabalhos publicados, consoante referido na secção inicial, e suporta a hipótese de que existem efetivamente efeitos biológicos mensuráveis indicativos de genotoxicidade aumentada no organismo dos trabalhadores expostos a citostáticos.



### 5.1.1 Teste de micronúcleos

No nosso estudo verificou-se uma diferença estatisticamente significativa na frequência de células micronucleadas em linfócitos do sangue periférico nos trabalhadores expostos a citostáticos por comparação com os trabalhadores não expostos a estes agentes químicos.

Este teste apresenta, consoante já foi referido, um elevado poder estatístico dado o grande número de células estudado (1000) por amostra, o que o torna especialmente adequado para detectar os efeitos de exposição crónica a baixos níveis de agentes genotóxicos como os que ocorrem em meio ocupacional.

Este elevado poder estatístico para detetar pequenas diferenças, a relativa facilidade técnica de realização e interpretação (quando comparado por exemplo com o estudo de aberrações cromossómicas) bem como o facto de traduzir lesão genómica cumulativa, demonstradamente associada em estudos prospetivos, a um risco aumentado de cancro, tornam o teste de micronúcleos, na nossa opinião, um teste de eleição para avaliar os efeitos da exposição ocupacional a agentes genotóxicos.

E o teste de micronúcleos tem efetivamente sido extensamente utilizado para avaliar a presença de lesão cromossómica em populações humanas expostas a agentes genotóxicos em contexto ocupacional.

Parte dos resultados obtidos por todos estes estudos foram incorporados no projecto HUMN (HUman MicroNucleus) que tentou estabelecer, utilizando uma base de dados com cerca de 7000 indivíduos estudados em 25 laboratórios de diversos países europeus um valor de referência “normal” para a frequência de micronúcleos na população geral tendo proposto 6,5% como valor de referência para a população geral, a usar em futuros estudos (Bonassi et al., 2001).

Este valor não se afasta muito do valor por nós encontrado na população de não expostos (5,9%), que tem a vantagem de ser constituída por trabalhadores não hospitalares e, portanto, não submetidos aos diversos fatores de risco para genotoxicidade presentes em meio hospitalar, incluindo a contaminação cruzada e à distância por citostáticos de áreas onde estes agentes supostamente não deveriam estar presentes.

No quadro 13 analisamos alguns dos estudos realizados sobre frequência de células micronucleadas quanto ao tipo de indivíduos utilizados como grupo controlo e respectiva frequência de micronúcleos.

Verificamos que alguns grupos usados como controlo, assinalados a sombreado, apresentam efetivamente uma frequência muito elevada deste indicador face ao valor apontado pelo projecto HUMN como valor basal para a população geral, sugerindo que se possam tratar de indivíduos expostos a algum tipo de agentes(s) genotóxico(s).

**Quadro 13 – Tipo de controlos utilizados e respectiva frequência média de células micronucleadas (MN) em linfócitos de sangue periférico**

	<b>Estudo</b>	<b>Controlos</b>	<b>Frequência MN nos controlos</b>
<b>Teste de micronúcleos</b>	Thiringer 1991	Trabalhadores não expostos do hospital	2,9
	Maluf 2000	Trabalhadores não expostos do hospital	11,5
	Pilger 2000	Trabalhadores não expostos do hospital	23,3
	Cavallo 2007	Administrativos do hospital	8,04
	Rekhadevi 2007	População geral	3,73
	Cornetta 2008	Administrativos do hospital	8,12
	Cavallo 2009	Familiares dos trabalhadores estudados	8,04
	Rombaldi 2009	Administrativos do hospital	2,88

Várias explicações são possíveis para este fenómeno, dependendo do tipo de trabalhadores selecionados e da forma como decorre o circuito dos citostáticos dentro de cada unidade hospitalar, devido à possibilidade já referida de contaminação cruzada entre diferentes zonas hospitalares.

A possibilidade de contaminação cruzada bem como a exposição a outros agentes genotóxicos presentes em meio hospitalar, apontam para a necessidade de escolher

e caracterizar de forma cuidadosa o grupo utilizado como controlo, não só relativamente à exposição inaparente a citotóxicos bem como relativamente à exposição a outros agentes genotóxicos ou a outros factores que possam influenciar a percentagem de células micronucleadas.

A elevada variabilidade dos valores obtidos no grupo controlo é indubitavelmente um fator importante na positividade ou negatividade dos estudos efetuados.

Os valores obtidos pelas diversas investigações para a frequência de células micronucleadas nos grupos de expostos são, por outro lado, quase uniformemente elevados (com duas exceções apenas) e substancialmente superiores ao valor sugerido como basal para a população geral, reforçando a hipótese de que uma possível causa da negatividade de alguns estudos esteja efetivamente na seleção do grupo controlo e não numa baixa sensibilidade do teste de micronúcleos.

**Quadro 14 – Frequência média de células micronucleadas em linfócitos de sangue periférico nos respectivos grupos de expostos e resultado do estudo**

	<b>Estudo</b>	<b>Frequência MN nos expostos</b>	<b>Resultado do estudo</b>
<b>Teste de micronúcleos</b>	Thiringer 1991	3,0	-
	Maluf 2000	13,5	-
	Pilger 2000	21,2	-
	Cavallo 2007	8,73	-
	Rekhadevi 2007	17,8	+
	Cornetta 2008	13,81	+
	Cavallo 2009	8,73	-
	Rombaldi 2009	4,04	+

No nosso trabalho a frequência de micronúcleos foi superior no género feminino tal como referido na literatura, mas sem atingir significado estatístico. Embora a maior parte dos estudos, mesmo com amostras de dimensões inferiores à nossa, refira uma predominância de células micronucleadas nas mulheres e esta seja corroborada

pelos resultados da extensa base de dados do projecto HUMN, esta *pool* de dados indica que a influência do género sobre a frequência de células micronucleadas tem um valor relativamente baixo quando tidos em conta todos os possíveis factores de confundimento (Bonassi et al., 2001), pelo que é natural que embora presente no nosso estudo, não tenha conseguido atingir significado estatístico face ao número relativamente pequeno de trabalhadores estudado.

O efeito do aumento da frequência de células micronucleadas em linfócitos do sangue periférico com o aumento da idade foi observado em diversos estudos. Os dados acumulados do projecto HUMN (Bonassi et al, 2001) sugerem que ele existe e que se torna particularmente evidente quando se divide a população em dois grupos: com mais ou com menos de 40 anos de idade.

Utilizando este valor etário como ponto de corte a frequência de células micronucleadas foi, no nosso estudo, efetivamente maior no grupo de trabalhadores com mais de 40 anos, embora não tenha atingido significado estatístico.

De novo este aumento de células micronucleadas com a idade patente quando se acumula a informação proveniente de diversos estudos, não existe em todos as investigações publicadas: factores como a dimensão da amostra e a sua distribuição por grupo etário bem como a influência do tempo de exposição podem contribuir para, nos estudos de menores dimensões, obscurecer esta relação.

A influência do tabagismo sobre a frequência de células micronucleadas é controversa, com estudos mostrando resultados díspares (Battershill, Burnett e Bull, 2008). Um estudo específico do projecto HUMN dirigido a este factor não encontrou, globalmente nenhum aumento significativo da frequência de células micronucleadas em fumadores (Bonassi et al., 2003).

Fenech relata que, após ajustamento para a idade e sexo, os indivíduos com consumo de tabaco muito elevado (superior a 30 cigarros por dia) apresentam uma frequência significativamente superior de células micronucleadas em linfócitos de sangue periférico quando comparados com não fumadores (Fenech, 1993). No nosso estudo não foi incluído nenhum fumador com esta carga tabágica e, curiosamente, verificou-se até existir uma frequência de células micronucleadas significativamente inferior no grupo de fumadores. Tal achado não é explicável pela distribuição por géneros ou grupo etário, semelhantes entre fumadores e não fumadores e poderá

ser apenas um resultado casual tendo em conta a dimensão da amostra, o pequeno número de fumadores nela contido e a baixa carga tabágica do grupo de fumadores (em todos os casos  $\leq 20$  cigarros por dia).

Apesar de este achado não ser facilmente explicável, os dados do projeto HUMN demonstram também que para indivíduos fumadores com carga tabágica inferior a 30 cigarros por dia, como sucede no nosso estudo, a frequência de células micronucleadas em linfócitos do sangue periférico é efetivamente inferior à dos não-fumadores (Bonassi et al, 2003).

### **5.1.2 Teste do cometa**

Quando testado quanto ao grau de lesão do ADN medido pelo teste do cometa, o grupo exposto apresentou níveis superiores de lesão, mas sem atingir significado estatístico.

Tal pode traduzir o menor poder estatístico deste teste, face ao menor número de células analisadas por amostra (100) em relação ao teste de micronúcleos (1000 por amostra), mas é preciso também ter em conta que os dois testes medem efeitos genotóxicos diferentes (lesão genética acumulada traduzindo exposição prolongada no caso do teste de micronúcleos e lesão genética transitória traduzindo exposição recente no caso do teste do cometa), pelo que não podem ser diretamente comparados um com o outro.

A lesão do ADN medida pelo teste do cometa é potencialmente reversível e reparável pelos mecanismos de defesa do organismo, sendo a sua deteção evidência de exposição recente a um agente genotóxico. A informação que este teste fornece deve, portanto, ser encarada como complementar da fornecida pelo teste de micronúcleos: este último é efetivamente um indicador de efeito biológico enquanto que o teste do cometa é considerado por alguns autores um indicador de dose bioquímica ou dose biológica efetiva (Moller, 2006)

A natureza transitória e auto-limitada da lesão do ADN detetada torna-o particularmente indicado para, por exemplo, juntamente com os indicadores de dose interna (medição de citostáticos ou seus metabolitos na urina) avaliar a eficácia de

medidas preventivas visando reduzir a exposição dos trabalhadores a agentes genotóxicos como os fármacos citostáticos.

À semelhança do verificado no nosso estudo, outros autores não conseguiram demonstrar a presença de uma relação clara entre o grau de lesão do ADN medido pelo teste do cometa e o género ou a idade (Moller et al, 2000).

Uma associação positiva com o consumo de tabaco tem sido sugerida, mas parece ser fraca e, portanto, de difícil deteção em estudos envolvendo um pequeno número de indivíduos (Moller et al, 2000), sobretudo quando como no nosso a percentagem de fumadores incluídos é baixa e a sua carga tabágica pequena.

O achado duma correlação negativa entre tempo de exposição e lesão do ADN, sugerindo que os indivíduos com menor tempo acumulado de exposição apresentam maior grau de lesão detetado pelo teste do cometa não é facilmente explicável.

É necessário ter em conta que a maior parte dos trabalhadores incluídos no nosso estudo apresentam tempo acumulado de exposição relativamente curto (inferior a 10 anos), pelo que este achado poderá ser apenas casual, relacionando-se com a preponderância numérica de trabalhadores com exposição curta incluídos no estudo face ao número relativamente pequeno de trabalhadores com exposições prolongadas.

As dimensões da nossa amostra e do nosso grupo controlo constituem certamente uma limitação do nosso estudo e implicam alguma cautela na interpretação dos resultados obtidos, embora estejam em linha com os diversos trabalhos similares publicados.

A título comparativo, podemos observar nos dois quadros seguintes as dimensões das amostras e dos grupos controlo utilizados por autores que previamente conduziram estudos semelhantes e verificar que globalmente não são muito diferentes dos por nós avaliados:

**Quadro 15 – Número de trabalhadores expostos a cistostáticos e indivíduos controlo avaliados em estudos usando o teste de micronúcleos**

	<b>Estudo</b>	<b>Amostra</b>	<b>Controlo</b>
<b>Teste de micronúcleos</b>	Thiringer 1991	60	60
	Maluf 2000	10	10
	Pilger 2000	39	39
	Cavallo 2007	23	20
	Rekhadevi 2007	60	60
	Cornetta 2008	83	73
	Cavallo 2009	30	76
	Rombaldi 2009	20	20
	Moretti 2013	52	52
	El-Ebiary 2013	30	30
	<b>MÉDIA</b>	<b>46 (10-83)</b>	<b>45 (10-76)</b>

**Quadro 16 – Número de trabalhadores expostos a cistostáticos e indivíduos controlo avaliados em estudos usando o teste do cometa**

	<b>Estudo</b>	<b>Amostra</b>	<b>Controlo</b>
<b>Teste do cometa</b>	Underger 1999	30	30
	Maluf 2000	10	10
	Kopjar 2001	50	20
	Ursini 2006	25	30
	Yoshida 2006	19	18
	Rekhadevi 2007	60	60
	Sasaki 2008	121	46
	Cornetta 2008	83	73
	Izdes 2009	19	19
	Cavallo 2009	30	76
	Rombaldi 2009	20	20
	Connor 2010	68	53
	Villarini 2010	52	52
	Buschini 2013	63	74
	Moretti 2013	52	52
<b>MÉDIA</b>	<b>47 (10-121)</b>	<b>42 (10-76)</b>	

A dimensão da nossa amostra enquadra-se nas utilizadas por outros estudos e curiosamente corresponde até aproximadamente à média do número de trabalhadores amostrado quando todos os estudos são analisados em conjunto.

A opção de incluir no grupo controlo um indivíduo por cada trabalhador da amostra deveu-se apenas ao facto de não ter sido possível obter um grupo de trabalhadores não expostos de maiores dimensões, como seria certamente desejável. O mesmo sucede na maior parte dos estudos publicados, existindo até estudos em que o grupo controlo apresenta um número de indivíduos inferior ao do grupo de estudo.

Claro que o baixo número de trabalhadores incluído no grupo controlo pode contribuir, no nosso caso como nos outros estudos, para retirar significância a resultados obtidos com testes de menor poder estatístico, como é o caso do teste do cometa.



O ideal seria dispor também, para além destes dois indicadores de efeito, necessariamente inespecíficos, de alguns indicadores de dose (presença de citostáticos ou seus metabolitos na urina dos trabalhadores expostos).

Tal demonstraria que, para além da exposição externa, existe também exposição interna relacionada com a efetiva absorção destes agentes químicos pelo organismo dos trabalhadores. Tal estava planeado no desenho inicial do nosso estudo, que previa o doseamento de indicadores biológicos de dose correspondentes aos citostáticos medidos nas superfícies e equipamentos na urina dos profissionais expostos (mais especificamente o doseamento de ciclofosfamida, paclitaxel e  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanina em amostras de urina colhidas pós turno por HPLC).

Não foi possível, no entanto, otimizar a técnica para doseamento destes indicadores, motivo pelo qual eles não foram medidos. Tal constitui obviamente uma limitação do nosso estudo, mas o facto de termos demonstrado que existe exposição externa por via cutânea bem como um aumento significativo de indicadores biológicos de efeito atribuíveis ao contacto com agentes genotóxicos no grupo com esta exposição por comparação com um grupo de trabalhadores não expostos, bem como os resultados da literatura, permitem-nos estabelecer com alguma segurança uma ligação entre o efeito observado e a exposição a citostáticos.

## **5.2 Contaminação de superfícies**

Os resultados por nós obtidos na medição da contaminação de superfícies e equipamentos estão de acordo com os resultados dos estudos prévios debruçando-se sobre o mesmo tema, tendo sido demonstrada uma contaminação generalizada da maioria dos locais analisados.

Particularmente preocupante foi a demonstração de contaminação em superfícies e equipamentos que são habitualmente tocados sem luvas porque os trabalhadores não sabem que existe contaminação a este nível. É o caso, por exemplo, das prateleiras das zonas de armazenamento de citostáticos, da mesa, cadeira e telefone da sala de apoio do hospital B e das mesas e bancadas de trabalho da zona de administração e das bombas infusoras em ambas as Unidades Hospitalares.

Os níveis mais elevados de contaminação encontrados no nosso estudo foram aliás precisamente em superfícies normalmente tocadas sem luvas (no hospital A as prateleiras de armazenamento dos citotóxicos e as bancadas de trabalho da área de administração e no hospital B de novo as bancadas de trabalho da administração, os carrinhos de apoio da mesma área e as bombas infusoras).

Estes achados indicam claramente uma necessidade de rever os procedimentos em termos de medidas de proteção coletiva (descontaminação de superfícies) e de proteção individual (uso de luvas em mais tarefas do que as atualmente realizadas com estes equipamentos de proteção).

Um resultado extremamente interessante do nosso estudo diz respeito à comparação da contaminação de superfícies entre as áreas de preparação e administração: em ambas as unidades hospitalares estudadas, a zona de administração apresentou valores significativamente superiores aos da zona de preparação (Viegas, 2014).

E talvez seja de valorizar, face a este achado e apesar da ausência de significado estatístico, o facto de ambos os indicadores biológicos estudados apresentarem valores mais elevados em profissionais de enfermagem do que em técnicos de farmácia.

A menor ênfase colocada na proteção dos enfermeiros, quer em termos de normas regulatórias quer em termos de formação específica deve, portanto, ser revista face à demonstração feita no nosso estudo de que a exposição é efetivamente maior na zona de administração de citostáticos onde estes profissionais trabalham do que na zona de preparação destes agentes.

A vigilância ambiental pressupõe não só a determinação da concentração do tóxico no ambiente de trabalho como também a sua comparação com referenciais externos de aceitabilidade, os Valores Limite de Exposição (VLEs). Estes representam a maior concentração de uma substância química a que a quase totalidade dos trabalhadores pode estar exposta ao longo da jornada de trabalho sem que daí resultem efeitos adversos para a saúde (ACGIH 2000 citada por Prista 2006).

A tendência tem sido, no entanto, dada a natureza estocástica dos principais efeitos para a saúde associados à exposição ocupacional crónica a estes agentes, para valorizar qualquer nível de contaminação detetada seja qual for o valor medido. Esta é também a nossa posição: o objetivo quando lidamos com efeitos sobre a saúde

deste tipo será sempre obter o menor nível de contaminação possível com os meios técnicos existentes, tendencialmente zero (princípio ALARA ou *As Low As Reasonably Achievable*).

A opinião relativamente consensual neste momento é efetivamente a de que para os agentes genotóxicos não é possível estabelecer uma relação dose-efeito de tipo determinístico e, portanto, não existe um limiar de segurança abaixo do qual o risco do efeito adverso (neste caso o cancro) ocorrer seja nulo ou negligenciável (Henderson; Albertini; Aardema, 2000).

Tal está de acordo com o que se sabe sobre os mecanismos de cancerigénese: o cancro resulta, pensa-se, de múltiplos eventos genéticos sequenciais ocorrendo numa única célula ou num pequeno número de células iniciadas. Mesmo os agentes não genotóxicos actuam aumentando a frequência de eventos genéticos espontâneos ou interferindo com a sua reparação. É biologicamente plausível, portanto, que não exista um limiar de dose seguro, sendo largamente assumido que relativamente ao cancro não existe limitar de dose abaixo da qual o risco seja negligenciável (Tomatis et al., 1997).

Há ainda que ter em consideração fatores como a suscetibilidade individual e as co-exposições: um nível de exposição considerado relativamente seguro para um único agente pode não o ser no contexto da exposição múltipla a outros agentes genotóxicos.

Todos estes fatores tornam muito difícil que se consigam estabelecer valores limite de exposição para agentes citotóxicos que ofereçam alguma garantia fiável em termos de proteção da saúde dos trabalhadores.

A eles acresce o facto das medições de contaminação por *wipe sampling* nem sempre serem feitas usando o mesmo método de medição e serem muitas vezes expressas em unidades diferentes, o que dificulta bastante a comparação de resultados, em termos de níveis de contaminação, entre diferentes estudos.

Por todos estes motivos fizemos a opção de, na revisão inicial da literatura, indicar apenas se foi ou não encontrada contaminação e não os valores desta medidos em cada estudo. De igual modo valorizamos apenas o facto de ter sido encontrada contaminação e os locais onde ela foi detectada, sem proceder a uma comparação quantitativa com valores encontrados noutros estudos.

### 5.3 Análise do trabalho

Da confrontação entre normas (tarefa) e atividade resultante da aplicação simultânea da ISOPP Audit Tool e da observação direta da atividade de trabalho ressaltam diversos pontos importantes que explicam que no nosso estudo a contaminação tenha sido encontrada em quase todas as superfícies testadas. Alguns destes pontos foram revelados apenas pela aplicação da ISOPP Audit Tool, outros apenas pela observação direta da atividade de trabalho e outros ainda foram evidenciados por ambos os instrumentos. Estes dois instrumentos são assim complementares no confronto entre tarefa prescrita e atividade real de trabalho, sendo de toda a vantagem que sejam usados em simultâneo de modo a maximizar a informação obtida.

#### 5.3.1 Preparação

No que respeita às condições para garantir a esterilidade das preparações, a maior parte dos aspetos focados neste item diz respeito a garantir a qualidade e esterilidade do produto e, portanto, a segurança do doente que o vai receber. Existem alguns aspetos, no entanto que se relacionam também com a saúde dos trabalhadores que fazem as preparações.

Assim, o facto de na zona de preparação não ser efetuada nenhuma monitorização regular da contagem de partículas no ar, da velocidade do ar e da integridade do filtro HEPA favorece a contaminação aérea e de superfícies e equipamentos de trabalho ao nível da própria câmara.

Adicionalmente, a CFALV não possui tubagem independente para entrada e saída de ar da câmara e não está ligada 24h por dia 7 dias por semana. Tais factos mais uma vez favorecem a contaminação das próprias superfícies internas da câmara.

A aplicação da ISOPP Audit Tool demonstrou, portanto que a própria CFALV é um ponto crítico a estudar que não foi alvo de análise no presente estudo: a colheita de diversas amostras por *wipe sampling* quer no exterior quer no interior da própria câmara bem como a monitorização dos níveis de contaminação aérea por amostragem individual nos trabalhadores que trabalham na câmara seriam dois pontos-chave a analisar.

Acresce a isto que a CFALV não é usada exclusivamente para a preparação de citotóxicos, mas também para a preparação de anticorpos monoclonais, o que pode originar contaminação cruzada para diversas partes do hospital.

Apesar da adesão ao uso de EPIs ser elevada ao nível da preparação, há um ponto importante a salientar, revelado pela observação direta da atividade de trabalho, e tornado extremamente importante pela ausência de controlo sobre o grau de descontaminação química no interior da CFALV.

Diversos estudos (Connor 1984, Laidlaw 1984, Colligan 1990, Wallemacq 2006) demonstram que a permeação das luvas de proteção por citostáticos é um facto após um determinado intervalo de tempo, variável de citostático para citostático. É este facto que está na base da recomendação de que as luvas sejam trocadas a cada 30 minutos, recomendação esta que não é seguida pelos profissionais que efetuam a preparação dentro da CFALV (que na realidade trocam de luvas apenas nas pausas programadas, de duas em duas horas). Esta atitude poderá estar na base de exposição por via dérmica, dado como vimos não haver garantia da adequada descontaminação química do interior da câmara e existirem estudos que demonstram existir contaminação do exterior das próprias ampolas dos citostáticos manipulados.

A pressão temporal foi o motivo invocado para a não adoção do procedimento de troca mais frequente de luvas, que é uma prática generalizada a todos os profissionais de farmácia que manipulam os citostáticos incluídos neste estudo.

Em termos teóricos, a preparação é a atividade com maior risco de exposição, dado serem manipulados diretamente fármacos citostáticos na sua forma pura e concentrada, sendo o resultado final desta atividade um preparado teoricamente livre de contaminação. Esta atividade é, no entanto, a mais sujeita a normas regulatórias e aquela em que os profissionais recebem maior nível de treino e educação.

Apesar de terem sido encontrados, no confronto entre normas regulatórias e atividade real, diversos pontos que podem ser alvo de melhoria, os nossos resultados sugerem que a exposição é na realidade menor nesta atividade do que em atividades menos reguladas e exercidas por profissionais com menor nível de treino específico como é o caso da administração.

### **5.3.2 Administração**

A análise da atividade de trabalho mostrou diferenças substanciais entre os modos operatórios e, conseqüentemente, os modos de exposição, dos dois grupos profissionais estudados.

O nosso estudo demonstrou existir contaminação ao nível do *transfer* e dos sacos de infusão contendo citostáticos, mas estes não serão os pontos mais críticos em termos de exposição dos profissionais de enfermagem.

Os sacos de infusão são recolhidos e manipulados, até à altura da conexão à linha endovenosa do doente, com um duplo par de luvas de nitrilo e estas são imediatamente descartadas para um contentor de resíduos logo após a manipulação. Quando a infusão termina, o saco e todo o sistema infusor é retirado em conjunto também com um duplo par de luvas, sendo todos estes materiais descartados para um contentor de resíduos.

Todos os outros procedimentos, no entanto, são executados sem luvas e os enfermeiros tocam sem o saber em inúmeras superfícies contaminadas sem qualquer espécie de proteção, incluindo as bancadas e tabuleiros de trabalho, os carrinhos de apoio, os teclados das bombas infusoras que é preciso ocasionalmente regular, os braços dos cadeirões e as superfícies expostas das camas onde os doentes recebem a quimioterapia, as maçanetas das portas e as prateleiras onde são armazenados produtos diversos.

### **5.3.3. Outros pontos críticos**

#### **5.3.3.1 Transporte**

Os citotóxicos são transportados internamente na embalagem original, pelo que um ponto de amostragem útil para avaliar a contaminação e os diversos grupos profissionais expostos, para além de enfermeiros e técnicos de farmácia, seria o exterior destas embalagens. Existem estudos publicados a demonstrar contaminação a este nível (Connor 2005, Touzin 2008, Naito 2012). Esta análise não

foi feita no nosso estudo, mas deve ser incluída em avaliações posteriores da contaminação ambiental.

Durante o transporte interno não existe *kit* para extravasão de citotóxicos, o que aumenta o risco de contaminação para os trabalhadores em caso de quebra dos recipientes. A isto acresce o facto de os trabalhadores responsáveis pelo transporte interno não receberem qualquer formação nem treino específicos para lidar com citotóxicos e portanto se encontrarem bastante desprotegidos face a um acidente em que ocorra derrame de citotóxicos.

Este é indubitavelmente um passo do circuito interno destes fármacos identificado pelo nosso estudo que deve ser alvo de avaliação por *wipe sampling* em diversos pontos e que apresenta várias necessidades em termos de intervenção preventiva.

Os profissionais responsáveis pelo transporte, regra geral auxiliares de ação médica, não foram incluídos neste estudo, mas são um grupo que merece sem dúvida ser alvo de estudos posteriores com recurso a indicadores biológicos de dose e de efeito.

### **5.3.3.2 Educação e treino**

Outro ponto importante de intervenção revelado pela aplicação da ISOPP Audit Tool diz respeito à educação e treino dos diversos grupos profissionais que lidam com fármacos citostáticos.

Com efeito, só existe um programa de formação específico e documentado para os profissionais da farmácia, não existindo nada semelhante dirigido a médicos, enfermeiros, auxiliares e pessoal responsável pelo transporte e pela limpeza.

Com excepção dos profissionais de enfermagem, estes grupos não têm sido incluídos nos estudos usando indicadores biológicos pelo que se desconhece qual o impacto que a exposição a citotóxicos poderá ter sobre eles em termos de absorção e de efeitos genotóxicos.

### 5.3.3.3 Limpeza e destino dos itens contaminados

Os procedimentos de limpeza e descontaminação são outro ponto crítico revelado quer pela ISOPP Audit Tool quer pela observação direta da atividade de trabalho.

Apenas a limpeza da CFALV e das bancadas da zona limpa é feita por profissionais de farmácia com treino e conhecimentos próprios nesta área. A limpeza de todas as outras zonas, superfícies e equipamentos é feita por uma empresa externa, utilizando pessoal com elevada rotatividade e sem formação específica sobre citostáticos. É feita sem a utilização de todos os EPIs necessários nomeadamente máscara, luvas e óculos. Os trabalhadores da limpeza, que não são alvo do presente estudo dado não pertencerem aos quadros das unidades hospitalares, encontram-se indubitavelmente sujeitos a um risco elevado de exposição.

É de salientar que existe da parte dos profissionais uma preocupação muito maior com os procedimentos de desinfeção, destinados a assegurar a esterilidade das preparações e, portanto, a segurança dos doentes que as recebem, do que com os procedimentos de descontaminação química, destinados a remover os resíduos de citotóxicos das superfícies de trabalho e assim a garantir a segurança dos profissionais de saúde que manipulam estes agentes.

Os procedimentos de descontaminação não são realizados com frequência nem é tido o cuidado de efetuar a validação química necessária para assegurar a sua eficácia.

A estes aspectos relacionados com a eficácia dos processos de limpeza e descontaminação acresce o facto de não existir um plano regular que contemple todos os locais potencialmente contaminados.

Assim, tanto na zona de preparação como na zona de administração, as prateleiras e armários de armazenamento foram uma das zonas escolhidas dado não serem limpos de forma regular nem possuírem nenhum sistema de exaustão ou de *air lock* e serem tocados sem luvas. E efetivamente demonstrou-se existir a este nível contaminação por citostáticos em ambas as unidades hospitalares.

Também o modo de lidar com determinados itens contaminados é um ponto a necessitar de intervenção, revelado por ambos os instrumentos utilizados.



No que diz respeito aos resíduos, existe um circuito próprio e contentores adequados, mas não existem procedimentos próprios para lidar com fluidos corporais ou roupas dos cadeirões e camas dos doentes tratados. Estas roupas contaminadas dos doentes tratados com citostáticos não são separadas nem identificadas, seguindo juntamente com a restante roupa do hospital e não são alvo de nenhum procedimento específico na lavandaria. Os trabalhadores que lidam com estas roupas, desde a recolha até ao processamento na lavandaria fazem-no sem luvas e sem sequer terem conhecimento de que estão a lidar com roupas contaminados por citostáticos.

Estes aspectos são importantes não apenas em termos teóricos, mas também práticos dado num estudo prévio ter sido demonstrado que existem níveis mensuráveis de citotóxicos ao nível das roupas em contacto com a pele dos doentes tratados com estes fármacos (Fransman et al., 2007b).

A aplicação da ISOPP Audit Tool e a observação da atividade de trabalho conduzidas no nosso estudo revelaram existir uma diversidade muito grande de pontos potencialmente contaminados a estudar por *wipe sampling* não avaliados neste estudo, mas sem dúvida a merecerem análise em estudos posteriores.

Concentrámo-nos neste trabalho nos pontos que nos pareceram mais críticos, por estarem sujeitos a níveis mais elevados de contaminação e poderem originar contacto dérmico por permeação através das luvas ou por serem tocados mais frequentemente sem luvas dado os trabalhadores não terem a noção de que poderão estar contaminados.

Os nossos resultados indicam, no entanto, que existem muitos mais pontos eventualmente contaminados que seria útil analisar, bem como a exposição de um leque muito mais vasto de profissionais de saúde expostos do que os incluídos quer no nosso estudo quer na maior parte dos estudos respeitantes a este tema.

Nesse sentido vai o trabalho efetuado por Hon e colaboradores (Hon et al., 2011) que estudaram todo o circuito percorrido pelos fármacos citostáticos desde a entrega até à fase final de eliminação de resíduos. Foi encontrada contaminação de superfícies em todos os locais analisados ao longo deste circuito, indicando que o número de profissionais expostos é muito maior do que simplesmente os

responsáveis pela preparação e pela administração destas drogas, tradicionalmente os alvos de estudos sobre os efeitos biológicos dos citostáticos nos trabalhadores.

Apesar de algumas dúvidas que ainda permanecem sobre os efeitos para a saúde relacionados com a exposição ocupacional a citostáticos, inevitáveis face à dificuldade que existe em os estudar, de acordo com a Conferência das Nações Unidas sobre o Ambiente e Desenvolvimento, que decorreu em Junho de 1992 no Rio de Janeiro *“sempre que exista a possibilidade de efeitos graves e irreversíveis a falta de conhecimento científico não deve ser usada como argumento para a não aplicação ou o adiamento de medidas ambientais”* (Espina, 2013). É, portanto, urgente tomar medidas visando reduzir ao mínimo possível a contaminação do ambiente de trabalho por citostáticos a fim de proteger a saúde dos trabalhadores que os manipulam.

A rapidez e eficácia de intervenção são particularmente importantes quando estamos a lidar com efeitos genotóxicos, que ocorrem a longo prazo, o que leva, a que exista um período de tempo muito longo após determinada intervenção para que se notem os seus efeitos benéficos. Para a maior parte dos carcinogéneos ocupacionais o período de latência é superior a 20 anos. Tal é ilustrado pelo facto de, apesar de ter ocorrido uma diminuição marcada na exposição ocupacional a asbestos nos países ocidentais, a incidência de mesotelioma ainda não apresentar uma redução significativa (Tomatis et al., 1997).

Por outro lado, é indiscutível que doses mais baixas de um agente químico carcinogénico se associam a menor incidência de cancro e a um período de latência mais prolongado. Tal leva a que a redução da exposição tenha um indiscutível efeito benéfico que, em Saúde Pública apesar do período de latência prolongado, é indubitavelmente bastante elevado, tendo em conta os grandes grupos populacionais envolvidos (Tomatis et al., 1997).

Os resultados do nosso estudo indicam assim a necessidade de uma intervenção, quer no âmbito da melhoria das práticas de trabalho por forma a aproximá-las da regulamentação e das normas existentes, quer no âmbito da monitorização da contaminação ambiental, que deve ser alargada a mais pontos e repetida de forma regular e planeada, com o objectivo de reduzir ao mínimo possível a exposição dos

trabalhadores e evitar o aparecimento de efeitos biológicos potencialmente adversos no seu organismo.

## 6. CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu-nos tirar conclusões importantes, com repercussão imediata e direta, sobre a manipulação de fármacos citostáticos por parte de profissionais de enfermagem e de farmácia das duas unidades hospitalares estudadas. Trata-se de unidades de grande dimensão em Lisboa, uma das quais constitui o principal centro de terapêutica oncológica de toda a região Sul do país.

Os profissionais de saúde estudados apresentam efeitos biológicos de genotoxicidade detetáveis ao nível dos linfócitos do sangue periférico, medidos pelo teste de micronúcleos.

Este não é apenas um indicador sensível de genotoxicidade como foi associado por estudos prospetivos a um risco aumentado de cancro, pelo que se torna necessário desencadear medidas visando reduzir a exposição e a sua repercussão sobre a saúde dos trabalhadores.

A avaliação ambiental revelou uma contaminação generalizada de superfícies e equipamentos de trabalho, favorecendo a exposição cutânea dos trabalhadores.

Esta contaminação foi mais marcada na área de administração relativamente à de preparação, mas em ambos os locais foi detetada em locais e utensílios habitualmente tocados pelos trabalhadores sem luvas.

Foi inclusivamente detectada contaminação com fármacos que não tinham sido manipulados no dia das colheitas, apontando para a existência de procedimentos de descontaminação inadequados e incompletos.

É necessário implementar medidas quer visando reduzir o grau de contaminação (por exemplo, através da revisão e melhoria dos procedimentos de limpeza e descontaminação) quer visando reduzir a exposição dos trabalhadores que exercem a sua atividade nos locais contaminados (por exemplo, através do uso de luvas em todas as atividades de trabalho implicadas).

A ISOPP Audit Tool e o registo da atividade de trabalho em grelha própria revelaram-se instrumentos complementares e extremamente úteis na área da Saúde Ocupacional.

Permitiram identificar pontos críticos a estudar e monitorizar por *wipe sampling* bem como detetar várias áreas suscetíveis de intervenção com vista a reduzir a exposição dos trabalhadores a citostáticos.

## 7. RECOMENDAÇÕES/PROPOSTAS

Várias recomendações e propostas emergem deste estudo, algumas relacionadas com áreas que merecem ser alvo de estudos posteriores, outras de natureza prática visando alterar procedimentos que favorecem a exposição cutânea dos trabalhadores aos fármacos citostáticos.

Um estudo incluindo maior número de trabalhadores dos grupos profissionais avaliados, mais unidades hospitalares e o recurso adicional a indicadores de dose interna (doseamento dos citostáticos ou seus metabolitos na urina) permitiria:

- Reforçar os resultados encontrados;
- Tornar significativos achados que face à dimensão da nossa amostra são apenas tendências;
- Revelar novos dados não detetados por este estudo.

Seria interessante conduzir uma investigação mais alargada incluindo outros profissionais que o nosso trabalho revelou poderem estar significativamente expostos a citostáticos, nomeadamente:

- Auxiliares de ação médica envolvidos no transporte intra-hospitalar dos citotóxicos e na remoção e limpeza das roupas de cama dos doentes tratados;
- Trabalhadores da limpeza envolvidos na higienização das zonas de administração e de parte das zonas de preparação destes fármacos.

Existem diversos pontos ao longo de todo o circuito que os citostáticos percorrem dentro das unidades hospitalares que a nossa investigação sugere que devem ser analisados por *wipe sampling*, pois encontram-se possivelmente contaminados e constituem potenciais fontes de exposição cutânea dos trabalhadores; estes incluem os diversos pontos relacionados com o transporte interno de citostáticos, bem como a própria câmara de fluxo laminar vertical e as roupas em contato com os doentes tratados.

O método de *wipe sampling* mostrou-se extremamente útil para avaliar a contaminação de superfícies e equipamentos, devendo ser utilizado de forma mais alargada e repetido ao longo do tempo, por forma a avaliar a eficácia das medidas tomadas com vista a reduzir a contaminação do ambiente de trabalho por citostáticos.

Existem ainda diversas implicações práticas dos nossos resultados nas unidades hospitalares estudadas em termos de procedimentos de trabalho e de uso dos equipamentos de proteção individual.

Como medida imediata, pois é a mais rápida e simples de implementar antes que sejam postas em ação as medidas visando reduzir a contaminação ambiental, o uso de luvas adequadas para proteção contra citostáticos é necessário não apenas durante a preparação das misturas de citostáticos (no caso dos profissionais de farmácia) e durante a manipulação direta destas misturas (no caso dos profissionais de enfermagem), mas também durante as tarefas executadas nas zonas adjacentes à zona de preparação e em todas as atividades realizadas nas salas de administração. Este uso de luvas deve ser extensivo aos auxiliares de ação médica que lidam com as roupas de cama dos doentes tratados e aos funcionários que asseguram a limpeza de todas as zonas onde são manipulados estes fármacos.

Os procedimentos de limpeza de todas as zonas e equipamentos em contato com citostáticos devem ser revistos.

A descontaminação de superfícies (e não apenas a sua desinfecção) deve ser feita de forma regular (diária) e cuidadosa e a sua eficácia deve ser validada por *wipe sampling*.

Deve ser implementado um plano de limpeza que inclua de forma regular todas as superfícies e equipamentos potencialmente contaminados e não apenas os pavimentos como é a prática atual.

Foram detetadas diversas lacunas na formação e informação específicas dos trabalhadores que lidam com estes agentes.

Os profissionais de enfermagem necessitam não apenas de formação, mas também de normas e procedimentos escritos semelhantes aos que existem para os profissionais de farmácia.

A formação deve estender-se a outros grupos de profissionais que lidam com citostáticos como os auxiliares de ação médica e os responsáveis pela limpeza.

Algumas destas medidas terão um impacto imediato e a sua eficácia pode ser avaliada de forma rápida quer ao nível do grau de contaminação ambiental (repetição da amostragem por *wipe sampling* das zonas envolvidas) quer ao nível dos

indicadores biológicos de efeito traduzindo exposição recente (repetição do teste do cometa e comparação dos valores médios de lesão do ADN encontrados antes e depois das intervenções).



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acar, H., Caliskan, U., Demirel, S., Largaespada, D.A. - Micronucleus incidence and their chromosomal origin related to therapy in acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients: detection by micronucleus and FISH techniques. **Teratog Carcinog Mutagen** 21 (2001) 341-347.
- Albertini, R. J., Nicklas, J. A., O'Neill, J. P. - Future research directions for evaluating human genetic and cancer risk from environmental exposures. **Environ Health Perspect** 104 (1996) 503-510.
- Albertini, R. J., Anderson, D., Douglas, G..R., et al. - IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutat Res** 43 (2000) 134-136.
- Allen, M., Poweres, M. L. E., Gronowski, K. S., Gronowski, A. M. - Human Tissue Ownership and use in research: what laboratorians and researchers should know. **Clinical Chemistry** 56 (2010) 1675-1682.
- Anderson, D., Plewa, M. - The international comet assay workshop. **Mutagenesis** 13 (1998) 67-73.
- Angerer, J., Bader M., Krämer, A. - Ambient and biochemical effect monitoring of workers exposed to ethylene oxide. **Int Arch Occup Environ Health** 71 (1998) 14-18.
- Angerer, J., Ewers, U., Wilhelm, M. - Human biomonitoring: state of the art. **Int J Hyg Environ Health** 210 (2007) 201-228.
- Arlt, V. M., Frei, E., Schmeiser, H. H. - ECNIS-sponsored workshop on biomarkers of exposure and cancer risk: DNA damager and DNA adduct detection and 6<sup>th</sup> GUM-32P-postlabelling workshop, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany. **Mutagenesis** 22 (2007) 83-88.
- Arnon, J., Meirow, D., Lewis-Roness, H., Ornoy, A. - Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. **Hum Reprod Update** 7 (2001) 394-403.
- ASHP – American Societt of Health System Pharmacist. Guidelines on Quality Assurance for Pharmacy-Prepared Sterile Products. Disponível em [http://www.ashp.org/s\\_ashp/7](http://www.ashp.org/s_ashp/7). Consultado em janeiro de 2016.
- Au, W. W. - Usefullness of biomarkers in population studies: from exposure to susceptibility and to prediction of cancer. **Int J Hyg Environ-Health** 210 (2007) 239-246.

- Aydemir, N., Bilaloglu, R. - Genotoxicity of two anticancer drugs, gemcitabine and topotecan, in mouse bone marrow in vivo. **Mutat Res** 537 (2003) 43–51.
- Barcelona Declaration in Developing Good Workplace Health Practice in Europe. European Network for Workplace Health Promotion. [Internet]. Consultado em 10 de janeiro de 2016. Disponível em: [http://www.enwhp.org/fileadmin/downloads/declaration\\_english\\_a3\\_01.pdf](http://www.enwhp.org/fileadmin/downloads/declaration_english_a3_01.pdf)
- Battershill, J. M., Burnett, K., Bull, S. - Factors affecting the incidence of genotoxicity biomarkers in peripheral blood lymphocytes: impact on design of biomonitoring studies. **Mutagenesis** 23 (2008) 423–437.
- Bawle, E. V., Conard, J. V., Weiss, L. - Adult and two children with fetal methotrexate. **Teratology** 57 (1998) 51–5.
- Bento, M. J, Barros, A. - Estilo de vida e factores de risco ocupacionais no carcinoma da bexiga. **Acta Médica Portuguesa** 10 (1997) 39-45.
- Bergmark, E. - Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and non-smokers. **Chem Res Toxicol** 10 (1997) 78-84.
- Bernstein, K. A., Rothstein, R. - At loose ends: resealing a double-strand break. **Cell** 137 (2009) 807-810.
- Blair, A., Zheng, T., Linos, A., Stewart, P. A., Zhang, Y. W., Cantor, K. P. - Occupation and leukemia: a population-based case-control study in Iowa and Minnesota. **Am J Ind Med** 40 (2001) 3-14.
- Blot, W. J , Tarone, R. E. - Doll and Peto's quantitative estimates of cancer risk: holding generally true for 35 years. **J Natl Cancer Inst** 107 (2015) djv044.
- Boffetta, P., Kogevinas, M., Simonato, L., et al. - Current perspectives on occupational cancer risks. **Int J Occup Environ Health** 1 (1995) 315-325.
- Boffetta, P., van der Hel, O., Norppa, H., et al. - Chromosomal aberrations and cancer risk: results of a cohort study from central Europe. **Am J Epidemiol** 165 (2007) 36-43.
- Bonassi, S., Hagmar, L., Strömberg, U., et al. - Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer risk independently of exposure to carcinogens. **Cancer Res** 60 (2000) 1619-1625.
- Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., et al. - Human MicroNucleus Project: international database comparison for results with the citocinesis-block

micronucleus assay in human lymphocytes: effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. **Environ Mol Mutagenesis** 37 (2001) 31-45.

- Bonassi, S., Neri, M., Lando, C., et al. - Effect of smoking habits on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus Project. **Mutat Res** 543 (2003) 155-166.
- Bonassi, S., Lando, C., Ceppi, M., et al. -No association between increased levels of high-frequency sister chromatid exchange cells (HFCs) and the risk of cancer in healthy individuals. **Environ Mol Mutagen** 43 (2004) 134-136.
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., et al. - An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis** 28 (2007) 625-631.
- Boos, G., Stopper, H. - Genotoxicity of several clinically used topoisomerase II inhibitors. **Toxicol Lett** 116 (2000) 7-16.
- Brendler-Schwaab, S., Hartmann, A., Pfuhler, S., Speit, G. - The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis** 20 (2005) 245-254.
- Brogger, A., Hagmer, L., Hansteen, I.L., et al. - An inter-Nordic prospective study on cytogenetic endpoints and cancer risk. Nordic study group on the health risk of chromosome damage. **Cancer Genet Cytogenet** 45 (1990) 85-92.
- Browsers, E. E. M, Huitema, A. D. R., Bakker, E. N. , et al. - Monitoring of platinum surface contamination in seven Dutch hospital pharmacies using inductively coupled plasma mass spectrometry. **Int Arch Occup Environ Health** 80 (2007) 689-699.
- Burgaz, S., Karahalil, B., Canli, Z., et al. - Assessment of genotoxic damage in nurses occupationally exposed to antineoplastics by the analysis of chromosomal aberrations. **Hum Exp Toxicol** 21 (2002) 129-135.
- Burnett, C., Robinson, C., Walker, J. - Cancer mortality in health and science technicians. **Am J Ind Med** 36 (1999)155-8.
- Buschini, A., Villarini, M., Feretti, D., et al. - Multicentre study for the evaluation of mutagenic/carcinogenic risk in nurses exposed to antineoplastic drugs: assessment of DNA damage. **Occup Environ Med** 70 (2013) 789-794.

- Castiglia, L., Miraglia, N., Pieri, M., et al. - Evaluation of occupational exposure to antineoplastic drugs in an Italian hospital oncological department. **J Occup Health** 50 (2008) 48-56.
- Cavallo, D., Ursini, C.L., Perniconi, B., et al. - Evaluation of genotoxic effects induced by exposure to antineoplastic drugs in lymphocytes and exfoliated buccal cells of oncology nurses and pharmacy employees. **Mutat Res** 587 (2005) 45-51.
- Cavallo, D., Ursini, C.L., Omodeo-Salé, E., Iavicoli, S. - Micronucleous induction and FISH analysis in buccal cells and lymphocytes of nurses administering antineoplastic drugs. **Mutat Res** 628 (2007) 11-18.
- Cavallo, D., Ursini, C.L., Rondinone, B., Iavicoli, S., 2009. - Evaluation of a suitable DNA damage biomarker for human biomonitoring of exposed workers. **Environ Mol Mutagen** 50 (2009) 781-790.
- CE – Mémento pour l'évaluation des risques professionnels. Luxembourg: Office des Publications Officielles des Communautés Européennes, 1996 (Santé et Sécurité).
- Chen, S. Y., Wang, L. Y., Lunn, R. M., et al. - Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in liver tissues of hepatocellular patients and controls. *Int J Cancer* 99 (2002) 14-21.
- Cheung, H. H. - DNA methylation of cancer genome. **Birth Defects Res C Embryo Today** 87 (2009) 335-350.
- Chia, K. S., Lee, H.P. - Occupational cancers. In: Koh, D., Chia, K.S., Jeyaratnam, J. (Eds.), **Textbook of Occupational Medicine Practice**, 2nd ed. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, Singapore. 2001.
- Choudhury, R. C., Palo, A. K., Padhy, A. - Cytogenetic consequences of vinblastine treatment in mouse bone marrow. **Chemotherapy** 50 (2004) 171–177.
- Chu, W. C., Hon, C. Y., Danyluk, Q., et al. - Pilot assessment of the antineoplastic drug contamination levels in British Columbian hospitals pre- and post-cleaning. **J Oncol Pharm Pract** 18 (2012) 46-51.
- Colligan, S. A., Horstman, S.W. - Permeation of cancer chemotherapeutic drugs through glove materials under static and flexed conditions. **Appl Occup Environ Hyg** 5 (1990) 848–852.

- Connor, T. H., Laidlaw, J. L., Theiss, J. C., et al. Permeability of latex and polyvinyl chloride gloves to carmustine. **Am J Hosp Pharm** 41 (1984) 676–679.
- Connor, T. H., Anderson, R. W., Sessink, P. J. M., et al. - Surface contamination with antineoplastic agents in six cancer treatment centers in Canada and the United States. **AM J Health-Syst Pharm** 56 (1999) 1427-1432.
- Connor, T. H., Sessink, P. J. M., Harrison, B. R., et al. - Surface contamination of chemotherapy drug vials and evaluation of new vial-cleaning techniques: results of three studies. **Am J Health-Syst Pharm** 26 (2005) 475-484.
- Connor, T. H., DeBord, G., Pretty, J. R., et al. - Evaluation of antineoplastic drug exposure of health care workers at three university-based US cancer centers. **JOEM** 52 (2010) 1019–1027.
- Conselho Europeu – Convention for the protection of human rights and dignity of the human being with regard to the application of Biology and Medicine. Convention on human rights and biomedicine. European Treaty Series – No. 164. Oviedo, 4.IV.1997
- Cornetta, T., Padua, L., Testa, A., et al. - Molecular biomonitoring of a population of nurses handling antineoplastic drugs. **Mutat Res** 638 (2008) 75–82.
- Delatycki, M. B. - A de novo, apparently balanced reciprocal translocation in a child with developmental delay whose mother was being treated with low-dose methotrexate at the time of conception. **Birth Defects Research** 73 (2005) 253-4.
- Denissenko, M. F., Pao, A., Tang, M, Pfeifer, G. P. - Preferential formation of benzo(a)pyrene, adducts at lung cancer mutational hotspots in p53. **Science** 274 (1996) 430-432.
- Doll, R., Peto, R. - The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **J Natl Cancer Inst** 66 (1981) 1191-1308.
- Dranitsaris, G., Johnston, M., Poirier, S., et al. - Are health care providers who work with cancer drugs at an increased risk for toxic events? a systematic review and meta-analysis of the literature. **J Oncol Pharm Pract** 11 (2005) 69-78.

- Duffaud, F., Orsiere, T., Villani, P., et al. - Comparison between micronucleated lymphocyte rates observed in healthy subjects and cancer patients. **Mutagenesis** 12 (1997) 227-231.
- El-Ebiary, A. A., Abuelfadl, A. A., Sarhan, N. I. - Evaluation of genotoxicity induced by exposure to antineoplastic drugs in lymphocytes of oncology nurses and pharmacists. **J Appl Toxicol** 33 (2013) 196-201.
- Elsendoorn, T. J., Weijl, N. I., Mithoe, S., et al. - Chemotherapy-induced chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes of cancer patients supplemented with antioxidants or placebo. **Mutat Res** 498 (2001) 145-158.
- Enns, G. M., Roeder, E., Chan, R. T., Ali-Khan, Catts Z., Cox, V. A., Golabi, M. - Apparent cyclophosphamide (cytoxan) embryopathy: a distinct phenotype? **Am J Med Genet** 86 (1999) 237-41.
- Ensslin, A. S., Stoll, Y., Pethran, A., et al. - Biological monitoring of cyclophosphamide and ifosfamide in urine of hospital personnel occupationally exposed to cytostatic drugs. **Occup Environ Med** 51 (1994) 229-233.
- Ensslin, A. S., Stoll, Y., Pethran, A., et al. - Biological monitoring of cyclophosphamide and ifosfamide in urine of hospital personnel occupationally exposed to cytostatic drugs. **Occup Environ Med** 51 (1994) 229-233.
- Espina, C., Porta, M., Schuz, J., et al. - Environmental and occupational interventions for primary prevention of cancer: a cross-sectorial policy framework. **Environ Health Perspect** 121 (2013) 420-426.
- EU - The Luxembourg Declaration on Workplace Health Promotion in the European Union, 1997.
- EU- Barcelona Declaration on Developing Good Workplace Health Practice in Europe, 2001. European Network for Workplace Health Promotion.
- EU - European Commission. Eurostat. Death due to cancer. Standardised death rate by 100.000 inhabitants in 2012. [Internet]. Consultado em 10 de janeiro de 2016. Disponível em:  
**[http://ec.europa.eu/eurostat/data/database?node\\_code=tp00116](http://ec.europa.eu/eurostat/data/database?node_code=tp00116)**
- Falck, K., Gröhn, P., Sorsa, M., et al. - Mutagenicity in urine of nurses handling cytostatic drugs. **Lancet** 8128 (1979) 1250-1251.
- Faria, M. - A análise do trabalho como instrumento metodológico fundamental em ergonomia. **Revista Portuguesa de Saúde Pública** 5 (1987) 55-60.

- Faria, M. - A ergonomia em Saúde Ocupacional: limites e perspectivas. Edição SO – Intervenção em saúde Ocupacional, s.a., Oeiras, junho de 2009.
- Fenech, M. - The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. **Mutat Res** 285 (1993) 35-44.
- Fenech, M., Holland, N., Chang, E., et al. - The Human MicroNucleus Project – an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mut Res** 428 (1999) 271-283.
- Fenech, M. - Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. **DDT** 7 (2002a) 1128–1137.
- Fenech, M. - Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. **Toxicology** 181-182 (2002b) 411-416.
- Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., et al. - Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **Int J Cancer** 127 (2010) 2893-2917.
- First International Conference on Health Promotion, Ottawa. 21 November 1986. Ottawa Charter. [Internet]. Ottawa: WHO 1986. consultado a 20 de março de 2015. Disponível em:  
**[http://www.who.int/hpr/NPH/docs/Otawa\\_charter\\_hp.pdf](http://www.who.int/hpr/NPH/docs/Otawa_charter_hp.pdf)**
- Fleck, O., Nielsen, O. - DNA repair. **Journal of Cell Science** 117 (2004) 515-517.
- Fortini, P., Dogliotti, E. - Mechanisms of dealing with DNA damage in terminally differentiated cells. **Mutat Res** 685 (2010) 38-44.
- Fransman, W., Vermeulen, R., Kromhout, H. - Occupational dermal exposure to cyclophosphamide in Dutch hospitals: a pilot study. **Ann Occup Hyg** 48 (2004) 237-244.
- Fransman, W., Peelen, S., Silhorst, S. et al. - A pooled analysis to study trends in exposure to antineoplastic drugs among nurses. **Ann Occup Hyg** 51 (2007a) 231-239.
- Fransman, W., Huizer, D., Turk, J., Kromhout, H. - Inhalation and dermal exposure to eight antineoplastic drugs in an industrial laundry facility. **Int Arch Occup Environ Health** 80 (2007b) 396-403.
- Gisselson, D., Bjork, J., Höglund, M., et al. - An abnormal nuclear shape in solid tumours reflects mitotic instability. **Am J Pathol** 158 (2001) 199–206.

- Gómez-Martins, A., Altakroni, B., Lozano-Paniagua, D., et al. - Increased N7-methyldeoxyguanosine DNA adducts after occupational exposure to pesticides and influence of genetic polymorphisms of paraoxonase-1 and glutathione S-transferase M1 and T1. **Environ Mol Mutagen** (2014). doi: 10.1002/em.21929. [Epub ahead of print].
- Gopalakrishnan, S., Emburgh, B. O., Robertson, K. D. - DNA methylation in development and human disease. **Mutat Res** 647 (2008) 30-38.
- Grade, M., Difillipantonio, M. J., Camps, J. - Patterns of chromosomal aberrations in solid tumors. **Recent Results Cancer Res** 200 (2015) 115-142.
- Gunnarsdottir, H. K., Aspelund, T., Karlsson, T., Rafnsson, V. - Occupational risk factors for breast cancer among nurses. **Int J Occup Environ Health** 3 (1997) 254-258.
- Hagmar, L., Bragger, A., Hansteen, I.L., et al. - Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosomal damage. **Cancer Res** 54 (1994) 2919–2922.
- Hagmar, L., Bonassi, S., Strömberg, U., et al. - Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on cytogenetic biomarkers and health (ESCH). **Cancer Research** 58 (1998) 4117-4121.
- Hagmar, L., Strömberg, U., Bonassi, S., et al. - Impact of types of chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts. **Cancer Res** 64 (2004) 2258-2263.
- Hagmar, L., Wirfalt, E., Paulsson, B., Tornqvist, M. - Differences in hemoglobin adduct levels of acrylamide in the general population with respect to dietary intake, smoking habits and gender. **Mutat Res** 580 (2005) 157-165.
- Hayes, R. B., Gerin, M., Raatgever, J. W., et al. - Wood-related occupations, wood dust exposure and sinonasal cancer. **Am J Epidemiol** 145 (1986) 139-144.
- Hedmer, M., Tinnerberg, H., Axmon, A., Jönsson, B. A. - Environmental and biological monitoring of antineoplastic drugs in four workplaces in a Swedish hospital. **Int Arch Occup Environ Health** 81 (2008) 899-911.
- Hemminki, K., Kyyrönen, P., Lindbohm, M. L. - Spontaneous abortions and malformations in the offspring of nurses exposed to anaesthetic gases,



cytostatic drugs, and other potential hazards in hospitals, based on registered information of outcome. **J Epidemiol Community Health** 39 (1985) 141-7.

- Henderson, L., Albertini, S., Aardema, M. - Thresholds in genotoxicity responses. **Mutat Res** (2000) 123-128.
- Hernandez, L. G., Steeg, H. V., Luitjen, M., et al. - Mechanisms of non-genotoxic carcinogens and importance of a weight of evidence approach. **Mutat Res** 682 (2009) 94-109.
- Hessel, H., Radon, K., Pethran, A., et al. - The genotoxic risk of hospital, pharmacy and medical personnel occupationally exposed to cytostatic drugs – evaluation by the micronucleus assay. **Mutat Res** 497 (2001) 101-109.
- Hiom, K. - Coping with DNA double strand breaks. **DNA Repair** 9 (2010) 1256-1263.
- Hon, C. Y., Teschke, K., Chua, P. et al. - Occupational exposure to antineoplastic drugs: identification of job categories potentially exposed throughout the hospital medication system. **Saf Health Work** 2 (2011) 273-281.
- IARC - International Agency for Research on Cancer. WHO. IARC monographs on the Evaluation of Carcinogenic risks to humans. Agents classified by the IARC monographs volumes 1-114. [Internet]. Consultado a 10 de janeiro de 2016. Disponível em:  
**<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>**
- IPCS – INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY – Principles for the assessment of risks to human health from exposure to chemicals. Geneva: WHO, 1999. – XX (Environmental Health Criteria; 210).
- ISOPP - International Society of Oncology Pharmacy Practitioners (ISOPP) Standards of Practice. Safe handling of cytotoxics. **J Oncol Pharm Pract** (2007) 13(suppl 3).
- Izdes, S., Sardas, S., Kadioglu, E., et al. - Assessment of genotoxic damage in nurses occupationally exposed to anaesthetic gases or antineoplastic drugs by the comet assay. **J Occup Health** 51 (2009) 283-286.
- Kapitaniak, B. – L'analyse global du travail. In Péninou, G., Monod, H.; Kapitaniak, B., ed. Lit – **Préventionnel ergonomie**. Paris: Masson, 1994. 39-49.

- Kopjar, N., Garaj-Vrohac, V. - Application of the alkaline comet assay in human biomonitoring for genotoxicity: a study on Croatian medical personnel handling antineoplastic drugs. **Mutagenesis** 16 (2001) 71-78.
- Kopjar, N., Milas, I., Garaj-Vrhovac, V., et al. - Alkaline comet assay study with breast cancer patients: evaluation of baseline and chemotherapy-induced DNA damage in non-target cells. **Clin Exp Med** 6 (2006) 177-190.
- Kopjar, N., Kasuba, V., Rozgaj, R., et al. - The genotoxic risk in health care workers occupationally exposed to cytotoxic drugs – a comprehensive evaluation by the SCE assay. **J Environ Sci Health** 44 (2009) 462-479.
- Kopp, B., Schierl, R., Nowak, D. - Evaluation of working practices and surface contamination with antineoplastic drugs in outpatient health care settings. **Int Arch Occup Environ Health** 86 (2013) 47-55.
- Ladeira C., Viegas S., Carolino E., et al. - Genotoxicity biomarker in occupational exposure to formaldehyde – the case of histopathology laboratories. **Mut Res** 721 (2011) 15-20.
- Laidlaw, J. L., Connor, T. H., Theiss, J. C., et al. - Permeability of latex and polyvinyl chloride gloves to 20 antineoplastic drugs. **Am J Hosp Pharm** 41 (1984) 2618–2623.
- Larson, R. R., Khazaeli, M. B., Dillon, H. K. - Development of an HPLC method for simultaneous analysis of five antineoplastic agents. **Applied Occupational and Environmental Hygiene** 18 (2003a) 109-119.
- Larson, R. R., Khazaeli, M. B., Dillon, H. K. -A new monitoring method using solid sorbent media for evaluation or airborne cyclophosphamide and other antineoplastic agents. **Applied Occupational and Environmental Hygiene** 18 (2003b) 120-131.
- Lei 67/98, de 26 de outubro.
- Lei 12/2005, de 26 de janeiro.
- Li, G. M. - Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. **Cell Research** 18 (2008) 85-98.
- Lindahl, T. - Instability and decay of the primary structure of DNA. **Nature** 362 (1993) 709-715.
- Loeb, L. A., Harris, C. C. - Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective. **Cancer Res** 68 (2008) 6863-6872.

- Lonkar, P., Dedon, P. C. - Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: reconciling chemical mechanisms and biological fates. **Int J Cancer** 128 (2011) 1999-2009.
- Lorente, C., Cordier, S., Berghet, A., et al. - Maternal occupation risk factors for oral clefts. **Scand J Work Environ Health** 26 (2000)137-45.
- Maeda, S., Miyawaki, K., Matsumoto, S., et al. - Evaluation of environmental contaminations and occupational exposures involved in preparation of chemotherapy drugs. **Yakugaku Zasshi** 130 (2010) 903-910.
- Maluf, S.W., Erdtmann, B. - Follow up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. **Mutat Res** 471 (2000) 21–27.
- Marchetti, F., Pearson, F.S., Bishop, J.B., et al. - Etoposide induces chromosomal abnormalities in mouse spermatocytes and stem cell spermatogonia. **Hum Reprod** 21 (2006) 888–895.
- Martin, C, Zhang, Y. - The diverse functions of histone lysine methylation. **Nat Rev Mol Cell Biol** 6 (2005) 838-849.
- Mason, H.J., Blair, S., Sams, S., et al. - Exposure to antineoplastic drugs in two UK hospital pharmacy units. **Ann Occup Hyg** 49 (2005) 603–610.
- Mateuca, R., Kirsch-Volders, M., 2011. - Chromosomal damage. In: Farmer, P.B., Emeny, J.M. (Eds.), *Biomarkers of Carcinogen Exposure and Early Effects*. Nofer Institute of Occupational Medicine, pp. 47–61.
- Maynard, S, Schurmann, SH, Harboe, C, et al. - Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. **Carcinogenesis** 30 (2009) 2-10.
- McDiarmid, M., Oliver, M.S., Roth, T.S., et al. - Chromosome 5 and 7 abnormalities in oncology personnel handling anticancer drugs. **JOEM** 52 (2000) 1028–1034.
- McDonald, AD, McDonald, JC, Armstrong, B., et al. - Congenital defects and work in pregnancy. **Br J Ind Med** 45 (1988) 481–588.
- Meijer, AJ, Codogno, P. - Autophagy: regulation and role in disease. **Crit Rev Clin Lab Sci** 46 (2009) 210-240.

- Meirrow, D., Schiff, E. - Appraisal of chemotherapy effects on reproductive outcome according to animal studies and clinical data. **J Natl Cancer Inst Monogr** 34 (2005) 21–25.
- Merger, D., Tanguay, C., Langlois, E., et al. - Multicenter study of environmental contamination with antineoplastic drugs in 33 Canadian hospitals. **Int Arch Occup Environ Health** 87 (2014) 307-313.
- Minoia, C., Turci, R., Sottani, C., et al. - Application of high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry in the environmental and biological monitoring of health care personnel occupationally exposed to cyclophosphamide and ifosfamide. **Rapid Commun Mass Spectrom** 12 (1998) 1485–1493.
- Moller, P., Knudsen, L.E., Loft, S., Wallin, H. - The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 9 (2000) 1005-1015.
- Moller, P. - The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. **Basic Clin Pharmacol Toxicol** 98 (2006) 336-345.
- Moretti, M., Villarini, M., Dominici, L. Evaluation of genotoxic effects in subjects occupationally exposed to antineoplastic drugs. **Ig Sanita Pubbl** 69 (2013) 55-77.
- Murgia, E., Ballardini, M., Bonassi, S., et al. - Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case–control study. **Mutat Res** 639 (2008) 27-34.
- Musak, L., Vodicka, P., Klimentová, G., et al. - Chromosomal damage and polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 in workers exposed to cytostatics. **Neuro Endocrinol Lett** 27 (Suppl. 2) (2006) 57-60.
- Nakabeppu, Y. - Cellular levels of 8-oxoguanine in either DNA or the nucleotide pool play pivotal roles in carcinogenesis and survival of cancer cells. **Int J Mol Sci** 15 (2004) 12543-12557.
- Naito, T., Osawa, T., Susuki, N., et al. - Comparison of contamination levels on the exterior surfaces of vials containing platinum anticancer drugs in Japan. **Biol Pharm Bull** 35 (2012) 2043-2049.

- Nan, X., Meehan, R. R., Bird, A. - Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. **Nucleic Acids Res** 21 (1993) 4886-4892.
- Natarajan, A. T., Vyas, R. C., Darroudi, F., et al. - Frequencies of x-ray-induced chromosome translocations in human peripheral lymphocytes as detected by in situ hybridization using chromosome-specific DNA libraries. **Int J Radiat Biol** 61 (1992) 199-203.
- Natarajan, A. T. - Mechanisms for induction of mutations and chromosome alterations. **Environ Health Perspect** Suppl 101(Suppl 3) (1993) 225-229
- Ndaw, S., Denis, F., Marsan, P., et al. - Biological monitoring of occupational exposure to 5-fluorouracil: urinary-fluoro-alanine assay by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry in health care personnel. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci** 878 (2010) 2630–2634.
- NIOSH – National Institute for Occupational Safety and Health. NIOSH Alert: Preventing Occupational Exposures to antineoplastic and other hazardous drugs in health care settings, 2004. Disponível em <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2004-165/pdfs/2004-165.pdf>
- Norppa, H., Falck, G.C.M. - What do human micronuclei contain? **Mutagenesis** 18 (2003) 221–233.
- Nurminen, M., Karjalainen, A. - Epidemiological estimate of the proportion of fatalities related to occupational factors in Finland. **Scand J Work Environ Health** 27 (2001) 161-213.
- Nygren, O., Lundgren, C. - Determination of platinum in workroom air and in blood and urine from nursing staff attending patients receiving cisplatin chemotherapy. **Int Arch Occup Environ Health** 70 (1997) 209–214.
- Olivier, M., Hollstein, M., Hainaut, P. - TP53 mutations in human cancers: origins, consequences and clinical use. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2 (2010) a001008.
- Orłowski, C., Mah, L. J., Varsireddy, R., et al. - Double strand breaks and the concept of short- and long- term epigenetic memory. **Chromosoma** 120 (2011) 129-149.
- Padjas, A., Lesisz, D., Lankoffr, A., et al. - Cytogenetic damage in lymphocytes of patients undergoing therapy for small cell lung cancer and ovarian carcinoma. **Toxicol Appl Pharmacol** 209 (2005) 183-191.

- Paskulin, G. A., Gazzolla Zen, P. R., De Camargo Pinto, L. L., et al. - Combined chemotherapy and teratogenicity. **Birth Defects Research** 73 (2005) 634-7.
- Pedersen-Bjegaard, J., Christiansen, D.H., Andersen, M.K., Skovby, F. - Causality of myelodysplasia and acute myeloid leukemia and their genetic abnormalities (review). **Leukemia** 16 (2002) 2177-2184.
- Pegg, A. E. - Multifaceted roles of alkyltransferase and related proteins in DNA repair, DNA damage, resistance to chemotherapy and research tools. **Chem Res Toxicol** 24 (2011) 618-639.
- Peipins, L. A., Burnett, C., Alterman, T., Lalich, N. - Mortality patterns among female nurses: a 27-state study, 1984 through 1990. **Am J Public Health** 87 (1997) 1539-43.
- Peña, C. E., Carter, D.E., Ayala-Fierro, F. – Toxicologia Ambiental: avaliacion de riegos y restauracion ambiental. 2001. Distributed on the Internet via the Southwest Hazardous Waste Program - website at **<http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>**
- Perera, F. P., Weinstein, I. B. 1982. Molecular epidemiology and carcinogen-DNA adduct detection: new approaches to studies of human cancer causation. **J Chron Dis** 35 (1982) 581-600.
- Perera, F. P., Weinstein, I. B. - Molecular epidemiology: recent advances and future directions. **Carcinogenesis** 21 (2000) 517-524.
- Pethran, A., Schierl, R., Hauff, K., et al. - Uptake of antineoplastic agents in pharmacy and hospital personnel. Part I: monitoring of urinary concentrations. **Int Arch Occup Environ Health** 76 (2003) 5–10.
- Petralia, S. A., Dosemeci, M., Adams, E. E., Zahn, S. H. - Cancer mortality among women in health care occupations in 24 US states 1984-1993. **Am J Ind Med** 36 (1999) 159–65.
- Petrich, A. M., Nabham, C., Smith, S.M. - MYC-associated and double-hit lymphomas: a review of pathobiology, prognosis and therapeutic approaches. **Cancer** 120 (2014) 3884-3895.
- PICS/S – Pharmaceutical Inspection Cooperation Scheme. Guide to Good Practices for the Preparation of Medicinal Products in Health Care Establishments. Disponível em **<http://www.picscheme.org/publication>**; atualização de 2010; consultado em 26 de janeiro de 2016.

- Pieri, M., Castiglia, L., Basilicata, P. et al. - Biological monitoring of nurses exposed to doxorubicin and epirubicin by a validated liquid chromatography fluorescence detection method. **Ann Occup Hyg** 54 (2010) 368-376
- Pilger, A., Kohler, I., Stettner, H., et al. - Long-term monitoring of sister chromatid exchanges and micronucleus frequencies in pharmacy personnel occupationally exposed to cytostatic drugs. **Int Arch Occup Environ Health** 73 (2000) 442–448.
- Pitot, H. C., Dragan, Y. P. - Chemical carcinogenesis. Casarett & Doull's Toxicology: the Basic Science of Poisons. 6<sup>th</sup> Edition (July 27, 2001): by Curtis D. Klaassen (Editor) by McGraw-Hill Professional.
- Preston, B. D., Albertson, T.M., Herr, A. J. - DNA replication fidelity and cancer. **Semin Cancer Biol** 20 (2010) 281-293.
- Prista, J. - Métodos de análise do trabalho em ergonomia. **Rev Portuguesa de Saúde Pública** 5 (1987) 61-66.
- Prista, J., Uva, A. S. - Exposição profissional a agentes químicos : Os indicadores biológicos na vigilância de saúde dos trabalhadores expostos, **Revista Saúde e Trabalho** 04 (2003) 5-12.
- Prista J, Uva AS., 2006. A utilização de indicadores biológicos em Saúde Ocupacional. **Rev Portuguesa de Saúde Pública** 6: 45-54.
- Ratner, P., Spinelli, J., Beking, K., et al. - Cancer incidence and adverse pregnancy outcome in registered nurses potentially exposed to antineoplastic drugs. **BMC Nursing** 9 (2010) 15-25.
- Rekhadevi, P. V., Sailaja, N., Chandrasekhar, M., et al. - Genotoxicity assessment in oncology nurses handling anti-neoplastic drugs. **Mutagenesis** 22 (2007) 395-401.
- Roberts, S., Khamo, N., McDonnel, G., Sewell, G. J. - Studies on the decontamination of surfaces exposed to cytotoxic drugs in chemotherapy workstations. **J Oncol Pharm Practice** 12 (2006) 95-104.
- Rombaldi, F., Cassini, C., Salvador, M., et al. - Occupational risk assessment of genotoxicity and oxidative stress in workers handling anti-neoplastic drugs during a working week. **Mutagenesis** 24 (2009) 143–148.
- Rosin, M.P., German, J., 1985. Evidence for chromosomal instability in vivo in Bloom syndrome: increased numbers of micronuclei in exfoliated cells. **Hum Genet** 71 (1985) 187–.191.

- Rushton, L., Hutchings, S., Brown, T. - The burden of cancer at work: estimation as the first step to prevention. **Occup Environ Med** 65 (2008) 789-800.
- Sasaki, M., Dakeishi, M., Hoshi, S., et al. - Assessment of DNA damage in Japanese nurses handling antineoplastic drugs by the comet assay. **J Occup Health** 50 (2008) 7-12.
- Schierl, R., Böhlandt, A., Nowak, D. - Guidance values for surface monitoring of antineoplastic drugs in German Pharmacies. **Ann Occup Hyg** 5 (2009) 703-711.
- Schulte, P. A. - Some implications of genetic biomarkers in occupational epidemiology and practice. **Scand J Work Environ Health** 30 (2004) 71-79.
- Second Meeting of the WHO Collaborating Centers in Occupational Health. Beijing, China. 11-14 October 1994. Declaration on Occupational Health for All. [Internet]. Beijing; WHO: 1994. Disponível em: **[http://www.who.int/occupational\\_health/en/oehdeclaration94.pdf](http://www.who.int/occupational_health/en/oehdeclaration94.pdf)**
- Selevan, S. G., Lindbohm, M. L., Horung, R. W., Hemminki, K. - A study of occupational exposure to antineoplastic drugs and fetal loss in nurses. **N Engl J Med** 313 (1985) 1173-1178.
- Serranheira, F., Uva, A. S., Lopes, F. – Lesões músculo-esqueléticas e trabalho : alguns métodos de avaliação do risco. Lisboa : Sociedade Portuguesa de medicina do Trabalho, 2008.
- Sessink, P.J., Boer, K.A., Scheefhals, A.P., et al., - Occupational exposure to antineoplastic agents at several departments in a hospital, Environmental contamination and excretion of cyclophosphamide and ifosfamide in urine of exposed workers. **Int Arch Occup Environ Health** 64 (1992) 105-112.
- Sessink, P. J. M., Kroese, E. D., van Kranen, H. J., Bos, R. P. - Cancer risk assessment for health care workers occupationally exposed to cyclophosphamide. **Int Arch Occup Environ Health** 67 (1995) 317-323.
- Sessink, P.J., Wittenhorst, B.C., Anzion, R.B., Bos, R.P. - Exposure of pharmacy technicians to antineoplastic agents: reevaluation after additional protective measures. **Arch Environ Health** 52 (1997) 240-244.
- Sessink, P.J., Bos, R.P. - Drugs hazardous to health care workers. Evaluation of occupational exposure to cytostatic drugs. **Drug Saf** 20 (1999) 347-359.



- Shuck, S. C., Short, E. A., Turchi, J. J. - Eucaryotic nucleotide excision repair, from understanding mechanisms to influencing biology. **Cell Res** 18 (2008) 64-72.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. - A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res** 175 (1988) 184-191.
- Skov, T., Marrup, B., Olsen, J., et al. - Leukemia and reproductive outcome among nurses handling anti-neoplastic drugs. **Br J Ind Med** 44 (1992) 855-61.
- Sottani, C., Porro, B., Comelli, M., et al. - An Analysis to study trends in occupational exposure to antineoplastic drugs among health care workers. **Jornal of Chromatography B** 878 (2010) 2593-2605.
- Spinello, R. A. - Property rights in genetic information. **Ethics and Information Technology** 6 (2004) 29-42.
- Shrivastav, N., Li, D., Essigmann, J. M. - Chemical biology of mutagenesis and DNA repair cellular responses to DNA alkylation. **Carcinogenesis** 31 (2010) 59-70
- Steenland, K., Burnett, C., Lalich, N., et al. - Dying for work: the magnitude of US mortality from selected causes of death associated with occupation. **Am J Ind Med** 43 (2003) 461-482.
- Stone, M. P., Huang, H., Brown, K. L., et al. Chemistry and structural biology of DNA damage and biological consequences. **Chem Biodivers** 8 (2011) 1571-1615.
- Stucker, I., Caillard, J.F., Collin, R., et al. - Risk of spontaneous abortion among nurses handling antineoplastic drugs. **Scand J Work Environ Health** 16 (1990) 102-7.
- Talaska, G., Gaultneu, B., Peters, S., et al. - 2-Naftol levels and genotoxicity in rubber workers. **Arch Toxicol** 85 Suppl 1 (2011) S53-64
- Testa, A., Giachelia, M., Palma, S., et al. - Occupational exposure to antineoplastic agents induces a high level of chromosome damage. Lack of effect of GST polymorphisms. **Toxicol Appl Pharmacol** 223 (2007) 46-55.
- The Luxembourg Declaration on Workplace Health Promotion in the European Union. Network meeting Luxembourg 27-28 November 1997, updated in June 2005 and January 2007. [Internet]. Luxembourg 1997. Consultado em 10 de janeiro de 2016. Disponível em:

[http://www.enwesp.org/fileadmin/RSDokumente/dataien/Luxembourg\\_Declaration.pdf](http://www.enwesp.org/fileadmin/RSDokumente/dataien/Luxembourg_Declaration.pdf)

- Thiringer, G., Granung, G., Holmen, A., et al. - Comparison of methods for the biomonitoring of nurses handling antitumor drugs. **Scand J Work Environ Health** 17 (1991) 133-138.
- Thompson, S. L., Compton, D. A. - Chromosomes and cancer cells. **Chromosome Res** 19 (2011) 433-444.
- Tomatis, L., Huff, J., Hertz-Picciotto, I., et al. - Avoided and avoidable risks of cancer. **Carcinogenesis** 18 (1997) 97-105.
- Tompa, A., Jakab, M., Biró, A., et al. - Chemical safety and health conditions among Hungarian hospital nurses. **Ann NY Acad Sci** 1076 (2006) 635–648.
- Torres-Bugarin, O., Ventura-Aguilar, A., Zamora-Perez, A., et al. - Evaluation of cisplatin + 5-FU, carboplatin + 5-FU and ifosfamide + epirubicine regimens using the micronuclei test and nuclear abnormalities in the buccal mucosa. **Mutat. Res.** 439 (2003) 177–186.
- Touzin, K., Bussiere, J. F., Langlois, F., et al. - Cyclophosphamide contamination observed on the external surface of drug vials and the efficacy of cleaning on vial contamination. **Ann Occup Hyg** 52 (2008) 765-771.
- Turci, R., Sotanni, C., Ronchi, A., Minoia, C. - Biological monitoring of hospital personnel occupationally exposed to antineoplastic agents. **Toxicol Lett** 134 (2002) 57–64.
- Undeger, U., Basaran, N., Kars, A., Güç, D. - Assessment of DNA damage in nurses handling antineoplastic drugs by the alkaline comet assay. **Mutat Res** 439 (1999) 277–285.
- UNESCO – Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura. Declaração Universal sobre Bioética e Direitos Humanos. UNESCO, 2006.
- Ursini, C.L., Cavallo, D., Colombi, A., et al. - Evaluation of early DNA damage in health care workers handling antineoplastic drugs. **Int Arch Occup Environ Health** 80 (2006) 134-240.
- Uva, A. S. - Alguns aspectos epidemiológicos acerca de influência dos factores profissionais na doença oncológica. **Jornal da Sociedade das Ciências Médicas de Lisboa** CLII:3 (1988) 132-133.

- Valanis, B., Vollmer, W. M., Steele, P. - Occupational exposure to antineoplastic agents: self-reported miscarriages and stillbirths among nurses and pharmacists. **J Occup Environ Med** 41 (1999) 632-8.
- Van der Weyden, L., Adams, D. J. - The ras-association domain family (RASSP) members and their role in human tumourigenesis. **Biochem Biophys Acta** 1776 (2007) 58-85.
- Venitt, S. Mechanisms of spontaneous human cancers. **Environ Health Perspect** 104(Suppl 3) (1996) 633-637.
- Viegas, S., Prista, J. - Cancro nasofaríngeo e exposição a formaldeído. Avaliação da história profissional em 63 casos registados. **Saude & Trabalho S7t.6** (2007) 13-22.
- Viegas, S. – Estudo da exposição profissional a formaldeído em laboratórios hospitalares de anatomia patológica. Tese de Doutoramento em Saúde Pública na especialidade de Saúde Ocupacional. Escola nacional de Saúde Pública, Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, 2010.
- Viegas, S., Pádua, M., Veiga, A. C., et al. - Antineoplastic drugs contamination of workplace surfaces in two Portuguese hospitals. **Environ Monit Assess** 186 (2014) 7807-7818.
- Villarini, M., Dominici, L., Piccinini, L., et al. - Assessment of primary, oxidative and excision repaired DNA damage in hospital personnel handling antineoplastic drugs. **Mutagenesis** (2010) 1-11.
- Vineis, P., Perera, F. - Molecular epidemiology and biomarkers in etiologic cancer research: the new in light of the old. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 16 (2007) 1954-1964.
- Vineis, P., Schatzkin, A., Potter, J. D. - Models of carcinogenesis: an overview. **Carcinogenesis** 31 (2010) 1703-1709.
- Vodicka, P., Koskinen, M., Stetinba, R., et al. - The role of various biomarkers in the evaluation of styrene genotoxicity. **Cancer Detection and Prevention** 27 (2003) 275-284.
- Wakui, N., Ookubo, T., Iwasaki, Y. et al. - Determination of exposure of dispensary drug preparers to cyclophosphamide by passive sampling and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **J Oncol Pharm Pract** 19 (2013) 31-37.

- Wallemacq, P.E., Capron, A., Vanbinst, R., et al. - Permeability of 13 different gloves to 13 cytotoxic agents under controlled dynamic conditions. **Am J Health Syst Pharm** 63 (2006) 547-556.
- Wilson, L., Panda, D., Jordan, M. A. - Modulation of microtubule dynamics by drugs: a paradigm for the actions of cellular regulators. **Cell Struct Funct** 24 (1999) 329-335.
- WHO – First International Conference on Health Promotion, Ottawa. 21 November, 1986. Ottawa Charter.
- WHO - Second Meeting of the WHO Collaborating Centers in Occupational Health. Beijing, China. 11-14 October 1994. Declaration on Occupational Health For All.
- WMA – World Medical Association. WMA Declaration of Helsinki. Ethical principles for medical research involving human subjects. Adopted by the WMA General Assembly in Helsinki, Finland, June 1964.
- Yoshida, J., Kosaka, H., Tomioka, K., Kumagai, S. - Genotoxic risks to nurses from contamination of the work environment with antineoplastic drugs in Japan. **J Occup Health** 48 (2006) 517-522.
- Yoshida, J., Koda, S., Nishida, S., et al., 2011. Association between occupational exposure levels of antineoplastic drugs and work environment in five hospitals in Japan. **J Oncol Pharm** 17 (2011) 29-38.
- Zaridze, D. G., 2008. Molecular Epidemiology of cancer. **Biochemistry** 73 (2008) 532-542.
- Zhang, L., Yang, W., Hubbard, A. E., Smith, M. T. - Nonrandom aneuploidy of chromosomes 1, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12 and 21 induced by the benzene metabolites hydroquinone and benzenetriol. **Environ Mol Mutag** 45 (2005) 4117-4121



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
*Escola Nacional de Saúde Pública*

# **Universidade Nova de Lisboa**

## **Escola Nacional de Saúde Pública**

**Exposição Ocupacional a Citostáticos e Efeitos sobre a Saúde em duas  
Unidades Hospitalares Portuguesas**

**ANEXOS**



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
*Escola Nacional de Saúde Pública*

# **Universidade Nova de Lisboa**

## **Escola Nacional de Saúde Pública**

**Exposição Ocupacional a Citostáticos e Efeitos sobre a Saúde em duas  
Unidades Hospitalares Portuguesas**

### **ANEXO 1**

**Questionário Aplicado na Caracterização  
das Populações de Expostos e não Expostos**

# ENTREVISTA

## 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:

<b>Alimentos</b>	<b>Nunca</b>	<b>Inferior a 1 vez por semana</b>	<b>1 a 2 vezes por semana</b>	<b>3 a 4 vezes por semana</b>	<b>Mais de 5 vezes por semana</b>
Carnes brancas (perú, frango)					
Carnes vermelhas (vaca, porco)					
Fígado					
<b>Alimentos</b>	<b>Nunca</b>	<b>Inferior a 1 vez por semana</b>	<b>1 a 2 vezes por semana</b>	<b>3 a 4 vezes por semana</b>	<b>Mais de 5 vezes por semana</b>
Alface					
Cereais integrais					
Pão					
Frutas cítricas (laranja, limão, morango, tangerina, pêsego)					
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 a citostáticos 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 a citostáticos no local de trabalho

#### 3.2.1. Ocupações ou actividades exercidas actualmente com exposição a citostáticos

	<b>Função exercida</b>	<b>Horas por dia</b>	<b>Dias por semana</b>
1			
2			
3			
4			
5			

#### 3.2.2. Ocupações ou actividades exercidas anteriormente com exposição a citostáticos

	<b>Função exercida</b>	<b>Horas por dia</b>	<b>Dias por semana</b>	<b>De... a .... (anos)</b>
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				

### 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?

---

---

---

---



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
*Escola Nacional de Saúde Pública*

# **Universidade Nova de Lisboa**

**Exposição Ocupacional a Citostáticos e Efeitos sobre a Saúde em duas  
Unidades Hospitalares Portuguesas**

**ANEXO 2**

**ISOPP Audit Tool**

## **EXPOSIÇÃO PROFISSIONAL A MEDICAMENTOS CITOTÓXICOS: Caracterização Inicial das Unidades Hospitalares Portuguesas**

Os citotóxicos constituem um grupo farmacoterapêutico que interfere por vários mecanismos de acção com o DNA, levando à destruição celular. Estes agentes terapêuticos são preparados diariamente em Unidades Hospitalares Portuguesas, e posteriormente usados no tratamento de várias doenças, nomeadamente as oncológicas. As doenças oncológicas constituem, actualmente, a segunda causa de morte nos países desenvolvidos, logo a seguir às doenças cardiovasculares. A Organização Mundial de Saúde prevê um aumento acentuado da incidência destas mesmas doenças, relacionado, entre outros factores, com o envelhecimento das populações, com hábitos e estilos de vida pouco saudáveis e com a exposição a carcinogéneos. Tal facto contribuirá para um aumento do número de preparações efectuadas nas Unidades Hospitalares e conseqüentemente, para um aumento significativo da exposição dos profissionais de saúde, nomeadamente Farmacêuticos, Técnicos de Farmácia e Enfermeiros. Assim, crescem os potenciais riscos para a saúde derivados destas exposições e ganham importância as necessidades de caracterização do risco e de desenvolvimento do conhecimento dos efeitos sobre a saúde dos trabalhadores.

No âmbito do Projecto "Exposição profissional a citostáticos: caracterização da exposição em unidades hospitalares portuguesas", solicita-se a vossa colaboração no preenchimento do questionário que se segue, de forma a possibilitar a caracterização inicial da Instituição. Garante-se o anonimato e confidencialidade dos resultados obtidos.

### **Instruções de preenchimento**

Este questionário encontra-se dividido em duas partes. A **Parte I** tem como objectivo a caracterização geral da Instituição e do circuito dos Medicamentos Citotóxicos; a **Parte II** foi elaborada pela Comissão de Boas Práticas da Sociedade Internacional de Profissionais de Farmácia em Oncologia (*International Society of Oncology Pharmacy Practitioners – ISOPP*) com o objectivo de verificar a conformidade das instituições que preparam medicamentos citotóxicos com as recomendações em vigor. Este questionário será também aplicado internacionalmente, pelo que podem existir questões que não se aplicam à realidade dos Hospitais Portugueses. Nesses casos, e sempre que não se aplicar a esta instituição, deverá responder N/A (Não se Aplica). Nos outros casos, poderá responder N/S (Não Sei), S (Sim) ou N (Não).

Agradecemos antecipadamente a vossa disponibilidade para colaborar nesta investigação.



## Parte II – ISOPP Standards Audit Tool

TRANSPORTE	S	N	N/A	N/S
Os medicamentos citotóxicos são preferencialmente adquiridos a fornecedores que fornecem frascos inquebráveis ou frascos envolvidos com plástico?		X		
Os medicamentos citotóxicos são transportados internamente (dentro da instituição) na sua embalagem original?	X			
Os medicamentos citotóxicos são transportados internamente (na instituição) num recipiente à prova de choque?	X			
Os medicamentos citotóxicos são transportados internamente (na instituição) num recipiente à prova de derrame (impermeável)? <i>à prova de choque e devidamente identificado</i>	X			
Os produtos citotóxicos transportados internamente (na instituição) apresentam uma etiqueta de aviso <b>citotóxico</b> no exterior do recipiente?	X			
Durante o transporte interno (na instituição), está presente um Kit de emergência citotóxica?		X		
As preparações citotóxicas são transportadas internamente (na instituição) numa mala/recipiente estanque?	X			
As preparações citotóxicas são transportadas internamente (na instituição) com protecção de luz, quando necessário?	X			
Os funcionários que transportam, internamente (na instituição), as preparações citotóxicas têm formação na actuação em caso de derrame de citotóxicos?		X		
Os recipientes utilizados para o transporte interno (na instituição) de medicamentos/preparações citotóxicas são utilizados exclusivamente para esse fim?	X			
São utilizados tubos pneumáticos para o transporte interno (na instituição) de preparações citotóxicas?		X		
Estes tubos pneumáticos utilizados no transporte interno (na instituição) de preparações citotóxicas são utilizados exclusivamente para esse fim?			X	
Os tubos pneumáticos usados no transporte interno das preparações citotóxicas foram previamente verificados e validados para o transporte de sacos de infusão?			X	
Existem procedimentos escritos de como se deve actuar em caso de derrame ou outros incidentes que envolvam medicamentos citotóxicos no tubo pneumático usado para o transporte internos (na instituição) de preparações citotóxicas?			X	

EDUCAÇÃO E TREINO	S	N	N/A	N/S
A sua instituição tem um programa de formação documentado para todos os funcionários que lidam com medicamentos citotóxicos? (A formação e o treino de todos estes funcionários pode não ser da responsabilidade dos Serviços Farmacêuticos.)	X			
• Farmacêuticos	X			
• Técnicos de Farmácia	X			
• Enfermeiros		<del>X</del>		X
• Médicos		<del>X</del>		X
• Assistentes Operacionais		<del>X</del>		X
• Pessoal da limpeza		<del>X</del>		X
• Doentes, família e cuidadores		<del>X</del>		X
<b>As perguntas seguintes referem-se à formação dos funcionários da Farmácia</b>				
Os funcionários são avaliados no final do programa de formação?		X		
A documentação referente à formação é arquivada indefinidamente?	X			
O programa de formação é repetido regularmente (a cada 2, 3 anos ou mais frequentemente se as práticas/conteúdos mudarem)?	X			
A formação é assegurada por um membro dos funcionários com conhecimentos específicos na área dos riscos associados aos medicamentos citotóxicos e da manipulação segura?	X			
Existe um programa de formação para todos os funcionários que manipulam e lidam com medicamentos citotóxicos?	X			
Os funcionários estão devidamente informados sobre os possíveis riscos da exposição ocupacional a medicamentos citotóxicos?	X			
A formação inclui conteúdos sobre os possíveis riscos da exposição a medicamentos citotóxicos?	X			
A formação sobre os possíveis riscos da exposição ocupacional a medicamentos citotóxicos está documentada?	X			
O programa de formação inclui o ensino sobre a utilização de câmaras de segurança biológica ou isoladores?	X			
Esta formação inclui o ensino sobre os procedimentos para trabalhar numa sala limpa de manipulação de medicamentos citotóxicos?	X			
Esta formação inclui o ensino da técnica asséptica?	X			
Esta formação inclui o ensino sobre a utilização de equipamentos de protecção individual?	X			



LOCAL DE RECONSTITUIÇÃO DE MEDICAMENTOS CITOTÓXICOS ESTÉREIS	S	N	N/A	N/S
✓ A preparação de medicamentos citotóxicos para administração parentérica está centralizada dentro da instituição?	X			
A área de preparação de medicamentos citotóxicos está localizada numa área da farmácia sob o controlo dos profissionais da farmácia (ou seja, nos Serviços Farmacêuticos ou numa farmácia satélite)?	X			
✓ Existe uma sala limpa ou uma área específica para preparação de medicamentos citotóxicos?	X			
✓ O acesso à sala limpa é realizado através de uma antecâmara?	X			
Existe algum meio de transferência de material ( <i>transfer</i> ) entre a área de preparação e o meio envolvente?	X			
Existe um chuveiro de emergência perto da sala de preparação de citotóxicos?	X			
Existe um lava-olhos de emergência disponível perto da sala de preparação citotóxica?		X		
O funcionamento e a limpeza do chuveiro de emergência e do lava-olhos são testados regularmente?			X	
✓ Existem diferenças de pressão entre a área de preparação e o ambiente envolvente?	X			
A pressão de ar é positiva na área de preparação e negativa na antecâmara?		X		
✓ A pressão de ar é negativa na área de preparação e positiva na antecâmara?	X			
✓ Os diferenciais de pressão de ar são monitorizados?	X			
O ar do local de trabalho é expulso e ventilado para o exterior?	X			
O ar expulso da sala de trabalho passa por um filtro HEPA?	X			
O ar que entra na área de preparação passa por um filtro HEPA?	X			
Existe uma troca de ar na área de preparação de pelo menos 20 volumes do ar da sala, por hora?				X
✓ A temperatura na área de preparação é controlada?	X			
A temperatura na área de preparação mantém-se entre 18 °C e 22 °C?	X			
✓ A humidade na área de preparação é controlada?	X			
A humidade relativa do ar na área de preparação está entre 30% e 70%?	X			
A amostragem de partículas no ar é realizada na área de preparação?		X		
A integridade do filtro HEPA é monitorizada na área de preparação?		X		
A velocidade do ar é monitorizada na área de preparação?		X		

DISPOSITIVOS ESPECIAIS	S	N	N/A	N/S
Os medicamentos citotóxicos utilizados encontram-se todos embalados em recipientes à prova de fuga em caso de quebra?		X		
Utiliza sempre seringas <i>Luer-lock</i> durante a preparação de citotóxicos?	X			
Utiliza dispositivos de transferência em sistema fechado durante a preparação de citotóxicos?	<del>X</del>	X		
Se não utiliza dispositivos de transferência em sistema fechado, utiliza <i>spike</i> durante a preparação de citotóxicos?	X			
Se não utiliza um dispositivo de transferência em sistema fechado, utiliza um dispositivo de ventilação de ar equipado com um filtro de 0,2 micrómetros hidrofóbico (Chemo Mini-Spike Plus® V) para evitar um diferencial de pressão entre o interior e o exterior do frasco do medicamento citotóxico durante a preparação?	X			
Se não utiliza o dispositivo de transferência em sistema fechado, utiliza agulhas (18 G/1,2 mm) para a reconstituição de medicamentos citotóxicos?	X			
Se não utiliza o dispositivo de transferência em sistema fechado, utiliza agulhas de calibre 21G/0.8mm ou menor para perfurar os sacos/frascos de soluções para diluição?	X			
Se não utiliza o dispositivo de transferência em sistema fechado, evita a utilização de agulhas com filtro (a não ser que o fármaco se encontre em ampolas de vidro ou se existirem partículas visíveis em suspensão)?			X	
É utilizado um dispositivo de administração em sistema fechado na administração de medicamentos citotóxicos?	X			
Os sistemas de administração são purgados na Farmácia com uma solução não citotóxica, antes da adição dos medicamentos citotóxicos?	X			
Os medicamentos citotóxicos na forma líquida administrados por via oral são dispensados em dose unitária?		<del>X</del>	X	



PREPARAÇÕES NÃO ESTÉREIS	S	N	N/A	N/S
O equipamento utilizado está destinado apenas para a preparação de medicamentos citotóxicos?	X			
As preparações não estéreis de medicamentos citotóxicos são realizadas numa sala separada, usada apenas para estes medicamentos?			X	
A sala de preparação de produtos não estéreis está sob pressão negativa em relação ao meio envolvente?			X	
As preparações não estéreis são realizadas numa CFAL do tipo I?			X	
As preparações não estéreis são manipuladas numa CFAL B2 do tipo II? (Não utilizando a mesma câmara para as preparações estéreis?)			X	
As preparações são realizadas num isolador, e este é usado apenas para este tipo de preparações?			X	
O equipamento de protecção individual é utilizado durante a preparação?	X			

PROCEDIMENTOS DE LIMPEZA	S	N	N/A	N/S
Existem procedimentos escritos para a limpeza da CFAL?	X			
Existem procedimentos escritos para a descontaminação da CFAL?	X			
O operador usa óculos de protecção para limpeza/descontaminação da CFAL quando o vidro frontal está levantado?	X			
O operador usa dois pares de luvas para limpeza/descontaminação da CFAL?	X			
É realizada a lavagem das mãos do operador (com água e sabão), imediatamente após a remoção das luvas?	X			
O operador usa uma bata de material impermeável a medicamentos citotóxicos com a frente fechada, mangas compridas e punhos elásticos, para limpeza/descontaminação da CFAL?	X			
O operador usa uma máscara de respiração P2/P3 ou N95/NI00 para limpar/descontaminar a CFAL?		X		
O operador usa uma touca descartável para limpar/descontaminar a CFAL?	X			
O operador usa uma protecção para a barda (quando aplicável) para limpar/descontaminar a CFAL?			X	
A superfície de trabalho da CFAL é limpa:				
1. No início do dia de trabalho?	X			
2. No final do dia de trabalho?	X			
3. Entre as preparações?	X			
4. Após derrames?	X			
A CFAL é descontaminada, pelo menos uma vez por semana, com um detergente fortemente alcalino?	X			
A parte inferior da superfície de trabalho da CFAL é limpa pelo menos uma vez por mês?	X			
Os resíduos provenientes da limpeza ou descontaminação são colocados num recipiente de resíduos citotóxicos (tipo IV)?	X			
O operador utiliza óculos de protecção para limpar a sala de preparação?	X			
As superfícies de trabalho da sala de preparação são limpas diariamente?	X			
As prateleiras são esvaziadas e limpas pelo menos uma vez por semana?	X			
A parte externa da CFAL é limpa pelo menos uma vez por semana?	X			
O chão é limpo diariamente, da zona menos limpa para a zona mais limpa?	X			
As paredes e tectos são limpos pelo menos uma vez por mês?	X			

EPI

←  
Percutir  
2 PPA

Limpe logo  
do 200 um recipiente  
sujeito

TRATAMENTO DE RESÍDUOS CITOTÓXICOS E FLUÍDOS CORPORAIS DOS DOENTES	S	N	N/A	N/S
Existe um procedimento escrito para a eliminação de resíduos contaminados?	X			
Os resíduos contaminados são eliminados separadamente dos resíduos não contaminados?	X			
Os recipientes para resíduos de citotóxicos são de material (plástico ou papelão) rígido?	X			
Os recipientes para resíduos de citotóxicos são à prova de fugas?	X			
Os recipientes para resíduos são devidamente identificados com uma etiqueta de aviso citotóxico?		X		
Existe um procedimento escrito para a manipulação de fluidos corporais dos doentes que recebem quimioterapia?		X		
As medidas especiais para manusear os fluidos corporais dos doentes mantêm-se até 7 dias após o fim do tratamento?		X		



ALERTAS DA PRESENÇA DE CITOTÓXICOS	S	N	N/A	N/S
Existe um sistema para sensibilizar os funcionários da presença de agentes citotóxicos na farmácia?	X			
Existe um sistema para sensibilizar os funcionários da presença de agentes citotóxicos nas áreas de armazenamento?	X			
Existe um sistema para sensibilizar os funcionários da presença de agentes citotóxicos na sala de preparação?	X			
Existe um sistema para sensibilizar os funcionários da presença de agentes citotóxicos durante o transporte?	X			
Existe um sistema para sensibilizar os funcionários da presença de agentes citotóxicos durante a administração?	X			
Existe um sistema para sensibilizar os funcionários da presença de agentes citotóxicos <u>eliminação dos resíduos?</u>	X			
Existe um sistema para sensibilizar as pessoas da presença de agentes citotóxicos (por exemplo, nas casa de banho), quando a quimioterapia é administrada em casa?	X		<del>///</del>	
Existe um sistema para sensibilizar todas as pessoas da presença de agentes citotóxicos (por exemplo, nas casas de banho, nas fezes e urina do doente, na roupa de cama do doente e nas roupas sujas) nos 7 dias após a administração de quimioterapia em casa ou no hospital?		X		
Existe um sistema para sensibilizar os funcionários da presença de agentes citotóxicos na medicação oral a ser administrada em casa?	X			
Existe um sistema para sensibilizar as pessoas da presença de agentes citotóxicos em casa, incluindo medicamentos citotóxicos de administração oral?	X			
Existe um sistema para sensibilizar as pessoas das precauções especiais para manusear agentes citotóxicos orais em casa?		X		
Existe um sistema para sensibilizar as pessoas da presença de agentes citotóxicos nos resíduos de citotóxicos nos 7 dias após a quimioterapia realizada em casa ou no hospital?		X		



GESTÃO DE MEDICAMENTOS	S	N	N/A	N/S
Existe um processo multidisciplinar para a selecção de medicamentos para o formulário de medicamentos da instituição?	X			
Existe um processo para a revisão da utilização de medicamentos de custo elevado?	X	<del>X</del>		
Existe um sistema que permite controlar os prazos de validade e consequente remoção dos stocks com validade expirada de toda a instituição?	X			
Existem políticas e procedimentos escritos sobre o armazenamento e rotulagem de medicamentos?	X			
Existem políticas e procedimentos escritos sobre o manuseamento de medicamentos devolvidos à farmácia?	X			
Existem políticas e procedimentos escritos sobre a reutilização de medicamentos devolvidos à farmácia?	X			
Existem políticas e procedimentos escritos sobre o armazenamento, validade, rotulagem e reutilização de frascos de medicamentos parcialmente utilizados?			X	
Existem políticas e procedimentos escritos sobre o uso de medicamentos sem autorização de introdução no mercado dentro da instituição?	X			
Existem políticas e procedimentos escritos sobre o uso <i>off-label</i> de medicamentos dentro da instituição?	X			
Existem políticas e procedimentos escritos sobre a utilização de medicamentos experimentais na instituição?	X			





**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
*Escola Nacional de Saúde Pública*

# **Universidade Nova de Lisboa**

## **Escola Nacional de Saúde Pública**

**Exposição Ocupacional a Citostáticos e Efeitos sobre a Saúde em duas  
Unidades Hospitalares Portuguesas**

**ANEXO 3**

**Grelha de Observação**

## Grelha de observação

A grelha deve ser preenchida pelo investigador. Deve ser registada a data da respectiva observação. Os procedimentos discriminados na grelha são alvo de avaliação, sendo o objectivo final determinar a conformidade ou não conformidade dos mesmos, colocando uma cruz no respectivo campo. Entenda-se como **Conforme**, a total concordância entre o procedimento descrito e a sua realização e **Não Conforme**, a não concordância entre o procedimento descrito e a sua realização. Sempre que para uma Não Conformidade seja encontrada a respectiva justificação, esta deve ser registada no campo destinado a **Observações**. Estas notas têm como objectivo elaborar sugestões de melhoria tendo em atenção a realidade do Hospital

Data da observação: \_\_/\_\_/\_\_

### 1. Limpeza e desinfeção

#### 1.1. Limpeza, desinfeção e manutenção da CFALV

AFIRMAÇÃO	Conforme	Não conforme	N/A
Os procedimentos de limpeza estão descritos.			
A limpeza é feita por profissionais competentes.			
Durante a limpeza, os profissionais utilizam equipamento de protecção individual.			
Não salpica o filtro HEPA com álcool a 70°.			
Limpa diariamente a CFALV com água e detergente.			
Efectua o registo das limpezas realizadas (diárias, semanais e mensais).			
Liga a CFALV 30 minutos antes da desinfeção.			
Desinfecta a CFALV antes do início das preparações.			
Desinfecta a CFALV após as preparações.			
Desinfecta a CFALV pela ordem: painel frontal, painéis laterais, bancada, vidro (dentro) e vidro (fora).			
Desinfecta de cima – junto ao filtro – para baixo, paralelamente ao filtro HEPA.			
Durante a desinfeção, quando chega a um canto, descreve uma curva com a gaze e regressa ao lado oposto junto ao local onde começou, em forma de “S”.			
Imediatamente antes de desinfectar a bancada, desinfecta as torneiras e lâmpadas.			
Desinfecta a CFALV quando se preparam medicamentos não citotóxicos, após se ter preparado medicamentos citotóxicos			
Desinfecta sempre que existe um derrame.			
Desinfecta diariamente todas as superfícies/bancadas com álcool a 70°.			
Efectua o registo diário das desinfeções realizadas.			
Desinfecta os materiais com álcool a 70°.			
Semanalmente é feita a descontaminação.			
A CFALV é utilizada apenas para preparação de medicamentos citotóxicos.			
Os desperdícios resultantes da limpeza são colocados em sacos vermelhos (tipo IV) que são fechados e retirados da CFALV com o mínimo de movimentos.			
Existe um programa de manutenção preventiva adequado às horas de utilização da CFALV			
Os parâmetros verificados são os que influenciam a protecção concedida pela CFALV			
Os caudais de insuflação e exaustão da CFALV são os adequados			

A CFALV apresenta sinalização (visual e/ou sonora) quando apresenta anomalias de funcionamento			
--	--	--	--

Observações:

### 1.2. Limpeza, desinfeção e funcionamento das salas

AFIRMAÇÃO	Conforme	Não conforme	N/A
Os procedimentos de limpeza estão descritos.			
A limpeza é feita por profissionais competentes.			
Durante a limpeza, os profissionais utilizam equipamento de protecção individual.			
Limpa diariamente todas as superfícies com água e detergente.			
Desinfecta diariamente todas as superfícies.			
As prateleiras e armários de armazenamento são limpos e desinfectados semanalmente.			
Existe um balde e uma esfregona utilizados apenas na sala limpa e semi-limpa.			
A esfregona/esfregão é esterilizado ou deitado fora após cada utilização.			
Efectua a limpeza diária do chão no sentido da zona suja para a zona semi-limpa.			
Efectua o registo das limpezas realizadas (diárias, semanais e mensais).			
Desinfecta diariamente todas as superfícies/bancadas com álcool a 70°.			
Efectua o registo diário das desinfeções realizadas.			
Semanalmente é feita a descontaminação do exterior da CFALV.			
Os desperdícios resultantes da limpeza são colocados em sacos vermelhos (tipo IV).			
As pressões negativas são asseguradas nos locais necessários			
Quem procede à limpeza tem informação acerca dos riscos associados à acção de limpeza			

### 1.3. Limpeza e desinfeção do material

AFIRMAÇÃO	Conforme	Não conforme	N/A
O material não estéril, utilizado na preparação de medicamentos citotóxicos, é lavado separadamente do restante material.			

### 1.4. Validação do processo de limpeza

AFIRMAÇÃO	Conforme	Não conforme	N/A
É feita a validação microbiológica.			
É feita a validação química.			

Observações:

## 2. Preparação de medicamentos citotóxicos

### 2.1. Preparação de medicamentos citotóxicos

AFIRMAÇÃO	Conforme	Não conforme	N/A
Existem procedimentos escritos para a reconstituição, diluição, mistura, etiquetagem e acondicionamento.			
Verifica as condições de temperatura, humidade, pressão e se as portas se encontram fechadas, antes do início da preparação.			
Liga a CFALV cerca de 30 minutos antes do início da preparação dos MC.			
Escolhe atempadamente o material necessário.			
Utiliza campo de trabalho para quimioterapia.			
Coloca um medicamento de cada vez dentro da CFALV.			
Assegura-se de que as superfícies externas dos recipientes que acondicionam os MC não se encontram contaminadas.			
Realiza uma preparação de cada vez.			
Utiliza seringas <i>Luer-slip</i> (somente se as conexões <i>Luer-lock</i> são incompatíveis) tais como agulhas intratecais.			
Utiliza conexões seringa-seringa quando transfere soluções de uma seringa para a outra.			
Não utiliza agulhas de grande calibre para reconstituir e aspirar MC.			
Utiliza agulha com filtro só quando o MC foi removido de uma ampola de vidro ou se são visíveis partículas de matéria.			
Experimenta o conjunto seringas/agulha antes de o utilizar.			
Quando utiliza ampolas de vidro, efectua a sua abertura com um quebra-ampolas ou com o auxílio de compressas.			
Utiliza dispositivos de ventilação do ar para igualar as pressões e para prevenir a passagem de pó, aerossóis e líquidos ( <i>p.e. spike</i> ).			
Utiliza técnicas que evitam a formação de diferenças de pressão.			
Controla o volume dos MC e do ar aquando da sua medição.			
Confere os volumes medidos.			
Não fecha completamente o vidro da CFALV.			
Sempre que o alarme detecta alterações no fluxo de ar, interrompe o trabalho e investiga a causa.			
<b>Utiliza o Equipamento de Protecção Individual adequado e necessário</b>			
Muda o segundo par de luvas de 30 em 30 minutos e sempre que ocorre um acidente.			
Faz pausas a cada 2 horas.			
Regista todo o material utilizado e as preparações efectuadas.			

Observações:

## 2.2. Controlo de qualidade do produto final

<b>AFIRMAÇÃO</b>	<b>Conforme</b>	<b>Não conforme</b>	<b>N/A</b>
É realizado o controlo de qualidade do produto final.			
É feita uma inspeção visual do produto acabado.			
São confirmados os volumes.			
É confirmado o rótulo.			
O rótulo contém:			
• Nome do doente.			
• Número de registo no Hospital.			
• Substância activa.			
• Dose.			
• Volume.			
• Via de administração.			
• Duração da infusão.			
• Data e hora de preparação.			
• Validade.			
• Recomendações para armazenamento.			
• Informação adicional, quando necessário.			

Observações:

### 3. Validação

#### 3.1. Validação do produto final

<b>AFIRMAÇÃO</b>	<b>Conforme</b>	<b>Não conforme</b>	<b>N/A</b>
É realizada a validação da qualidade microbiológica do produto.			
Confirmação dos volumes medidos durante a preparação.			
Pesagem das bolsas depois de preparadas.			

#### 3.2. Validação da não existência de contaminação cruzada

<b>AFIRMAÇÃO</b>	<b>Conforme</b>	<b>Não conforme</b>	<b>N/A</b>
É garantido que não existe contaminação cruzada.			
Este processo está validado.			

#### 3.3. Validação do programa informático

<b>AFIRMAÇÃO</b>	<b>Conforme</b>	<b>Não conforme</b>	<b>N/A</b>
O software utilizado está validado.			

Observações:



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
*Escola Nacional de Saúde Pública*

# **Universidade Nova de Lisboa**

## **Escola Nacional de Saúde Pública**

**Exposição Ocupacional a Citostáticos e Efeitos sobre a Saúde em duas  
Unidades Hospitalares Portuguesas**

**ANEXO 4**

**Resultados da Aplicação do Questionário da ISOPP**

## Resultados da aplicação da ISOPP Audit Tool

### Item 1– Transporte

Questão	
Os citotóxicos são preferencialmente adquiridos a fabricantes com recipientes protegidos ou inquebráveis?	N
Os citotóxicos são transportados internamente na sua embalagem original?	S
Os citotóxicos são transportados internamente num contentor à prova de choque?	S
Os citotóxicos são transportados internamente num contentor à prova de fugas?	S
Durante o transporte interno os citotóxicos têm uma etiqueta de aviso no exterior do contentor?	S
O transporte interno inclui um <i>kit</i> para fugas?	N
Os citotóxicos são transportados internamente numa embalagem externa selada e à prova de fugas?	S
Quando indicado os citotóxicos são transportados internamente protegidos da luz?	S
O pessoal que transporta os citotóxicos tem treino específico em como lidar com uma fuga?	N
O contentor é utilizado apenas para o transporte dos citotóxicos?	S
Para o transporte interno de citotóxicos são usados tubos pneumáticos?	N
Os tubos pneumáticos são usados unicamente para o transporte de citotóxicos?	N



Os tubos pneumáticos são previamente verificados e validados para o transporte que vão efetuar?	N
Existe um procedimento escrito sobre o modo de lidar com fugas ou outros incidentes que envolvam os citotóxicos contidos no tubo pneumático?	N

## Item 2– Pessoal

Questão	
A preparação de citotóxicos para administração parentérica é efetuada apenas por pessoal de farmácia treinado?	S
Existe uma política escrita sobre como lidar com trabalhadores que peçam para ser afastados da preparação de citotóxicos?	S
É efetuada recolocação sem exposição a citotóxicos para todas as trabalhadoras tentando engravidar ou com gravidez diagnosticada?	S
É efetuada recolocação sem exposição a citotóxicos para todas as trabalhadoras a amamentar?	S
Existe uma política escrita sobre vigilância médica para os trabalhadores expostos a citotóxicos?	N
É feito um exame médico basal antes do trabalhador entrar em contacto com os citotóxicos?	S
Os trabalhadores com alterações no exame médico são afastados do contacto com citotóxicos até que a alteração seja esclarecida?	S
O acesso à área de preparação é restrito apenas a pessoal autorizado?	S
Existe sinalização adequada indicando acesso restrito às áreas de preparação e armazenamento?	S

Existem procedimentos escritos sobre higiene para os trabalhadores que exercem actividade nas áreas de preparação?	S
É proibido comer, beber, mascar pastilha elástica e aplicar cosméticos nas áreas de preparação?	S
É exigido aos trabalhadores que retirem a maquilhagem, verniz das unhas, anéis, brincos, pulseiras e todo o tipo de joalharia antes de entrarem nas áreas de preparação?	S
Estão disponíveis equipamentos de protecção individual?	S
A área de preparação e zona limpa estão pensadas tendo em conta a segurança e o conforto dos trabalhadores?	S
Os trabalhadores com infecções cutâneas ou respiratórias ou que estejam a receber terapêutica imunossupressora são impedidos de preparar citotóxicos para administração parentérica?	S
Existe pessoal suficiente para permitir que quem esteja a trabalhar na área de preparação faça um intervalo a cada 2 horas?	S

### Item 3– Educação e treino

Questão	
Existe um programa de formação documentado para todos os que contactam com citotóxicos:	S
• Técnicos de farmácia	N
• Enfermeiros	N
• Médicos	N
• Auxiliares	N
• Pessoal de limpeza	N
• Doentes e seus acompanhantes	N

(as questões seguintes referem-se apenas à formação do pessoal de farmácia)	N
Os trabalhadores são avaliados no final da formação?	N
A documentação referente à formação é arquivada e guardada?	S
A formação é repetida regularmente (pelo menos de 2-2 ou 3-3 anos)?	S
A formação é administrada por pessoal especializado na área dos riscos associados aos citotóxicos e respectivos procedimentos de segurança?	S
Existe um programa de formação para todos os trabalhadores que manipulam citotóxicos?	S
Os trabalhadores são especificamente informados sobre os riscos associados à exposição ocupacional a citotóxicos?	S
Esta informação está incluída no programa de formação?	S
O fornecimento desta informação fica documentado?	S
A formação inclui educação sobre o uso das câmaras de fluxo laminar?	S
A formação inclui educação sobre os procedimentos a adotar para trabalho na zona limpa?	S
A formação inclui educação sobre técnicas de assepsia?	S
A formação inclui educação sobre o uso dos equipamentos de proteção individual?	S
A formação inclui educação sobre como eliminar os resíduos de citotóxicos?	S
A formação inclui instruções sobre como utilizar as estações de emergência (lava-olhos e chuveiro de emergência)?	S

A formação inclui treino na rotulagem e embalagem de preparações de citotóxicos?	S
A formação inclui instruções sobre o transporte de citotóxicos?	S
A formação inclui instruções sobre a preparação de citotóxicos para administração tópica e oral?	S
A formação inclui instruções sobre procedimentos de limpeza e descontaminação?	S
É efetuada validação microbiológica para o procedimento de preparação efectuado por cada trabalhador?	S
É efetuado teste de validação com fluoresceína para o procedimento de preparação efectuada por cada trabalhador?	N
O programa é repetido regularmente (cada 2 ou 3 anos)?	S
O programa é assegurado por um funcionário com conhecimentos específicos na área dos riscos associados a citotóxicos e sua manipulação segura?	S
Os trabalhadores têm oportunidade para avaliar o treino que lhes é administrado?	N
O programa de formação é revisto regularmente para assegurar a sua eficácia e atualidade do seu conteúdo?	S

#### **Item 4– Condições para garantir a esterilidade da preparação de misturas de citotóxicos para administração**

<b>Questão</b>	
A preparação de citotóxicos para administração parentérica está centralizada na instituição?	S

A área de preparação está num local da farmácia específico sob o controlo do pessoal de farmácia (ou seja na farmácia central ou numa unidade satélite)?	S
Existe uma área separada para preparação de citotóxicos ou uma área limpa?	S
O acesso à área limpa faz-se através de uma antecâmara?	S
Existe um sistema de transfer entre a área de preparação e o ambiente circundante?	S
Está disponível um chuveiro de emergência junto à área de preparação de citotóxicos?	S
Existe um lava-olhos de emergência junto à área de preparação de citotóxicos?	N
O funcionamento do chuveiro e do lava-olhos é testado regularmente?	N
Existe um diferencial de pressões entre a área de preparação e o ambiente circundante?	S
Existe pressão positiva na área de preparação e pressão negativa na antecâmara?	N
Existe pressão negativa na área de preparação e pressão positiva na antecâmara?	S
As diferenças de pressão são monitorizadas?	S
O ar do local de trabalho é aspirado e expelido para o ambiente exterior?	S
O ar do local de trabalho aspirado passa por um filtro HEPA?	S
O ar que entra na área de preparação passa através de um filtro HEPA?	S

A recirculação de ar na área de preparação é de pelo menos 20 volumes da área por hora?	S
A temperatura na área de preparação é controlada?	S
A temperatura na área de preparação é mantida entre os 18°C e os 22°C?	S
A humidade na área de preparação é controlada?	S
A humidade relativa na área de preparação está entre os 30% e os 70%?	S
É feita colheita de partículas no ar da zona de preparação?	N
A integridade do filtro HEPA da área de preparação é monitorizada?	N
A velocidade do ar na área de preparação é monitorizada?	N

### Item 5 – Equipamentos de Protecção Individual

Questão	
Existem procedimentos escritos sobre o uso de EPIs?	S
É usada bata protetora durante a preparação de citotóxicos para administração parentérica?	S
A bata é impermeável aos citotóxicos?	S
A parte da frente da bata é fechada?	S
A bata é fechada ao nível do pescoço?	S
A bata tem mangas compridas?	S
A bata tem punhos apertados?	S
A bata é feita de material que não liberta resíduos?	S

São utilizadas proteções para sapatos destinadas apenas ao uso nesta área?	S
É utilizada uma máscara P2 ou P3 quando há risco de inalação de citotóxicos? (por exemplo quando é feita a descontaminação da câmara com a janela anterior levantada)	S
É utilizada uma máscara P2 ou P3 durante a preparação de produtos citotóxicos não estéreis?	S
São utilizados óculos quando há risco de contaminação acidental dos olhos? (por exemplo durante a descontaminação da câmara)	S
Durante a preparação são usadas luvas de latex ou de nitrilo?	S
As luvas são mudadas de 30 em 30 minutos?	S
As luvas são mudadas sempre que ficam danificadas ou contaminadas?	S
São exigidas luvas idênticas para os trabalhadores que retiram os citotóxicos necessários para preparar as misturas?	S
São exigidas luvas idênticas para os trabalhadores que conferem o produto final?	S
DISPOSITIVOS ESPECIAIS	
Utilizam apenas citotóxicos embalados em contentores à prova de fuga em caso de quebra?	N
São sempre usadas seringas <i>luer-lock</i> durante a preparação?	S
Durante a preparação é usado um sistema de transferência de fármacos fechado?	N
Se não é usado um sistema fechado, são usados spikes?	S

Se não é usado um sistema fechado é utilizado um filtro hidrofóbico com 0,2 $\mu$ para evitar um diferencial de pressão entre o interior e o exterior do frasco de citotóxico?	S
Se não é usado um sistema fechado são usadas agulhas de calibre largo (18G/1,2mm) durante a preparação das misturas?	S
Se não é usado um sistema fechado são usadas agulhas de 21G/0,8 mm ou menores para perfurar o acesso onde o citotóxico vai ser adicionado?	S
Se não é usado um sistema fechado é evitado o uso de agulhas normais a não ser que o citotóxico tenha sido removido de uma ampola de vidro ou que exista material particulado claramente visível?	N
Para administração dos citotóxicos é usado um sistema com contenção?	S
As linhas de administração são previamente tratadas na farmácia com um soluto não citotóxico antes da adição do citotóxico ao saco de infusão?	S
Os citotóxicos líquidos para administração oral são dispensados em unidoses?	N

### Item 6 – Câmaras de Fluxo Laminar

Questão	
Existe uma BSC tipo II B2?	S
A câmara está localizada numa área longe de esgotos, respiradouros e zonas de elevada circulação de pessoal?	S
A câmara é ventilada a 100% com ar não reciclado?	S
Existe tubagem independente para entrada e saída de ar na câmara?	N



A câmara tem dois filtros de exaustão mais um filtro suplente?	S
A câmara está equipada com equipamentos de monitorização contínua e alarmes de forma a confirmar que existe sempre um fluxo de ar adequado?	N
A qualidade do filtro HEPA é testada? (DOP/EMERY)	S
A qualidade do filtro é testada pelo menos 1 vez por ano por um certificador qualificado?	S
A velocidade do fluxo de ar é medida e registada pelo menos de 3-3 meses?	N
É feita contagem de partículas?	N
É feita e documentada contagem de partículas pelo menos de 3-3 meses?	N
É feita monitorização biológica?	S
É feito teste de fumo?	S
É medido o ruído provocado pela câmara?	S
É testado o nível de luminosidade na câmara? (400 Lux)	S
A câmara funciona 24 horas por dia, 7 dias por semana?	N

### Item 7 – Preparações não estéreis

Questão	
O equipamento usado é destinado apenas à preparação de citotóxicos?	S
A preparação decorre num compartimento separado utilizado apenas para preparações não estéreis de citotóxicos?	N

Este compartimento encontra-se sob pressão negativa relativamente ao ambiente circundante?	N
As preparações não estéreis são feitas numa BSC tipo I?	N
As preparações não estéreis são feitas numa BSC tipo II? (mas não a mesma usada para as preparações estéreis)	N
As preparações são feitas num ambiente fechado com acesso através de luvas? ( <i>glove box</i> )	N
Durante a preparação é usado equipamento de proteção individual?	S

### Item 8 – Procedimentos de verificação

Questão	
Os citotóxicos são requisitados por via eletrónica com registo em computador?	N
As requisições são verificadas em relação à sua correção e se estão ou não completas por um profissional de farmácia especializado na área oncológica antes de iniciar a preparação?	S
São criados perfis de quimioterapia para cada doente e estes são mantidos e estão disponíveis para consulta na farmácia?	S
O profissional de farmácia responsável pela verificação tem acesso a todos os regimes terapêuticos e protocolos usados no hospital?	S
Existem procedimentos escritos sobre como proceder em caso de utilização de um regime terapêutico não <i>standard</i> ?	N
O profissional de farmácia tem acesso ao processo clínico do doente?	S
O profissional de farmácia tem acesso a dados atualizados sobre o peso e altura do doente?	S

O profissional de farmácia tem acesso aos resultados das análises do doente?	S
O profissional de farmácia verifica todas as medicações que o doente está a utilizar?	S
O profissional de farmácia verifica a adequação da dose de quimioterapia com base nos resultados das análises incluindo as funções hepática e renal?	S
O profissional de farmácia pesquisa sobre a existência de eventuais interações medicamentosas?	S
Antes de iniciar a preparação existe uma confirmação assinada pelo profissional sobre: <ul style="list-style-type: none"> <li>• a correção do citotóxico e sua dose</li> <li>• a seleção do diluente adequado</li> <li>• o facto de todos os componentes estarem dentro do prazo de validade</li> <li>• o facto de todos os rótulos estarem corretos</li> </ul>	S S S S
Os números e datas de validade de todos os fármacos, diluentes e sacos de infusão podem ser retirados?	S
Todas as preparações são assinadas por quem as prepara?	S
Existe uma verificação final pelo profissional de farmácia antes da preparação ser entregue para administração?	N
Esta verificação final é confirmada através de uma assinatura?	N

### Item 9 – Procedimentos de limpeza

<b>Questão</b>	
Existem procedimentos escritos sobre a limpeza da câmara?	S

Existem procedimentos escritos sobre a descontaminação da câmara?	S
O trabalhador usa óculos para limpar e descontaminar a câmara sempre que a janela anterior está levantada?	S
O trabalhador usa dois pares de luvas para limpar e descontaminar a câmara?	S
O trabalhador lava as mãos com água e sabão imediatamente após remover as luvas?	S
O trabalhador usa uma bata impermeável aos citotóxicos com a frente fechada, mangas compridas e punhos apertados para limpar e descontaminar a câmara?	S
O trabalhador usa uma máscara P2 ou P3 para limpar e descontaminar a câmara?	N
O trabalhador usa uma cobertura descartável para o cabelo para limpar e descontaminar a câmara?	S
O trabalhador usa, se necessário, uma máscara para a barba para limpar e descontaminar a câmara?	N
A superfície de trabalho da câmara é limpa <ul style="list-style-type: none"> <li>• no início do dia de trabalho</li> <li>• no final do dia de trabalho</li> <li>• entre preparações</li> <li>• após fugas</li> </ul>	S S S S
A câmara é descontaminada pelo menos uma vez por semana com um detergente alcalino forte?	S
A parte inferior da câmara é limpa pelo menos uma vez por mês?	S

Os resíduos originados ao longo do dia pelos procedimentos de limpeza e descontaminação são recolhidos num contentor próprio para citotóxicos?	S
O trabalhador usa óculos para limpar a sala de preparação?	S
As superfícies de trabalho da sala de preparação são limpas diariamente?	S
As prateleiras de armazenamento são esvaziadas e limpas pelo menos uma vez por semana?	S
O exterior da câmara é limpo pelo menos uma vez por semana?	S
Os pavimentos são limpos diariamente da área mais contaminada para a menos contaminada?	S
As paredes e tecto são limpos pelo menos uma vez por mês?	S

### Item 10 – Procedimentos para lidar com fugas /extravasão de citotóxicos

Questão	
Existe um procedimento escrito para lidar com as fugas de citotóxicos dentro da câmara?	S
Existe um procedimento escrito para lidar com as fugas de citotóxicos em superfícies fora da câmara?	S
Existe um procedimento escrito para lidar com a contaminação do trabalhador por citotóxicos?	S
Estão disponíveis kits para extravasão de citotóxicos contendo todos os elementos necessários bem como instruções para a limpeza e manejo das fugas?	S
Os kits estão localizados nas zonas onde os citotóxicos são recebidos, armazenados, preparados e administrados?	S

Todos os trabalhadores envolvidos na manipulação de citotóxicos recebem treino relativamente aos procedimentos a adoptar em caso de fuga?	S
Existe um procedimento escrito sobre como lidar com a exposição acidental a citotóxicos?	S
Os incidentes que envolvem exposição acidental a citotóxicos são documentados e reportados a um supervisor?	S
Existe uma política escrita sobre como lidar com fugas de citotóxicos?	S
A farmácia tem uma lista de todos os fármacos corrosivos?	S
Existe um kit de extravasão na zona onde são administrados os fármacos corrosivos?	N

### **Item 11 – Procedimentos para lidar com resíduos de citotóxicos e fluidos corporais dos doentes**

<b>Questão</b>	
Existe um procedimento escrito sobre a remoção dos resíduos contaminados?	S
Os resíduos contaminados são separados dos não contaminados no processo de eliminação?	S
Os contentores para resíduos de citotóxicos são feitos de plástico rígido ou de cartão?	S
Estes contentores são á prova de fuga?	S
Os contentores estão claramente identificados como contendo citotóxicos?	S
Existe um procedimento escrito sobre como lidar com os fluidos corporais dos doentes que recebem quimioterapia?	N

São tomadas medidas especiais para lidar com estes fluidos nos 7 dias seguintes ao tratamento?	N
--	---

### Item 12 – Procedimentos relativos à lavandaria

Questão	
Existe um procedimento escrito para a manipulação das roupas dos doentes que receberam quimioterapia?	N
Os trabalhadores usam luvas quando manipulam estas roupas?	N
As roupas contaminadas são recolhidas em contentores identificados como contaminados?	N
Os trabalhadores evitam agitar demasiado a roupa, espalhando partículas, quando as estão a manipular?	N
Os doentes que têm que tomar banho na cama são limpos com toalhetes descartáveis?	S
A roupa contaminada é mantida separada da restante roupa?	N
A roupa contaminada é lavada à parte da restante roupa?	N
O processo de lavagem é iniciado com um ciclo de água fria?	N
O processo de lavagem é reiniciado depois com o processo de lavagem normal?	N

### Item 13 – Sistemas de aviso dos trabalhadores quanto à presença de citotóxicos

Questão	
Existe um sistema para avisar os trabalhadores da presença de citotóxicos na farmácia?	S

Existe um sistema para avisar os trabalhadores da presença de citotóxicos na zona de armazenamento?	S
Existe um sistema para avisar os trabalhadores da presença de citotóxicos na sala de preparação?	S
Existe um sistema de aviso dos trabalhadores sobre a presença de citotóxicos durante o transporte?	S
Existe um sistema de aviso dos trabalhadores sobre a presença de citotóxicos durante a administração?	S
Existe um sistema de aviso dos trabalhadores sobre a presença de citotóxicos durante a eliminação de resíduos?	S
Existe um sistema de aviso dos trabalhadores sobre a presença de citotóxicos quando os doentes fazem a quimioterapia em casa?	S
Existe um sistema de aviso dos trabalhadores sobre a presença de citotóxicos nos fluidos corporais e roupas dos doentes nos 7 dias após a quimioterapia?	N
Existe um sistema de aviso dos trabalhadores sobre a presença de citotóxicos orais na medicação que o doente leva para casa?	S

#### Item 14 – Gestão do risco

Questão	
Existe uma listagem atualizada de todos os fármacos perigosos usados na instituição?	S
A lista está disponível sempre que os produtos são recebidos, armazenados, preparados e administrados?	N
Esta listagem é atualizada regularmente e sempre que são adicionadas novas drogas ao formulário da instituição?	N



Todas as áreas da instituição que possam eventualmente ser alvo de contaminação estão identificadas, desde a receção dos fármacos até à eliminação dos fluídos dos doentes?	N
São efetuadas regularmente <i>wipe samples</i> para avaliar a contaminação de superfícies?	N
São efetuadas regularmente colheitas para avaliar a contaminação do ar com citotóxicos?	N
Os resultados obtidos são usados para implementar alterações dos procedimentos?	N
Os trabalhadores são alvo de exames médicos iniciais e anuais?	S
Os exames médicos incluem um questionário geral?	S
Os exames médicos incluem exames objectivos?	S
Os exames médicos incluem análises ao sangue?	S
Os exames médicos incluem outros testes como análises de urina ou espirometria?	S

### Item 15 – Gestão dos medicamentos

Questão	
Existe uma equipa multidisciplinar para seleção dos medicamentos do formulário institucional?	S
Está implementado um processo para a revisão do uso de medicamentos de custo elevado?	S
Existe um sistema de verificação das datas de validade e de remoção de todos os medicamentos com a data expirada?	S

Existem políticas e procedimentos escritos sobre armazenamento e rotulagem de fármacos?	S
Existem políticas e procedimentos escritos sobre o manejo dos fármacos devolvidos à farmácia?	S
Existem políticas e procedimentos escritos sobre a reutilização de fármacos?	N
Existem políticas e procedimentos escritos sobre o que fazer com embalagens de fármacos parcialmente utilizadas?	S
Existem políticas e procedimentos escritos sobre o uso de fármacos não licenciados?	S
Existem políticas e procedimentos escritos sobre a utilização off-label de fármacos?	S
Existem políticas e procedimentos escritos sobre o uso de fármacos em investigação?	S

### Item 16 – Documentação

Questão	
São mantidos registos sobre a monitorização da saúde dos trabalhadores?	S
São mantidos registos sobre a formação e treino dos trabalhadores envolvidos na manipulação de citotóxicos?	S
Existe documentação escrita do fornecimento de informação sobre os riscos da exposição ocupacional a citotóxicos?	S
São mantidos registos da validação dos trabalhadores que preparam citotóxicos?	S
São mantidos registos da exposição dos trabalhadores a citotóxicos?	S

São mantidos registos sobre a monitorização microbiológica da sala de preparação?	N
São mantidos registos sobre a monitorização microbiológica da câmara?	S
São mantidos registos da contaminação química, se esta for efetuada?	N
São mantidos registos sobre a manutenção técnica da câmara e outros dispositivos com ventilação?	S
São mantidos registos sobre a limpeza e descontaminação dos sistemas de ventilação?	S
São mantidos registos sobre a limpeza da sala de preparação?	S
São mantidos registos sobre o diferencial de pressões entre salas?	S
São mantidos registos sobre o transporte de citotóxicos para fora da farmácia?	S
É mantido um registo das fugas de citotóxicos?	S
É mantido um registo dos acidentes com picadas e respetivo seguimento?	S
É mantido um registo dos incidentes envolvendo extravasão de citotóxicos?	S
É mantido um registo de outros incidentes (ex: receção de ampolas quebradas)?	S



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
*Escola Nacional de Saúde Pública*

# **Universidade Nova de Lisboa**

## **Escola Nacional de Saúde Pública**

**Exposição Ocupacional a Citostáticos e Efeitos sobre a Saúde em duas  
Unidades Hospitalares Portuguesas**

**ANEXO 5**

**Resultados do Registo na Grelha de Observação**

**Resultados da observação direta da atividade de trabalho com registo em grelha de observação e das entrevistas com os trabalhadores confrontados com os procedimentos escritos – zona de preparação**

<b>Limpeza e desinfeção da câmara</b>	
Existem procedimentos escritos para a limpeza da câmara	S
A limpeza é feita por profissionais com formação para esta tarefa	S
A descontaminação é feita: <ul style="list-style-type: none"> <li>• diariamente</li> <li>• semanalmente</li> <li>• mensalmente</li> </ul>	S
A desinfeção é feita <ul style="list-style-type: none"> <li>• diariamente</li> <li>• semanalmente</li> <li>• mensalmente</li> </ul>	D
A superfície da câmara é descontaminada <ul style="list-style-type: none"> <li>• no início do dia de trabalho</li> <li>• no final do dia de trabalho</li> <li>• entre as preparações</li> <li>• após derrames</li> </ul>	N N N N
A superfície da câmara é desinfectada <ul style="list-style-type: none"> <li>• no início do dia de trabalho</li> <li>• no final do dia de trabalho</li> <li>• entre as preparações</li> <li>• após derrames</li> </ul>	S S N S

<p>Durante a limpeza os profissionais usam:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• bata descartável</li> <li>• luvas</li> <li>• máscara</li> <li>• protectores de calçado</li> <li>• óculos de protecção</li> </ul>	<p>S</p> <p>S</p> <p>S</p> <p>S</p> <p>N</p>
Desinfeta diariamente as superfícies da câmara com álcool a 70°	S
Descontamina as superfícies da câmara pelo menos uma vez por semana com um detergente alcalino	S
A parte inferior da superfície de trabalho da câmara é limpa pelo menos uma vez por mês	N
Desinfeta a câmara pela ordem: painel frontal, painéis laterais, bancada, vidro (dentro) e vidro (fora)	S
Desinfeta de cima (junto ao filtro) para baixo perpendicularmente ao filtro HEPA	S
Durante a desinfeção quando chega a um canto descreve uma curva com a gaze e regressa ao lado oposto junto ao local onde começou em forma de S	S
Desinfeta a câmara cerca de 30 min antes do início das preparações	N
Desinfeta a câmara cerca de 30 min após as preparações	N

Desinfeta as torneiras e lâmpadas dentro da câmara	N
A câmara é usada apenas para a preparação de citotóxicos	N
Descontamina a câmara quando se preparam medicamentos não citotóxicos após ter preparado medicamentos citotóxicos	N
Os desperdícios resultantes da limpeza são colocados em sacos vermelhos (tipo IV) que são fechados e retirados da câmara com o mínimo de movimentos	S
<b>Limpeza e desinfeção da sala</b>	
Os procedimentos de limpeza estão escritos	S
A limpeza é feita por profissionais com formação para esta tarefa	S <sup>1</sup> N <sup>2</sup>
<sup>1</sup> bancadas	
<sup>2</sup> restantes zonas	
O teto e as paredes são limpos mensalmente	N
São limpos diariamente	
• chão	S
• bancadas	S
• cadeiras	N
• exterior da câmara	N
Durante a limpeza os profissionais utilizam	
• bata descartável	S
• luvas	S
• máscara	S
• protectores de calçado	S
• óculos de protecção	S

	S
	N
Limpa diariamente todas as superfícies com água e detergente	N
Desinfeta diariamente todas as bancadas com álcool a 70°	S
As prateleiras e armários de armazenamento são limpos	N
Existe um balde e uma esfregona usados apenas na sala limpa e semilimpa	N
Efetua a limpeza diária do chão no sentido da zona suja para a zona semilimpa	N
Efetua o registo das limpezas realizadas	N
Os desperdícios resultantes da limpeza são colocados em sacos vermelhos (tipo IV)	N
<b>Limpeza e desinfeção do material</b>	
O material não estéril usado na preparação de citotóxicos é lavado separadamente do restante material	N
Desinfeta os materiais com álcool a 70°	S
Os materiais estão em contacto com o álcool pelo menos 2 minutos	N
É realizada a validação microbiológica	N
É realizada a validação química	N
<b>Preparação de medicamentos citotóxicos</b>	
Existem procedimentos escritos para a reconstituição, diluição, mistura, rotulagem e acondicionamento	S
Antes do início da preparação é verificado:	



<ul style="list-style-type: none"> <li>• temperatura</li> <li>• humidade</li> <li>• pressão</li> <li>• portas fechadas</li> </ul>	S
	S
	S
	N
Liga a câmara cerca de 30 min antes do início da preparação	S
Escolhe atempadamente o material necessário	S
Usa campos de trabalho para quimioterapia	S
Durante a preparação os profissionais usam:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• bata descartável</li> </ul>	S
<ul style="list-style-type: none"> <li>• dois pares de luvas</li> </ul>	S
<ul style="list-style-type: none"> <li>• máscara</li> </ul>	S
<ul style="list-style-type: none"> <li>• protectores de calçado</li> </ul>	S
<ul style="list-style-type: none"> <li>• óculos de protecção</li> </ul>	S
	N
Coloca um medicamento de cada vez dentro da câmara	S
Realiza uma preparação de cada vez	S
Usa seringas com conexões luer-lock	S
Usa dispositivos de ventilação do ar para igualar as pressões e para prevenir a passagem de pó, aerossóis e líquidos (spike)	S
Experimenta o conjunto seringas/agulha antes de o usar	S
Usa técnicas que evitam a formação de diferenças de pressão	S
Controlo o volume dos citotóxicos e do ar aquando da sua medição	S
Confere os volumes medidos	S

Os sistemas de administração são purgados na câmara	S
Não fecha completamente o vidro da câmara	N
Sempre que o alarme deteta alterações do fluxo de ar interrompe o trabalho e investiga a causa	não há alarme
Muda as luvas de 30 em 30 min	N
Muda as luvas sempre que ocorre um derrame	S
Faz pausas a cada 2 horas	S
Regista todo o material usado e as preparações efetuadas	S
Existe um transfer de entrada e outro de saída	N
É realizado o controlo microbiológico do ambiente da câmara	S
É feita uma inspeção visual do produto acabado	S
São confirmados os volumes	S
É confirmado o rótulo	S
É realizada a validação da qualidade microbiológica do produto	N
É realizada a confirmação dos volumes medidos durante a preparação	S
É realizada a validação química do produto	N

**Resultados da observação direta da atividade de trabalho com registo em grelha de observação e das entrevistas com os trabalhadores confrontados com os procedimentos escritos – zona de administração**

<b>Limpeza e desinfeção da sala</b>	
Os procedimentos de limpeza estão descritos	N
A limpeza é feita por profissionais com formação para esta tarefa	N

O teto e as paredes são limpos mensalmente	N
São limpos diariamente <ul style="list-style-type: none"> <li>• Chão</li> <li>• Bancadas</li> <li>• Portas</li> <li>• Cadeiras</li> </ul>	S N N N
Durante a limpeza os profissionais usam <ul style="list-style-type: none"> <li>• Bata descartável</li> <li>• Luvas</li> <li>• Máscara</li> <li>• Protetores de calçado</li> <li>• Óculos de proteção</li> </ul>	N S N N N
Limpa diariamente todas as superfícies com água e detergente	N
Desinfeta diariamente todas as bancadas com álcool a 70°	N
As prateleiras e armários de armazenamento são limpos e desinfetados	N
Existe um balde e uma esfregona utilizados apenas na sala de administração	N
Efetua a limpeza diária do chão no sentido da zona suja para a zona semilimpa	N
Efetua o registo das limpezas realizadas	
Os desperdícios resultantes da limpeza são colocados em sacos vermelhos (tipo IV)	S

O material não estéril utilizado na administração de citotóxicos é lavado separadamente do restante material	N
Os lençóis são lavados separadamente da restante roupa	N
É feita validação microbiológica	N
É feita validação química	N
<b>Procedimentos de administração de citotóxicos</b>	
A zona de administração encontra-se fisicamente nas proximidades da zona de preparação	S
Existe um sistema de transporte específico e com regras definidas por escrito para trazer os citotóxicos da zona de preparação para a zona de administração	S
Existe sistema de transfer específico para movimentar citotóxicos entre zonas de preparação e administração	S
Existem procedimentos escritos para a administração (colocação e retirada)	S
A identidade do doente é verificada verbalmente	S
A prescrição é verificada, garantindo que todos os detalhes estão corretos incluindo a data de administração, a via de administração e a dose	S
O rótulo da preparação é verificado em relação à prescrição	S
Para administração os enfermeiros usam:	
• Bata descartável	N
• Luvas	S
• Máscara	S
• Protetores de calçado	S
• Óculos de proteção	N

	N
Os enfermeiros usam luvas específicas para manipular cada mistura e descartam-nas imediatamente após ter cessado a manipulação	S
O enfermeiro aspira o cateter e verifica o retorno de sangue para confirmar que não existe obstrução antes de administrar os citotóxicos	S
Se for administrado mais de um medicamento pela mesma via esta é lavada (com solução recomendada) entre administrações	S
O local de injeção é coberto com uma compressa esterilizada durante a administração	N
No final o local de infusão é deixado visível para fácil identificação de eventuais problemas	S
Há registo de todas as preparações administradas	S
As bolsas são desperdiçadas juntamente com os sistemas	S
No final as preparações são colocadas em recipientes vermelhos (tipo IV)	S
É feita lavagem das mãos sempre que se sai da sala de administração	S
São feitas pausas a cada 2 horas	N



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
*Escola Nacional de Saúde Pública*

# **Universidade Nova de Lisboa**

## **Escola Nacional de Saúde Pública**

**Exposição Ocupacional a Citostáticos e Efeitos sobre a Saúde em duas  
Unidades Hospitalares Portuguesas**

**ANEXO 6**

**Resultados Individuais do Teste de Micronúcleos**

**Características e percentagem de células micronucleadas no grupo de  
trabalhadores expostos a citostáticos**

Amostra	Género	Idade	Fumador	Carga tabágica	Álcool	Ocupação	Tempo exp anos	MN
1	F	26	0	0	0	Farmácia	3	11
2	F	26	0	0	0	Farmácia	3	1
3	F	32	0	0	1	Farmácia	10	2
4	F	38	0	0	0	Enfermagem	4	5
5	F	26	0	0	1	Enfermagem	5	3
6	F	55	0	0	1	Enfermagem	8	2
7	M	46	0	0	0	Enfermagem	5	18
8	F	27	0	0	0	Enfermagem	2	6
9	F	34	0	0	0	Enfermagem	3	9
10	F	39	0	0	1	Enfermagem	7	17
11	F	36	0	0	0	Enfermagem	0,5	5
12	M	29	1	6	1	Enfermagem	5	7
13	F	30	0	0	0	Enfermagem	0,6	8
14	F	27	0	0	0	Enfermagem	4	1
15	F	31	1	2	1	Enfermagem	6	9
16	F	36	0	0	0	Enfermagem	7	2
17	F	41	0	0	0	Enfermagem	0,5	10
18	F	28	0	0	0	Enfermagem	5	8
19	F	34	0	0	0	Enfermagem	2	6
20	F	26	0	0	1	Farmácia	3	16
21	F	28	0	0	0	Farmácia	0,5	4
22	F	29	0	0	0	Farmácia	4	8
23	F	30	0	0	0	Farmácia	5	9
24	F	29	0	0	0	Farmácia	2	7
25	F	41	0	0	0	Auxiliar	8	13
26	F	28	0	0	1	Farmácia	1	14
27	F	52	0	0	0	Auxiliar	8	15
28	F	28	0	0	0	Farmácia	2	8
29	F	31	0	0	0	Farmácia	7	5
30	F	30	0	0	1	Farmácia	5	19
31	F	36	0	0	0	Farmácia	12	10
32	F	38	0	0	1	Enfermagem	4,6	14
33	F	39	0	0	1	Enfermagem	26	48
34	F	30	0	0	0	Enfermagem	8	10
35	F	58	0	0	0	Farmácia	30	10
36	F	39	0	0	0	Enfermagem	9	20
37	F	28	0	0	1	Enfermagem	5	5
38	F	31	0	0	0	Enfermagem	9	10
39	F	43	0	0	0	Enfermagem	21	11
40	F	39	0	0	0	Enfermagem	17	10
41	F	42	1	8	0	Enfermagem	17	6
42	M	31	0	0	0	Enfermagem	6	6
43	M	25	1	2	0	Enfermagem	1	7
44	F	30	0	0	0	Farmácia	3	11
45	F	24	0	0	0	Farmácia	0,75	6
46	F	31	0	0	0	Farmácia	8	10
<b>Frequência global</b>								<b>9,83±8,65</b>

**Características e percentagem de células micronucleadas no grupo de indivíduos  
controlo não expostos a citostáticos**

<b>Amostra</b>	<b>Género</b>	<b>Idade</b>	<b>Fumador</b>	<b>Carga tabágica</b>	<b>Álcool</b>	<b>MN lymph</b>
1C	F	28	0	0	1	1
2C	F	35	0	0	0	5
3C	M	51	0	0	0	6
4C	F	49	0	0	0	12
5C	M	61	0	0	1	3
6C	M	20	0	0	0	0
7C	F	43	1	3	1	1
8C	M	23	0	0	1	0
9C	F	51	0	0	1	0
10C	F	57	0	0	0	34
11C	F	43	0	0	0	0
12C	F	42	1	10	0	9
13C	F	28	1	10	0	3
14C	M	41	0	0	0	0
15C	F	27	1	5	0	1
16C	F	48	0	0	1	6
17C	F	42	0	0	0	1
18C	F	36	0	0	1	1
19C	F	30	1	12	0	0
20C	F	44	1	10	0	5
21C	F	47	1	20	0	3
22C	F	25	1	2	0	0
23C	F	46	0	0	0	6
24C	F	39	0	0	0	1
25C	F	38	0	0	0	6
26C	F	50	0	0	0	11
27C	F	35	0	0	0	7
28C	F	39	0	0	0	4
29C	0	42	0	0	0	3
30C	F	49	0	0	0	3
31C	F	35	0	0	0	13
32C	M	43	0	0	1	15
33C	F	52	1	15	1	9
34C	F	28	0	0	0	13
35C	F	36	0	0	0	2
36C	F	32	0	0	0	4
37C	M	46	0	0	0	8
38C	F	45	0	0	0	12
39C	M	26	1	16	1	3
40C	M	39	0	0	1	5
41C	F	37	0	0	0	5
42C	M	23	0	0	1	2
43C	M	32	0	0	0	0
44C	F	30	0	0	0	0
45C	F	51	0	0	0	7
46C	F	38	0	0	0	4
<b>Frequência global</b>						<b>5,09±6,00</b>





**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
*Escola Nacional de Saúde Pública*

# **Universidade Nova de Lisboa**

## **Escola Nacional de Saúde Pública**

**Exposição Ocupacional a Citostáticos e Efeitos sobre a Saúde em duas  
Unidades Hospitalares Portuguesas**

**ANEXO 7**

**Resultados Individuais do Teste do Cometa**

**Percentagem de ADN na cauda do cometa no grupo de trabalhadores expostos a citostáticos**

Amostra	Género	Idade	Fumador	Carga tabágica	Álcool	Ocupação	Tempo exp anos	% ADN
1	F	26	0	0	0	Farmácia	3	5,87
2	F	26	0	0	0	Farmácia	3	21,16
3	F	32	0	0	1	Farmácia	10	8,83
4	F	38	0	0	0	Enfermagem	4	15,67
5	F	26	0	0	1	Enfermagem	5	7,51
6	F	55	0	0	1	Enfermagem	8	9,44
7	M	46	0	0	0	Enfermagem	5	8,92
8	F	27	0	0	0	Enfermagem	2	28,04
9	F	34	0	0	0	Enfermagem	3	14,03
10	F	39	0	0	1	Enfermagem	7	22,91
11	F	36	0	0	0	Enfermagem	0,5	12,11
12	M	29	1	6	1	Enfermagem	5	22,85
13	F	30	0	0	0	Enfermagem	0,6	20,88
14	F	27	0	0	0	Enfermagem	4	13,40
15	F	31	1	2	1	Enfermagem	6	9,92
16	F	36	0	0	0	Enfermagem	7	16,09
17	F	41	0	0	0	Enfermagem	0,5	30,74
18	F	28	0	0	0	Enfermagem	5	24,31
19	F	34	0	0	0	Enfermagem	2	13,21
20	F	26	0	0	1	Farmácia	3	21,51
21	F	28	0	0	0	Farmácia	0,5	13,80
22	F	29	0	0	0	Farmácia	4	25,68
23	F	30	0	0	0	Farmácia	5	20,30
24	F	29	0	0	0	Farmácia	2	2,89
25	F	41	0	0	0	Auxiliar	8	10,83
26	F	28	0	0	1	Farmácia	1	17,29
27	F	52	0	0	0	Auxiliar	8	22,35
28	F	28	0	0	0	Farmácia	2	31,64
29	F	31	0	0	0	Farmácia	7	1,79
30	F	30	0	0	1	Farmácia	5	27,20
31	F	36	0	0	0	Farmácia	12	4,61
32	F	38	0	0	1	Enfermagem	4,6	44,50
33	F	39	0	0	1	Enfermagem	26	20,21
34	F	30	0	0	0	Enfermagem	8	22,66
35	F	58	0	0	0	Farmácia	30	3,33
36	F	39	0	0	0	Enfermagem	9	24,03
37	F	28	0	0	1	Enfermagem	5	20,39
38	F	31	0	0	0	Enfermagem	9	3,26
39	F	43	0	0	0	Enfermagem	21	5,76
40	F	39	0	0	0	Enfermagem	17	5,43
41	F	42	1	8	0	Enfermagem	17	3,50
42	M	31	0	0	0	Enfermagem	6	13,01
43	M	25	1	2	0	Enfermagem	1	10,71
44	F	30	0	0	0	Farmácia	3	5,83
45	F	24	0	0	0	Farmácia	0,75	4,31
46	F	31	0	0	0	Farmácia	8	5,54
<b>Percentagem média de ADN na cauda do cometa</b>								<b>15,18±9,5</b>

### Percentagem de ADN na cauda do cometa no grupo de indivíduos controlo

Amostra	Género	Idade	Fumador	Carga tabágica	Álcool	% ADN
1C	F	28	0	0	1	3,78
2C	F	35	0	0	0	30,43
3C	M	51	0	0	0	14,33
4C	F	49	0	0	0	13,40
5C	M	61	0	0	1	15,20
6C	M	20	0	0	0	6,76
7C	F	43	1	3	1	10,77
8C	M	23	0	0	1	5,30
9C	F	51	0	0	1	21,19
10C	F	57	0	0	0	4,58
11C	F	43	0	0	0	17,65
12C	F	42	1	10	0	26,57
13C	F	28	1	10	0	22,63
14C	M	41	0	0	0	3,49
15C	F	27	1	5	0	23,32
16C	F	48	0	0	1	6,75
17C	F	42	0	0	0	22,30
18C	F	36	0	0	1	20,03
19C	F	30	1	12	0	23,53
20C	F	44	1	10	0	16,31
21C	F	47	1	20	0	8,00
22C	F	25	1	2	0	13,91
23C	F	46	0	0	0	20,32
24C	F	39	0	0	0	11,29
25C	F	38	0	0	0	3,72
26C	F	50	0	0	0	20,30
27C	F	35	0	0	0	2,48
28C	F	39	0	0	0	23,60
29C	0	42	0	0	0	18,49
30C	F	49	0	0	0	28,18
31C	F	35	0	0	0	5,21
32C	M	43	0	0	1	2,79
33C	F	52	1	15	1	3,08
34C	F	28	0	0	0	5,91
35C	F	36	0	0	0	5,30
36C	F	32	0	0	0	4,22
37C	M	46	0	0	0	4,59
38C	F	45	0	0	0	5,06
39C	M	26	1	16	1	4,91
40C	M	39	0	0	1	5,01
41C	F	37	0	0	0	2,68
42C	M	23	0	0	1	4,12
43C	M	32	0	0	0	4,54
44C	F	30	0	0	0	20,30
45C	F	51	0	0	0	20,32
46C	F	38	0	0	0	13,91
<b>Percentagem média de ADN na cauda do cometa</b>						<b>12,38±8,4</b>