

Avaliação da Exposição Profissional ao Formaldeído: Efeito Genotóxico

Carolina Duarte de Sousa Pina

Dissertação de Mestrado em Contaminação e Toxicologia Ambientais

2010

Carolina Duarte de Sousa Pina

Avaliação da Exposição Profissional ao Formaldeído: Efeito Genotóxico

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Contaminação e Toxicologia Ambientais submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Doutor João Paulo Teixeira

Categoria – Investigador Auxiliar do Departamento de Saúde Ambiental e Ocupacional

Afiliação – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, I.P.

Resumo

O Formaldeído (FA) é um dos compostos químicos mais utilizados em todo o mundo. A sua aplicação é multifacetada e transversal a praticamente todas as actividades, sendo que a exposição humana a este composto assume particular importância a nível industrial e no sector da saúde, onde é bastante utilizado. Este facto aliado ao seu baixo custo de produção, faz do FA um químico de uso corrente e de difícil substituição.

Recentemente a *International Agency for Research on Cancer (IARC)* reclassificou-o como agente carcinogénico para o Homem, com base em estudos epidemiológicos de populações ocupacionalmente expostas. Embora tenha sido classificado como carcinogénico, não existem até ao momento dados conclusivos no que se refere às consequências na saúde humana da exposição a este aldeído. O potencial genotóxico e citotóxico do FA está descrito tanto *in vitro* como *in vivo*. Vários estudos apontam os laboratórios de anatomia patológica como sendo um dos cenários ocupacionais em que os trabalhadores estão expostos a elevados níveis de FA. Nestes laboratórios decorrem actividades que implicam a libertação de vapores de FA pela utilização de formol, usado em procedimentos anatomopatológicos para conservar e armazenar biópsias e peças cirúrgicas. Um estudo recente, realizado em Portugal, indica que os valores de FA existentes no ar dos laboratórios dos Serviços Hospitalares de Anatomia Patológica excedem valores normativos, tanto nacionais como internacionais.

Neste contexto desenvolveu-se um trabalho que teve como principal objectivo avaliar o efeito genotóxico da exposição ocupacional a FA em profissionais dos Serviços Hospitalares de Anatomia Patológica, relacionando um biomarcador de toxicidade e a exposição. Para o efeito foi estudada uma população de 55 profissionais dos Serviços Hospitalares de Anatomia Patológica, expostos a FA no seu ambiente de trabalho e 52 indivíduos com historial ocupacional de não exposição a FA e com características demográficas e estilos de vida semelhantes ao grupo exposto.

A avaliação da exposição ocupacional a FA foi realizada pela medição da concentração no local de trabalho e pela análise de um indicador biológico, o teste do micronúcleo (MN). Para estimar o nível de exposição a FA nos Serviços de Anatomia Patológica durante a jornada de trabalho (TWA) recorreu-se à amostragem contínua de ar no posto de trabalho, representativa do ar inalado pelos trabalhadores. Para a observação dos efeitos genotóxicos recorreu-se ao teste do MN em linfócitos de sangue periférico.

Para o grupo de trabalhadores estudados, tendo em conta a jornada de trabalho (8 horas diárias e 40 horas semanais) obteve-se um valor médio de exposição a FA de 0.49 ppm. Os resultados obtidos para o indicador de genotoxicidade revelaram que os indivíduos expostos apresentaram, em média, maior dano genético comparativamente aos

indivíduos do grupo controlo. Observou-se no grupo exposto uma relação estatisticamente significativa entre a exposição a FA e a frequência de MN ($p < 0.003$). A análise das características da população sugere que o género tem um efeito significativo na frequência de MN em ambos os grupos ($p < 0.017$) e que o fumo do tabaco não influencia significativamente a variável dependente estudada. Observou-se uma maior frequência de MN com o aumento da idade e com o aumento do tempo de exposição a FA.

O conjunto de dados reunidos contribui para a caracterização da exposição a FA num contexto profissional específico, podendo, deste modo, revelar-se particularmente útil para reforçar a necessidade de alterar as práticas de trabalho de forma a salvaguardar a saúde dos profissionais. Por outro lado, a informação recolhida será útil para as entidades responsáveis em definir os níveis aceitáveis para a exposição ocupacional a FA e para os serviços que têm a seu cargo a vigilância da saúde dos trabalhadores.

Abstract

Formaldehyde (FA) is an important industrial compound with numerous applications ranging from the production of resins to medicine. At room temperature is a flammable and colorless gas with a strong pungent odor. It is also a naturally occurring biological compound present in tissues, cells and body fluids. The highest level of human exposure to this aldehyde occurs in occupational settings. Because of its widespread use a relatively large number of workers are exposed to FA. Increased incidences of nasopharyngeal cancer were found in populations occupationally exposed to FA. There was also some evidence for an association between FA exposure and leukemia. Based on available data the International Agency for Research on Cancer (IARC) classified FA carcinogenic to humans. Several studies have shown the potential genotoxic effect of FA in proliferating cultured mammalian cell lines and in human lymphocytes. Induction of micronuclei was reported in industrial workers, embalmers and pathologists/anatomists exposed to FA. Although the *in vitro* genotoxic as well as the *in vivo* carcinogenic potentials of FA are well documented in mammalian cells and in rodents, *in vivo* genotoxic effects and carcinogenic properties in humans remains to be more documented. Occupational exposure to FA occurs mainly in pathology and anatomy laboratories where it is widely used as a tissue preservative for more than 100 years. In these settings, absorption of FA occurs mainly through inhalation. Inhaled FA primarily affects the upper airways; the severity and extent of physiological response depends on its concentration in the air. Several studies have consistently shown that the levels of airborne FA in anatomy laboratories exceed recommended exposure criteria.

The aim of the present study was to evaluate cytogenetic damage in peripheral lymphocytes of 55 workers from five hospital pathology and anatomy laboratories exposed to FA. Genetic damage was studied using a specific biomarker of effect, the micronucleus test (MN test).

The concentration of airborne FA in pathology and anatomy laboratories was also determined. Air sampling was performed in the breathing zone for representative working periods, and subsequent FA quantification was carried out in order to estimate the time weighted average (TWA) level of exposure for each subject. An unexposed group (n = 52) from the same area and with same demographic characteristics without occupational exposure history to genotoxic compounds was studied and data obtained from both groups were compared.

For each subject selected for the study relevant data on personal and medical history were elicited via standard questionnaire. Controls did not differ from exposed workers in gender, age and smoking habits.

The TWA mean value (8 h) for FA exposed workers was 0.49 ± 0.06 ppm (range 0.07 - 1.58 ppm). MN frequency was significantly higher ($p < 0.003$) in the exposed subjects (6.02 ± 0.58) when compared with controls (3.71 ± 0.50). Gender had a significant effect on the frequency of the studied biomarker in both groups ($p < 0.017$). Smoking habits had no significant effect on the MN frequency. It was also found a relationship between age and exposure time, occurring higher MN frequency with increased age and with increased exposure time to FA.

Genotoxic endpoints analysis may be of great interest in risk assessment of occupational carcinogens because they precede by a long time the potential health effects, thus offering a greater potential for preventive measures. The results of the present biomonitoring study emphasize the need of more effective measures in order to protect the workers from potentially hazard health effects due to occupational exposure to FA. Implementation of security and hygiene measures in this sector as well as good practices campaigns may be crucial to decrease risk.

Agradecimentos

Este espaço é dedicado a todos os que participaram directa ou indirectamente na elaboração deste trabalho. A todos eles deixo aqui a minha sincera gratidão.

Agradeço a todos os profissionais de Anatomia Patológica que aceitaram participar neste projecto pois sem eles não poderia ter concretizado os meus objectivos, às Instituições e aos responsáveis pelos Serviços de Anatomia Patológica por terem permitido a realização do estudo.

Ao meu orientador, Doutor João Paulo Teixeira, agradeço a sugestão do tema, a possibilidade de realização desta dissertação e a orientação prestada. A sua paciência e disponibilidade, os seus ensinamentos, sugestões e conselhos foram essenciais em todas as etapas deste trabalho. Agradeço ainda a confiança depositada em mim e tudo o que aprendi.

Um agradecimento muito especial à Dra. Solange Costa pelo incansável acompanhamento e pela disponibilidade, incentivo e apoio constantes, sem os quais este trabalho não seria concluído. Pelo modo empenhado e estimulante com que acompanhou a realização desta dissertação, pela ajuda fundamental na análise e críticas construtivas, pelos conhecimentos teóricos e práticos facultados que foram de essencial importância neste percurso, pelo ânimo e atitude positiva que sempre me incutiu em todas as ocasiões, pela inesgotável paciência, pelos conselhos, ideias, comentários e sugestões que foram factores decisivos ao longo desta jornada.

Um obrigada também a todos os membros do Departamento de Saúde Ambiental pela ajuda, simpatia e bom ambiente de trabalho com que me presentearam durante o período de elaboração deste trabalho. Não posso deixar de agradecer à Dra. Susana Silva, Dra. Patrícia Coelho e Dra. Carla Costa pelos seus ensinamentos, disponibilidade, sugestões, simpatia, prestabilidade, generosidade e boa vontade.

A todos os colegas de mestrado agradeço os agradáveis momentos e os conhecimentos partilhados, em especial à Daniela e ao Miguel pelo companheirismo e amizade, e à Ana e Joana, pelo incentivo e cumplicidade.

Aos meus amigos de sempre, Ana Isabel, Maria, Marina, André, Luís, Pedro e Amadeu agradeço toda a força, alegria e amizade.

Agradeço sobretudo aos meus pais e ao meu irmão Bernardo pelo entusiasmo, apoio, confiança e paciência durante esta jornada.

Índice

| | Pág. |
|--|-----------|
| Índice de abreviaturas..... | i |
| Índice de figuras..... | iii |
| Índice de tabelas..... | v |
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. Formaldeído (FA) | 3 |
| 1.1.1. Aplicações e relevância comercial | 4 |
| 1.1.2. Exposição Ambiental | 5 |
| 1.1.3. Exposição Ocupacional..... | 5 |
| 1.1.4. Metabolismo..... | 6 |
| 1.1.5. Efeitos na Saúde..... | 7 |
| 1.1.5.1. Sintomatologia | 7 |
| 1.1.5.2. Carcinogenicidade..... | 9 |
| 1.2. Avaliação de Exposição | 11 |
| 1.2.1. Monitorização Ambiental | 11 |
| 1.2.2. Monitorização Biológica..... | 14 |
| 1.2.2.1. Biomarcadores | 15 |
| 1.2.2.1.1. Biomarcadores de exposição | 15 |
| 1.2.2.1.2. Biomarcadores de efeito | 17 |
| 1.2.2.1.3. Biomarcadores de susceptibilidade. | 22 |
| 2. Materiais e Métodos | 25 |
| 2.1. População estudada | 25 |
| 2.1.1. Contacto com as Instituições e informação relevante | 25 |
| 2.2. Metodologia | 26 |
| 2.2.1. Monitorização Ambiental | 26 |
| 2.2.2. Monitorização Biológica | 28 |
| 2.3. Análise Estatística | 29 |
| 3. Resultados | 31 |
| 3.1. Monitorização Ambiental | 31 |
| 3.2. Monitorização Biológica | 31 |
| 3.2.1. Teste do micronúcleo | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.2. Relação entre a exposição a formaldeído e a frequência de micronúcleos | 32 |
| 3.2.3. Relação entre o sexo dos indivíduos e a frequência de micronúcleos..... | 33 |
| 3.2.4. Relação entre a idade dos indivíduos e a frequência de micronúcleos.... | 34 |
| 3.2.5. Relação entre os hábitos tabágicos dos indivíduos e a frequência de micronúcleos | 36 |
| 3.2.6. Relação entre o tempo de exposição dos indivíduos e a frequência de micronúcleos | 37 |
| 4. Discussão | 39 |
| 5. Conclusão | 43 |
| Bibliografia | 45 |
| Anexo I | I |

Índice de Abreviaturas

| | |
|-------|---|
| AC | Aberrações Cromossómicas |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| BrdU | 5-bromodeoxiuridina |
| C | Ceiling Limit (concentração máxima) |
| Cyt-B | Citocalasina-B |
| FA | Formaldeído |
| FBS | Fetal bovine serum (soro fetal bovino) |
| GSH | Glutationa |
| IARC | International Agency for Research on Cancer |
| MN | Miconúcleo(s) |
| NAD | Nicotinamida adenina dinucleótido |
| NADH | Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reduzida) |
| NIOSH | National Institute for Occupational Safety and Health |
| NP | Norma Portuguesa |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| OSHA | Occupational Safety and Health Administration |
| PEL | Permissible exposure limit |
| ppm | Partes por milhão |
| REL | Recommended airborne exposure limit |
| rpm | Rotações por minuto |
| SCE | Sister Chromatid Exchange (trocas entre cromátídeos irmãos) |
| STEL | Short Term Exposure Limit |
| TLV | Threshold Limit Value |
| TWA | Time-Weighted Average (concentração média ponderada) |
| VLE | Valor limite de exposição |

Índice de Figuras

| Figura | | Pág. |
|--------|--|------|
| 1. | Fórmula estrutural do FA..... | 3 |
| 2. | Principais vias de metabolização do FA | 7 |
| 3. | Monitorização Ambiental e Monitorização Biológica..... | 14 |
| 4. | Esquema representativo das três categorias de biomarcadores..... | 15 |
| 5. | Exemplos de AC..... | 18 |
| 6. | Cromossomas metafásicos onde se pode observar SCE..... | 19 |
| 7. | Formação de MN a partir de um fragmento acêntrico de um cromossoma ou de um cromossoma inteiro..... | 20 |
| 8. | a) Linfócito binucleado com um MN; b) Linfócito binucleado com dois MN..... | 21 |
| 9. | Aspecto da electroforese em microgel em que se pode observar o ADN de linfócitos humanos intacto (a) e com diferentes graus de ADN danificado (b, c e d – aparência de cometa) | 22 |
| 10. | Esquema representativo da contribuição de factores ambientais, genéticos e estilos de vida no desenvolvimento da doença..... | 24 |
| 11. | Colector de ar..... | 27 |
| 12. | Cálculo do valor de TWA para cada trabalhador numa jornada diária de trabalho (8 horas) | 28 |
| 13. | Linfócitos em telofase: a) Célula binucleada; b) Célula binucleada com um MN..... | 32 |
| 14. | Representação gráfica da distribuição de MN de acordo com o grupo de indivíduos..... | 33 |
| 15. | Representação gráfica da distribuição de MN de acordo com o sexo dos indivíduos em ambos os grupos..... | 34 |
| 16. | Representação gráfica da distribuição de MN de acordo com as classes etárias no grupo controlo..... | 36 |
| 17. | Representação gráfica da distribuição de MN de acordo com as classes etárias no grupo exposto..... | 36 |
| 18. | Representação gráfica da distribuição da frequência de MN com o tempo de exposição dos indivíduos do grupo exposto..... | 38 |

Índice de Tabelas

| Tabela | Pág. |
|---|------|
| 1. Propriedades físico-químicas do FA | 4 |
| 2. Efeitos crônicos e agudos do FA | 8 |
| 3. Relação dose-resposta para os efeitos resultantes da exposição a FA. | 9 |
| 4. Limites de exposição ocupacional para o FA estabelecidos pelas principais Instituições Mundiais..... | 13 |
| 5. Exemplos de biomarcadores de dose interna..... | 16 |
| 6. Características da população estudada..... | 25 |
| 7. Concentração média da exposição dos trabalhadores a FA..... | 31 |
| 8. Valores médios das frequências de MN em ambos os grupos..... | 32 |
| 9. Valores médios das frequências de MN em ambos os grupos de acordo com o sexo dos indivíduos..... | 34 |
| 10. Valores médios das frequências de MN nas três classes etárias em ambos os grupos..... | 35 |
| 11. Valores médios das frequências de MN em ambos os grupos de acordo com os hábitos tabágicos..... | 37 |
| 12. Valores médios das frequências de MN no grupo exposto de acordo com o tempo de exposição..... | 38 |

1. Introdução

O trabalho, enquanto factor imprescindível ao desenvolvimento económico e social tem representado um papel de transcendente importância ao longo de toda a história da humanidade (Uva & Faria, 2000). Durante a vida adulta, os seres humanos ocupam a maioria dos seus dias em actividades profissionais por isso, um ambiente de trabalho saudável é fundamental para a saúde e bem-estar das populações.

Actualmente são conhecidas mais de 100 mil substâncias químicas das quais apenas 6% foram alvo de uma avaliação considerada como minimamente adequada sobre os riscos para a saúde humana e meio ambiente. As substâncias químicas são parte integrante da esmagadora maioria das actividades humanas desempenhando um papel fundamental na sociedade, pois para além de serem utilizadas em ampla escala na agricultura são elementos indissociáveis aos processos industriais e a inúmeros outros serviços (Prista & Uva, 2003). A este quadro acresce a capacidade de inovação tecnológica do ramo químico que coloca no mercado, a cada ano, entre mil a duas mil novas substâncias.

A expansão da indústria química levou ao aumento da exposição humana a substâncias potencialmente tóxicas. Das substâncias químicas até agora estudadas algumas foram identificadas como alergénicas e outras demonstraram ter acção mutagénica e/ou cancerígena. Embora a população em geral se encontre exposta a estes agentes, é a nível ocupacional que essa exposição se torna mais relevante. Os trabalhadores expostos a agentes tóxicos no seu ambiente de trabalho são os que mais sofrem os seus efeitos adversos, uma vez que as concentrações são mais elevadas e as exposições mais intensas e prolongadas.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que entre 90 a 95% dos cancros humanos possam estar relacionados com a exposição ocupacional, factores alimentares e fumo de tabaco (Hughes, 1996), muito embora se reconheça que existem outros factores que também podem ser importantes, nomeadamente a predisposição genética do organismo exposto (Timbrell, 1998).

O estudo da exposição ocupacional a agentes químicos e a consequente tomada de decisões sobre meios para o seu controlo e prevenção são fundamentais para a criação e manutenção de ambientes de trabalho saudáveis. A detecção precoce de uma exposição de risco pode diminuir significativamente a ocorrência de efeitos adversos na saúde dos trabalhadores expostos a esses compostos.

O potencial genotóxico de um composto químico é um dos mais importantes factores de risco para o aparecimento de efeitos a longo prazo, como o cancro ou efeitos a nível reprodutivo. São compostos genotóxicos aqueles que directa ou indirectamente são capazes de danificar o ADN nuclear. A probabilidade deste dano genético originar um efeito real na saúde do indivíduo depende da natureza do dano, da capacidade da célula para reparar e amplificar esse dano, da oportunidade que a célula pode ter ou não de expressar essa alteração e ainda da capacidade do organismo de reconhecer e suprimir a multiplicação de células aberrantes (Silbergeld, 2001).

A monitorização da exposição ocupacional a agentes químicos é um procedimento que consiste numa rotina de avaliação e interpretação de parâmetros biológicos e/ou ambientais, com a finalidade de detectar possíveis riscos para a saúde dos trabalhadores, antes que a intoxicação ou doença ocorram. A exposição pode ser avaliada pela medição da concentração do agente químico em amostras ambientais, como o ar (Monitorização Ambiental), ou através da medição de parâmetros biológicos (Monitorização Biológica), denominados indicadores biológicos ou biomarcadores. As informações provenientes destes dois tipos de monitorização são complementares e permitem a implementação de medidas de prevenção e controlo apropriadas (Prista & Uva, 2006).

Do exposto se evidencia a importância da caracterização da exposição aos agentes químicos presentes no local de trabalho, provenientes de produtos manipulados e/ou de processos industriais, como uma das acções a desenvolver na prevenção do risco profissional.

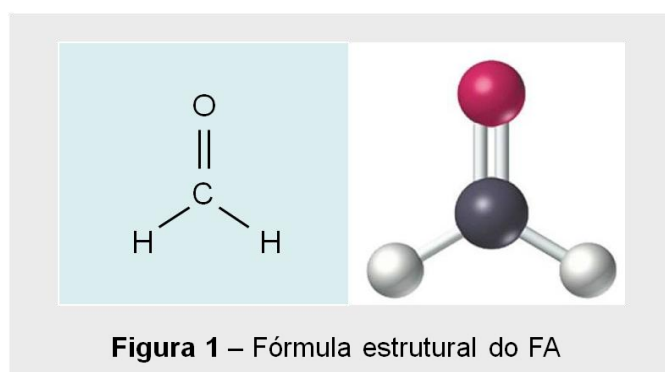
O formol ou formalina é um composto químico amplamente usado em procedimentos anatomopatológicos, cuja aplicação remonta ao século XIX. A sua manipulação implica a libertação de vapores de formaldeído. Estudos recentes sobre a qualidade do ar interior dos Serviços Hospitalares de Anatomia Patológica (Costa *et al.*, 2008; Ferro *et al.*, 2005) registaram níveis elevados deste aldeído, superiores ao valor limite normativo (NP – 1796: 2007).

Embora haja dados em Portugal sobre a sintomatologia resultante da exposição ao FA em profissionais e estudantes de laboratórios de anatomia patológica, até ao momento são poucos os que avaliaram o potencial risco genotóxico decorrente dessa exposição.

O objectivo deste trabalho é avaliar a exposição ocupacional a formaldeído de profissionais de Serviços de Anatomia Patológica, em ambiente hospitalar, e estudar os potenciais efeitos genotóxicos provocados pela utilização desse composto, recorrendo ao teste dos micronúcleos em linfócitos humanos.

1.1. Formaldeído

O Formaldeído (FA) (Número CAS: 50-00-0) é o composto mais simples da família dos aldeídos alifáticos. Conhecido também como aldeído fórmico ou metanal (nome IUPAC) é em condições normais de pressão e temperatura um gás incolor com elevada capacidade de difusão. Caracteriza-se ainda por possuir um odor forte e característico, detectável a baixas concentrações. É solúvel em água, álcool etílico, éter dietílico, clorofórmio e miscível com acetona e benzeno (ATSDR, 1999). A sua fórmula estrutural está representada na Figura 1.



Face à elevada reactividade e à facilidade com que se condensa, o FA não se pode isolar nem manipular facilmente no estado puro, por esta razão não se encontra disponível comercialmente sua forma gasosa. A nível industrial este composto é produzido por oxidação catalítica do metanol, fazendo passar vapores deste, juntamente com ar, sobre espirais de cobre incandescentes ou de óxidos metálicos (catalisadores metálicos). Em presença de traços de água, o FA tende a polimerizar-se espontaneamente formando um sólido denominado paraformaldeído. A polimerização pode ser evitada na presença de metanol (IARC, 2006). As propriedades deste aldeído estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas do FA

| | |
|--------------------------|-------------------------------|
| Peso Molecular | 30.03 g/mol |
| Fórmula Molecular | CH ₂ O |
| Ponto de Fusão | - 118 a - 92 °C |
| Ponto de Ebulição | - 21 a - 19 °C |
| Densidade a - 20 °C | 0.815 g/mL |
| Pressão a 25 °C | 3.883 mm Hg |
| Conversão a 25 °C e 1bar | 1 ppm = 1.2 mg/m ³ |

Adaptado de ATSDR, 1999

1.1.1. Aplicações e relevância comercial

O FA foi descoberto por Butlerov em 1859 e começou a ser comercializado no início do século XX (Mayan *et al.*, 1995). É uma substância de grande relevância comercial devido à polivalência de aplicações e ao baixo custo de produção.

Comercialmente o FA, por ser reactivo e instável à temperatura ambiente, é vendido em solução aquosa de 37-39%, contendo ainda 10-15% de metanol, para inibir a sua polimerização a paraformaldeído (IARC, 1995). A estas soluções comerciais de FA mais estáveis dá-se o nome de formol (ATSDR, 1999).

Este composto é produzido mundialmente em grande escala. No ano 2000, a produção mundial foi cerca de 21 milhões de toneladas (IARC, 2006). Em Portugal, a produção industrial deste composto (sob a forma de solução aquosa a 37%) atinge cerca de 320 mil toneladas por ano (IPQ, 2007).

As características químicas do FA em especial a sua reactividade química e poder bactericida, torna a sua utilização muito diversificada tendo aplicações tanto nas ciências como na indústria.

No sector têxtil é usado para melhorar a resistência aos vincos e na indústria da madeira para a produção de aglomerados, contraplacados e painéis de fibras. No entanto, a maioria das aplicações dizem respeito à produção das resinas fenólicas, de ureia, de melamina e de poliacetal. As três primeiras têm uma ampla utilização na indústria de

produtos de madeira (adesivos e aglutinantes), pasta de papel e na produção de plásticos. As últimas, devido às suas características únicas, podem ser usadas como substitutos de metal, madeira, vidro, borracha e plástico em diversas indústrias nomeadamente na indústria eléctrica, automóvel, química e petrolífera (Tang *et al.*, 2009).

É igualmente usado na indústria farmacêutica, na produção de cosméticos e no curtimento de peles. Pode ainda ser encontrado noutros produtos de consumo como aditivos alimentares, papéis com brilho e fotografias a cores (IARC, 2006). A sua aplicação estende-se também ao sector da saúde onde é amplamente usado em produtos de limpeza para fins sanitários e em procedimentos laboratoriais, como desinfectante, conservante de tecidos e na esterilização a frio (ATSDR, 1999).

1.1.2. Exposição Ambiental

O FA é ubíquo no meio ambiente, constituindo cerca de 50% do total de aldeídos de uma atmosfera urbana (Cleaves, 2008). É produzido em grandes quantidades na troposfera durante a oxidação fotoquímica de hidrocarbonetos, como o metano, provenientes sobretudo de fontes poluentes (Hong *et al.*, 2007).

A maioria deste composto químico é libertada em resultado de actividades e processos antropogénicos tais como fábricas, veículos e cigarros (IARC, 2006). Por ser constituinte de materiais de construção como espumas de isolamento, aglomerados de madeira, tapetes, tintas e vernizes, o FA pode também estar presente em atmosferas interiores e atingir níveis de concentração capazes de provocar sintomatologia nos seus ocupantes (WHO, 2000; Zhang & Smith, 2003). É também produzido na Natureza em pequena escala a partir da decomposição de resíduos vegetais e processos de combustão naturais (IARC, 2006).

1.1.3. Exposição Ocupacional

A exposição a FA assume particular importância em ambiente ocupacional quando comparada com a exposição ambiental (ar livre e habitação), uma vez que é nos locais de trabalho que a concentração ambiental deste aldeído pode atingir valores elevados (WHO, 2002).

Embora não seja possível calcular com precisão o número de pessoas ocupacionalmente expostas a FA a nível mundial, estima-se que só na União Europeia haja cerca de 971 mil trabalhadores expostos a este aldeído (IARC, 2006).

Segundo a OSHA (*Occupational Safety and Health Administration*), os laboratórios de anatomia patológica, salas de autópsia e indústrias químicas e de madeira são os postos de trabalho com maior número de exposições a concentrações elevadas de FA, sendo indicadas pela mesma agência como os cenários ocupacionais de maior risco (Mayan *et al.*, 1995).

Um estudo sobre a exposição ao FA de 29 estudantes de medicina durante a técnica de embalsamento detectou que a concentração média desse composto no ar era de 1.4 ppm (Suruda *et al.*, 1993), sendo importante referir que o valor limite estabelecido pela OSHA é de 0.75 ppm (PEL). São vários os trabalhos publicados posteriormente sobre a exposição ocupacional ao FA no sector da saúde, tanto em instituições hospitalares como académicas, que reportam a exposição dos profissionais a níveis elevados desse agente químico (Vasudeva & Anand, 1996; Ying *et al.*, 1997; Hauptmann *et al.*, 2003; Pala *et al.*, 2008).

Este produto é um fixador de tecidos pouco dispendioso e bastante eficiente sendo, por isso, o eleito em procedimentos de rotina anatomopatológicos. Como não provoca o endurecimento excessivo dos tecidos é igualmente o meio preferencial para conservar e armazenar biópsias e peças cirúrgicas. Face ao exposto, torna-se evidente que o formol é um produto de uso corrente e frequente pelos profissionais dos Serviços de Anatomia Patológica. A principal desvantagem apontada na utilização do formol é o facto de haver libertação de vapores de FA durante o seu manuseamento, com consequente inalação por parte dos trabalhadores (Ferro *et al.*, 2005).

1.1.4. Metabolismo

O FA ocorre naturalmente nas células humanas (Orsière *et al.*, 2006). É produzido no organismo durante o processo metabólico de aminoácidos (serina, glicina, metionina e colina) e xenobióticos (substâncias estranhas ao organismo) e, independentemente da sua origem, endógena ou exógena, é metabolizado pelas mesmas vias (ATSDR, 1999, WHO, 2002)

No organismo, este composto é rapidamente oxidado a ácido fórmico. A destoxificação deste xenobiótico é inicializada no citosol pela sua conjugação com a glutathiona (GSH). O conjugado é oxidado a S-formilglutathiona pela S-(hidroximetil) glutathiona desidrogenase. A S-formilglutathiona é posteriormente hidrolisada a ácido fórmico. Este último composto pode ser eliminado pela urina como formato (maior percentagem) ou ser novamente oxidado, formando dióxido de carbono (CO₂) (IARC, 2006).

O FA pode ainda ser incorporado em macromoléculas biológicas através da via biossintética de compostos de um carbono e pode também ser oxidado a ácido fórmico por enzimas peroxissomais, como a catalase (OECD, 2002). Na figura 2 encontram-se representadas as principais vias de metabolização do FA, bem como vias secundárias também descritas na literatura científica.

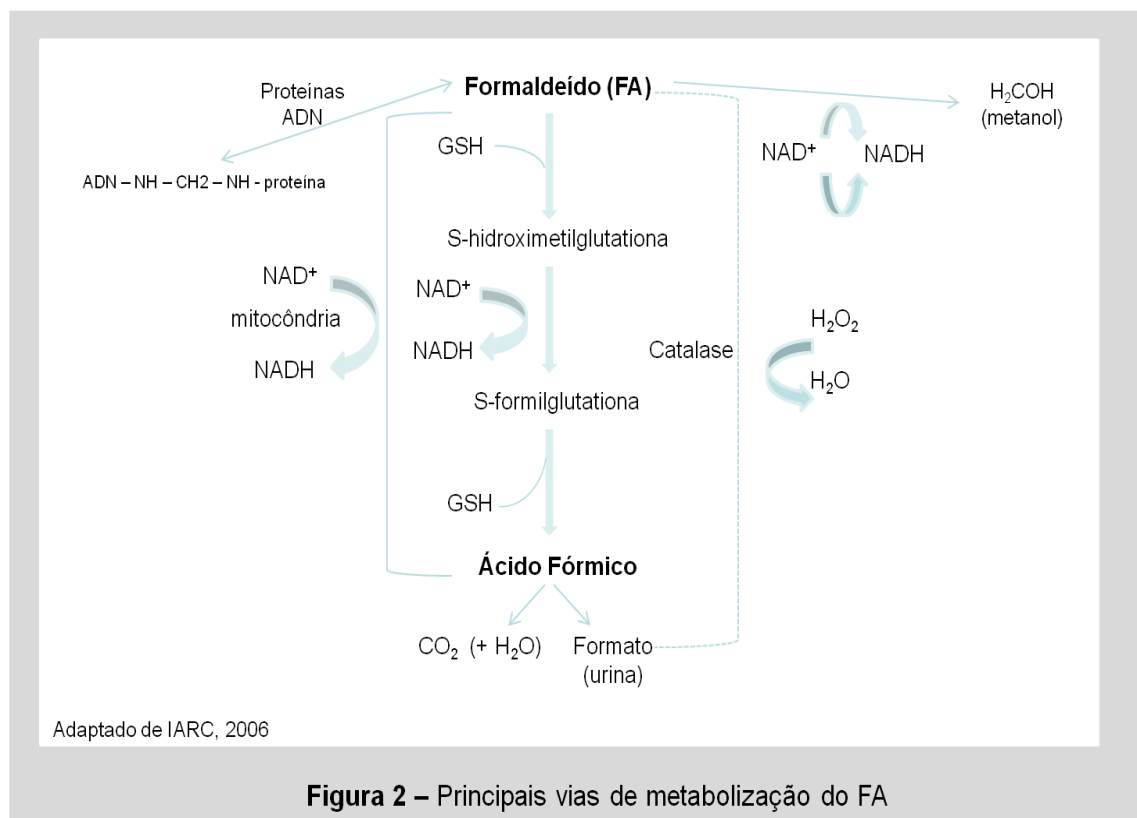


Figura 2 – Principais vias de metabolização do FA

1.1.5. Efeitos na Saúde

A exposição ao FA acarreta efeitos adversos na saúde humana que dependem da via de exposição, da duração e da concentração (IARC, 2006).

1.1.5.1. Sintomatologia

A principal via de exposição a este composto é a inalatória e a sintomatologia mais comum inclui irritação no nariz e garganta e aumento de lacrimação (ATSDR, 1999).

A exposição prolongada e repetida ao FA pode causar fortes dores de cabeça, alterações neurocomportamentais, náuseas, vômitos, vertigens, tosse, diarreia, dor abdominal, dificuldades respiratórias e edemas pulmonares. O FA é também um irritante dérmico capaz de promover reacções alérgicas como a dermatite de contacto (ATSDR, 1999). Os principais efeitos da exposição aguda a vapores de FA caracterizam-se pela irritação das

membranas mucosas do tracto respiratório superior e olhos e dependendo da concentração da exposição, rinite, dores torácicas e dispneia (Fox & Boyes, 2001; Arts *et al.*, 2006; Lang *et al.*, 2008). A tabela 2 contém o resumo dos principais efeitos do FA.

Tabela 2 – Efeitos crónicos e agudos do FA

| Área Afectada | Efeitos Crónicos |
|------------------------------|---|
| Nariz | Displasia, metaplasia escamosa |
| Pele | Sensibilização e dermatite de contacto |
| Pulmões | Broncospasmo, pneumonite |
| Efeitos Agudos | |
| Olhos | Irritação e secreção lacrimal (formaldeído gasoso); opacidade da córnea e cegueira (formaldeído aquoso) |
| Nariz | Redução temporária da capacidade olfactiva (formaldeído gasoso) |
| Tracto respiratório superior | Irritação (formaldeído gasoso) |
| Pulmões | Irritação, broncoconstrição e edema pulmonar (formaldeído gasoso); Edema das mucosas (formaldeído aquoso) |
| Tracto gastrointestinal | Alteração da estrutura do esófago e gastrite (formaldeído aquoso) |
| Pele | Irritação e dermatite de contacto alérgica (formaldeído aquoso) |

Adaptado de ATSDR, 1999

A Norma Portuguesa, NP – 1796 de 2007 classifica o FA como agente sensibilizante (IPQ, 2007). É também apontado pela Sociedade Portuguesa de Pneumologia como um dos agentes etiológicos envolvidos no desenvolvimento de asma ocupacional (Costa *et al.*, 2008).

Num estudo realizado em Portugal sobre a exposição a FA em laboratórios de ensino de Anatomia a maioria dos alunos inquiridos apresentou sintomas de irritação ocular e do tracto respiratório superior (Almeida *et al.*, 2000). Sintomatologia semelhante foi observada num grupo de 34 profissionais de um laboratório de anatomia. Os sintomas mais frequentes foram irritação ocular (88%), irritação no nariz (74%) e irritação na garganta (29%) (Akbar-Khanzadeh *et al.*, 1994).

O limiar de detecção humana a FA pode variar entre valores de 0.05 ppm a 1.5 ppm. Concentrações ambientais de FA com valores entre 0.005 ppm e 2 ppm podem provocar

irritação ocular e das membranas mucosas. A exposição torna-se intolerável quando a sua concentração atinge valores superiores a 5 ppm. Concentrações a partir de 12 ppm são responsáveis por irritações graves e a inalação de valores de FA superiores a 50 ppm pode causar graves lesões respiratórias. A tabela 3 resume a sintomatologia associada a diferentes concentrações ambientais de FA, os valores apresentados são uma estimativa que tem por base a bibliografia consultada (IARC, 2006).

Tabela 3 – Relação dose-resposta para os efeitos resultantes da exposição a FA

| Concentração de FA (ppm) | Sintomatologia |
|--------------------------|---|
| 0.05 – 1.50 | Detecção do odor |
| 0.05 – 2.0 | Irritação ocular |
| 0.10 – 25 | Irritação da via aérea superior (nariz e garganta) |
| 5 – 30 | Irritação da via aérea inferior (sintomas respiratórios graves) |
| 50 – 100 | Inflamação e edema pulmonar |
| >100 | Morte |

Adaptado de IARC, 2006

1.1.5.2. Carcinogenicidade

O FA foi inicialmente classificado como provável agente carcinogénico humano em 1982 (Binetti *et al.*, 2006). Desde então foram publicados diversos estudos que demonstram uma relação positiva entre a exposição de profissionais a FA e o aumento de risco de desenvolvimento de cancro (Ballarin *et al.*, 1992; McLaughlin, 1994; Armstrong *et al.*, 2000; Vaughan *et al.*, 2000; Hildesheim *et al.*, 2001; Collins *et al.*, 2001; Luce *et al.*, 2002). Com base nestes resultados e em dados de estudos experimentais animais, a IARC (*International Agency for Research on Cancer*) reclassificou recentemente o FA como agente carcinogénico (IARC, 2006).

Um estudo de 2004 revelou um aumento estatisticamente significativo de cancro nasofaríngeo num grupo de 26 mil trabalhadores industriais americanos expostos ao FA (Hauptmann *et al.*, 2004). Resultados similares para o mesmo tipo de cancro foram

obtidos noutros estudos publicados anteriormente (Blair *et al.*, 1990; Partanen, 1993; Ying *et al.*, 1997). Em 2003 foi publicado um artigo sobre a exposição de 14 mil trabalhadores de seis indústrias química britânicas ao FA que concluiu que, relativamente à população nacional, esse grupo apresentava uma maior probabilidade de desenvolvimento de cancro do pulmão (Coggon *et al.*, 2003). À mesma conclusão chegaram três outros estudos divulgados alguns anos antes (Bertazzi *et al.*, 1986; Gardner *et al.*, 1993; Stone *et al.*, 2001).

A ocorrência de cancro em 4 mil embalsamadores americanos foi examinada num estudo que evidenciou uma correlação positiva entre a exposição a FA e o risco acrescido de desenvolvimento de cancro do cólon (Hayes *et al.*, 1990). Até à data foram também publicados dois trabalhos sobre a relação entre a exposição a FA e o risco acrescido de cancro pancreático, e ambos verificaram uma associação positiva (Dell & Teta, 1995; Kernan *et al.*, 1999). Para avaliar os potenciais efeitos carcinogénicos do FA, um estudo sobre a ocorrência de cancro da próstata em embalsamadores da Califórnia concluiu que, nesse grupo profissional, esta patologia era significativamente elevada (Walrath & Fraumeni, 1984).

Um trabalho publicado sobre a mortalidade derivada de doenças linfomatópóieticas em 26 mil trabalhadores de 10 indústrias que produzem FA demonstrou uma relação entre a exposição a esse agente químico e doenças do sistema linfomatópóietico (Freeman *et al.*, 2009). Esta associação foi também verificada noutros trabalhos (Hauptmann *et al.*, 2003; Pinkerton *et al.*, 2004), alguns com foco na associação positiva entre a exposição ocupacional a FA e o aumento de risco de desenvolvimento de leucemias (Hayes *et al.*, 1990; Hall *et al.*, 1991; Coggon *et al.*, 2003). No entanto, outros estudos publicados concluem que não há dados suficientes para assumir uma relação causal entre a exposição a FA e o risco de leucemia (Collins *et al.*, 2004; Heck & Casanova, 2004; Marsh & Youk, 2004; Marsh & Youk, 2005; Golden *et al.*, 2006). Por outro lado, a IARC conclui que existem fortes indícios, mas não suficientes, de uma associação causal entre o desenvolvimento de leucemia e a exposição ocupacional a FA (IARC, 2006).

É importante referir que as conclusões dos estudos referidos anteriormente permanecem controversas uma vez que alguns não avaliaram, entre outros factores, a exposição concomitante com outras substâncias.

A actividade genotóxica e carcinogénica do FA tem sido comprovada em diversos modelos tanto *in vitro*, como *in vivo* em animais e humanos, através de ligações cruzadas ADN-proteína, aberrações cromossómicas, troca entre cromatídeos irmãos e micronúcleos (Binetti *et al.*, 2006; Schulte *et al.*, 2006; Pala *et al.*, 2008 Duhayon *et al.*,

2008). Está comprovado que o FA é mutagénico para bactérias e eucariontes inferiores e em linfoblastos humanos (Crosby *et al.*, 1988) e clastogénico em células de mamíferos (Merck & Speit, 1998).

1.2. Avaliação da Exposição

A avaliação da exposição consiste numa rotina de monitorização e interpretação de parâmetros biológicos e/ou ambientais com a finalidade de detectar os possíveis riscos na saúde, antes que uma intoxicação ou doença se instale (Amorim, 2003).

A exposição humana pode ser caracterizada recorrendo a duas metodologias complementares, a monitorização ambiental que consiste na determinação da concentração do agente químico em amostras ambientais (amostras de ar) e a monitorização biológica que se baseia na determinação de parâmetros biológicos, denominados indicadores biológicos ou biomarcadores (Prista & Uva, 2006).

Esta avaliação, quando associada ao conhecimento dos limites considerados seguros, permite avaliar o risco da população exposta e constitui o primeiro passo para a fixação de normas para os contaminantes químicos presentes em meio ocupacional (IEH, 1996).

Por outro lado, embora os estudos epidemiológicos realizados em populações humanas ajudem a estabelecer os riscos associados à exposição a um determinado agente químico, a maioria não permite determinar se os efeitos observados na saúde são o resultado directo da exposição a esse agente químico (Amorim, 2003).

1.2.1. Monitorização Ambiental

A monitorização ambiental é a actividade sistemática, contínua ou repetida, pela qual se procede à recolha de amostras do ar ambiente, para análise da concentração de poluentes químicos. O objectivo consiste em estimar a exposição e o risco para a saúde dos trabalhadores, por comparação dos resultados obtidos com um valor de referência estabelecido (Hughes, 1996).

A colheita de amostras de ar pode ser efectuada no local de trabalho ou por amostragem individual do trabalhador, recorrendo a dispositivos individuais portáteis. O tipo de amostragem que se efectua depende sobretudo da natureza das tarefas realizadas pelo trabalhador e da sua mobilidade no espaço geográfico de exposição ao agente que se pretende dosear (Amorim, 2003).

Os valores máximos admissíveis (VLE, Valores Limite de Exposição; TLV, *Threshold Limit Values*; PEL, *Permissible exposure limit*; REL, *Recommended Exposure Limit*) têm como objectivo promover a segurança e saúde do trabalhador. Para agentes químicos (como no caso do FA) esses valores limite são expressos como níveis de concentrações ambientais aceitáveis, sendo estabelecidos como normas por agências reguladoras ou como orientações por grupos de pesquisa ou organizações (ACGIH, 2008). Referem-se a concentração da substância e representam, à luz do conhecimento científico actual, concentrações abaixo das quais se crê que a maioria dos trabalhadores pode estar repetidamente expostos dia após dia sem sofrer efeitos adversos na saúde.

São sugeridos três tipos de valores limite. A *concentração média ponderada (Time Weighted Average - TWA)* representa uma concentração limite de exposição ocupacional para exposições médias durante 8 horas por dia, 5 dias por semana, geralmente aplicados a tóxicos que exercem os seus efeitos durante longos períodos. O *Short Term Exposure Limit (STEL)* representa uma concentração limite de exposição ocupacional para um período de 15 minutos, a qual não deve ser excedida em nenhum dos 15 minutos da janela de amostragem, devendo ocorrer um tempo mínimo de 60 minutos entre as exposições nesse intervalo (NP – 1796: 2007). A *concentração máxima (Ceiling Limit - C)* representa uma concentração que nunca deve ser excedida, usualmente aplicado a tóxicos que causam efeitos agudos (Thorne, 2001).

Na tabela 4 estão referidos os limites de exposição ocupacional a FA no ar (ppm) definidos pelas principais Organizações e Agências Mundiais.

Tabela 4 - Limites de exposição ocupacional para o FA estabelecidos pelas principais Instituições Mundiais

| Organização/Agência | Valores Limite |
|---|---|
| OSHA (Occupational Safety and Health Administration) | PEL – Permissible exposure limit 0.75 ppm (TWA) ¹ 2 ppm (STEL) ² |
| NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) | REL – Recommended airborne exposure limit 0.016 ppm (TWA) ¹ 0.1 ppm (C) ³ |
| ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) | TLV – Threshold limit value 0.3 ppm (C) ³ |

¹ TWA (*time-weighted average*): concentração média do agente químico no ar que não deve ser excedida durante jornadas diárias de trabalho de 8 horas (OSHA)/10 horas (NIOSH) e 40 horas semanais

² STEL (*short-term exposure limit*): concentração máxima do agente químico no ar que não pode ser excedida durante 15 minutos ao longo do turno de trabalho

³ C (*ceiling limit*): concentração do agente químico no ar que nunca deve ser excedida durante qualquer período de exposição, mesmo momentaneamente.

Adaptado de IARC, 2006

Um estudo de 2006 sobre a exposição de trabalhadores de laboratórios de anatomia patológica de cinco Hospitais do sul de França detectou níveis médios de FA de 2.0 ppm (STEL) (Orsière *et al.*, 2006). Neste país, o valor normativo é de 1 ppm (IARC, 2006).

Em Portugal, foi publicado um estudo sobre a qualidade do ar no interior dos Serviços de Anatomia Patológica de 5 hospitais da zona de Lisboa que reportou concentrações de FA com valores compreendidos entre 0.2 ppm e 50.6 ppm (Ferro *et al.*, 2005). A média dos valores de concentração, mínima e máxima, foram respectivamente 0.45 ppm e 5.47 ppm. Sendo de destacar que o valor limite admissível estabelecido pelo normativo português para qualquer período de exposição ao FA é de 0.3 ppm (TWA) (NP – 1796: 2007).

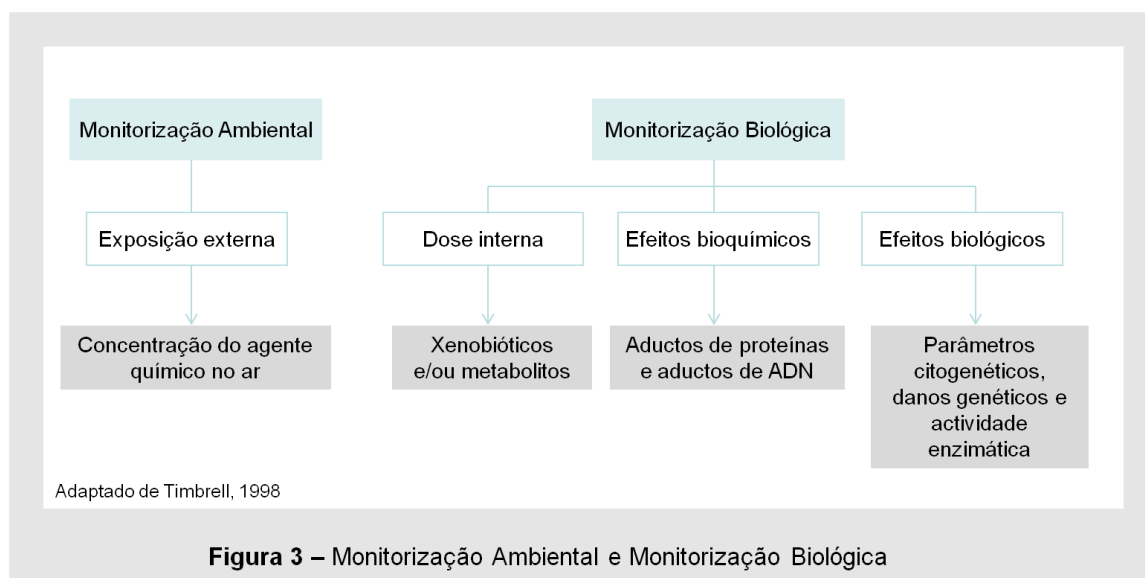
Este tipo de monitorização apenas permite obter a dose aproximada a que o indivíduo está exposto, não incluindo as diferenças existentes entre indivíduos (Hughes, 1996). Incide sobre o ambiente de trabalho onde o indivíduo está inserido, e as informações dela obtidas permitem a implementação de medidas de prevenção e controlo apropriadas (Amorim, 2003).

1.2.2. Monitorização Biológica

A monitorização biológica incide sobre o próprio indivíduo exposto. Consiste na quantificação e avaliação da substância química, dos seus metabolitos ou outros parâmetros bioquímicos resultantes da sua interacção com o organismo, medidos em meios biológicos, como sangue, urina e ar exalado (Amorim, 2003). O doseamento dessas substâncias em fluidos biológicos e tecidos corporais (unhas e cabelo) permite conhecer a exposição do indivíduo ao agente tóxico, sendo estes designados por indicadores biológicos ou biomarcadores (Timbrell, 1998).

Esta monitorização visa avaliar o risco resultante da exposição, não pela presença do agente químico no meio ambiente, mas em função da quantidade que efectivamente penetrou no organismo (Prista & Uva, 2006).

Uma das vantagens da monitorização biológica relativamente à monitorização ambiental consiste no facto de considerar todas as vias de entrada no organismo. Permite avaliar a exposição global ao agente tóxico na medida em que é capaz de prever variações individuais no que diz respeito à absorção, ao metabolismo, à excreção e à distribuição do composto tóxico (IEH, 1996). A figura 3 representa a caracterização dos dois tipos de monitorização.

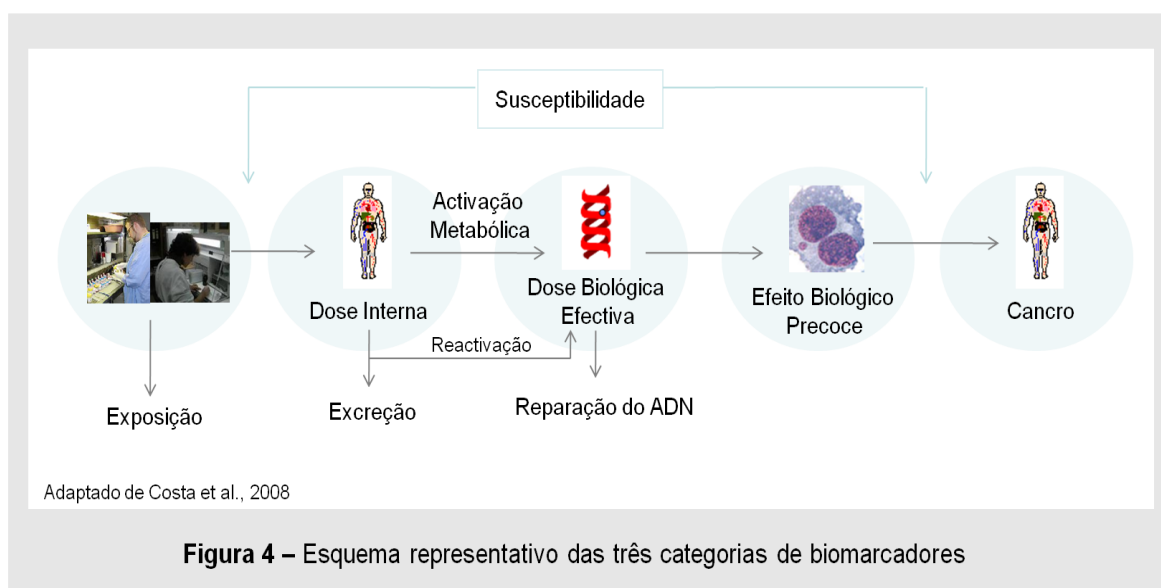


Os dois tipos de monitorização fornecem informações diferentes mas complementares sobre os riscos resultantes da interacção entre o agente químico presente no ambiente ocupacional e o indivíduo, sendo fundamental que não sejam tomadas como acções alternativas, mas os seus resultados sejam antes interpretados com base na sua complementaridade (Prista & Uva, 2006).

1.2.2.1. Biomarcadores

Os biomarcadores (ou indicadores biológicos) são uma ferramenta importante para a avaliação dos níveis de exposição e para o estabelecimento de valores de referência para a mesma, uma vez que podem ser intermediários entre a exposição e a manifestação clínica da doença. Por si só, não são indicadores de uma situação de doença ou de um processo tóxico, uma vez que, na maioria das situações, apenas indicam a exposição do organismo, constituindo informação complementar aos programas de vigilância da saúde (Amorim, 2003).

São geralmente classificados em três categorias, biomarcadores de exposição, de efeito e de susceptibilidade. Estes são úteis na avaliação de exposição de curto prazo e, idealmente, devem ser usados simultaneamente de forma a obterem-se informações mais completas e abrangentes. Na figura 4 encontram-se representados os três tipos de indicadores biológicos e o percurso entre a exposição e a manifestação clínica da doença.



1.2.2.1.1. Biomarcadores de exposição

Os biomarcadores de exposição referem-se a qualquer substância exógena, seus metabolitos ou produtos da sua associação com moléculas alvo, como ADN ou proteínas, que podem ser medidos no organismo (Amorim, 2003). Podem ser divididos em biomarcadores de dose interna e biomarcadores de dose biológica efectiva.

Biomarcadores de dose interna

Os biomarcadores de dose interna dão evidência da existência de exposição do organismo a um xenobiótico pela medição deste ou dos seus metabolitos em meios biológicos, indicando qual a extensão dessa exposição. Reflectem somente a exposição, indicando a quantidade de substância química que foi absorvida pelo organismo. Não fornecem informação sobre se essa exposição teve ou não como consequência a ocorrência de danos que podem resultar em cancro ou outras doenças (Amorim, 2003). Os meios analisados são geralmente urina e sangue mas também podem ser utilizados o ar exalado, cabelos, unhas, saliva, leite materno, tecido adiposo e fezes (Timbrell, 1998).

Na tabela 5 encontram-se alguns exemplos de indicadores de dose interna de compostos químicos.

Tabela 5 – Exemplos de biomarcadores de dose interna

| Composto | Indicador de dose interna | Meio biológico |
|---------------|--|----------------|
| Estireno | Ácido mandélico; Ácido fenilgloxílico | Urina |
| Tolueno | ácido hipúrico | Urina |
| Xileno | Ácido metil-hipúrico | Urina |
| Benzeno | Ácido <i>trans,trans</i> -mucónico | Urina |
| Chumbo (Pb) | Pb | Sangue |
| Níquel (Ni) | Ni | Urina; sangue |
| Cádmio (Cd) | Cd | Urina; sangue |
| Mercúrio (Hg) | Hg | Sangue |

Enquanto biomarcadores como o chumbo e o mercúrio no sangue reflectem a exposição média dos últimos meses, outros como o cádmio na urina reflectem a exposição dos últimos anos (IPCS, 1993).

Biomarcadores de dose biológica efectiva

Os biomarcadores de dose biológica efectiva fornecem informação sobre a extensão da exposição ao xenobiótico do local alvo através da quantificação das espécies químicas reactivas que interagem com esses locais, tecidos, células, organelos ou macromoléculas (ADN e proteínas). Exemplos deste tipo de biomarcadores são os aductos de ADN e de proteínas (albumina e hemoglobina) (Amorim, 2003).

Os aductos de ADN são indicadores de um efeito biológico precoce que surgem da ligação covalente de um metabolito extremamente reactivo (electrofílico) com as bases nucleofílicas do ADN. Se não reparado poderá dar origem a um processo de carcinogénese (Conaway *et al.*, 1996; Delft *et al.*, 1998; Amorim, 2003).

Contrariamente ao que acontece com os aductos de ADN, os aductos de proteínas não estão directamente envolvidos na carcinogénese. Como os eritrócitos têm um tempo de vida de cerca de 120 dias, os aductos de hemoglobina são considerados bons indicadores para a quantificação da dose interna derivada de exposições longas ou repetidas. Por outro lado, os aductos de albumina avaliam exposições mais recentes já que o tempo de semi-vida da albumina é apenas de 20 a 25 dias (Teixeira *et al.*, 2008).

1.2.2.1.2. Biomarcadores de efeito

Os biomarcadores de efeito são indicadores de alterações bioquímicas resultantes da interacção entre o xenobiótico e o organismo. Reflectem modificações precoces, reversíveis ou não, que precedem danos estruturais ou funcionais progressivos a nível molecular, celular e tecidual (Prista & Uva, 2006). As alterações bioquímicas podem ser citogenéticas (danos genotóxicos em células) avaliadas pelo estudo das aberrações cromossómicas, das trocas entre cromátídeos irmãos e dos micronúcleos ou podem ser danos no ADN avaliados pelo teste do cometa.

Este tipo de indicadores biológicos poderá permitir a detecção precoce de doenças, em fase de pré-clínica, possibilitando a intervenção atempada em situações de risco (IEH, 1996). O decréscimo no número de células sanguíneas ou alteração no nível ou actividade de uma enzima em particular são exemplos de biomarcadores de efeito.

Alterações citogenéticas

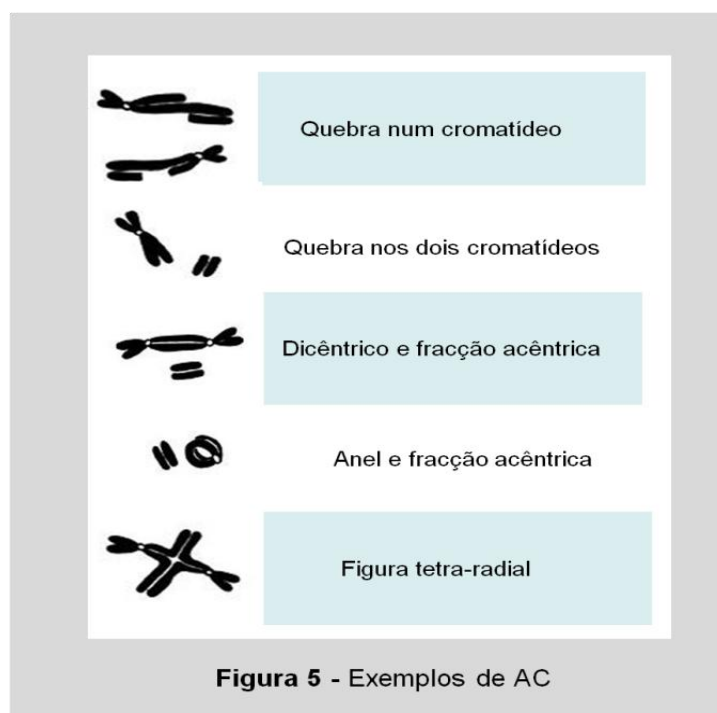
A exposição a certos compostos químicos pode induzir danos genéticos que podem ser detectados por técnicas citogenéticas através da análise das alterações cromossómicas consequentes dessa exposição em linfócitos de sangue periférico estimulados (Amorim,

2003). Os métodos citogenéticos convencionais *in vitro* permitem detectar três tipos de alterações cromossómicas, as aberrações cromossómicas, as trocas entre cromátídeos irmãos e a formação de micronúcleos.

Aberrações Cromossómicas (AC)

As AC são alterações estruturais e/ou numéricas nos cromossomas. As alterações estruturais dos cromossomas resultam da quebra de cromossomas (efeito clastogénico) e do seu rearranjo aberrante no cromossoma ou entre cromossomas.

Podem distinguir-se vários tipos de danos cromossómicos estruturais: deleções terminais, inversões, trocas simétricas, rearranjos assimétricos (anéis acêntricos ou com centrómero) e trocas assimétricas (dicêntricos, figuras tri- e tetra-radiais) (Parry & Parry, 1995). Os rearranjos assimétricos são considerados aberrações instáveis pois conduzem à morte da célula. Os rearranjos simétricos, como translocações e inversões, são considerados estáveis uma vez que podem ser transmitidos às células filhas (Bonassi, 1999). Na figura 5 encontram-se representados diferentes tipos de AC.

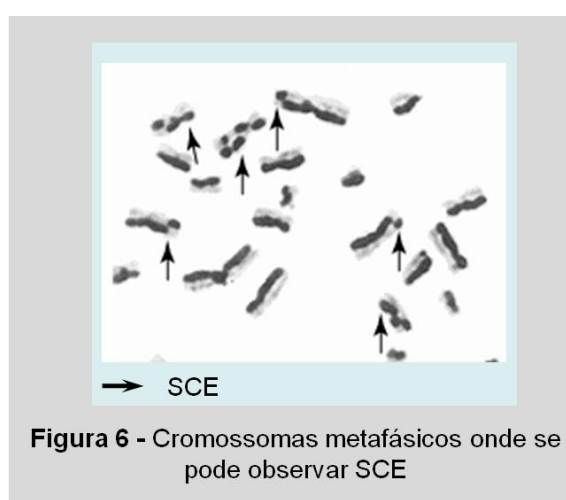


As AC são consideradas como um indicador da existência de risco acrescido de doença oncológica, uma vez que estas estão associadas a diversos tipos de cancro humano. Alguns estudos demonstram a existência de uma correlação positiva entre a exposição ao FA e a indução de AC (He *et al.* 1998, Bonassi, 1999; Jakab *et al.*, 2010). As

translocações e inversões estão associadas com subtipos morfológicos e fenotípicos de leucemias, linfomas e sarcomas (Heng *et al.*, 2004).

Trocas entre cromátídeos irmãos (**SCE – Sister chromatid exchange**)

As SCE consistem na ocorrência de troca de informação genética entre as duas cadeias de ADN de ambos os cromátídeos de um mesmo cromossoma. Este fenómeno ocorre durante a replicação, através da quebra das cadeias de ADN e posterior junção, em locais aparentemente semelhantes nos dois cromátídeos de um mesmo cromossoma (He *et al.*, 1998). Na figura 6 pode-se observar SCE em cromossomas metafásicos.



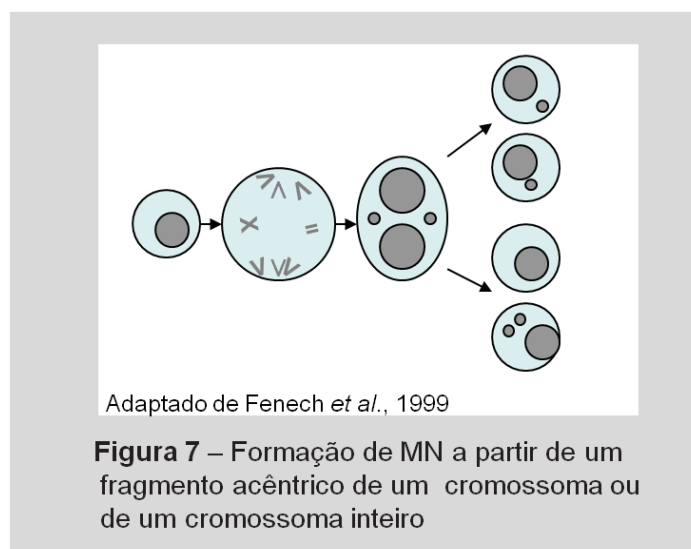
As SCE poderão ser induzidas por substâncias que formam aductos de ADN ou que interferem com o processo de reparação de ADN (Farmer & Emeny, 2006). Estas trocas são observadas em preparações de cromossomas em metafase. A diferenciação entre os cromátídeos irmãos é obtida em células que incorporaram 5 -bromodeoxiuridina (BrdU), análogo da timina, em dois ciclos de replicação consecutivos. Durante estes ciclos não há tempo para que ocorra reparação do ADN que foi lesado *in vivo*. A adição, na fase da coloração da técnica, do fluorocromo *Hoescht* torna visível a distinção das duas cadeias, uma vez que apenas a cadeia que tem a BrdU incorporado adquire fluorescência (Rooney & Czepulkowski, 1996).

Vários estudos realizados em animais e em populações humanas demonstraram que a frequência de SCE aumenta em células que tenham estado expostas a agentes mutagénicos e carcinogénicos (Yager *et al.*, 1986; He *et al.*, 1998; Shaham *et al.*, 2002).

Teste do micronúcleo (MN)

O teste do MN consiste na observação de células em interfase onde são detectados MN resultantes de danos genéticos induzidos por agentes tóxicos.

Os MN são formados por condensação de fragmentos de cromossomas acêntricos (efeito clastogénico) ou por cromossomas inteiros (efeito aneugénico) que se atrasam em relação aos restantes durante a anáfase do ciclo celular, não sendo incluídos no núcleo das células-filhas em telofase. Nesta fase, os fragmentos de cromossomas ou cromossomas inteiros são envolvidos por um invólucro nuclear formando estruturas tipicamente arredondadas, com cor e textura semelhantes ao núcleo principal e diâmetro a variar entre 1/20 e 1/5 do diâmetro do núcleo principal (Fenech, 2000). O processo de formação de MN encontra-se esquematizado na figura 7.



Os MN que são formados por cromossomas inteiros têm a sua origem em defeitos na segregação de cromossomas, tais como deficiências nos genes que controlam o ciclo celular, falhas no fuso mitótico ou no cinetocóro, dano em sub-estruturas cromossómicas, disrupção mecânica e hipometilação de ADN centromérico (Iarmarcovai *et al.*, 2008).

O destino dos MN após a sua formação é pouco conhecida mas sabe-se que, após a mitose, pode ocorrer:

- eliminação de células com MN por apoptose;
- expulsão da célula, quando o ADN que o constitui não é funcional ou capaz de replicação ou quando não tem os componentes citoplasmáticos necessários;
- retenção dentro do citoplasma da célula como uma entidade extranuclear incapaz de completar um ou mais ciclos de replicação ADN/cromossoma (Iarmarcovai *et al.*, 2008).

O teste do MN é um ensaio que apresenta diversas vantagens, sendo a rapidez e a simplicidade as principais. Requer proliferação celular, uma vez que os MN só podem ser observados em células em interfase que completaram pelo menos uma divisão nuclear (Fenech, 1993; Fenech *et al.*, 1999). Por outro lado apresenta uma desvantagem evidente que consiste no facto de não ser possível distinguir MN com cromossomas inteiros de MN com fragmentos de cromossomas. Esta limitação pode ser ultrapassada utilizando a técnica de hibridização *in situ* de fluorescência (FISH) que permite detectar a presença do centrómero (Surrallés *et al.*, 1996).

No método usado actualmente adiciona-se citocalasina-B (Cyt-B) ao meio de cultura para bloquear a citocinese (NIOSH, 1994). Deste modo as células em que já ocorreu mitose (divisão celular) distinguem-se por se apresentarem binucleadas. Na figura 8 pode-se observar células binucleadas que contêm MN.

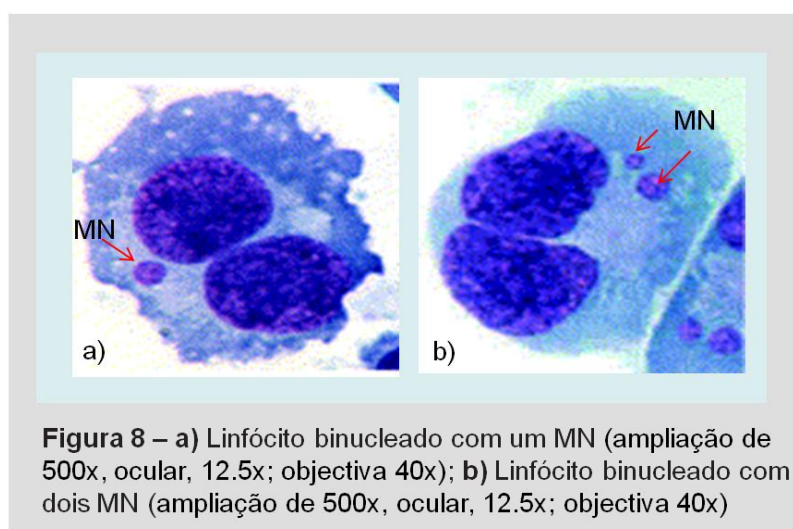


Figura 8 – a) Linfócito binucleado com um MN (ampliação de 500x, ocular, 12.5x; objectiva 40x); **b)** Linfócito binucleado com dois MN (ampliação de 500x, ocular, 12.5x; objectiva 40x)

O teste do MN tem sido amplamente utilizado desde há vários anos, estando bem validado e com um grande número de substâncias testadas (IEH, 1996).

Recentemente, a formação de MN em células foi considerado um indicador válido de risco acrescido de cancro (Bonassi *et al.*, 2007). Alguns trabalhos sobre a exposição ocupacional a FA demonstram um aumento da frequência de MN em linfócitos de indivíduos expostos a FA (He *et al.*, 1998; Hoffmann & Speit, 2005; Schmid & Speit, 2007; Jiang *et al.*, 2009). Contudo, outros estudos mostraram resultados inconclusivos e contraditórios no que diz respeito à genotoxicidade em seres humanos (Kitaeva *et al.*, 1996; Vasudeva & Anand, 1996; Bonassi *et al.*, 2007). Nos seres humanos, o aumento da incidência de células com MN da mucosa bucal ou nasal tem também sido documentado em alguns estudos de exposição ocupacional (Ballarin *et al.*, 1992; Suruda *et al.*, 1993; Titenko-Holland *et al.*, 1996; Ying *et al.*, 1997; Ye *et al.*, 2005).

Danos no ADN: Electroforese em microgel (Teste do Cometa)

A electroforese em microgel é uma técnica rápida, sensível e fiável que permite detectar danos no ADN de células individuais e que tem vindo a ser extensamente utilizada na detecção de danos genéticos em biomonitorização humana (Vodicka *et al.*, 2004).

Sucintamente, a técnica consiste na lise de células que foram previamente suspensas em gel de agarose e colocadas sobre lâminas. Durante a electroforese o ADN danificado migra dando a aparência de uma cauda. O nome de teste do cometa deve-se ao facto de, após a sua realização, as células com ADN danificado apresentarem a aparência de um cometa com a cabeça intensamente brilhante e uma cauda cujo comprimento e intensidade se relaciona com o dano. As células não danificadas apresentam-se sem cauda (Fairbairn *et al.*, 1995). O aspecto da electroforese em microgel de ADN de linfócitos humanos com diferentes graus de danificação pode ser observados na figura 9.

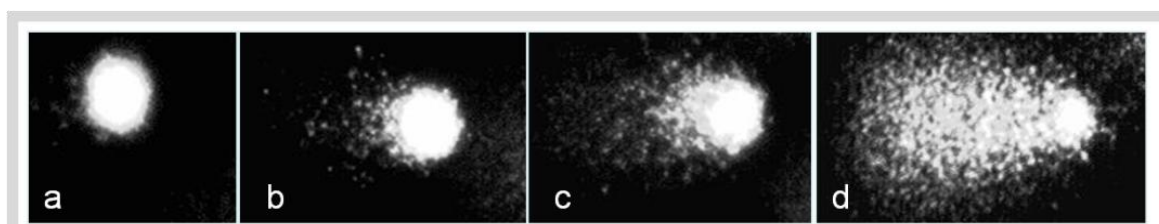


Figura 9 - Aspecto da electroforese em microgel em que se pode observar o ADN de linfócitos humanos intacto (a) e com diferentes graus de ADN danificado (b, c e d - aparência de cometa).

A capacidade do FA em induzir um aumento do dano no ADN, detectado pelo teste do cometa, em linfócitos de trabalhadores expostos a este aldeído no seu local de trabalho tem sido comprovada em alguns trabalhos (Fairbairn *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 2005).

1.2.2.1.3. Biomarcadores de susceptibilidade

Os biomarcadores de susceptibilidade podem reflectir factores genéticos ou adquiridos que influenciam a resposta do organismo a uma determinada exposição química. Estes são factores pré-existentes e independentes da exposição.

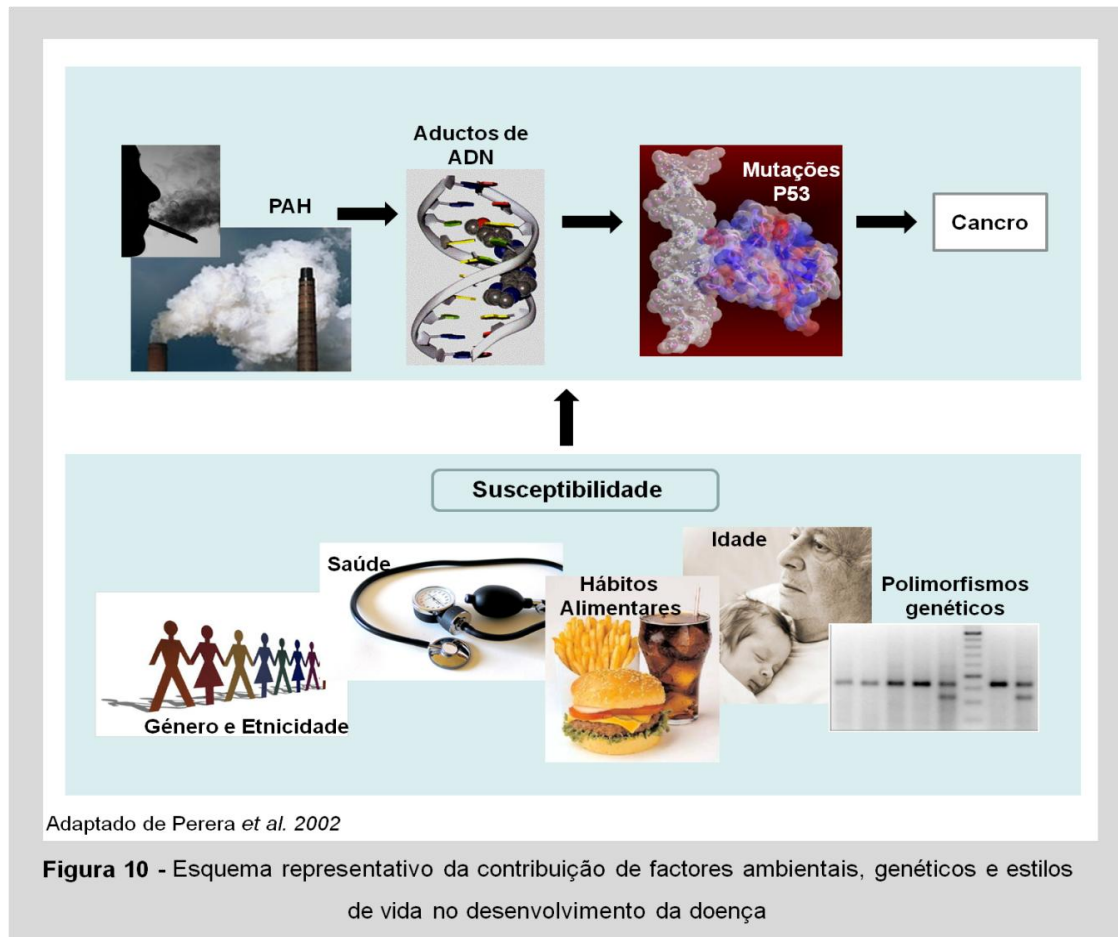
A susceptibilidade refere-se à forma como as variações genéticas influenciam, aumentando ou diminuindo, a susceptibilidade individual a factores ambientais nocivos, como é o caso de alguns compostos químicos, radiação ou estilos de vida (Amorim, 2003).

Os biomarcadores de susceptibilidade incluem polimorfismos em genes que codificam as enzimas do metabolismo dos xenobióticos, genes que codificam as enzimas de reparação do ADN e genes que codificam proteínas que regulam o crescimento celular (Teixeira *et al.*, 2004). Recentemente foram identificadas numerosas diferenças nos genes que codificam as enzimas do metabolismo dos xenobióticos, sendo que essas diferenças provocam variações na actividade enzimática. Estas enzimas poderão converter compostos inactivos em compostos intermédios tóxicos extremamente reactivos que poderão interagir com o ADN e conseqüentemente elevar o risco de cancro. Os polimorfismos nos genes envolvidos na reparação do dano do ADN que provoquem uma diminuição na eficiência da reparação do ADN poderão aumentar a susceptibilidade de risco de cancro. Os polimorfismos nos genes que codificam proteínas que regulam o crescimento celular poderão provocar um aumento do risco de cancro, uma vez que há uma desregulação de oncogenes e genes supressores de tumores (Silbergeld, 2001).

A susceptibilidade genética é muito importante mas existem outros factores de igual importância, como por exemplo, a ocorrência de alterações fisiológicas, a existência de medicação e a exposição a outros agentes ambientais (IEH, 1996).

Um exemplo muito comum da interacção entre factores ambientais e variações genéticas são as doenças multifactoriais que incluem patologias como a diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares e cancro (Rueff *et al.*, 2002).

A contribuição de factores ambientais, genéticos e estilos de vida no desenvolvimento da doença encontra-se representada na figura 10.



2. Materiais e Métodos

2.1. População estudada

A população em estudo foi constituída por um conjunto de 55 profissionais dos Serviços Hospitalares de Anatomia Patológica da região Norte e Centro do país. Foi também constituída uma população controlo formada por 52 indivíduos do sector terciário na área da Educação e dos Sistemas Multimédia com um historial ocupacional de não exposição a FA.

As características demográficas, sexo e idade, e os estilos de vida, hábitos tabágicos e tempo de exposição, dos dois grupos estudados estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 – Características da população estudada

| | Grupo Controlo (N = 52) | Grupo Exposto (N = 55) |
|---|----------------------------|---------------------------|
| Sexo (%) | | |
| Feminino | 73 (N= 38) | 71 (N= 39) |
| Masculino | 27 (N= 14) | 29 (N= 16) |
| Idade (anos) ^a | 37 ± 10 | 40 ± 10 |
| Hábitos Tabágicos (%) | | |
| Não Fumadores | 87 (N= 45) | 80 (N= 44) |
| Fumadores | 13 (N= 7) | 20 (N= 11) |
| Tempo de Exposição (anos) ^a | — | 14 ± 9 |

^a Média ± Desvio Padrão

2.1.1. Contacto com as Instituições e Informação relevante

Após identificação das unidades hospitalares com Serviços de Anatomia Patológica procedeu-se ao contacto com os responsáveis destas e do serviço visado. O primeiro contacto, feito por carta, acompanhada por uma breve descrição do projecto, teve como objectivo dar a conhecer o estudo, pedir a colaboração dos profissionais do Serviço e obter autorização por parte da Direcção para a realização do mesmo. Num segundo contacto, *in loco*, pretendeu-se contactar directamente os trabalhadores visados com o objectivo de esclarecer quaisquer dúvidas acerca do estudo e da natureza da participação requerida. O mesmo procedimento foi adoptado no contacto com a população controlo.

O estudo foi submetido à Comissão de Ética do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge e desenvolvido de acordo com a Declaração de Helsínquia de 1975, revista em 1989.

Todos os indivíduos que aceitaram participar no estudo foram informados dos objectivos do trabalho em curso e, uma vez manifestado o seu consentimento por escrito, responderam a um questionário, que se encontra em anexo (Anexo I), visando a avaliação de factores demográficos e sociais e outros potenciais factores de risco associados com a exposição a compostos reconhecidos como cancerígenos (hábitos tabágicos, Raios X, entre outros). Os indivíduos expostos responderam ainda a questões relacionadas com a sua actividade laboral, uso de equipamento de protecção individual, anos de actividade profissional, entre outros.

2.2. Metodologia

Procedeu-se à monitorização ambiental para avaliar a exposição de cada profissional a FA, e à monitorização biológica para analisar o efeito genotóxico. As metodologias abaixo descritas encontram-se optimizadas pelo Laboratório.

2.2.1. Monitorização Ambiental

A exposição dos profissionais dos Serviços de Anatomia Patológica a FA ocorre principalmente durante o exame macroscópico das peças cirúrgicas conservadas em formol (registo das peças) e no despejo desse mesmo formol aquando da eliminação das peças para posterior tratamento como resíduos hospitalares (despejo e lavagem das peças). A monitorização ambiental foi realizada no decorrer destas duas tarefas e em outros pontos relevantes para a estimativa da concentração média ponderada (TWA).

A quantificação de FA no ambiente de trabalho dos profissionais dos Serviços de Anatomia Patológica, representativa do ar inalado pelos mesmos durante a sua actividade laboral, foi efectuada por colheita de ar no posto de trabalho e posterior quantificação do composto no laboratório.

A colheita de ar foi efectuada em frascos lavadores (ou impingers) com 10 mL de bissulfito de sódio a 1%, ligados a bombas de colheita de ar com fluxo máximo de aspiração regulado para 1L/minuto (Figura 11).

Em cada posto de trabalho foram colocados dois colectores de ar, ao nível das vias respiratórias do trabalhador, durante períodos representativos do processo normal de trabalho (cada amostragem por períodos máximos de 60 minutos).

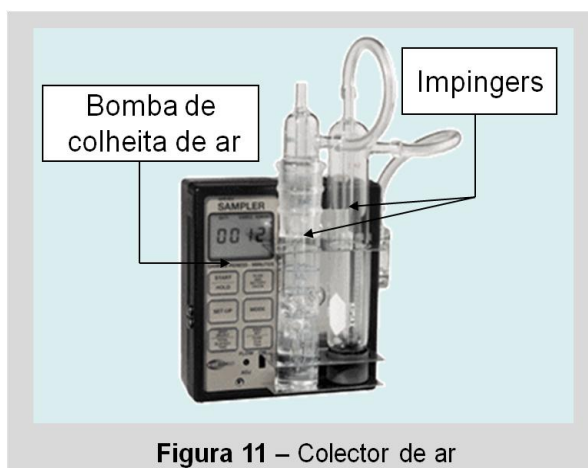


Figura 11 – Colector de ar

A disposição dos colectores é localizada e específica, de forma a não perturbar a rotina normal de trabalho dos profissionais, e obter uma melhor caracterização do ambiente de exposição do trabalhador.

No momento da colheita de ar foi pedido ao trabalhador que respondesse a questões sobre a sua rotina de trabalho, nomeadamente, o tipo de tarefas que desenvolve naquele posto de trabalho e o número de horas despendido para cada tarefa.

O procedimento para a quantificação de FA no ar é adaptado do descrito pela NIOSH (NIOSH, 1994), método nº 3500, no qual se recorre à técnica de Espectrofotometria UV/Visível. Neste método o FA, num meio de ácido sulfúrico concentrado, reage com o ácido cromotrópico e produz um complexo que tem o seu máximo de absorção a 580 nm. Assim, para a quantificação do FA, adicionou-se 0.1 mL de ácido cromotrópico a 1% aos tubos de ensaio com 4 mL de amostra, devidamente identificados (amostras, branco e padrões de leitura). Na hotte foram adicionados lentamente 6 mL de ácido sulfúrico concentrado em cada tubo e após mistura, esses tubos foram colocados num banho-maria a 90°C durante 10 minutos. Deixou-se arrefecer à temperatura ambiente e procedeu-se à leitura das absorvâncias dos padrões e das amostras no espectrofotómetro UV/VIS ATI UNICAM, a 580 nm. O limite de quantificação do método usado é de 0.06 ppm (para um volume da amostragem de 60 Litros).

O valor da concentração média ponderada (TWA) de exposição a FA, obtido para cada trabalhador por jornadas diárias de trabalho de 8 horas, foi calculado matematicamente de acordo com a expressão representada na Figura 12. Cada produto, $C_N \times T_N$, representa uma tarefa, sendo C_N a concentração de FA no ar (ppm) obtida durante a realização da tarefa e, T_N o tempo, em horas, que o trabalhador despende na sua jornada de trabalho para a realização daquela tarefa.

$$\text{TWA (8 horas)} = \frac{C_1 \times T_1 + C_2 \times T_2 + \dots + C_N \times T_N}{8 \text{ Horas}}$$

Figura 12 – Cálculo do valor de TWA para cada trabalhador numa jornada diária de trabalho (8 horas); C representa a concentração de FA no ar (ppm) obtida durante a realização da tarefa e T, representa o tempo, em horas, de duração da tarefa

2.2.2. Monitorização Biológica

Recolha de amostras biológicas

A cada indivíduo participante foi colhida uma amostra de 10 mL de sangue para o doseamento do biomarcador de genotoxicidade – Teste do Micronúcleo (MN). A colheita de sangue foi feita em tubos com heparina sódica.

Todas as amostras foram codificadas e mantidas a 4°C até chegarem ao laboratório, para serem processadas. Para cada amostra prepararam-se duas réplicas de cultura de células. Até à finalização da incubação todos os passos foram realizados em condições de assépsia, numa câmara de fluxo laminar e utilizando material esterilizado.

Teste dos micronúcleos (MN)

O teste dos MN baseou-se no método descrito por Monteiro Gil *et al.* (2000). Em tubos previamente identificados adicionaram-se alíquotas de 0.5 mL de sangue total a 4.5 mL de meio de cultura [Nutrient Mixture F-10 HAM suplementado com estreptomicina (50 µg/mL), penicilina (50 IU/mL), 1% de L-glutamina, 1% de heparina sódica e 24% de FBS]. As culturas foram depois colocadas a incubar numa estufa a 37°C.

Às 44 horas de incubação foram adicionados 150 µL de Cyt-B (6 µg/mL) de forma a inibir a citocinese das células em cultura. A incubação continuou até às 72 horas, após a qual as células foram separadas por centrifugação a 1000 rpm (270 x g) durante 10 minutos. A partir deste passo deixou de ser necessário trabalhar em condições de assépsia.

Desprezou-se o sobrenadante e as células (sedimento) foram lavadas 2 vezes com solução de RPMI 1640 a pH 7.2 suplementado com FBS (soro fetal bovino) a 2% e centrifugadas, durante 7 minutos, a 1000 rpm. As células foram depois submetidas a um tratamento hipotónico (solução de água desionizada e RPMI 1640 a pH 7.2, suplementado com 2% de FBS, na proporção de 4:1) e imediatamente centrifugadas,

durante 5 minutos, a 1000 rpm. O sobrenadante foi novamente desprezado. Da suspensão celular resultante foram retiradas gotas para lâminas, tendo-se feito esfregaços (cerca de 3 por réplica).

Após 24 horas a secar ao abrigo da luz os esfregaços foram fixados numa solução gelada de metanol e ácido acético (3:1), a - 20 °C durante 20 minutos. Uma vez secos, procedeu-se à coloração dos esfregaços. As lâminas foram mergulhadas numa solução de Giemsa 4% em tampão fosfato pH 6.8 durante 7 minutos e lavadas em água corrente, ficando a secar ao ar. Depois de secas fez-se a montagem de lamelas sobre as lâminas com Entellan e deixaram-se secar. Para a observação das lâminas foi usado o Microscópio Nikon Eclipse E400.

Para cada indivíduo foi contado o número total de MN observados numa população de 1000 células binucleadas.

A contagem das células binucleadas foi efectuada com uma ampliação de 500x (ocular, 12.5x; objectiva, 40x) e a identificação dos MN foi conseguida com ampliações de 500x e de 1250x (ocular, 12.5x; objectivas, 40x e 100x). Os MN foram identificados com base nos critérios descritos por Caria *et al.* (1995), nomeadamente, textura igual à dos núcleos principais, diâmetro entre 1/16 a 1/3 do diâmetro médio dos núcleos principais, sem ligação aos núcleos e pertencerem a uma célula com citoplasma bem preservado.

2.3. Análise Estatística

Com o objectivo de avaliar o efeito da exposição ocupacional a FA no biomarcador de efeito estudado (MN) procedeu-se ao tratamento estatístico dos resultados.

Na análise estatística dos resultados foi utilizado a versão 16.0 do programa SPSS para Windows. Foram consideradas variáveis independentes o género, idade, hábitos tabágicos e duração de exposição, e variável dependente a frequência de MN.

As variáveis contínuas obtidas nas diversas fases do estudo (idade, tempo de exposição, valores de concentração de FA no ar e frequências de MN) foram descritas usando médias, erros-padrão da média e intervalos (máximo, mínimo). As variáveis categóricas (sexo e hábitos tabágicos) foram descritas usando percentagens.

O pressuposto da normalidade foi testado através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Uma vez que a variável dependente, frequência de MN, se desvia significativamente da distribuição normal foram aplicados testes não paramétricos (Mann-Whitney e Kruskal-Wallis).

Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas com um intervalo de confiança de 95% ($p < 0.05$).

3. Resultados

3.1. Monitorização Ambiental

Após o cálculo da concentração média ponderada (TWA) da exposição a FA no ar para cada um dos profissionais expostos, verificou-se que o valor médio foi de 0.49 ppm (mínimo = 0.07; máximo = 1.58). Os resultados obtidos para este parâmetro encontram-se na tabela 7.

Tabela 7 – Concentração média da exposição dos trabalhadores a FA

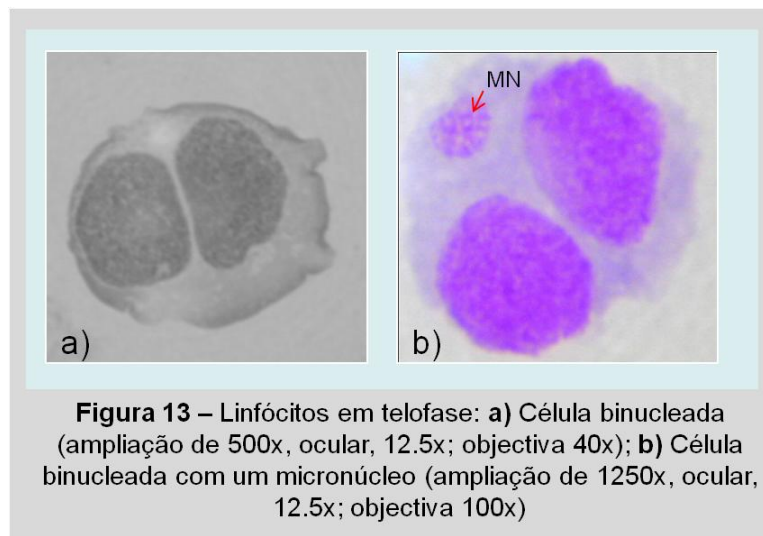
| | N | TWA (ppm) ^a |
|---------------|----|------------------------------|
| Grupo Exposto | 55 | 0.49 ± 0.06 (0.07 – 1.58) |

^a Média ± Erro Padrão da Média (Mínimo – Máximo)

3.2. Monitorização Biológica

3.2.1. Teste do micronúcleo (MN)

Através da observação microscópica de linfócitos de sangue periférico, foi possível encontrar células binucleadas contendo MN, sendo mais comum encontrar esse tipo de células com apenas um MN. Na figura 13 pode-se observar dois exemplos do tipo de células estudadas.



3.2.2. Relação entre a exposição a formaldeído e a frequência de micronúcleos

Através da análise estatística dos resultados para o biomarcador estudado, verificou-se que os indivíduos expostos a FA apresentam uma frequência de MN significativamente superior à dos indivíduos não expostos ($p < 0.003$). Os valores médios obtidos nesta análise e a sua representação gráfica encontram-se apresentados na tabela 8 e na figura 14, respectivamente.

Tabela 8 – Valores médios da frequência de MN em ambos os grupos

| Grupo | N | MN (‰) ^a |
|----------|----|--------------------------------------|
| Controlo | 52 | 3.71 ± 0.50 ^b (0 – 17) |
| Exposto | 55 | 6.02 ± 0.58 (0 – 18) |

^a Média ± Erro Padrão da Média (Mínimo – Máximo)

^b $p < 0.003$, entre o grupo controlo e o exposto

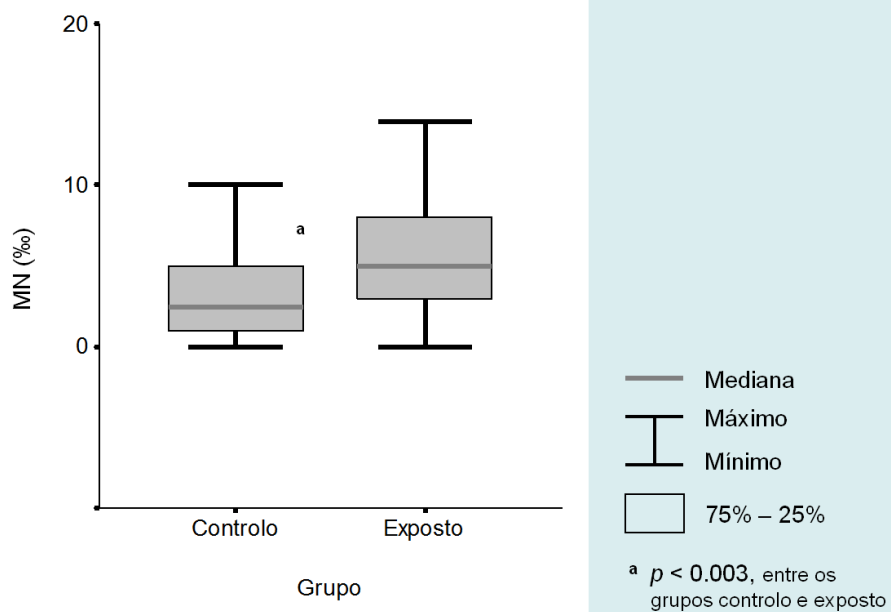


Figura 14 – Representação gráfica da distribuição de MN de acordo com o grupo de indivíduos

3.2.3. Relação entre o sexo dos indivíduos e a frequência de micronúcleos

A análise estatística dos resultados permitiu verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas na frequência de MN entre homens e mulheres tanto no grupo controlo como no grupo exposto (Tabela 9).

Observou-se que, em ambos os grupos, os indivíduos do sexo feminino apresentavam frequências de MN mais elevadas do que os indivíduos do sexo masculino, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0.017$).

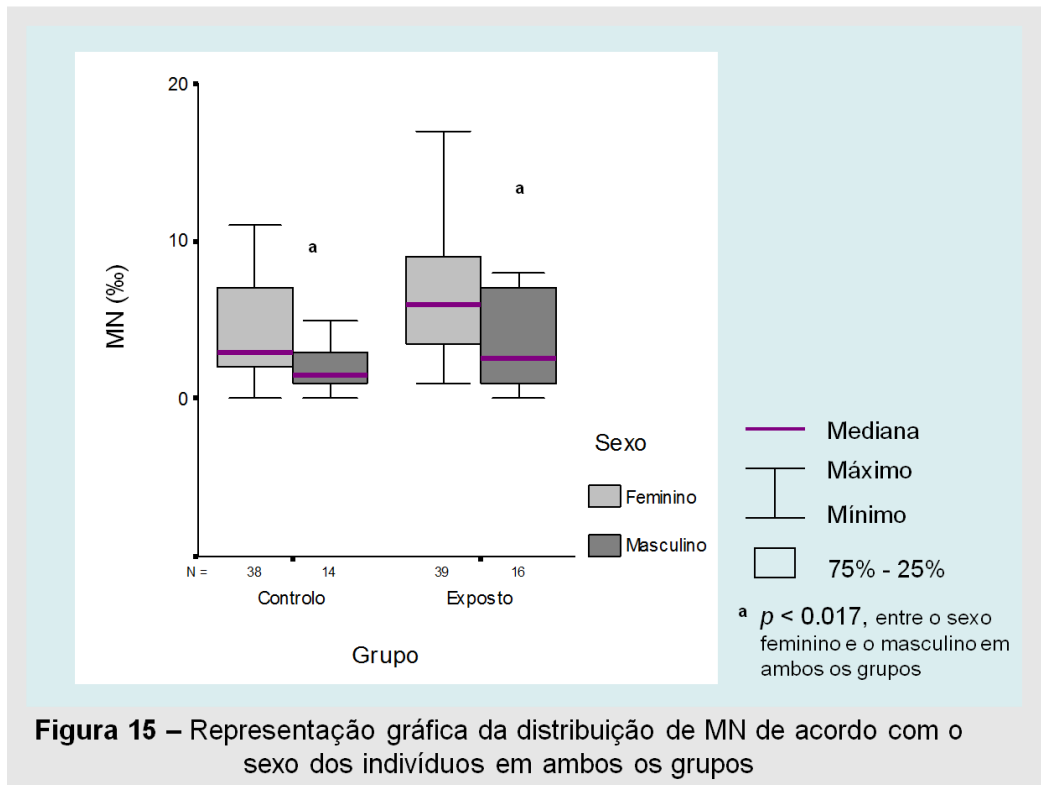
Na figura 15 pode-se observar a distribuição das frequências de MN para ambos os sexos nos dois grupos estudados.

Tabela 9 – Valores médios da frequência de MN em ambos os grupos de acordo com o sexo dos indivíduos

| | N | MN (‰) ^a |
|-----------------------|----|--------------------------------------|
| Grupo Controlo | | |
| Sexo Feminino | 38 | 4.39 ± 0.63 ^b (0 – 17) |
| Sexo Masculino | 14 | 1.86 ± 0.44 (0 – 5) |
| Grupo Exposto | | |
| Sexo Feminino | 39 | 6.72 ± 0.66 ^b (1 – 18) |
| Sexo Masculino | 16 | 4.31 ± 1.10 (0 – 17) |

^a Média ± Erro Padrão da Média (Mínimo – Máximo)

^b $p < 0.017$, entre o sexo feminino e o masculino em ambos os grupos



3.2.4. Relação entre a idade dos indivíduos e a frequência de micronúcleos

Para avaliar o efeito da idade na frequência de MN, estratificaram-se os indivíduos estudados em três classes etárias: Classe A (< 32 anos), Classe B (32 – 41 anos) e Classe C (> 41 anos).

Após a análise dos resultados é possível afirmar que existe uma relação positiva entre a idade dos indivíduos e a frequência de MN (Tabela 10). Isto significa que existe um aumento do número de MN com o aumento da idade nos grupos controlo e exposto. A relação entre a frequência de MN e as classes etárias no grupo controlo e no grupo exposto encontram-se representadas nas figuras 16 e 17, respectivamente.

Da análise dos valores obtidos para o grupo controlo e exposto, verifica-se que o aumento das frequências de MN da Classe A para a Classe B não é estatisticamente significativo. No entanto existe um aumento estatisticamente significativo na frequência de MN da Classe B para a Classe C ($p < 0.006$ e $p < 0.02$, no grupo controlo e exposto, respectivamente) e da classe A para a Classe C ($p < 0.001$ em ambos os grupos).

Tabela 10 – Valores médios da frequência de MN nas três classes etárias em ambos os grupos

| | N | MN (%) ^a |
|-----------------------|----|--------------------------------------|
| Grupo Controle | | |
| Classe A (< 32) | 20 | 2.10 ± 0.47 ^b (0 – 8) |
| Classe B (32 – 41) | 19 | 3.32 ± 0.64 ^c (0 – 10) |
| Classe C (>41) | 13 | 6.77 ± 1.29 (0 – 17) |
| Grupo Exposto | | |
| Classe A (< 32) | 14 | 3.14 ± 0.76 ^b (0 – 10) |
| Classe B (32 – 41) | 17 | 5.24 ± 0.90 ^d (1 – 17) |
| Classe C (>41) | 24 | 8.25 ± 0.87 (2 – 18) |

^a Média ± Erro Padrão da Média (Mínimo – Máximo)

^b $p < 0.001$, entre a classe A e a classe C, em ambos os grupos

^c $p < 0.006$, entre a classe B e a Classe C no grupo controle

^d $p < 0.020$, entre a classe B e a Classe C no grupo exposto

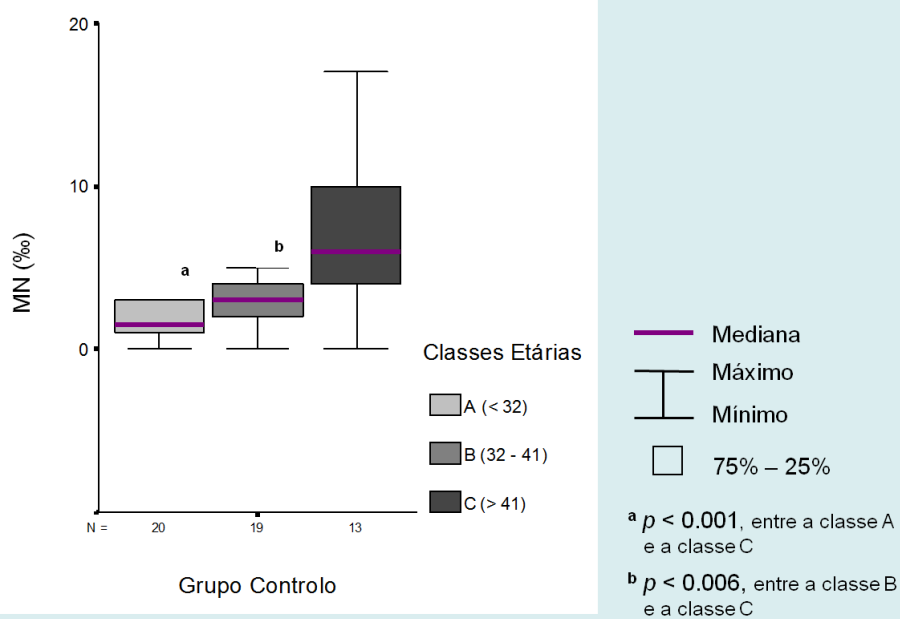
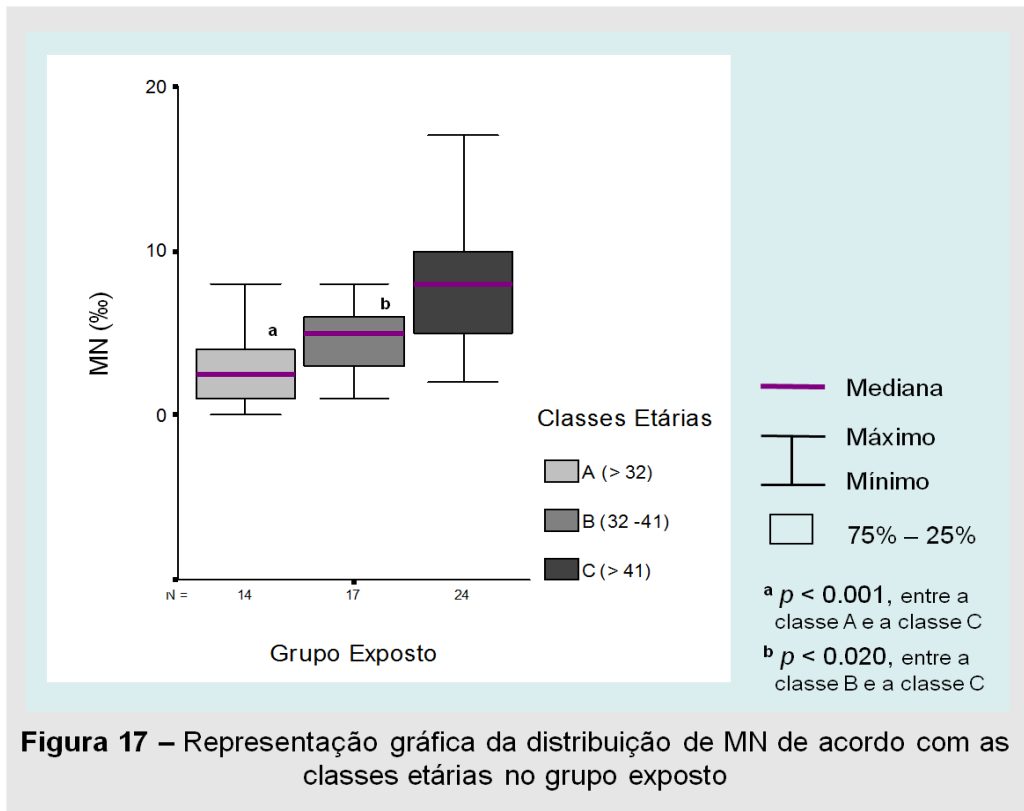


Figura 16 – Representação gráfica da distribuição de MN de acordo com as classes etárias no grupo controle



3.2.5. Relação entre os hábitos tabágicos dos indivíduos e a frequência de micronúcleos

A análise estatística dos resultados não evidenciou diferenças significativas na frequência de MN entre fumadores e não fumadores no grupo exposto ($p = 0.404$) e no grupo controlo ($p = 0.896$). No entanto, é importante mencionar que na população estudada o número de fumadores é reduzido. A influência dos hábitos tabágicos na frequência de MN em ambos os grupos encontra-se representada na tabela 11.

Tabela 11 – Valores médios da frequência de MN em ambos os grupos de acordo com os hábitos tabágicos

| | N | MN (%)^a |
|-----------------------|----------|---------------------------|
| Grupo Controlo | | |
| Não Fumadores | 45 | 3.69 ± 0.54 (0 – 17) |
| Fumadores | 7 | 3.86 ± 1.44 (0 – 11) |
| Grupo Exposto | | |
| Não Fumadores | 44 | 6.18 ± 0.64 (1 – 18) |
| Fumadores | 11 | 5.36 ± 1.42 (0 – 17) |

^a Média ± Erro Padrão da Média (Mínimo – Máximo)

3.2.6. Relação entre o tempo de exposição dos indivíduos e a frequência de micronúcleos

A duração da exposição dos trabalhadores ao FA, isto é, o número de anos de trabalho no Serviço de Anatomia Patológica, foi dividida nas seguintes classes: Classe A (1 – 7 anos), Classe B (8 – 14 anos), Classe C (15 – 21 anos) e Classe D (22 – 36 anos). Os resultados apresentados na Tabela 12 reflectem a influência do tempo de exposição na frequência de MN no grupo exposto.

Verifica-se uma diferença estatisticamente significativa entre a classe mais baixa de tempo de exposição, a classe A, quando comparada com a Classe D, que representa o tempo de exposição mais prolongado ($p < 0.009$), como se pode observar na figura 18.

Tabela 12 – Valores médios da frequência de MN no grupo exposto de acordo com o tempo de exposição

| Tempo de Exposição (anos) | N | MN (%) ^a |
|---------------------------|----|--------------------------------------|
| Classe A (1 – 7) | 16 | 3.81 ± 0.77 ^b (0 – 10) |
| Classe B (8 – 14) | 16 | 5.00 ± 0.74 (1 -11) |
| Classe C (15 – 21) | 7 | 7.86 ± 2.24 (2 -17) |
| Classe D (22 – 36) | 16 | 8.44 ± 1.11 (3 – 18) |

^a Média ± Erro Padrão da Média (Mínimo – Máximo)

^b $p < 0.009$, entre a classe A e a classe D

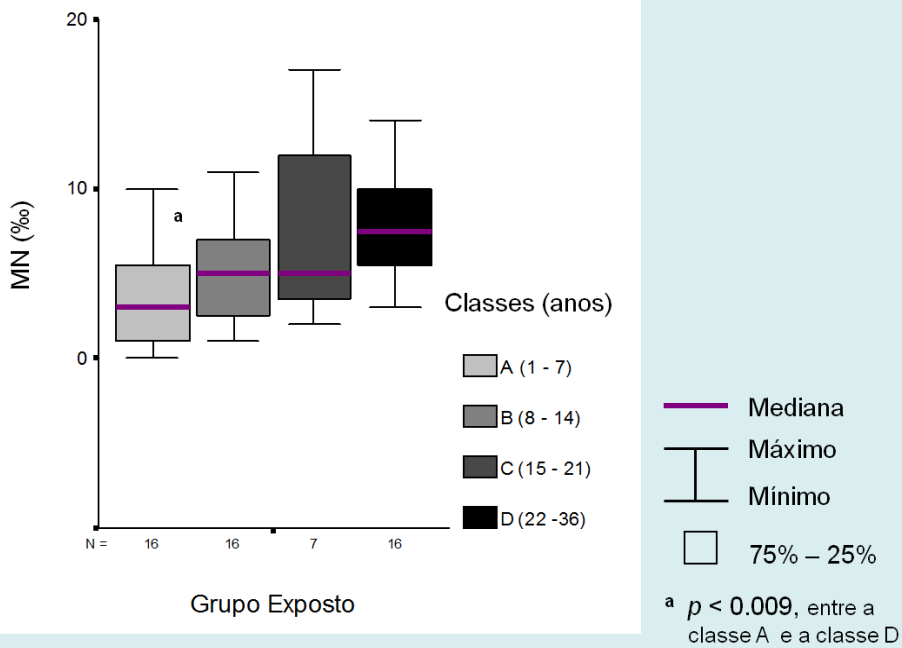


Figura 18 – Representação gráfica da distribuição da frequência de MN com o tempo de exposição dos indivíduos do grupo exposto

4. Discussão

Através do cálculo da concentração média ponderada (TWA) para cada um dos indivíduos expostos, constatou-se que o valor médio de exposição a FA para a população estudada foi de 0.49 ppm (mínimo = 0.07; máximo = 1.58). Este valor é indicativo da ocorrência de uma exposição elevada a FA nos Serviços de Anatomia Patológica das unidades hospitalares estudadas. Sendo o valor limite de concentração de FA no ar 0.3 ppm (IPQ, 2007), é seguro dizer que os profissionais que aí exercem a sua actividade estão expostos a níveis de FA superiores aos valores limite estabelecidos.

Vários estudos apontam os laboratórios de anatomia patológica como um dos cenários ocupacionais onde os trabalhadores estão expostos a concentrações de FA superiores aos valores limite regulamentados, o que indica uma situação de risco de exposição profissional (Akbar-Khanzadeh *et al.*, 1994; Shaham *et al.*, 1997; Akbar-Khanzadeh & Pulido, 2003). Um estudo recente revelou que os níveis deste composto em 4 hospitais da zona do Porto e Aveiro estavam compreendidos entre 0.04 ppm e 1.58 ppm (mínimo e máximo, respectivamente) e que a concentração média era de 0.44 ppm (TWA) (Costa *et al.*, 2008). Um outro estudo publicado anteriormente reportou que trabalhadores deste ramo profissional estavam expostos a concentrações médias de FA compreendidas entre 0.1 e 0.7 ppm (mínimo e máximo, respectivamente) (Orsière *et al.*, 2006).

Da análise dos resultados obtidos verifica-se que o valor médio de frequência de MN dos indivíduos expostos é significativamente mais elevado quando comparado com o grupo controlo. O aumento significativo da frequência de MN em trabalhadores expostos a FA é um facto referenciado em alguns estudos encontrados na literatura científica.

Um estudo sobre os efeitos citotóxicos da exposição a FA descreveu um aumento significativo da frequência de MN em linfócitos de sangue periférico (28%) em estudantes expostos a este composto durante o processo de embalsamento (TWA = 0.33 ppm) (Suruda *et al.*, 1993). Outro estudo sobre a detecção de efeitos citogenéticos em linfócitos periféricos de estudantes de anatomia expostos a este composto químico (concentração média = 2.37 ppm) relatou um aumento significativo da frequência de MN nesse grupo quando comparado com o grupo controlo (He *et al.*, 1998). Recentemente, o mesmo efeito foi descrito para um grupo de 151 operários expostos a esse composto químico (Yu *et al.*, 2005).

Em 2006 foi publicado um trabalho sobre o efeito genotóxico do FA em 59 profissionais de laboratórios de anatomia patológica, tendo sido encontrado um aumento significativo na frequência de MN nesse grupo quando comparado com o grupo controlo (Orsière *et al.*, 2006). Outro estudo obteve resultados semelhantes para este indicador de dano genético, detectando que a frequência de MN no grupo exposto é significativamente superior à do grupo controlo ($p = 0.003$) (Costa *et al.*, 2008).

Por outro lado, outros estudos revelam que não existem diferenças significativas na frequência de MN entre indivíduos expostos e controlo (Titenko-Holland *et al.*, 1996; Ying *et al.*, 1997, Pala *et al.*, 2008). No entanto, devido ao grande número de estudos que comprovam a relação positiva entre o aumento da frequência de MN e a exposição a FA, poder-se-á afirmar que a frequência de MN em linfócitos é um bom biomarcador de danos genéticos em populações humanas expostas a FA (Fenech, 1993; Fenech *et al.*, 1999; Bonassi *et al.* 2007). Vários estudos apontam para a existência de uma relação entre a indução de MN e o desenvolvimento de cancro (Blair *et al.*, 1990; Armstrong *et al.*, 2000; Vaughan *et al.*, 2000; Luce *et al.*, 2002; Pinkerton *et al.*, 2004; Freeman *et al.*, 2009).

Na biomonitorização de populações expostas ocupacionalmente a compostos tóxicos é necessário estudar a interferência de algumas características da população como a idade, o sexo, o tempo de exposição e os hábitos tabágicos dos indivíduos. Neste trabalho estudou-se a influência destas variáveis na frequência de MN.

A análise estatística da relação entre o sexo dos indivíduos e a frequência de MN revelou que as mulheres apresentam, em média, um número de MN significativamente superior aos encontrados nos homens, tanto no grupo controlo como no exposto.

Alguns estudos referenciados na literatura científica encontraram resultados semelhantes, revelando que os indivíduos do sexo feminino apresentam um maior número de MN do que os indivíduos do sexo masculino (Bonassi *et al.*, 2001; Vodicka *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2008). Um estudo sobre a influência do sexo na ocorrência de MN atribuiu o aumento do número de MN nas mulheres a eventos aneugénicos que envolvem o cromossoma X (Barale *et al.*, 1998). Um outro estudo referiu que encontrar o cromossoma X em MN é mais frequente do que seria de esperar, demonstrando existir uma expressão excessiva deste cromossoma em MN de linfócitos de indivíduos do sexo feminino (Surrallés *et al.*, 1996). Contudo a explicação para este fenómeno não se encontra totalmente esclarecida.

No estudo da relação entre a idade dos indivíduos e a frequência de MN verificou-se que ocorre um aumento da frequência de MN com o aumento da idade dos indivíduos

em ambos os grupos. Para a análise desta variável, procedeu-se ao estabelecimento de três classes etárias, Classe A (< 32 anos), Classe B (32 - 41 anos) e Classe C (> 41 anos). Assim, foi possível verificar a existência de um aumento significativo de MN da classe B para a classe C e da classe A para a classe C em ambos os grupos, demonstrando que indivíduos mais velhos apresentam uma maior frequência de MN, comparativamente aos mais novos.

O aumento da frequência de MN com o aumento da idade foi comprovado em alguns estudos (Bolognesi *et al.*, 1999; Fenech *et al.*, 1999; Bonassi *et al.*, 2001). Há evidências que esse aumento resulta de alterações no fuso mitótico, o que leva a atrasos na ascensão polar dos cromossomas durante a anafase (Costa *et al.*, 2008). O aumento da ocorrência de danos genéticos com o aumento da idade dos indivíduos está relacionado com a perda de eficiência dos mecanismos de reparação do ADN e com o aparecimento de defeitos no sistema de defesa celular, durante o processo de envelhecimento (Orsière *et al.*, 2006).

Após a análise estatística da relação entre os hábitos tabágicos dos indivíduos e a frequência de MN constatou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre fumadores e não fumadores no que diz respeito à frequência de MN para ambos os grupos.

Esta constatação difere da obtida noutros estudos que evidenciam que os fumadores apresentam uma maior frequência de MN quando comparados com os não fumadores, possivelmente devido à existência de substâncias carcinogénicas no fumo do tabaco, capazes de provocar danos no ADN (Laffon *et al.*, 2002; Orsière *et al.*, 2006; Bahlli *et al.*, 2006). Contudo, noutros trabalhos, essa relação não foi comprovada, não tendo sido detectada relação causal entre o fumo do tabaco e o aumento da frequência de MN (Bonassi *et al.*, 2003; Hoffmann & Speit *et al.*, 2005). O resultado obtido neste estudo no que diz respeito ao efeito do fumo do tabaco poderá ser explicado pelo reduzido número de fumadores na população estudada.

A análise estatística da relação entre o tempo de exposição e a frequência de MN evidenciou a existência de uma relação positiva entre essas variáveis. Para se proceder ao estudo desta relação, dividiu-se os indivíduos em quatro classes: Classe A (1 - 7 anos de trabalho), Classe B (8 - 14 anos de trabalho), Classe C (15 - 21 anos de trabalho) e Classe D (22 - 36 anos de trabalho). Foi possível verificar a existência de um aumento estatisticamente significativo da classe A para a classe D no grupo estudado, demonstrando que a frequência média de MN aumenta com o aumento do tempo de exposição ao FA.

Esta última variável estudada está relacionada com outra já mencionada, a idade. De um modo geral, o aumento da idade dos indivíduos está relacionado com o aumento do tempo de exposição a FA, verificando-se assim um aumento na frequência média de MN em indivíduos expostos mais velhos e que trabalham há mais anos (Bolognesi *et al.*, 1999; Orsière *et al.*, 2006).

5. Conclusão

Neste trabalho foi avaliada a exposição ocupacional a FA de um grupo de profissionais dos Serviços de Anatomia Patológica (monitorização ambiental) e estudado o dano genotóxico induzido pela exposição a este composto (monitorização biológica).

Na monitorização ambiental constatou-se que os profissionais estão expostos a níveis elevados de FA, superiores aos valores limite estabelecidos tanto a nível nacional como internacional. Idealmente a primeira abordagem a este cenário seria a substituição do composto por outro, no entanto, face à relação custo/benefício do FA os laboratórios muito dificilmente o substituirão. Torna-se por isso necessária a implementação de medidas de prevenção e de controlo que minimizem o risco de exposição a este químico, nomeadamente a implementação de boas práticas de trabalho e a formação dos profissionais nesses princípios. Os trabalhadores deverão também ser informados sobre a correcta utilização dos meios de prevenção (colectiva e individual) e sua manutenção, de modo a minimizar os riscos inerentes às suas actividades. Paralelamente deverá ser assegurado um programa de vigilância da saúde dos trabalhadores que permita uma avaliação contínua dos riscos na saúde de natureza profissional e subsidie medidas e acções preventivas adequadas ao controle da exposição. Dever-se-à igualmente proceder a melhorias nos locais de trabalho nomeadamente no que diz respeito às condições de exaustão, ventilação e climatização.

Relativamente à monitorização biológica, para avaliar o potencial dano genotóxico provocado pela exposição a FA recorreu-se ao teste do MN e verificou-se que os indivíduos expostos ocupacionalmente a FA, apresentam um dano genético significativamente mais elevado do que grupo dos indivíduos não expostos.

Assim, é possível concluir que este biomarcador é útil na avaliação dos efeitos genotóxicos provocados pela exposição a FA, e tendo em consideração que os MN tal como as aberrações cromossómicas são um indicador precoce do possível desenvolvimento de patologias oncológicas. Por este motivo, é fundamental a execução de medidas que visem a diminuição da exposição ocupacional a este composto.

Para finalizar, é importante referir que seria interessante a realização de um estudo de avaliação da exposição ao FA que envolvesse a aplicação de vários biomarcadores bem como um aumento do número de indivíduos estudados. Assim, os resultados obtidos reflectiriam mais correctamente os efeitos adversos provocados pela

exposição ocupacional a este composto na saúde dos profissionais e contribuiriam seguramente para a prevenção dos mesmos.

Bibliografia

- ACGIH (*American Conference of Governmental Industrial Hygienists*). 2008. TLV's and BEI's – Based on the Documentation of the Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents & Biological Exposure Indices, 256.
- Akbar-Khanzadeh, F., Vaquerano, M.U., Akbar-Khanzadeh, M., Bisesi, M.S. 1994. Formaldehyde exposure, acute pulmonary response and exposure control options in a gross anatomy laboratory. *Am J Ind Med*, 26 (1): 61-75.
- Akbar-Khanzadeh, F., Pulido, E.V. 2003. Using respirators and goggles to control exposure to air pollutants in an anatomy laboratory. *Am J Ind Med*, 43: 326-331.
- Almeida, C., Carvalho, C., Oliveira, J., Marinho, N., Cardoso, S. 2000. Formaldeído: um problema de saúde no ICBAS (monografia no âmbito da disciplina Saúde Comunitária da Licenciatura em Medicina). Universidade do Porto, Porto.
- Amorim, L. 2003. O uso dos biomarcadores na avaliação da exposição ocupacional a substâncias químicas. *Rev Bras Med Trab*, 1 (2): 124-132.
- Armstrong, R.W., Imrey P.B., Lye, M.S., Armstrong, M.J., Yu, M.C., Sani, S. 2000. Nasopharyngeal carcinoma in Malaysian Chinese: occupational exposures to particles, formaldehyde and heat. *Int J Epidemiol*, 29: 991-998.
- Arts, J., Rennen, M., Heer, C. 2006. Formaldehyde: Evaluation of sensory irritation in relation to carcinogenicity. *Regul Toxicol Pharmacol*, 44: 144-160.
- ATSDR (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*). 1999. Toxicological profile for formaldehyde - health effects. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta. Disponível em <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp111.htm>, consultado a 27/03/2010.
- Ballarin, C., Sarto, F., Giacomelli, L., Bartolucci, G.B., Clonfero, E. 1992. Micronucleated cells in nasal mucosa of formaldehyde exposed workers. *Mutat Res*, 280: 1-7.
- Barale, R., Chelotti, L., Davini, T., Ry, S.D., Andreassi, M.G., Ballardini, M., Bulleri, M., He, J., Baldacci, S., Pede, F.D., Gemignani, F., Landi, S. 1998. Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age, and lifestyle. *Environ Mol Mutagen*, 31: 228-242.

- Bertazzi, P.A., Pesatori, A.C., Radice, L., Zocchetti, C., Vai, T. 1986. Exposure to formaldehyde and cancer mortality in a cohort of workers producing resins. *Scand J Work Environ Health*, 12 (5): 461-8.
- Bhalli, J.A., Khan, Q.M., Nasim, A. 2006. DNA damage in Pakistani pesticide manufacturing workers assayed using the Comet assay. *Environ Mol Mutagen*, 47 (8): 587-93.
- Binetti, R., Costamagna, F.M., Marcello, I. 2006. Development of carcinogenicity classifications and evaluations: the case of formaldehyde. *Ann Ist Super Sanità*, 42 (2): 132-143.
- Blair, A., Saracci, R., Stewart, P.A., Hayes, R.B., Shy, C., 1990. Epidemiologic evidence on the relationship between formaldehyde exposure and cancer. *Scand J Work Environ Health*, 16: 381-393.
- Bolognesi, C., Lando, C., Forni, A., Landini, E., Scarpato, R., Migliore, L., Bonassi, S. 1999. Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Age Ageing*, 28 (4): 393-7.
- Bonassi, S. 1999. Combining environmental exposure and genetic effect measurements in health outcome assessment. *Mutat Res*, 428 (1-2): 177-85.
- Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., DiGiorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Müller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A., Zijno, A. 2001. Human Micronucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ Mol Mutagen*, 37 (1): 31-45.
- Bonassi, S., Neri, M., Lando, C., Ceppi, M., Lin, Y.P., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Fenech, M. 2003. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutat Res*, 543 (2): 155-66.
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliori, L., Mirkova, E., Scarfi, M.R., Zijno, A., Norppa, H., Fenech, M. 2007. An

- increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28: 625-631.
- Caria, H., Chaveca, T., Laires, A., Rueff, J. 1995. Genotoxicity of quercetin in the micronucleus assay in mouse bone marrow erythrocytes, human lymphocytes, V79 cell line and identification of kinetochore-containing (CREST staining) micronuclei in human lymphocytes. *Mutat Res.* 343 (2-3): 85-94.
- Cleaves, H. 2008. The prebiotic geochemistry of formaldehyde. *Precambrian Res*, 164: 111-118.
- Coggon, D., Harris, E.C., Poole, J., Palmer, K.T., 2003. Extended follow up of a cohort of British chemical workers exposed to formaldehyde. *J Natl Cancer Inst*, 95: 1608–1615.
- Collins, J.J., Esmen, N.A., Hall, T.A., 2001. A review and meta-analysis of formaldehyde exposure and pancreatic cancer. *Am J Ind Med*, 39: 336-345.
- Collins, J.J., Lineker, G.A. 2004. A review and meta-analysis of formaldehyde exposure and leukemia. *Regul Toxicol Pharm*, 40: 81-91.
- Conaway, C.C., Whysner, J., Verna, L.K., Williams, G.M. 1996. Formaldehyde mechanistic data and risk assessment: endogenous protection from DNA adduct formation. *Pharmacol Ther*, 71: 29-55.
- Costa, S., Coelho, P., Costa, C., Silva, S., Mayan, O., Santos, L., Gaspar, J., Teixeira, J.P. 2008. Genotoxic damage in pathology anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde. *Toxicology*, 252: 40-48.
- Crosby, R.M., Richardson, K.K., Craft, T.R., Benforado, K.B., Liber, H.L., Skopek, T.R. 1988. Molecular analysis of formaldehyde-induced mutations in human's lymphoblasts and *E. coli*. *Environ Mol Mutagen*, 12: 155-166.
- Delft, J.H.M., Baan, R.A., Roza, L. 1998. Biological effect markers for exposure to carcinogenic compound and their relevance for risk assessment. *Crit Rev Toxicol*, 28 (5): 477-510.
- Dell, L., Teta, M.J. 1995. Mortality among workers at a plastics manufacturing and research and development facility: 1946-1988. *Am J Ind Med*, 28 (3): 373-84.
- Duhayon, S., Hoet, P., Van Maele-Fabry, G., Lison, D. 2008. Carcinogenic potential of formaldehyde in occupational settings: a critical assessment and possible impact on occupational exposure levels. *Int Arch Occup Environ Health*, 81: 695-710.

- Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res*, 339: 37-59.
- Farmer, P.B., Emeny, J.M. 2006. Biomarkers of carcinogen exposure and early effects. Nofer Institute of Occupational Medicine, Poland, 163.
- Fenech, M. 1993. The cytokinesis-blockmicronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environ Health Perspect*, 101: 101-107.
- Fenech, M., Holland, N., Chang, W.P., Zeiger, E., Bonassi, S. 1999. The Human MicroNucleus Project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res*, 428: 271-283.
- Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*, 455: 81-95.
- Ferro, A., Ponte, A., Silva, A., Viegas, C., Quintino, F., Albuquerque, P., Fernandes, S., Viegas, S. 2005. A qualidade do ar interior nos serviços de anatomia patológica. *Rev Segurança*, 167: 45-50.
- Fox, D.A., Boyes, W.K. 2001. Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In: Klaassen, C.D., editor. *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. United States of America: McGraw-Hill, 565-95.
- Freeman, L., Blair, A., Lubin, J., Stewart, P., Hayes, R., Hoover, R., Hauptmann, M. 2009. Mortality from lymphohematopoietic malignancies among workers in Formaldehyde Industries: The National Cancer Institute Cohort. *J Natl Cancer Inst*, 101: 751-761.
- Gardner, M.J., Pannett, B., Winter, P.D., Cruddas, A.M. 1993. A cohort study of workers exposed to formaldehyde in the British chemical industry: an update. *Br J Ind Med*, 50: 827-834.
- Golden, R., Pyatt, D., Shields, P.G. 2006. Formaldehyde as a potential human leukemogen: an assessment of biological plausibility. *Crit Rev Toxicol*, 36: 135-153.
- Hall, A., Harrington, J.M., Aw, T.C. 1991. Mortality study of British pathologists. *Am J Ind Med*, 20: 83-89.
- Hauptmann, M., Lubin, J.H., Stewart, P.A., Hayes, R.B., Blair, A. 2003. Mortality from lymphohematopoietic malignancies among workers in formaldehyde industries. *J Natl Cancer Inst*, 95: 1615-1623.

- Hauptmann, M., Lubin, J.H., Hayes, R.B., Stewart, P., Blair, A. 2004. Mortality from solid cancers among workers in formaldehyde industries. *Am J Epidemiol*, 159: 1117-1130.
- Hayes, R.B., Blair, A., Stewart, P.A., Herrick, R.F., Mahar, H. 1990. Mortality of U.S. embalmers and funeral directors. *Am J Ind Med*, 18: 641-652.
- He, J.L., Jin, L.F., Jin, H.Y. 1998. Detection of cytogenetic effects in peripheral lymphocytes of students exposed to formaldehyde with cytokinesis-blocked micronucleus assay. *Biomed Environ Sci*, 11: 87-92.
- Heck, H., Casanova, M. 2004. The implausibility of leukemia induction by formaldehyde: a critical review of the biological evidence on distant-site toxicity. *Regul Toxicol Pharmacol*, 40: 92-106.
- Heng, Q., Stevens, J.B., Liu, G., Bremer, S.W., Ye, C.J. 2004. Imaging genome abnormalities in cancer research. *Cell Chromosome*, 3: 1-12.
- Hildesheim, A., Dosemeci, M., Chan, C.C., Chen, C.J., Cheng, Y.J., Hsu, M.M., Chen, I.H., Mittl, B.F., Sun, B., Levine, P.H., Chen, J.Y., Brinton, L.A., Yang, C.S. 2001. Occupational exposure to wood, formaldehyde, and solvents and risk of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10: 1145-1153.
- Hoffmann, H., Speit, G. 2005. Assessment of DNA damage in peripheral blood of heavy smokers with the comet assay and the micronucleus test. *Mutat Res*, 581 (1-2): 105-14.
- Hong, S.B., Kim, G.S., Jung, Y.G., Lee, J.H. 2007. The determination of ambient formaldehyde using a dual coil system and an assessment of dominant factors that influence its abundance in Korea. *Environ Monit Assess*, 138 (1-3): 1-15.
- Hughes, W. 1996. *Essentials of environmental toxicology: the effects of environmental hazardous substances on human health*. Taylor and Francis, London, 350.
- IARC (*International Agency for Research on Cancer*). 1995. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol.62: Wood dust and formaldehyde. Lyon, France, 217-362.
- IARC (*International Agency for Research on Cancer*). 2006. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol.88: Formaldehyde, 2-butoxyethanol, and 1-tert-butoxypropan-2-ol. Lyon, France.

- Iarmarcovai, G., Bonassi, S., Botta, A., Baan, R.A., Orsière, T. 2008. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature, *Mutat Res*, 658 (3): 215-33.
- IEH (*Institute for Environment and Health*). 1996. Report R5: The use of biomarkers in environmental exposure assessment. Leicester, 114.
- IPCS (*International Programme on Chemical Safety*). 1993. Environmental Health Criteria 155: Biomarkers and risk assessment: Concepts and Principles. WHO, Geneva.
- IPQ (Instituto Português da qualidade). 2007. NP-1796: Segurança e saúde do trabalho, valores limite de exposição profissional a agentes químicos. IPQ, 53.
- Jakab, M.G., Klupp, T., Besenyei, K., Biró, A., Major, J., Tompa, A. 2010. Formaldehyde-induced chromosomal aberrations and apoptosis in peripheral blood lymphocytes of personnel working in pathology departments. *Mutat Res*, 698 (1-2): 11-17.
- Jiang, S., Yu, L., Cheng, J., Leng, S., Dai, W., Zhang, Y., Niu, Y., Yan, H., Qu, W., Zhang, C., Zhang, K., Yang, R. Zhou, L., Zheng, Y. 2009. Genomic damages in peripheral blood lymphocytes and association with polymorphisms of three glutathione S-transferases in workers exposed to formaldehyde. *Mutat Res*, 695: 9-15.
- Kernan, G.J., Ji, B.T., Dosemeci, M., Silverman, D.T., Balbus, J., Zahm, S.H. 1999. Occupational risk factors for pancreatic cancer: a case-control study based on death certificates from 24 U.S. states. *Am J Ind Med*, 36 (2): 260-70.
- Kitaeva, L.V., Mikheeva, E.A., Shelomova, L.F. 1996. Genotoxic effect of formaldehyde in somatic human cells in vivo. *Genetika*, 32: 1287-1290.
- Laffon, B., Pásaro, E., Méndez, J. 2002. Evaluation of genotoxic effects in a group of workers exposed to low levels of styrene. *Toxicology*, 171 (2-3): 175-86.
- Lang, I., Bruckner, T., Triebig, G. 2008. Formaldehyde and chemosensory irritation in humans: A controlled human exposure study. *Regul Toxicol Pharm*, 50: 23-36.
- Luce, D., Leclerc, A., Bégin, D., Demers, P.A., Gérin, M., Orłowski, E., Kogevinas, M., Belli, S., Bugel, I., Bolm-Audorff, U., Brinton, L.A., Comba, P., Hardell, L., Hayes, R.B., Magnani, C., Merler, E., Preston-Martin, S., Vaughan, T.L., Zheng, W., Boffetta, P. 2002. Sinonasal cancer and occupational exposures: a pooled analysis of 12 case-control studies. *Cancer Causes Control*, 13: 147-157.

- Marsh, G.M., Youk, A.O. 2004. Reevaluation of mortality risks from leukemia in the formaldehyde cohort study of the National Cancer Institute. *Regul Toxicol Pharmacol*, 40: 113-124.
- Marsh, G.M., Youk, A.O. 2005. Reevaluation of mortality risks from nasopharyngeal cancer in the formaldehyde cohort study of the National Cancer Institute. *Regul Toxicol Pharmacol*, 42: 275-283.
- Mayan, O., Lacomblez, M., Pinto, L., Freitas, I., Coelho, J. 1995. Formaldeído: contribuição para o estudo de alguns dos seus efeitos numa população de técnicos de laboratório. *Rev Saude Trab*, 1 (1): 9-51.
- McLaughlin, J. 1994. Formaldehyde and cancer: a critical review. *Int Arch Occup Environ Health*, 66: 295-301.
- Merk, O., Speit, G. 1998. Significance of formaldehyde-induced DNA protein crosslinks for mutagenesis. *Environ Mol Mutagen*, 32: 260-268.
- Monteiro Gil, O., Oliveira, N., Rodrigues, A., Laires, A., Ferreira, T., Limbert, E., Léonard, A., Gerber, G., Rueff, J. 2000. Cytogenetic alterations and oxidative stress in thyroid cancer patients after iodine-131 therapy. *Mutagenesis*, 15 (1): 69-75.
- NIOSH (*National Institute for Occupational Safety and Health*). 1994. FORMALDEHYDE: Method 3500, Issue 2 in NIOSH Manual of Analytical Method, 4th Edition. U.S. Department of Health and Human Services. Cincinnati, Ohio.
- OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*). 2002. SIDS initial assessment profile - Formaldehyde CAS 50-00-0. UNEP Chemicals Publications. Disponível em: <http://incem.org/documents/sids/sids/FORMALDEYDE.pdf>, consultado a 21/02/2010.
- Orsière, T., Sari-Minodier, I., Iarmarcovai, G., Botta, A. 2006. Genotoxic risk assessment of pathology and anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde by use of personal air sampling and analysis of DNA damage in peripheral lymphocytes. *Mutat. Res*, 605: 30-41.
- Pala, M., Ugolini, D., Ceppi, M., Rizzo, F., Maiorana, L., Bolognesi, C., Schilirò, T., Gilli, G., Bigatti, P., Bono, R., Vecchio, D. 2008. Occupational exposure to formaldehyde and biological monitoring of Research Institute workers. *Cancer Detect Prev*, 32: 121-126.
- Parry, E., Parry, J. 1995. *In vitro* cytogenetics and aneuploidy. In: *Environmental mutagenesis*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, 121-140.

- Partanen, T. 1993. Formaldehyde exposure and respiratory cancer: a meta-analysis of the epidemiologic evidence. *Scand J Work Environ Health*, 19: 8-15.
- Perera, F.P., Weinstein, I.B. 2000. Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis* 21(3): 517-24.
- Pinkerton, L.E., Hein, M.J., Stayner, L.T. 2004. Mortality among a cohort of garment workers exposed to formaldehyde: an update. *Occup Environ Med*, 61: 193-200.
- Prista, J., Uva, A. 2003. Exposição profissional a agentes químicos: os indicadores biológicos na vigilância de saúde dos trabalhadores. *Saude Trab*, 4: 5-12.
- Prista, J., Uva, A. S. 2006. A utilização de indicadores biológicos em Saúde Ocupacional. *Rev Port Saude Publica*, 6: 45-54.
- Rooney, D.E., Czepulkowski, B.H. 1996. Human Chromosome Preparation: essential techniques. Wiley, Canada, 154.
- Rueff, J., Gaspar, J., Kranendonk, M. 2002. DNA polymorphisms as modulators of genotoxicity and cancer. *J. Biol. Chem*, 383 (6): 923-32.
- Schmid, O., Speit, G. 2007. Genotoxic effects induced by formaldehyde in human blood and implications for the interpretation of biomonitoring studies. *Mutagenesis*, 22 (1): 69-74.
- Schulte, A., Bernauer, U., Madle, S., Mielke, H., Herbst, U., Richter-Reichhelm, H-B., Appel, K-E., Gundert-Remy, U. 2006. Assessment of the carcinogenicity of formaldehyde (CAS No. 50-00-0). Berlin, Germany, 156.
- Shaham, J., Bomstein, Y., Meltzer, A., Ribak, J. 1997. DNA-protein crosslinks and sister chromatid exchanges as biomarkers of exposure to formaldehyde. *Int J Occup Environ Health*, 3: 95-104.
- Shaham, J., Gurvich, R., Kaufman, Z. 2002. Sister chromatid exchange in pathology staff occupationally exposed to formaldehyde. *Mutat Res*, 514: 115-123.
- Silbergeld, E.K. 2001. Toxicologia, herramientas y enfoques. In: *enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*.
- Stone, R.A., Youk, A.O., Marsh, G.M., Buchanich, J.M., McHenry, M.B., Smith, T.J. 2001. Historical cohort study of US man-made vitreous fiber production workers: IV. Quantitative exposure-response analysis of the nested case-control study of respiratory system cancer. *J Occup Environ Med*, 43. 779-792.

- Surrallés, J., Falck, G., Norppa, H. 1996. In vivo cytogenetic damage revealed by FISH analysis of micronuclei in uncultured human T lymphocytes. *Cytogenet Cell Genet*, 75: 151-154.
- Suruda, A., Schulte, P., Boeniger, M., Hayes, R.B., Livingston, G.K., Steenland, K. 1993. Cytogenetic effects of formaldehyde exposure in students of mortuary science. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2: 453-460.
- Tang, X., Bai, Y., Duong, A., Smith, M., Li, L., Zhang, L. 2009. Formaldehyde in China: Production, consumption, exposure levels, and health effects. *Environ Int*, 35: 1210–1224.
- Teixeira, J.P., Gaspar, J., Silva, S., Torres, J., Silva, S., Azevedo, M., Neves, P., Laffon, B., Mendez, J., Goncalves, C., Mayan, O., Farmer, P., Rueff, J. 2004. Occupational exposure to styrene: modulation of cytogenetic damage and levels of urinary metabolites of styrene by polymorphisms in genes CYP2E1, EPHX1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1. *Toxicology*, 195: 231-42.
- Teixeira, J.P., Silva, S., Torres, J., Gaspar, J., Roach, J., Farmer, P.B., Rueff, J., Mayan, O. 2008. Styrene-oxide N-terminal valine haemoglobin adducts as biomarkers of occupational exposure to styrene. *Int J Hyg Environ Health*, 211 (1-2): 59-62.
- Thorne, P.S. 2001. Occupational Toxicology. In: Klaassen CD, editor. *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. United States of America: McGraw-Hill, 1123-40.
- Timbrell, J.A. 1998. Biomarkers in toxicology. *Toxicology*, 129 (1): 1-12.
- Titenko-Holland, N., Levine, A.J., Smith, M.T., Quintana, P.J., Boeniger, M., Hayes, R., Suruda, A., Schulte, P. 1996. Quantification of epithelial cell micronuclei by fluorescence in situ hybridization (FISH) in mortuary science students exposed to formaldehyde. *Mutat Res*, 20: 237-248.
- Uva, A., Faria, M. 2000. Exposição profissional a substâncias químicas: diagnóstico das situações de risco. *Rev Port Saude Publica*, 18 (1): 5-10.
- Vasudeva, N., Anand, C. 1996. Cytogenetic evaluation of medical students exposed to formaldehyde vapor in the gross anatomy dissection laboratory. *J Am Coll Health*, 44: 177-179.
- Vaughan, T.L., Stewart, P.A., Teschke, K., Lynch, C.F., Swanson, G.M., Lyon, J.L. 2000. Occupational exposure to formaldehyde and wood dust and nasopharyngeal carcinoma. *Occup Environ Med*, 57: 376-384.

- Vodicka, P., Tuimala, J., Stetina, R., Kumar, R., Manini, P., Naccarati, A., Maestri, L., Vodickova, L., Kuricova, M., Järventaus, H., Majvaldova, Z., Hirvonen, A., Imbriani, M., Mutti, A., Migliore, L., Norppa, H., Hemminki, K. 2004. Cytogenetic markers, DNA single-strand breaks, urinary metabolites, and DNA repair rates in styrene-exposed lamination workers. *Environ Health Perspect*, 112 (8).
- Walrath, J., Fraumeni Jr., J.F. 1984. Cancer and other causes of death among embalmers. *Cancer Res*, 44: 4638-4641.
- WHO (*World Health Organization*). 2000. Air Quality Guidelines for Europe, 2nd edition. WHO Regional Publications, European series No. 91, Copenhagen, 273.
- WHO (*World Health Organization*). 2002. Concise International Chemical Assessment Document 40 - Formaldehyde. United Nations Environment Programme, International Labour Organization – Inter Organization Programme for the Sound Management of Chemicals. Geneva.
- Yager, J.W., Cohn, K.L., Spear, R.C., Fisher, J.M., Morse, L. 1986. Sister-chromatid exchanges in lymphocytes of anatomy students exposed to formaldehyde-embalming solution. *Mutat Res*, 174 (2): 135-9.
- Ye, X., Yan, W., Xie, H., Zhao, M., Ying, C. 2005. Cytogenetic analysis of nasal mucosa cells and lymphocytes from high-level long-term formaldehyde exposed workers and low-level short-term exposed waiters. *Mutat Res*, 588: 22–27.
- Ying, C.J., Yan, W.S., Zhao, M.Y., Ye, X.L., Xie, H.S., Yin, Y., Zhu, X.S. 1997. Micronuclei in nasal mucosa and lymphocytes in students exposed to formaldehyde vapor in anatomy class. *Biomed Environ Sci*, 10: 451-455.
- Yu, L.Q., Jiang, S.F., Leng, S.G., He, F.S., Zheng, Y.X. 2005. Early genetic effects on workers occupationally exposed to formaldehyde. *Chinese J Prev Med*, 39 (6): 392-5.
- Zhang, J., Smith, K.R. 2003. Indoor air pollution: a global health concern. *Br Med J*, 68: 209-225.

INSA - Laboratório Toxicologia

Inquérito: Projecto GenFA

CÓDIGO DE IDENTIFICAÇÃO : _____

Amostra recolhida por: _____ Data: ____/____/____

Hora: _____

A) CARACTERIZAÇÃO SÓCIO-DEMOGRÁFICA :

1. Data de Nascimento : ____/____/____ (Idade=_____anos)

2. Sexo: M F

3. Altura: _____ Peso: _____

4. Naturalidade: _____ Localidade onde reside: _____

B) ACTIVIDADE PROFISSIONAL:

5. Actividade profissional: _____

6. Posto de trabalho: _____ 3. Há quanto tempo a exerce: _____

7. Em que consiste: _____

_____8. Usa algum tipo de equipamento de protecção individual? SIM NÃO

8.1 Qual? _____

9. Exerce a sua actividade profissional noutra local : SIM NÃO

9.1 Quantas horas por semana _____

10. Profissões anteriores: _____ Período : _____

C) CARACTERIZAÇÃO DE ESTILO DE VIDA E SAÚDE:

C₁) Hábitos Tabágicos11. É actualmente fumador? SIM NÃO Se é fumador:

Com que idade começou a fumar? ____ anos

Quantos cigarros fuma por dia? _____

INSA - Laboratório Toxicologia

Inquérito: Projecto GenFA

12. Alguma vez fumou? SIM NÃO

Se é ex-fumador: Com que idade começou a fumar? _____ anos
Com que idade deixou de fumar? _____ anos

13. Se é fumador passivo :

Tem contacto regular durante 2 ou mais horas com fumadores?

Em casa SIM NÃO

No trabalho SIM NÃO

No café ou similar SIM NÃO

C₂) Consumo de Álcool

14. Consumo

Que quantidade de álcool consome em média, por dia ? _____

Que tipo de bebida alcoólica bebe habitualmente? _____

15. Não consumo

C₃) Historial Clínico

16. Sofre de alergias respiratórias? SIM NÃO

Se respondeu SIM :

16.1. Só desde que comecei a exercer a minha actual função.....

16.2. Sempre sofri.....

Se sempre sofreu, sente que houve um agravamento desde que começou a exercer a sua actual actividade profissional? SIM NÃO

17. Costuma sentir alguma da sintomatologia seguinte?

17.1. Irritação na garganta.....

17.2. Irritação no nariz.....

17.3. Irritação nos olhos.....

17.4. Aumento do lacrimejar.....

17.5. Outros.....Qual/Quais ? _____

Se assinalou algum sintoma, pode especificar a altura do dia ou da semana em que sente mais? _____

18. No último ano fez algum tipo de Exame radiológico (Raios X) ? SIM NÃO

Qual? _____

19. Nos últimos 2 meses teve algum problema de saúde ? SIM NÃO

Qual? _____

20. No último ano foi submetido(a) a alguma intervenção cirúrgica ? SIM NÃO

Qual? _____

21. Toma algum tipo de medicação? SIM NÃO

Qual/Quais? _____

22. Alguma vez tomou ou toma pílula contraceptiva ou faz terapêutica hormonal de substituição? SIM NÃO

Há quanto tempo? _____

23. Tomou alguma vacina nos últimos 12 meses? SIM NÃO

Qual? _____