

Avaliação dos efeitos respiratórios e genotóxicos / citotóxicos da exposição a produtos resultantes das atividades de tipografia

Tese de Mestrado

Joana Gonçalves Rocha

Mestrado em
Ciências Biomédicas



Avaliação dos efeitos respiratórios e genotóxicos / citotóxicos da exposição a produtos resultantes das atividades de tipografia

Tese de Mestrado

Joana Gonçalves Rocha

Orientadores

Professor Doutor Armindo Rodrigues

Professora Doutora Patrícia Garcia

Tese de Mestrado submetido como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biomédicas



“Não costumo acreditar muito nos sonhos... porque de todos se acorda”

- Florbela Espanca

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço aos meus orientadores Professor Armindo Rodrigues e Professora Patrícia Garcia, pela sua disponibilidade e ajuda prestada na execução deste projeto. Bem como a sua dedicação, interesse e paciência mostrada ao longo deste trabalho. Ao Professor Armindo um especial agradecimento pela ajuda prestada ao longo de toda a etapa experimental e à Professora Patrícia pela ajuda no tratamento de dados a nível estatístico.

A todas as pessoas que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste projeto, em particular Ricardo Camarinho e Paulo Melo.

Ao Senhor José Resendes, sócio-gerente da Nova Gráfica e ao Senhor Aníbal Rocha, gerente da Tipografia Aníbal pela sua disponibilidade e ajuda prestada para a realização deste trabalho. Sem eles este trabalho não seria possível.

Ao Diogo Pavão, que me acompanhou em todos os momentos na realização deste projeto. Por ter estado lá a apoiar, a incentivar e por me ter aberto os olhos e nunca me deixou desistir. A ti devo-te muito, pelos momentos de amizade, de carinho e por toda a confiança que depositaste em mim. Por vezes acreditavas mais em mim do que eu própria. Foste nos momentos mais obscuros uma luz.

Aos meus amigos, os de longe e os de perto, que sempre me foram perguntando pelo trabalho e sempre acreditaram que seria capaz de o realizar com “uma perna às costas”. Às minhas colegas de equipa, aos meus colegas treinadores e às minhas meninas que treino na Associação do Clube Operário Desportivo, por todos os momentos de descontração, pelo apoio mostrado neste trabalho e pela disponibilidade.

Por fim, agradeço à minha família, em particular à minha avó e mãe, pelo apoio mostrado e por todos os sacrifícios que fizeram para que eu pudesse realizar o meu sonho.

A todos um grande Obrigada!

Índice

Resumo	10
Abstract.....	11
Introdução.....	12
Material e Métodos.....	17
Recolha da amostra.....	17
Micronúcleos e Outras Anomalias Nucleares de células do epitélio bucal	17
Critérios da análise de Micronúcleos e Outras Anomalias Nucleares	18
Espirometria.....	18
Análise estatística	19
Resultados.....	20
Discussão.....	24
Referências Bibliográficas.....	27
Anexos.....	33

Índice de Figuras

Figura 1- Fotomicrografias de células do epitélio oral corado com Feulgen. (A) célula com micronúcleo; (B) cariorréxis; (C) binucleação; (D) cariólise. Fotos tiradas no microscópio ótico com uma ampliação 400x (barra de escala =20µm)21

Figura 2- Diagrama de caixas que mostra a distribuição de células com outras anomalias nucleares (ONA) (A) e de células com micronúcleos (B) por 2000 células.....22

Índice de Tabelas

Tabela 1- Descrição da população em estudo (média \pm erro padrão - para variáveis contínuas ou % para variáveis categóricas) 20

Tabela 2- Associação entre a frequência de células com MN e a exposição ao ambiente das tipografias, expresso em Risco Relativo (RR) com um intervalo de confiança de 95%..... 23

Índice de Anexos

Anexo 1- Questionário aplicado aos participantes do estudo	33
Anexo 2- Termo de consentimento informado	35
Anexo 3- Protocolo de Feulgen	36

Lista de Abreviaturas

ADN- Ácido desoxirribonucleico

CI- Intervalo de confiança

CHX- Clorexidina

FEV₁- Volume de ar expirado no primeiro segundo

FVC- Volume de ar expirado forçado

ISO- International Organization for Standardization (Organização Internacional da Normalização)

kPa- Unidade quilopascal

MEF75-25%- Fluxo médio de ar durante os 25% a 75% do teste

MN- Micronúcleo

MNC- Célula com micronúcleo

N/n- Número de amostras

ONA- Outras anomalias nucleares

OMS- Organização Mundial de Saúde

P- p- value

PAHs- Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

RR- Risco Relativo

χ^2 - Qui-quadrado

°C- Grau Celsius

Resumo

O presente estudo foi elaborado com o intuito de avaliar os efeitos respiratórios e genotóxicos da exposição ocupacional a produtos resultantes da atividade de tipografias e determinar o risco associado a esta exposição. Para tal, recorreu-se à espirometria para avaliar a função pulmonar e ao teste dos micronúcleos para determinar o risco de genotoxicidade. Participaram neste estudo 69 indivíduos, dos quais 25 estão ocupacionalmente expostos aos produtos das tipografias (grupo exposto) e 44 indivíduos não estão expostos ao ambiente estudado (grupo não exposto). Todos responderam a um questionário sobre o seu estilo de vida, realizaram o teste da espirometria, mediram a pressão arterial e recolheu-se as células do epitélio bucal. Analisou-se a frequência de células micronucleadas e outras anomalias nucleares (binucleação, cariólise, picnose e cariorréxis) e verificou-se que no grupo exposto a frequência de células micronucleadas foi maior (12.96 MN/2000 células) enquanto que no grupo não exposto foi menor (4MN/2000células). Relativamente às outras anomalias nucleares observou-se uma grande discrepância entre o grupo exposto e o não exposto (218.84 e 51.48 ONA/ 2000 células, respetivamente). Relativamente às variáveis de caracterização, obtidas através dos questionários, não se observaram diferenças significativas entre os dois grupos em estudo ($p \leq 0.05$). Para além disso, o mesmo aconteceu com os resultados do diagnóstico do teste de espirometria (normal, obstrução leve / moderada / severa), onde não se verificaram diferenças significativas entre o grupo exposto e o grupo não exposto. Os resultados deste estudo revelaram que o risco de ter células com MN é 3,2 vezes superior no grupo exposto ao ambiente em estudo do que no grupo não exposto (controlo), mostrando que neste ambiente os produtos resultantes das atividades de impressão são agentes genotóxicos.

Palavras-chaves: Micronúcleos; espirometria; tipografias; COV; Exposição ocupacional; genotoxicidade.

Abstract

The present research has been organized in order to evaluate the respiratory and genotoxic effects of occupational exposure to products resulting from the activity of printers in typographies, and to determine the risk associated to such exposure. To achieve these goals, spirometry was used to evaluate lung function while the micronucleus test was carried to determine the risk of genotoxicity. This study comprised 69 subjects, being 25 individuals occupationally exposed to the products of typographies (group exposed) and 44 individuals non-exposed to the environment studied (group not exposed). Each individual responded to a questionnaire about their lifestyle, performed the spirometry test and measured the blood pressure. Also, the frequency of micronucleated cells and of other nuclear anomalies (binucleated, karyolytic, pyknotic and karyorrhectic) in the oral epithelia of each subject was analyzed. We found that in the exposed group the frequency of micronucleated cells was high (12.96 MN/2000 cells), while in the group non-exposed was significantly lower (4MN/ 2000cells). Concerning the other nuclear anomalies, there was a large discrepancy between the exposed and non-exposed group (218.84 and 51.48 ONA/2000 cells, respectively). Regarding the variables of characterization, obtained by questionnaires, we did not observe significant differences between the two studied groups ($p \leq 0.05$). Similarly, the results of spirometry test (diagnosis of normal, mild, moderate or severe respiratory obstruction) did not reveal significant differences between the exposed and non-exposed group. Results showed that the risk of having cells with MN is 3.2 times higher in the group occupationally exposed than in non-exposed one (control group), revealing that the products of printing are genotoxic agents.

Key-words: Micronuclei; spirometry; typographies; VOC; Occupational exposure; genotoxicity.

Introdução

Um indivíduo passa em média um terço da sua vida no local de trabalho. Assim sendo, este espaço é considerado um grande fator condicionante para a saúde de cada indivíduo (Goud *et al.* 2001). No caso de tipografias, a exposição ocupacional a componentes tóxicos derivados das fotocopiadoras pode causar danos ao nível do genoma nas células somáticas dos trabalhadores (Manikantan *et al.* 2009). As pessoas que trabalham com as fotocopiadoras estão, particularmente, expostas às substâncias que constituem os tinteiros, sendo os seus componentes essencialmente dois: o carbono negro e a resina (Goud *et al.* 2004). No entanto, nestes ambientes também estão presentes os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), estireno, magnetita (Fe_3O_4) e nitropireno (Goud *et al.* 2001). Para além dos componentes dos tinteiros, quando as impressoras estão em funcionamento libertam vários compostos, tais como gases tóxicos (ozono, dióxido de nitrogénio) e compostos orgânicos voláteis (COV), e produzem emissões de baixa frequência eletromagnética (Goud *et al.* 2004).

Estudos prévios revelam que a exposição a alguns componentes dos tinteiros induz efeitos mutagénicos nas células. Por exemplo, o estireno induz anomalias no ADN, tais como transposições de cromátídeos irmãos em linfócitos (Vaghef & Hellman 1998), os PAHs atuam no ADN por oxidação (Popp *et al.* 1997) e o ozono induz anomalias nucleares nas células do epitélio nasal (Garciduenas *et al.* 1997).

Os componentes dos tinteiros das impressoras que mais influenciam a saúde dos trabalhadores são os COV; estes, são compostos orgânicos que possuem alta pressão de vapor sob condições normais, a tal ponto de vaporizarem facilmente e entrarem na atmosfera (Berenjian & Khodiev, 2009). A Organização Mundial de Saúde (OMS) define COV como qualquer composto orgânico cujo ponto de ebulição se situa na gama dos 50-100°C a 240-260°C, o que corresponde a pressões de vapor de saturação superior a 102 kPa a 25 °C (ISO16000- 6, 1989). Uma grande variedade de moléculas à base de carbono, tais como aldeídos, cetonas e outros hidrocarbonetos leves são considerados COV (Berenjian *et al.* 2012). Muitos destes compostos voláteis são tóxicos ou mesmo mortais para os seres humanos e podem ser prejudiciais para o meio ambiente. Vários estudos demonstram que a exposição aos COV induz um aumento significativo na frequência de micronúcleos em células epiteliais bucais (Caselli *et al.* 2009; Sutton *et al.* 2009; Garcia *et al.* 2012) e em células sanguíneas, como os linfócitos (Manikantan *et al.* 2009; Sancini

et al. 2014). O aparecimento de outras anomalias nucleares também está relacionado com a exposição a COV (Goud *et al.* 2004). Para além destes efeitos genotóxicos, outros estudos concluíram que os trabalhadores expostos aos COV são mais suscetíveis a demonstrar fadiga, perda de forças tanto nos braços como nas mãos, dificuldade de concentração, dores de garganta e baixa tolerância ao álcool (Horstman *et al.* 2001). Existem evidências que mostram uma associação entre a exposição ocupacional a COV e os efeitos na saúde humana dos trabalhadores das tipografias (Guo *et al.* 2004), sendo os principais efeitos a nível respiratório, pulmonar, neurológico e de irritação ocular (Caselli *et al.* 2009).

Um biomarcador é considerado pela OMS (1993) como sendo “uma substância, estrutura ou processo que pode ser medido no organismo ou, um produto derivado desta estrutura ou processo que possa influenciar/prever alguma doença”. Também, acrescentam que pode ser considerado “qualquer medida que reflete uma interação entre um sistema biológico e um perigo potencial que pode ser químico, físico ou biológico”. Os biomarcadores desempenham, na verdade, um papel fundamental na pesquisa biomédica e no conhecimento profundo de várias doenças, como por exemplo o cancro (Strimbu & Tavel 2010).

Os micronúcleos (MN) são um dos biomarcadores mais estudados, e a sua análise é feita através de um teste considerado barato e eficaz que permite a avaliação do risco de carcinogénese (Ramirez *et al.* 2002). Quando a frequência de MN é elevada nos linfócitos, indica um aumento do risco de desenvolvimento de cancros gastrointestinais e urogenitais (Bonassi *et al.* 2007) sendo que, a frequência de MN e os polimorfismos nucleares ajudam a entender o quão maligna pode ser a neoplasia (Mahimkar *et al.* 2010). A mucosa oral fornece uma barreira a potenciais agentes genotóxicos que podem ser metabolizados para gerar diversos produtos reativos (Spivack *et al.* 2004). Como até 90% de todos os cancros são de origem epitelial, a aplicação do teste dos MN pode ser utilizada para monitorizar acontecimentos genotóxicos precoces. Para a análise dos estilos de vida no quotidiano (tabaco, álcool), um método não-invasivo e já estudado, é a exfoliação de células bucais, sendo este muitas vezes associado à utilização de MN como biomarcadores (Holland *et al.* 2008).

As células com MN são caracterizadas pela presença de um ou mais pequenos núcleos perto do núcleo principal. Estes podem ser redondos ou ovais, com a mesma textura e mesma intensidade da coloração do núcleo principal, possuem de diâmetro 1/3

a 1/6 do núcleo principal, não existindo nenhum tipo de ligação com o núcleo principal (Bolognesi *et al.* 2013). Um indivíduo que não esteja exposto a nenhum tipo de agente genotóxico apresenta, normalmente, entre 0,50-2,5 células com MN por 1000 células (Bonassi *et al.* 2011). A formação de células micronucleadas ocorre na telófase, aquando da formação da membrana nuclear, pois por vezes há cromossomas inteiros, ou pequenas partes destes, que não atingem os polos durante a divisão celular, ficando estes fragmentos fora do núcleo principal (Krisch-Volders *et al.* 2011; Norppa & Falck 2003). Outro modo de formação de células com MN pode ser numa falha do fuso mitótico, levando ao não emparelhamento dos centrómeros aos microtúbulos. Isto fará com que o centrómero não passe para a próxima fase da divisão celular (anáfase) e, conseqüentemente, para a telófase (Mateuca *et al.* 2006).

Para além dos MN existem outros tipos de anomalias nucleares (ONA), como por exemplo, células com a cromatina condensada, cariorréxis, cariólise, picnose, células binucleadas e com pontes nucleares (Thomas *et al.* 2009). As células com a cromatina condensada possuem um núcleo com um padrão estriado devido à agregação da cromatina, que está intensamente corada. Esta cromatina tem pouca ou nenhuma atividade e é associada ao processo de apoptose (Thomas *et al.* 2009). Nas células com cariorréxis também ocorre a agregação da cromatina, só que em extensões maiores, havendo um padrão corado mais intenso que o das células anteriores. Esta anomalia indica-nos que a célula já está num estado avançado da apoptose (Majno & Joris 1995). Outra anomalia nuclear é a cariólise, onde o núcleo está desprovido de ADN, contendo apenas proteínas nucleares, pois como esta célula não possui material genético não é “corado” com a técnica de Feulgen (Bolognesi *et al.* 2013). Este tipo de células indica-nos os últimos estádios da apoptose ou necrose (Majno & Joris 1995). As células picnóticas possuem um núcleo reduzido e intensamente corado, apresentando uma condensação da cromatina irreversível. O núcleo, como já foi referido, é reduzido e condensado, apresentando um diâmetro de cerca de 1/3 de um núcleo de uma célula viável (Bolognesi *et al.* 2013). O seu significado biológico ainda não está totalmente desvendado, no entanto sabe-se que está diretamente relacionado com as células com a cromatina condensada e com cariorréxis, ou seja, as células picnóticas estão também num processo de apoptose (Bolognesi *et al.* 2013). Nas células binucleadas, há dois núcleos com o mesmo tamanho e corados com a mesma intensidade dentro da mesma célula, pois ocorre uma falha numa das fases da divisão celular, a cariocinese, mais concretamente

um defeito na formação do fuso acromático (Shi & King 2005), originado uma segregação anómala dos cromossomas (Bolognesi *et al.* 2013). Por último, as células com pontes nucleares (NBUD) caracterizam-se por conterem corpos nucleares ligados ao núcleo por uma ponte nucleoplasmática, os quais possuem a mesma textura e a intensidade da coloração que o núcleo. Normalmente, as NUBD apresentam 1/3 do diâmetro do núcleo, mas por vezes podem ser do mesmo tamanho sendo então estas anomalias designadas de “broken egg” (Bolognesi *et al.* 2013).

O teste histoquímico utilizado neste estudo foi a reação de Feulgen. Neste teste, inicialmente trata-se a célula com ácido clorídrico, para remover as bases de purina do ADN, ficando expostos os aldeídos do açúcar desoxirribose. De seguida, a amostra é imersa no reagente de Schiff, que depois se liga aos aldeídos e forma a cor avermelhada. Este tipo de teste é o mais utilizado para estudar as anomalias nucleares acima referidas (Kumar *et al.* 2016).

Considerando que a composição do ambiente a que os indivíduos do presente estudo estão expostos deverá ter algum efeito na função pulmonar, criou-se a necessidade de avaliar a mesma, recorrendo ao teste de espirometria (Backman *et al.* 2015). A espirometria é o teste mais utilizado na avaliação da função pulmonar e consiste na medição do fluxo de ar, utilizando um espirómetro, podendo avaliar e/ou diagnosticar várias doenças pulmonares (Gold & Koth 2015). Depois de realizar o teste, o equipamento dá-nos os valores dos parâmetros, sendo os mais relevantes: o volume de ar expirado forçado (FVC); o volume de ar expirado no primeiro segundo (FEV_1), este parâmetro pode ser importante para conseguirmos determinar quanto tempo demora a esvaziar os pulmões cheios de ar; um índice de limitação de fluxo de ar (FEV_1/FVC); e MEF75-25% que é o fluxo médio de ar durante os 25% a 75% do teste. Dependendo do aparelho utilizado podem ser disponibilizados também, outros tipos de parâmetros (Johns & Pierce 2007). Os valores obtidos no teste de espirometria, têm em consideração as características do indivíduo, como a idade, altura, etnia e género, e os resultados obtidos são expressos em percentagem (Gold & Kalt, 2015), sendo que estas variáveis individuais podem alterar os valores do teste de espirometria. Tendo em conta o género, os indivíduos masculinos apresentam os valores de FVC, FEV_1 e MEF25%-75% mais elevados do que os indivíduos femininos (Johns & Pierce 2007), devido ao menor volume dos pulmões destes últimos (American, 1995); em relação à idade, os valores de FVC, FEV_1 e MEF25%-75% aumentam até aos 20 anos no sexo feminino e até aos 25 anos no sexo masculino, sendo

que depois diminuem gradualmente (Johns & Pierce 2007); relativamente à altura, todos os índices aumentam com a altura, menos o FEV₁/FVC; por fim a etnia, - os caucasianos têm o maior FEV₁ e FVC de todos os grupos étnicos, os polinésios são os que apresentam os valores mais baixos (Johns & Pierce 2007). Quando aplicado o teste de espirometria, o seu modo de aplicação no indivíduo tem que ser rigoroso (Backman *et al.* 2015).

O presente estudo tem como objetivo avaliar se os poluentes produzidos na atividade de tipografia/gráfica estão associados ao aumento de MN e de outras anomalias nucleares nas células do epitélio bucal dos trabalhadores (exposição ocupacional) e, para além disso, se influenciam os parâmetros do funcionamento pulmonar dos mesmos, através de testes de espirometria. Este trabalho tem um carácter interessante e com inovação, pois apesar de já haver vários estudos que comprovam que este tipo de poluentes apresenta riscos para a saúde humana (Balakrishnan & Das, 2010; Manikantan *et al.* 2009), ainda não existem estudos que esclareçam a utilidade do uso das anomalias nucleares das células do epitélio bucal como biomarcadores de efeito neste tipo de exposição ocupacional.