

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Avaliação dos níveis de genotoxicidade e estresse oxidativo em  
manipuladores de quimioterápicos em serviços de oncologia**

**FERNANDA ROMBALDI RANDON**

**2006**

**FERNANDA ROMBALDI RANDON**

**Avaliação dos níveis de genotoxicidade e estresse oxidativo em manipuladores de quimioterápicos em serviços de oncologia**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.**

**Orientador: Prof Dr Bernardo Erdtmann**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jenifer Saffi**

**Caxias do Sul**

**2006**

**FERNANDA ROMBALDI RANDON**

**Avaliação dos níveis de genotoxicidade e estresse oxidativo em manipuladores de quimioterápicos em serviços de oncologia**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, nível Mestrado, visando a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.  
Orientador: Prof Dr Bernardo Erdtmann  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jenifer Saffi**

**Dissertação aprovada em 22 de novembro de 2006.**

---

**Orientador: Prof Dr Bernardo Erdtmann**

---

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jenifer Saffi**

---

**Dra. Vanina Dalstroem. Heuser**

---

**Dr. Diego Bonatto**

---

**Dr. Sharbel Weidmer Maluf**

**Dedico esse trabalho aos meus pais Raul e Ione pelos ensinamentos ao longo da vida; a minha irmã Cláudia e meu irmão Roberto pelo carinhoso incentivo; e ao meu amado esposo Flávio pelo amor e apoio incondicionais durante esta caminhada.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para o sucesso desse trabalho, especialmente:

Ao Prof. Dr. Bernardo Erdtammn, pela orientação, confiança e amizade;

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jenifer Saffi, pela co-orientação, amizade, e pelo incentivo para que eu seguisse na pesquisa experimental;

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mirian Salvador, pela colaboração, incentivo e amizade;

À CAPES, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia a à Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade de Caxias do Sul;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia desta Universidade, especialmente ao coordenador do Curso, Prof. Dr. Aldo Dillon;

Aos funcionários do INBI/UCS, especialmente à Claudia B. Marques, pela paciência e amizade e aos colegas do Laboratório de Genética Toxicológica e do Laboratório de Estresse Oxidativo;

Às bolsistas de iniciação científica, especialmente à Carina Cassini.

Às colegas do laboratório de Genética Toxicológica, em especial a Diana Bordin;

A amiga Ana Cristina pelo carinho, atenção e amizade.

As amigas Julia, Leni e Luciana pela ajuda nas coletas das amostras.

A Deus, por ter iluminado meus passos até aqui.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>3.7 Analysis of serum TBARS (Tiobarbituric acid reactive substances).....</b>	<b>31</b>
3.9 Statistical Analysis.....	32
<b>Exposed.....</b>	<b>44</b>
<b>Control.....</b>	<b>44</b>







## **LISTA DE FIGURAS**

## RESUMO

Vinte farmacêuticos e enfermeiros que manipulam quimioterápicos foram monitorados durante uma semana de trabalho, tendo sido coletadas seis amostras de sangue, de segunda-feira, pela manhã e a tarde, e de terça a sexta-feira a tarde. Foi avaliada a genotoxicidade através do ensaio cometa, e o estresse oxidativo através dos produtos da reação do ácidotiobarbitúrico (TBARS) e das enzimas superóxido dismutase (Sod) e catalase (Cat). Foi realizado também o teste de micronúcleos em linfócitos, mas apenas em uma amostra. Os indivíduos expostos apresentaram um aumento no dano ao DNA pelo teste cometa em relação aos controles. Os resultados do ensaio cometa mostraram uma correlação positiva com os dias da semana e com o consumo de álcool. A frequência de MN foi significativamente elevada nos expostos e apresentou uma significativa correlação com idade e tempo de serviço (anos). Nos parâmetros de estresse oxidativo, apenas a catalase apresentou aumento significativo no grupo exposto, considerando-se a média de todas as amostras. Porém, o TBARS apresentou um resultado interessante, considerando-se os diferentes dias de amostra; os expostos apresentaram uma correlação significativa com os dias da semana e o resultado mais elevado na sexta-feira em relação ao controle e a si próprio, na segunda-feira de manhã. O monitoramento de profissionais em risco de forma mais prolongada, como neste estudo durante uma semana, pode apresentar novos aspectos do comportamento de risco, cujos resultados podem complementar o controle do risco de genotoxicidade. Este estudo mostra que, é interessante também, avaliar o estresse oxidativo nesses trabalhadores, já que ambos os fatores de risco são frequentemente resultantes dos mesmos agentes.

## **ABSTRACT**

Twenty pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs in a hospital were monitored during a working week by six blood samplings, from Monday to Friday, in the morning (only on Monday) and afternoon (all days). Genotoxicity was analysed by comet assay and Micronucleus test (MN) and oxidative stress was analyzed in serum by thiobarbituric acid reaction substances (TBARS) and measurements of the antioxidants enzymes superoxide dismutase (Sod) and catalase (Cat). The exposed workers have presented an increase in DNA damage levels by comet assay in relation to the controls. The comet assay results have also shown significant positive correlation with the day of the week and alcohol consumption. The MN frequency was significantly higher in the exposed workers, and presented significant correlation with age and working time. In the oxidative stress parameters, only catalase presented a significant increase in the exposed group, considering all the samplings. However, TBARS data presented a interesting results, considering the different sampling times; the exposed group presented a significant correlation with the working days, and significant higher results on Friday in relation to the controls and to the Monday morning it self. Monitoring occupational risk during a longer time, e.g., during a working week as it was done in this study, presents more aspects of the risk behavior, which can improve the risk management. This work than demonstrates that in genotoxic risk assessment it is also interesting to evaluate the oxidative stress, once both often result of the same factors.



## 1. INTRODUÇÃO

No decorrer da vida, o DNA sofre alterações denominadas de mutações, que podem ser causadas por erros durante a replicação do DNA na divisão celular. O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies.

A espécie humana tem atravessado sua evolução sendo exposta a uma infinidade de agentes genotóxicos, principalmente pelos agentes ambientais e modernamente também pelos de origem antropogênica. Hoje em dia, o enfoque sobre o problema relativo a danos de saúde por exposição química está dirigido àqueles produzidos e/ou concentrados e que são de uso intensivo pelo homem. A exposição a agentes genotóxicos em nosso ambiente, pode causar uma variedade de efeitos sobre a saúde humana, principalmente por seus efeitos serem cumulativos, e se somarem ao longo da idade.

É crescente a preocupação sobre o efeito mutagênico e carcinogênico de agentes genotóxicos em populações expostas ocupacionalmente, acidentalmente ou por estilo de vida. Estimativas indicam que a exposição ocupacional é a causa de 4% de todos os tipos de câncer em humanos. Trabalhadores de diferentes áreas ocupacionais estão potencialmente expostos tanto em células somáticas como em células germinativas. Essas substâncias podem ocasionar alterações em genes, como os proto-oncogenes e genes supressores tumorais, os quais levam ao desenvolvimento de tumores em órgãos específicos.

Na rotina de um hospital, vários agentes mutagênicos e carcinogênicos são utilizados para manutenção, diagnóstico ou tratamento. Para os pacientes, o benefício é óbvio, porém,

para os profissionais que estão continuamente expostos a estes agentes, os riscos devem ser avaliados.

Dentre os diferentes agentes de risco ocupacional destacam-se as drogas anti-câncer. Os antineoplásicos constituem um grupo heterogêneo de agentes químicos, que inibem o crescimento do tumor, interrompendo a divisão celular e, conseqüentemente, promovendo a morte destas. Muitos agentes antineoplásicos usados no tratamento do câncer mostraram-se mutagênicos e carcinogênicos, em testes laboratoriais realizados em animais.

Alguns dos mecanismos envolvidos com a toxicidade de várias drogas utilizadas no tratamento do câncer estão relacionados a danos oxidativos. Por exemplo, a cisplatina e a doxorubicina, quimioterápicos amplamente utilizado na prática médica, interagem com os lipídeos e afetam enzimas. Este mecanismo foi evidenciado pela inibição da síntese de proteínas, tendo como conseqüência o prejuízo celular do aumento da peroxidação lipídica em rins e fígado de ratos.

Descuidos na manipulação destas drogas podem causar sintomas como náusea, dor de cabeça, vertigens e queda de cabelo entre os profissionais que preparam e administram drogas antineoplásicas. Também a toxicidade hepática foi observada em enfermeiros que, por longo período, estiveram em contato com agentes citostáticos.

Diversos métodos de monitoramento da exposição ocupacional para profissionais que trabalham com quimioterápicos estão sendo desenvolvidos e validados. Métodos como a determinação de mutágenos e tioésteres na urina; métodos citogenéticos, como a análise de aberrações cromossômicas, além da análise da freqüência de trocas de cromátides irmãs; teste de micronúcleos em linfócitos de sangue periférico e o ensaio cometa estão sendo utilizados freqüentemente.

Em vista disso, neste trabalho, foi estudado o risco ocupacional dos profissionais que manipulam drogas antineoplásicas em hospitais e clínicas da cidade de Caxias do Sul, através

da avaliação de marcadores séricos de estresse oxidativo e da determinação da genotoxicidade em linfócitos do sangue periférico.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Avaliação da genotoxicidade**

Na medida em que algumas das causas históricas da mortalidade foram sendo controladas, como as doenças infecto-contagiosas, os especialistas em saúde tem se interessado em fatores de risco que no passado mereciam pouca ou nenhuma atenção (Maluf & Erdtmann, 2003).

A nova área de pesquisa molecular epidemiológica envolve técnicas sofisticadas e métodos sensíveis de análise laboratorial com métodos epidemiológicos analíticos. A epidemiologia molecular faz ponte com a pesquisa da biologia molecular e os estudos do câncer em humanos. Esta ligação resulta da combinação de medidas laboratoriais de doses internas, doses biologicamente efetivas, e efeitos biológicos, juntamente com a influência da susceptibilidade individual (Srám & Binková, 2000).

A espécie humana tem atravessado sua evolução, sendo exposta a uma infinidade de agentes genotóxicos, quer naturais, como pela ingestão de alimentos e bebidas (contaminantes da dieta), ou resultantes da ação humana, como a fumaça de exaustão dos veículos e radiação para fins diagnósticos ou terapêuticos. Atualmente, o enfoque sobre o problema relativo a danos de saúde por exposição química está dirigido àqueles produzidos e ou concentrados e de uso intensivo pelo homem. Contaminantes atmosféricos depositados no solo e na água participam, também, via ingestão de alimentos e da água, do conjunto de substâncias que podem afetar a saúde humana (Sorsa *et al.*, 1990). A exposição a agentes genotóxicos, em



nosso ambiente, pode causar uma variedade de efeitos sobre a saúde humana. Entre eles, podemos citar a indução do câncer, doenças genéticas nas gerações seguintes e desordens de desenvolvimento (Au, 1991).

O processo carcinogênico desenvolve-se após vários estágios e cada um pode ser influenciado por vários fatores. Dados epidemiológicos, estudos com animais e o uso de técnicas modernas de biologia molecular demonstraram não haver dúvidas sobre a influência de agentes químicos em alguns destes estágios, embora existam muitos outros fatores envolvidos. Muitos dos agentes potencialmente carcinogênicos estão presentes em nossa alimentação e no meio ambiente. Há evidências convincentes de que o sítio de ação destes agentes é o material genético celular, sendo que muitos dos carcinógenos químicos conhecidos atuam pela indução de mutações (Maluf & Erdtmann, 2003). Vários estudos têm demonstrado, tanto em animais como em humanos, que populações expostas a agente mutagênicos ambientais apresentam um incremento de mutações, mesmo em situações de exposições baixas e não detectáveis. Contudo ao se associar o efeito genotóxico com a idade, as populações expostas apresentam uma significativa correlação, enquanto, nas populações controle, estas correlações são tênues e pouco significantes (Obe *et al.*, 1980; Migliore *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 2000;).

Na década de noventa, houve um aumento do número de pesquisadores preocupados em investigar a exposição ocupacional e ambiental a mutágenos e carcinógenos (Srám & Binková, 2000), embora já, em 1887, houvesse uma preocupação em como monitorar populações usando técnicas citogenéticas (Carrano & Natarajam, 1988). Muitos estudos foram realizados com profissionais expostos ocupacionalmente, como trabalhadores que manipulam fornos de coque que apresentaram alterações hematológicas típicas da ação do benzeno (que é encontrado no Benzole, um subproduto do forno de coque), tendo sido encontrado um aumento significativo de aberrações cromossômicas e uma alta frequência de

deleção cromossômica (Santos-Mello *et al.*, 1992). Em trabalhadores que estão expostos a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) e ao benzopireno, Binková *et al.*, (1998) observaram uma correlação positiva a nível individual entre aductos de DNA e HAP e/ou Benzopireno inalados. Kalina *et al.*, (1998) encontraram uma relação similar no mesmo grupo, analisando aberrações cromossômicas e troca de cromátides irmãs.

Nos trabalhadores da indústria de calçados, Heuser *et.al.* (2005) avaliaram o dano genético nos profissionais expostos à cola a base de solvente (CBS) e a base de água (CBA), encontrando um valor aumentado de concentração de ácido hipúrico nos grupos expostos em relação ao controle, e também diferença significativa entre os grupos com CBS em relação ao com CBA. Embora não tenham encontrado diferença significativa no teste de micronúcleos, pelo teste Cometa, encontrou-se aumento da média do índice de dano entre o grupo exposto a CBS, quando compara ao controle, e ao grupo CBA.

Arbak *et al.*, (2004) estudaram os níveis séricos de antioxidantes e oxidantes em trabalhadores de pedágio expostos ao diesel, observando-se um significativo aumento de MDA (ácido malondialdeído) plasmático, nos níveis de nitrato e nitrito no grupo exposto do que no controle. Foram avaliados também os níveis de vitamina E, e não foi observado diferença entre os grupos. Deng *et al.*, (2005; 2006) investigaram dano genético a profissionais de indústria farmacêutica expostos ao metotrexate (MTX) e a vincristina (VCR), mostrando um aumento da média de micronúcleos nos trabalhadores expostos a estes medicamentos. Foi encontrada ainda diferença significativa no aumento da frequência de mutações para o gene *hprt* (hipoxantina fosforibosil transferase) e para o gene *TCR*.

É crescente a preocupação sobre o possível efeito mutagênico e carcinogênico de agentes genotóxicos em populações expostas ocupacionalmente, acidentalmente ou por estilo de vida (Carrano & Natarajam, 1988). Na rotina de um hospital, vários agentes mutagênicos são utilizados para manutenção, diagnóstico ou tratamento do paciente. Para os pacientes, o

benefício é óbvio, porém para os profissionais que estão continuamente expostos a estes agentes, os riscos devem ser avaliados (Maluf & Erdmann, 2000b).

Doll & Peto (1981), revisando as causas e prevenção do câncer, argumentaram que a proporção de cânceres causados por agentes de risco ocupacional é, provavelmente, baixa quando comparada com a proporção de câncer atribuída ao cigarro, aos componentes da dieta, às infecções e aos carcinógenos naturais, sendo esta visão reforçada por Ames & Gold (2000). No entanto, a justificativa da preocupação da exposição a agentes químicos ambientais é que a exposição adicional representa um aumento na carga mutagênica, e que todo risco em excesso precisa ser identificado e, se possível, minimizado (Ribeiro & Marques, 2003). Um aspecto a ser considerado é que os trabalhadores expostos a um maior risco geralmente exercem atividades essenciais e benéficas na sociedade moderna. Por isto, é necessário que se avaliem bem os possíveis riscos e modos de reduzi-los ou até evitá-los. A tabela 1 relaciona algumas das fontes, em potencial, de exposição humana a agentes mutagênicos.

**Tabela 1.** Fontes de exposição humana a agentes mutagênicos.

<b>Tipo</b>	<b>Exemplos</b>
Endógena	Óxido nítrico Radicais livres
Biológico	Mutágenos originados de infecção crônica por vírus, bactéria ou parasitas.
Dieta	Mutágenos naturais presentes na dieta Mutágenos gerados durante o cozimento dos alimentos Mutágenos gerados no processo de preservação de alimentos
Físicos	Exposição médica – raios-X para diagnóstico e radioterapia Radiação UV
Químicos	Efluentes industriais Emissões por motores de veículos Pesticidas usados na agricultura Produtos petroquímicos Agentes quimioterápicos

Adaptado de Ribeiro e Marques (2003).

Dentre os diferentes agentes de risco ocupacional podem-se citar as drogas anticâncer. As drogas antineoplásicas constituem um grupo heterogêneo de agentes químicos, que inibem o crescimento do tumor, interrompendo a divisão celular e, conseqüentemente, promovendo a morte destas. Muitos dos agentes antineoplásicos utilizados no tratamento do câncer são mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos, em testes laboratoriais realizados em animais (Calabresi & Chabner, 1996). Os agentes anticâncer causam toxicidade em células de mamíferos, efeitos adversos como hematológicos, alopecia, êmese, fadiga, entre outros, podendo, também ter efeitos genotóxicos e induzir o aparecimento de um tumor secundário por atuarem em células normais (Beretta, 1991). Apesar disto, o seu uso, num momento crítico para o paciente, traz vantagens óbvias, contudo podem representar um risco para os trabalhadores que os manipulam continuamente.

A negligência na manipulação destes medicamentos pode ser a causa de muitos sintomas, como náusea, dor de cabeça, vertigens e queda de cabelo, entre os profissionais que preparam e administram antineoplásicos (Calabresi & Chabner, 1996). Também a toxicidade no fígado foi observada em enfermeiros que, por longo período, estavam em contato com agentes citotóxicos (Undeger *et al.*, 1999).

Diversos métodos de monitoramento da exposição ocupacional para profissionais que trabalham com quimioterápicos estão sendo desenvolvidos e validados. Métodos como a determinação de mutágenos e tioéteres na urina; métodos citogenéticos, como a análise de aberrações cromossômicas, além da análise da frequência de trocas de cromátides irmãs e teste de micronúcleos em linfócitos de sangue periféricos, estão sendo utilizados frequentemente (Undeger *et al.*, 1999; Maluf & Erdtmann, 2003). Mais recentemente, o teste cometa que identifica dano ao DNA, por ser simples e rápido, tem sido recomendado e usado para avaliação rotineira de trabalhadores em risco com agentes genotóxicos (Maluf, 2004).

## **2.2 Drogas anticâncer**

Dentre todas as especialidades da medicina interna, a oncologia clínica pode ter exercido o maior impacto na transformação da prática médica nas duas últimas décadas. Este fato pode ser justificado em razão de terem sido identificados tratamentos curativos para várias malignidades, anteriormente fatais, como o câncer testicular, linfomas e leucemias (Calabresi & Chabner, 1996).

Neste mesmo período, os avanços efetuados na quimioterapia do câncer também começaram a fornecer provas de que o controle químico da neoplasia pode tornar-se uma realidade para muitas das suas formas. O que se tem utilizado é a terapia combinada, que consiste em combinações de cirurgia, radioterapia e quimioterapia, buscando erradicar tanto a neoplasia primária quanto suas micrometástases ocultas, antes que se possa detectar a ocorrência de disseminação macroscópica no exame físico ou radiológico (Salmon & Sartorelli, 2003).

Os agentes antineoplásicos, também denominados citotóxicos, como uma classe, incluem agentes químicos não relacionados que podem inibir o crescimento de tumores, através da inibição do crescimento celular ou pela morte das células que estão crescendo ativamente.

### ***2.2.1 Agentes Alquilantes***

Os agentes alquilantes são compostos eletrofilicos que apresentam afinidade por centros nucleofílicos de macromoléculas orgânicas, sendo muitos deles considerados potenciais carcinógenos (Saffi & Henriques, 2003). Resumidamente, são definidos como compostos eletrofilicos que reagem com o DNA, substituindo um átomo de hidrogênio por um grupo alquila em condições fisiológicas (Cunha & Lehmann, 2003). Esses agentes podem ser mono ou bifuncionais. No primeiro caso, eles possuem um único grupo reativo e, portanto,

interagem com um único centro nucleofílico no DNA. São exemplos destes compostos o metil metano sulfonato (MMS), o etil metano sulfonato (EMS), dimetilnitrosoamina, N-metil-N-nitrosouréia, N-etil-N-nitrosouréia, mustarda nitrogenada (HN1) e N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG). Os agentes bifuncionais apresentam dois grupamentos reativos e cada molécula é potencialmente capaz de reagir com dois sítios no DNA. São exemplos destes compostos as mustardas nitrogenadas bifuncionais (HN2), cisplatina e 1, 2, 7, 8-diepoxioctano (DEO) (Saffi & Henriques, 2003).

Os principais agentes alquilantes clinicamente úteis possuem uma estrutura que contém bis-(cloroetil) aminas, etilenilamina, ou nitrosouréias. Por exemplo:

- As mustardas nitrogenadas: ciclofosfamida, isofosfamida, melfalan, clorambucil;
- Etileniminas e Etilmelaminas: hexametilmelanina e tioepa;
- Nitrosuréias: carmustina, lomustina, semustina;
- Triazenos: dacarbazina (DTIC)

Os agentes alquilantes como classe exercem seus efeitos citotóxicos, através da transferência de seus grupos alquila para vários componentes celulares. A alquilação do DNA no interior do núcleo provavelmente representa a principal interação que leva a morte celular. Além da alquilação, existe um mecanismo secundário para as nitrosuréias, que envolve a carbamilação de radicais de lisina de proteínas, através da formação de isocianatos (Calabresi & Chabner, 1996; Salmon & Sartorelli, 2003).

### ***2.2.2 Antimetabólitos***

O desenvolvimento de fármacos com ações sobre o metabolismo intermediário das células em proliferação foi importante, tanto do ponto de vista clínico quanto conceitual. As células neoplásicas possuem várias diferenças metabólicas quantitativas em comparação com

as células normais, tornando-as mais sensíveis a diversos antimetabólitos ou análogos estruturais (Calabresi & Chabner, 1996, Salmon & Sartorelli, 2003). O conjunto de quimioterápicos agrupados sob o nome de antimetabólitos inclui compostos de uso clínico que apresentam diferentes mecanismos de ação responsáveis pela sua citotoxicidade, agentes que interferem com a síntese de novo de precursores de DNA e RNA, inibidores da síntese de DNA e compostos que alteram o padrão da metilação do DNA. São exemplos deste grupo:

- Análogos do Ácido Fólico: metotrexate (MTX);
- Análogos de Pirimidinas: 5-Fluorouracil (5-FU), citarabina (ARA-C), gencitabina, capecitabina;
- Análogos de purinas: mercaptopurina, fludarabina, cladribina.

### **2.2.3 Produtos Naturais**

*a) Alcalóides da Pervinca: vincristina (VCR), vinorelbina, vimblastina (VBL).*

No que se refere aos inibidores da polimerização dos microtúbulos, os alcalóides da vinca destacam-se como quimioterápicos clinicamente usados a mais de 30 anos (VCR e VBL). Recentemente, um novo análogo semi-sintético da VBL, a vinorelbina, tem demonstrado alta eficiência como quimioterápico (Cunha & Lehmann, 2003). São agentes específicos do ciclo celular, cujo mecanismo de ação é bloquear a célula em mitose. As atividades biológicas destas drogas são explicadas pela sua capacidade de se ligar especificamente a tubulina e bloquear a capacidade de se polimerizar em microtúbulos, parando a mitose, com dissolução do fuso mitótico e interferência na segregação dos cromossomos, ocasionando então a morte celular (Calabresi & Chabner, 1996; Salmon & Sartorelli, 2003).

*b) Taxanos: paclitaxel e docetaxel*

O paclitaxel e o docetaxel são fármacos que atuam como veneno do fuso mitótico, aumentando a polimerização da tubulina. Diferentemente dos quimioterápicos alcalóides da vinca, estes agentes antimetabólicos (taxol e docetaxel) estimulam a polimerização dos microtúbulos, ao se combinarem dímeros  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina. Esta ligação sítio-específica parece antagonizar a desagregação desta proteína-chave citoesquelética, com conseqüente formação de microtúbulos estáveis e anormais, bloqueando a progressão das células em fase G2 e M do ciclo celular (Calabresi & Chabner, 1996; Cunha & Lehmann, 2003; Salmon & Sartorelli, 2003).

*c) Podofilotoxinas: etoposide (VP-16) e tenoposide*

O etoposide e o tenoposide são muito semelhantes na sua estrutura química, na sua ação clínica e no bloqueio das células na fase S-G2 final do ciclo celular. O modo de ação envolve a inibição da topoisomerase-II, que resulta na lesão do DNA, através das quebras dos filamentos, induzidas pela formação de um complexo ternário do fármaco, do DNA e da enzima (Calabresi & Chabner, 1996; Salmon & Sartorelli, 2003).

*d) Camptotecinas: topotecano e irinotecano*

O topotecano e o irinotecano são produtos naturais que interferem na atividade da topoisomerase I, enzima responsável pela quebra e religação de filamentos simples de DNA, que resulta em lesões do DNA (Calabresi & Chabner, 1996; Salmon & Sartorelli, 2003).

#### **2.2.4 Antibióticos**

*Antraciclina: doxorubicina (ADR), daunorrubicina, idarrubicina.*

A doxorubicina, daunorrubicina e idarrubicina estão entre os mais importantes agentes anti-tumorais. São produzidos pelo fungo *Streptomyces paucetius* var *caesius*, sendo a idarrubicina um derivado sintético.



Apesar dos mecanismos de ação das antraciclinas ainda serem controversos, podemos considerar como principais meios de ação da droga como sendo: 1) intercalação ao DNA, proporcionando a inibição da síntese de macromoléculas; 2) geração de radical livres, formando um dano ao DNA ou peroxidação lipídica; 3) enovelamento ao DNA e alquilação do mesmo; 4) ligação covalente entre as cadeias de DNA (DNA cross-links); 5) interferência com o enovelamento do DNA ou interferência na separação da fita do DNA e na atividade da helicase; 6) efeito direto na membrana celular; 7) indução de dano ao DNA por inibição da topoisomerase-II (top2); e 8) indução de apoptose por resposta da inibição da top2 (Gewirtz, 1999).

Entretanto, ao contrário da maioria das drogas capazes de se ligar à top2, drogas como a mitoxantrona, etoposido e doxorubicina não matam as células através do bloqueio das funções catalíticas da top2. Na realidade, elas exploram a potencialidade letal da enzima, tornando-a um veneno para a célula, devido ao aumento da concentração dos complexos de clivagem DNA-top2. A ação da drogas torna a top2 uma toxina fisiológica, capaz de criar quebras duplas de DNA no genoma das células expostas e de induzir eventos genotóxicos letais (Cunha & Lehmann, 2003).

Outros antibióticos importantes, que também apresentam atividade genotóxica, são a dactinomicina, a mitomicina e a bleomicina (Calabresi & Chabner, 1996; Salmon & Sartorelli, 2003).

### **2.2.5 Agentes Diversos**

#### *a) Complexo de coordenação de platina: cisplatina (DDP) e carboplatina*

A cisplatina é um antineoplásico amplamente utilizado no tratamento do câncer. Os complexos da platina possuem como alvo terapêutico o DNA e são capazes de se intercalar com o DNA, formando ligações cruzadas intra e interfilamentares (Cisplatina-DNA aductos).

Os derivados de adição de DNA formados pela cisplatina inibem a replicação e transcrição do DNA, levando a quebras, erros de codificação e a apoptose (Turchi, 2006; Salmon & Sartorelli, 2003; Calabresi & Chabner, 1996).

Existem evidências que a nefrotoxicidade associada à cisplatina se deve ao aumento da peroxidação lipídica e ao aumento de radicais livres de oxigênio em rins de ratos, mostrando assim um aumento do estresse oxidativo induzido por este medicamento (Kadikoylu *et al.*, 2004).

#### *b) Hidroxiuréias*

A hidroxiuréia destrói um radical livre, tirosila, que é formado no centro catalítico da enzima ribonucleosídeo-difosfato redutase. A droga é específica para fase S do ciclo celular e faz as células pararem na interface G1-S.

Outras drogas desta classe são a procarbazina e o mitotano (Calabresi & Chabner, 1996).

### **2.3 Dano ao DNA e Ensaio Cometa**

O ensaio cometa *in vivo* tem sido usado largamente como teste de genotoxicidade. As vantagens do teste *in vivo* incluem a aplicabilidade para os mais variados tecidos e/ou especiais tipos de células. Além de ser sensível o bastante para detectar baixos níveis de dano ao DNA, requer um número baixo de células por amostra. Em geral, é um teste de fácil e rápido desenvolvimento, além ter um custo baixo, quando comparado a outros testes citogenéticos (Tice *et al.*, 2000).

O Ensaio Cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas, que podem ser reparadas, e se não reparadas, podem resultar em mutação. Este teste também pode ser utilizado para estudos de reparo de DNA, visto que as lesões detectadas pelo Ensaio Cometa são passíveis de correção; embora impossibilite inferir a fidelidade do processo de

reparo, pode trazer informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada (Contijo & Tice, 2003). Os danos mais facilmente detectados no DNA são quebras (simples ou duplas), danos alcali-lábeis, *crosslinks* e quebras resultantes de reparo por excisão (Singh, *et al.*, 1988; Silva *et al.*, 2000). Este teste apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, uma vez que pode ser utilizado para qualquer tipo de células, desde que individualizadas (de tecido devem ser extraídas células nucleadas não lesadas), sendo necessário apenas um pequeno número das mesmas e de não requerer células em divisão (Hartmann & Speit, 1994).

Existem dois tipos principais de protocolos para este teste: (a) tratamento neutro (pH 7 - 8), que detecta quebras duplas no DNA e *crosslinks*; e (b) tratamento alcalino (pH > 13), que detecta quebras simples e duplas, bem como sítios álcali lábeis e *crosslinks* (DNA-DNA e DNA-Proteína). Neste sentido, danos indiretos ao DNA promovem efeitos como metilação e adutos, que, por serem álquil lábeis, se expressam como quebras simples frente ao tratamento alcalino (Fairbain *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 1988; Silva *et al.*, 2000; Tice *et al.*, 2000).

O dano ao DNA produzido por oxidação é considerado o mais significativo dano oriundo do metabolismo celular. Alguns estudos têm mostrado que o cigarro pode aumentar o dano ao DNA tanto em jovens como em adultos (Piperakis *et al.*, 2003). Singh *et al.*, (1991) mostraram que o dano ao DNA aumenta com o envelhecimento. Além disso, está bem relatado que a frequência de mutações também aumenta com o envelhecimento causado pelo acúmulo de danos e/ou pela diminuição da capacidade de reparo ao DNA (Betti *et al.*, 1994; McCord & Edeas, 2005). Maluf (2004) relata a influência do exercício físico na indução de cometa, porém até o momento nenhum trabalho demonstrou alterações cromossômicas em indivíduos praticantes de exercício físico intenso. Portanto deve-se levar em consideração que o dano ao DNA pode ser induzido por hábitos alimentares e estilo de vida (McCord & Edeas, 2005), mas que não necessariamente, leva a mutação, pois pode ser corrigido.

## 2.4 Teste de Micronúcleos

A detecção de micronúcleos em células humanas se tornou um dos principais testes para monitoramento de populações de risco, pois é um parâmetro das aberrações cromossômicas. No entanto, os micronúcleos somente se formam após divisão nuclear. Para identificar células que se dividiram, Pincu *et al.*, (1984) propuseram uma técnica em que as células cresciam em um meio de cultura contendo 5-bromodeoxyuridine (BrdU), de tal forma que os núcleos divididos eram distinguidos dos não divididos por diferenças na coloração. Porém, BrdU induz a formação de micronúcleos, tornando a técnica imprópria. Essa dificuldade foi superada por Fenech & Morley (1985), com o uso de citocalasina-B para bloquear a citocinese celular. Desta maneira, apenas as células que passam por um ciclo de divisão nuclear (células binucleadas) são consideradas na análise da frequência de micronúcleos (Maluf & Erdtmann, 2003).

A técnica do micronúcleo por bloqueio da citocinese (CBMN citokinesis-block micronucleus technique) é o método preferido para avaliar micronúcleos de cultura celular humana, pois o resultado é restrito a uma divisão celular. Estas células são reconhecidas por ficarem binucleadas após inibição da citocinese pela citocalasina-B (Maluf, 2004).

Os micronúcleos são estruturalmente pequenos núcleos representando o material genético que foi perdido pelo núcleo principal, como consequência de um dano genético que pode ser causado por agentes físicos, químicos ou biológicos, capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo as fibras do fuso (aneugênese), ou que podem induzir a quebra ou perda do cromossomo (clastogênese). Após a separação das cromátides no processo mitótico dois núcleos são reconstituídos, um em cada pólo. A membrana nuclear é refeita ao redor destes dois conjuntos cromossômicos. Mas, se um cromossomo inteiro ou um fragmento cromossômico acêntrico não se integra ao novo núcleo (por não estar unido ao fuso), este

também pode constituir um pequeno núcleo individual, chamado micronúcleo (Tucker & Preston, 1996).

O teste de micronúcleos, portanto, detecta mutagênese cromossômica em eucariotos do tipo clastogênese e aneugênese (Villela *et al.*, 2003). A presença de micronúcleo pode ser tomada como indicação da existência prévia de aberração cromossômica. O micronúcleo aparece pela primeira vez no final da primeira divisão mitótica, após clastogênese ou aneugênese, porém micronúcleos adicionais podem se formar nas divisões seguintes (Maluf & Erdtmann, 2003).

Comparando este método com outros ensaios citogenéticos, há uma série de vantagens de quantificação de micronúcleo, incluindo facilidade e rapidez na análise e o não requerimento de células em metáfase (Tucker & Preston, 1996). Outras vantagens também são descritas por Fenech (1997) como a confiável identificação de células que tenham completado uma única divisão nuclear, sensibilidade, precisão e detecção de outros parâmetros como as pontes dicêntricas.

## **2.5 Radicais livres, espécies reativas e estresse oxidativo**

Radical livre (RL) é definido como uma espécie química (átomo ou molécula) que possui um elétron desemparelhado no seu orbital de valência (Halliwell & Gutteridge, 1999; Halliwell, 2001). Essa situação confere ao radical uma alta reatividade química, especialmente como agente oxidante, pela tendência de adquirir um segundo elétron para estabilizar o seu orbital de valência (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Em nosso organismo são produzidos radicais livres de carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio (Tabela 2), mas o que ganha mais destaque, devido à reatividade e aos danos que podem causar, são os radicais derivados do oxigênio. O termo espécies reativas do oxigênio (ERO) é um termo coletivo freqüentemente usado para incluir não apenas radicais livres de

oxigênio, mas também alguns não radicais derivados do oxigênio capazes de gerar RL, como por exemplo, o ácido hipocloroso, o peróxido de hidrogênio que é capaz de levar a formação do radical hidroxila, quando em presença de metais, entre outros (Halliwell & Gutteridge, 1999).

**Tabela 2:** Principais espécies reativas do oxigênio, nitrogênio e outras (adaptado de Halliwell & Gutteridge 1999).

<b>Principais Espécies Reativas</b>		
<b><i>Espécies reativas do Oxigênio</i></b>		
Radical superóxido	$O_2^{\cdot -}$	Radical mais abundante nas células, gerado por reações de autooxidação, pela cadeia de transporte de elétrons, enzimas como a xantina oxidase e células fagocitárias.
Peróxido de hidrogênio (não-radicalar)	$H_2O_2$	Gerado principalmente na matriz mitocondrial durante o processo de redução do $O_2$ a $H_2O$ .
Radical hidroxila	$OH^{\cdot}$	É extremamente reativo, podendo lesar DNA, proteínas, carboidratos e lipídios. Possui uma meia vida de $7 \times 10^{-4}$ s. A capacidade desse radical em lesar as células é grande visto que o organismo não possui uma defesa específica para esse radical
Oxigênio Singlet (não-radicalar)	$O_2^1$	Pode ser gerado por indução luminosa, reações catalisadas por peroxidases ou por células fagocíticas. Pode lesar o DNA diretamente.
<b><i>Espécies Reativas do Nitrogênio</i></b>		
Oxido Nítrico (radical)	$NO^{\cdot}$	Possui um importante papel no cérebro na vasoregulação e na neurotransmissão. Não possui alta reatividade, porém quando em excesso pode reagir com o $O_2^{\cdot -}$ e formar o radical ONOO $^{\cdot}$ .
Peroxinitrito (não-radicalar)	ONOO $^{\cdot}$	Esse radical pode causar a oxidação e a nitração de lipídios, DNA e resíduos de aminoácidos de proteínas.
<b><i>Outras espécies ou radicais livres</i></b>		
Radicais do Enxofre	$S^{\cdot}$	Os radicais do enxofre são formados quando um grupo tiol (-SH) reage com vários radicais do oxigênio ou com

metais de transição ( $\text{Fe}^{3+}$ ). A homocisteína, por sua vez, é capaz de gerar radicais tióis.

Radicais Lipídicos	$\text{RO}^\bullet$ , $\text{ROO}^\bullet$	O radical alcóxil ( $\text{RO}^\bullet$ ) e peróxil ( $\text{ROO}^\bullet$ ) possuem reatividade intermediária. O $\text{ROO}^\bullet$ pode dar início a reações em cadeias de RL.
--------------------	-----------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

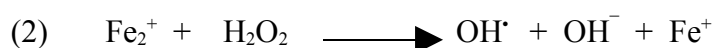
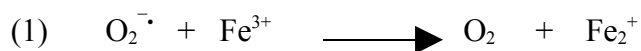
---

<sup>c</sup>Utiliza-se o símbolo R para representar de modo geral qualquer grupo alquila.

As ERO e outros RL podem ser produzidos por fontes endógenas ou exógenas. As principais fontes endógenas são a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, a degradação de ácidos graxos nos peroxissomos, os mecanismos de detoxificação mediados pelo complexo enzimático citocromo P-450, o processo de fagocitose e a oxidação de pequenas moléculas como hidroquinonas, ferredoxinas reduzidas e catecolaminas, entre outras (Salvador *et al.*, 2004; Andreazza *et al.*, 2004).

Já as principais fontes exógenas de formação de RL incluem a exposição a fatores ambientais, como luz ultravioleta, radiação gama, fumo, poluição solventes orgânicos (Mates *et al.*, 2000) e alguns medicamentos, incluindo drogas anti-câncer, anestésicos e analgésicos (paracetamol) (Hug *et al.*, 1997).

Nem todas as EROs podem lesar o DNA diretamente (Halliwell & Gutteridge, 1984). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o  $\text{O}_2^\bullet$  interagem com metais de transição, em particular cobre e ferro, pela reação de Harber-Weiss (1), originando oxigênio e ferro reduzido, o qual catalisa a reação de Fenton (2) formando o radical hidroxila (Halliwell & Gutteridge, 1999).



O radical hidroxila é por sua vez altamente reativo, podendo atacar todas as biomoléculas: carboidratos, lipídeos, proteínas e DNA (Von Sonntag, 1987), tendo mais de 20 produtos diferentes formados a partir de seu ataque às bases do DNA, sendo a maioria deles mutagênicos (Dizdaraglu, 1993; Kuraoka, 2000). Estes produtos incluem citosina glicol, 8-

hidroxiadenina, 8-hidroxi guanina, 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrotimina (Dizdaraglu, 1993; Fujikawa *et al.*, 1998; Kuraoka, 2000; Droge, 2002).

Os RL formam-se em condições fisiológicas em proporções controladas pelos mecanismos defensivos celulares. Entretanto, em situações patológicas, esta produção pode aumentar substancialmente. O estresse oxidativo (EO) é empregado quando há uma diminuição nos níveis de enzimas antioxidantes e/ou uma elevada velocidade de produção de ERO (Pawlak *et al.*, 1998; Beckman & Ames, 1998; Halliwell, 2001). Este processo pode estar relacionado com vários processos fisiológicos e patológicos, como mutagênese, carcinogênese, diabetes mellitus, catarata, doenças degenerativas e envelhecimento, entre outros (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Na presença de ERO, os lipídeos insaturados reagem como o oxigênio para produzir radicais alquila (ROO•) e peroxila (RO•), que se propagam por uma cadeia de radicais livres e formam hidroperóxidos como produtos primários (Fridovich, 1998; Llesuy, 2000; Droge, 2002). Em sistemas biológicos, a peroxidação lipídica ocorre principalmente em membranas, onde o conteúdo de ácidos graxos insaturados é relativamente alto (Adegoke *et al.*, 1998) causando a modificação de estrutura e diminuição da fluidez da membrana celular resultando na alteração das suas propriedades fisiológicas. A destruição da membrana celular causa a perda da função das organelas e pode levar a morte celular e/ou oxidação de lipoproteínas, como a lipoproteína de baixa densidade (LDL), o que pode levar a formação de placa ateromatosa (Abuja & Albertini, 2001; Droge, 2002).

A peroxidação lipídica resulta em uma mistura complexa de compostos de baixo peso molecular, como hidrocarbonetos (etano e pentano) e aldeídos, por exemplo, o malondialdedeído (MDA). *In vitro* o MDA pode lesar proteínas, DNA, RNA e outras biomoléculas (Esterbauer, 1991). A dosagem do MDA, através da reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), é um importante indicativo dos níveis de estresse oxidativo em



indivíduos (Salvador & Henriques, 2004).

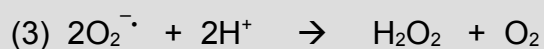
## 2.6 Defesas Antioxidantes

O estresse oxidativo tem seus danos minimizados pelo sistema de defesa antioxidante não enzimático e/ou sistema de defesa antioxidante enzimático. Entre os antioxidantes não enzimáticos estão a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), flavonóides e outras moléculas com  $\beta$ -caroteno, N-acetilcisteína e glutathione (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Os antioxidantes enzimáticos incluem as enzimas superóxido dismutase (Sod), catalase (Cat), glutathione-peroxidase (GPx) e glutathione-redutase (GR) (Bonney *et al.*, 2002).

### 2.6.1 Superóxido Dismutase (Sod)

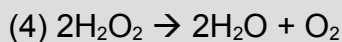
A Sod, uma das mais importantes enzimas antioxidantes, foi descoberta em 1969 por McCord & Fridovich. São metaenzimas abundantes em células aeróbicas, responsáveis pela dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio (Reação 3), que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a Cat e GPx.



Em mamíferos, são três tipos de Sod bioquímica e molecularmente caracterizados (Fridovich, 1998): Sod1 ou SodCuZn foi a primeira a ser caracterizada e é um homodímero de cobre e zinco que se encontra quase que exclusivamente no espaço citoplasmático intracelular. A Sod2 ou SodMn é um tetrâmero que contém manganês em seu sítio ativo encontrada exclusivamente na mitocôndria. E a Sod3 ou ECSod é a mais recente Sod caracterizada, sendo um tetrâmero que contém cobre e zinco e possui um peptídeo sinalizador, que direciona essa enzima exclusivamente para o espaço extracelular (Fridovich, 1998; Zelko *et al.*, 2002).

### 2.6.2 Catalase (Cat)

A enzima catalase é uma ferrilhemoenzima formada por quatro unidades idênticas, sendo que cada monômero contém um grupo prostético heme no centro catalítico cuja função principal é dismutar peróxido de hidrogênio formando água e oxigênio molecular (reação 4) e requer a presença de NADPH para ativar os tetrâmeros da enzima (Ursini *et al.*, 1997; Fridovich, 1998;).



Em animais, a catalase está presente praticamente em todos os órgãos principais do corpo, principalmente fígado. Porém, alguns órgãos, por não possuírem peroxissomos, estão mais expostos a danos provocados pela produção de espécies reativas de oxigênio, como coração, pulmões e cérebro. Nestes órgãos, como mecanismo de defesa, pode ocorrer a difusão de peróxido de hidrogênio para o sangue, onde reage com a Cat eritrocitária (Inoue, 1994).

Em um trabalho prévio e que foram avaliados, pelo ensaio cometa, 12 trabalhadores e 12 controles do Hospital Geral e Clínicas de oncologias de Caxias do Sul-RS, foi detectado que, indivíduos expostos a antineoplásicos, apresentaram índice de dano no DNA maior que os controles, e que este índice na segunda-feira a tarde era superior à sexta-feira (Rombaldi, 2003). Em vista destes resultados, e da literatura científica citada anteriormente, na qual não foi encontrado dado referente ao monitoramento de estresse oxidativo em trabalhadores hospitalares, resolveu-se avaliar o risco ocupacional de genotoxicidade e estresse oxidativo durante uma semana de trabalho em farmacêuticos e enfermeiros que lidavam com produtos antineoplásicos.



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho é avaliar a genotoxicidade e os níveis de estresse oxidativo de profissionais que manipulam medicamentos quimioterápicos em hospitais e clínicas de oncologia da cidade de Caxias do Sul e região, durante uma semana de trabalho, de segunda de manhã antes da jornada de trabalho e após a jornada de trabalho, de segunda-feria a sexta-feira.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Testes de genotoxicidade:

1. Avaliar o dano ao DNA pelo ensaio cometa durante toda semana de trabalho;
2. Caso o teste cometa apresente dados significativamente superiores, verificar se estes dados se expressam em mutações cromossômicas pelo teste de micronúcleos em linfócitos, com apenas uma avaliação;

Estresse oxidativo:

1. Avaliar os níveis de estresse oxidativo através dos produtos de reação do ácido tiobarbitúrico e da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e Catalase.

Correlações:

1. Correlacionar os dados de genotoxicidade com os de estresse oxidativo.
2. Relacionar os resultados obtidos com os procedimentos de segurança na manipulação das drogas, dieta e hábitos de vida.



## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Este capítulo é apresentado na forma de um artigo científico, seguido por discussão complementar.

### **4.1 Artigo 1**

O artigo constante neste ítem, o qual será submetido à revista *Mutation Research*, tem como objetivo principal avaliar o dano ao DNA (Ensaio Cometa e Teste de Micronúcleos) e o nível de estresse oxidativo (TBARS) e atividade das enzimas antioxidantes (Sod e Cat) dos profissionais que manipulam medicamentos quimioterápicos em hospitais e clínicas de oncologia da cidade de Caxias do Sul.



## **Occupational risk assessment of genotoxicity and oxidative stress in workers handling antineoplastic drugs during a workingweek**

FERNANDA ROMBALDI<sup>1</sup>, CARINA CASSINI<sup>1</sup>,  
MIRIAN SALVADOR<sup>1</sup>, JENIFER SAFFI<sup>2</sup>,  
BERNARDO ERDTMANN<sup>1,3\*</sup>

1-Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brasil

2--Laboratório de Genética Toxicológica/ Curso de Farmácia; Universidade Luterana do Brasil (ULBRA),  
Canoas, RS, Brasil

3-Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
Porto Alegre, RS, Brasil

---

**ABSTRACT:** Twenty pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs in a hospital were monitored during a working week by six blood samplings, from Monday to Friday, in the morning (only on Monday) and afternoon (all days). Genotoxicity was analysed by comet assay and Micronucleus test (MN) and oxidative stress was analyzed in serum by thiobarbituric acid reaction substances (TBARS) and measurements of the antioxidants enzymes superoxide dismutase (Sod) and catalase (Cat). The exposed workers have presented an increase in DNA damage levels by comet assay in relation to the controls. The comet assay results have also shown significant positive correlation with the day of the week and alcohol consumption. The MN frequency was significantly higher in the exposed workers, and presented significant correlation with age and working time. In the oxidative stress parameters, only catalase presented a significant increase in the exposed group, considering all the samplings. However, TBARS data presented a interesting results, considering the different sampling times; the exposed group presented a significant correlation with the working days, and significant higher results on Friday in relation to the controls and to the Monday morning it self. Monitoring occupational risk during a longer time, e.g., during a working week as it was done in this study, presents more aspects of the risk behavior, which can improve the risk management. This work than demonstrates that in genotoxic risk assessment it is also interesting to evaluate the oxidative stress, once both often result of the same factors.

---

Keywords: occupational risk, antineoplastic, comet assay, micronucleus test, oxidative stress, catalase, superoxide dismutase.

\* Corresponding adress: Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brasil. Phone: +55-54-3218-2682.e-mail:berdtman@ucs.br



## INTRODUCTION

It is well known that there are a lot of risks for the workers in a hospital, where several genotoxic agents are used, either for maintenance or for diagnosis and treatment of patients. The professionals who are continuously exposed to these agents need to be monitored in order to establish the behavior of the risk for a proper management. A lot of studies have assessed the risk of workers with antineoplastic drugs [1-13]. In personnel occupationally exposed to antineoplastic drugs it was detected an increase in chromosome aberrations [1,3-4], sister chromatid exchanges-SCEs [1,4], micronucleus frequency in lymphocytes [5,7,8,12,13], DNA damages by comet assay [2,6,8,9,11,12,13], high rate of gene mutations [12, 13] and also increased amounts of antineoplastic drugs in urine [10]. All the published studies detected an increase of some endpoint in the workers, but through a better management, the risk could be reduced [8]. So, it is important to establish all the aspects of the risks to make a better management possible. Although the risk of workers handling antineoplastic drugs, is well known, it is interesting to monitor the risk behavior during the working week, or after the resting time. The antineoplastic drugs also induce reactive oxygen species (ROS). The anthracyclines as cyclophosphamides and cisplatin produce hydrogen peroxide, which supposedly induce apoptosis [14-17]. ROS can affect cell function by directly acting on cell components, including lipids, protein and DNA, and destroying the structure [18]. No study of occupational risk of hospital workers with antineoplastic drugs and oxidative stress was found out in the literature. Citogenetic methods have been extensively used for the biological monitoring of populations exposed to mutagenic and carcinogenic agents. And the comet assay is increasingly being used in genotoxicity testing. The advantages of the Comet assay include its demonstrated sensitivity for detecting low levels of DNA damage, the requirement for small numbers of cells per sample, its flexibility, its low costs, its ease of application, and the short time needed to complete a study (TICE 2000). Other method equally indicated to

occupational exposure is the micronucleus test. Micronuclei are acentric fragments or complete chromosomes which fail to attach to the mitotic spindle during cytokinesis, and are excluded from the nuclei. The advantages of this test from other cytogenetics tests are the speed and ease of analysis, and the fact that it does not require metaphase cells. (Tucker, 1996). In previous unpublished evaluation of hospital workers with antineoplastic drugs, more DNA damages were detected on Monday evening to Friday, and in both times the workers presented more damages than the controls. Therefore, in this study, the genotoxicity and oxidative stress parameters were evaluated in hospital workers handling antineoplastic drugs, during all the working week. The workers were sampled from Monday to Friday before (only on Monday) and after (all days) the working journey. The genotoxicity was evaluated by comet assay and micronuclei frequency (MF) in the lymphocytes and oxidative stress parameters were analysed in the serum by TBARS and measurement of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (Sod) and catalase (Cat).

### **3. MATERIALS AND METHODS**

#### **3.1 Subjects**

The exposed group consisted of 20 professional nurses and pharmacists, currently employed in the oncology departments of different hospitals and Oncology clinics in Caxias do Sul and Bento Gonçalves towns in the southern state of Brazil, Rio Grande do Sul. Twenty non-exposed workers from the same hospitals of comparable age, sex, life style - like smoking and alcohol habits were part of the control group.

All individuals in both groups answered a Portuguese version of the personal health questionnaire published by the International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens (ICPEMC) [19]. Workers characteristics of the exposed group such as the use of protective equipment (gloves, masks, gowns, eye glasses,

protective clothes and vertical laminar flow safety hoods) were also investigated. The characteristics of the study groups are presented in Table 1.

### **3.2 Sampling**

The biological samples were obtained in six different moments in five consecutive days (Monday through Friday) by a venipuncture using vacutainers with heparine. The first and second samples were obtained on Monday, in two distinct moments times the first at the beginning and the second at the end of the working journey. The other samples were always taken at the end of the working journey, from Tuesday through Friday. For the control group just one sample was collected in the week.

### **3.3 Comet Assay**

Blood was obtained from each subject by venipuncture using vacutainers with heparine, and refrigerated at between 10° to 20 °C for a maximum 4 hours until it is processed. A standard protocol for Comet Assay preparation and analysis was adopted [20-21]. The slides were prepared by mixing 5µl whole blood with 95 µl of low melting point agarose (0.75%). The mixture (cells/agarose) was added to a fully frosted microscope slide coated with a layer of 300 µl of normal melting agarose (1%). After solidification, the cover slip was gently removed and the slides were placed in lyses solution (2.5M NaCl, 100mM EDTA and 10mM Tris, pH 10.0 – 10.5, with freshly added 1% Triton X-100 and 10% dimethyl sulfoxide [DMSO]) for a minimum of 1hr and a maximum of 7 days. Subsequently, the slides were incubated in freshly made alkaline buffer (300mM NaOH and 1mM EDTA, ph 12.6) for 20min. The DNA was electrophoresed 20min at 25 V (0.90 V/cm) and 300mA, the buffer was neutralized with 0.4 M Tris (pH 7.5). Finally, the DNA was stained with nitrate of silver. The slides were coded for blind analysis.

Negative and positive controls were used for each electrophoresis assay in order to ensure the reliability of the procedure. For a positive control, 50  $\mu$ l of whole blood was mixed with 13  $\mu$ l of methyl methanesulfonate (MMS-M4016 / Sigma, St. Louis, MO, USA) at  $8 \times 10^{-5}$  M final concentration. This mix was incubated for 2 hours at 37°C. The result of each electrophoresis was considered only if the negative and positive controls yielded negative and positive results respectively. Images of 100 randomly selected cells (50 cells from of two replicated slides) were analyzed from each sample. Cells were also scored visually according to tails size into five classes, from no tails (0), to maximally (4), resulting in a single DNA damage score for each subject, and consequently for each study group. Therefore, a group damage index could range from 0 (all cells no tail, 100 cells x 0) to 400 (all cells with maximally long tails, 100 cells x 4) [22-23].

### **3.4 Micronucleus Test**

Blood was obtained from each subject by venipuncture using vacutainers with heparine, and refrigerated at between 10° to 20 °C until it is processed. Lymphocytes cultures were set up by adding 0.3ml of blood to 5 ml of standard culture (Nutricell®, Campinas, SP, Brazil). The flasks were cultured at 37°C. Two cultures per subject were established. At 44 h after initiation of the lymphocyte culture, cytochalasin B (cyt B; Sigma, St.Luis, MO) was added to the concentration of 5 $\mu$ g/ml [24]. At 72 h incubation, the cultures were harvested by centrifugation at 800 r.p.m. for 5 min and fixed in 3:1 methanol:acetic acid without hypotonic treatment and dropped on to clean slides. The staining was made with Giemsa 5%. Two thousand binucleated lymphocytes per individual (1000 cells from each of two replicate slides) were scored for the presence of MN, using a magnification of 200-1000x. The slides were coded to blind analysis.

### **3.5 Superoxide Dismutase activity**

Superoxide dismutase activity was determined by spectrophotometry in serum samples, by measuring the inhibition of the rate of auto-catalytic adrenochrome formation at 480nm, in a reaction medium containing 1mmol/L adrenaline (pH 2.0) and 50 mmol/L glycine (pH 10.2) [25], both from E. Merck. This reaction was conducted at a constant temperature of 30°C during 3 minutes. The enzymatic activity is expressed as superoxide dismutase units per g of protein. One unit is defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of adrenochrome formation in 50%.

### **3.6 Catalase activity**

The assay was performed according to the method described by Aebi, (1984) [26]. The assay principle is based on the determination of the rate of hydrogen peroxide (E. Merck) decomposition at 240 nm. This reaction was conducted at a constant temperature (30°C) for 1 minute. The enzymatic activity is expressed as catalase units per mg of protein. One unit of catalase decomposed 1  $\mu$ mole of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per min at pH 7.4 and 30°C.

### **3.7 Analysis of serum TBARS (Tiobarbituric acid reactive substances)**

Oxidative stress levels were measured spectrophotometrically by concentration of the thiobarbituric acid reactive substances [27]. TBARS results were expressed as nmol/mL.

### **3.8 Total protein**

The total protein levels were analyzed by Biuret method (Total proteins Kit - Labtest Diagnostica S.A., Brazil), for spectrophotometrical determination in 545nm.

### 3.9 Statistical Analysis

Statistical evaluations were performed by using descriptive statistics and Kolmogorov-Smirnov Test (verification of the normality). The *t*-Test was used to compare the mean of groups and analysis of variance (ANOVA) and Tukey post-test was used to multiple comparisons means values during the week. Statistical significance was accepted as  $p \leq 0.05$ . The Pearson correlation was used to verify the interrelation of the data. All tests were performed with the statistical program SPSS 12.0 for Windows.

## 4. RESULTS

The main characteristics of the exposed-workers to antineoplastic drugs and controls are present in Table 1. No significant difference was detected between the two groups. All exposed workers had been continuously involved in the preparation or in the administration of the antineoplastic drugs for a period of 0.6 – 10 years, with a working journey of six hour/day, used protective equipments and all hospitals have vertical laminar flow safety hoods,

The results (mean  $\pm$  standard deviation) of the analyses of all days (from Monday through Friday) of catalase, superoxide dismutase, TBARS, comet assay, besides the micronucleus frequencies in one sample, in both control and exposed groups are presented in Table 2. A significant increase in the DNA damage index, micronucleus and catalase was observed in the exposed workers ( $p=0.000$   $p=0.001$   $p= 0.002$ , respectively) in relation to the controls. The results of TBARS and Superoxide Dismutase were similar in both groups.

### 4.1 Analysis of genotoxicity

The comet assay results showed that the mean damage index (DI) for the exposed group in relation to the controls was significantly higher in all sampling times, except Monday morning ( $p=0.000$  and  $p=0.143$ , respectively, Figure 1a). A significant difference

was also observed among the days, so that Tuesday Wednesday and Thursday was increased in relation to Monday morning ( $p=0.012$   $p=0.006$   $p=0.004$ , respectively). There was also a positive correlation between DNA damage index and sampling days ( $r=0.269$ ,  $p=0.004$ ) and this significance is maintained when a multiple regression is made in order to remove confounding factors as age, alcohol consumption and smoking ( $r=0.353$ .  $p=0.012$ ). The alcohol consumptions has also shown influence on the increasing of DNA damage index ( $r=0.228$ ,  $p=0.014$ ). No significant correlations were obtained between DNA damage index with the parameters Sod, Cat, TBARS and MN.

The micronucleus frequency in binucleated lymphocytes showed a significant difference between exposed ( $4.94 \pm 1.95$ ) and control groups ( $2.88 \pm 0.78$ ;  $p=0.01$ ). A positive correlation was found between MN frequency and age ( $r=0.559$ ,  $p=0.000$ ) and between MN and working time ( $r=0.319$ ,  $p=0.001$ ), and both (age and working time) are also highly correlated ( $r=0.663$ ,  $p=0.000$ ). Through an adjusted correlation, the working time lost the significance, suggesting that the age was the main factor of correlation with micronuclei frequency.

#### **4.2 Behavior of the oxidative parameters during the working week**

The oxidative stress parameters, catalase, superoxide dismutase and TBARS of the exposed group were analyzed in six different moments during five consecutive days from Monday morning, Monday afternoon up to Friday afternoon. Considering the different sampling times, the results are shown in Figures 1b, 1c and 1d, respectively. No significant difference between the control and exposed group for catalase and superoxide dismutase was detected for each sampling, and among different samplings of the exposed group itself within the working days. Differently, the TBARS of exposed group presented an increase of this oxidative parameter between Friday afternoon and control group, and also intra-exposed

group between Friday and Monday morning. A positive correlation can also be seen between the TBARS and the days ( $r=0.369$ ,  $p=0.000$ ), and this significance is maintained ( $r=0.389$ ,  $p=0.002$ ) when the influence of age, alcohol consumption and smoking are considered as confounding factors in a multiple regression. No significant correlations were obtained between TBARS and Sod, Cat, ID and MN.

## **DISCUSSION**

The antineoplastics inhibit the cellular growth or kill the growing cells generally by apoptosis. They can also induce a secondary cancer, but the benefit at the critical moment is unequivocal for the patient. Most published studies about the professionals working with antineoplastic drugs assessed some increasing genotoxicity [1-13]. This data can be an overevaluation, because the negative results are not stimulated to be reported. It is interesting to note in three studies [2,6,9] which included workers without the recommended safety equipment, that these people presented significant higher genotoxicity. The use of appropriate protection or the improvement of the management did show a reduction or elimination of detected genotoxicity in some endpoints analyzed of workers handling antineoplastic drugs, [2,8].

In this study, as in others, already mentioned, the workers use all the individual safety protection, but even so genotoxicity is importante to be assessed. In the studies where different endpoints were used, it is not easy to compare the results. The conventional studies of chromosomal aberrations (CA) seem to be the best detector of genotoxicity, showing an increase in the risk groups from 70% to 260% [1,3,4]; and a higher increase, by the improvement of the CA analysis using FISH (fluorescent in situ hybridization) labeling, only on two chromosomes (pair 1 and 4) it was detected a increase of aberrations at 286% in the workers in relation to the controls [3]. So, the CA analysis seems to be the most sensitive



endpoint to evaluate the genotoxic risk, but it is also very laborious. The widely used endpoints in the analysis of the risk in these professional are the micronucleus test and comet assay, which were also made in this study. The results of literature obtained with the micronucleus test vary from non significant (14%) [8], to highly significant (377%) [13] increasing in the workers in relation to the controls. In the comet assay the results also vary from non significant increase of DNA damage in some parameter (tail moment) [12-13] to highly significant (160%) [8]. It must be noted that the studies which did not detected higher risk in the workers by some endpoint, a major risk by other endpoint was found. In this study the occupational risk was evaluated within a week, so a lot of data was collected but, if the average of all analysis made during the week is taken into account, the MN increase 71 %, which remains in the range of the other studies; and the comet assay increase 204%, which is the highest result.

In this study it was detected a significant positive correlation between DNA damage and the days of continuous working ( $r=0.27$ ;  $p=0.004$ ), the lowest result was observed on Monday morning, before the beginning of the working journey, without significant difference in relation to the control. These results show the importance of the rest intermittently in risk activities, or the reduction of the working journey, as already suggested by others [8].

The result of comet assay was also positively associated with alcohol ingestion in workers ( $r=0.23$ ,  $p=0.01$ ), but in the controls this correlation was not significant ( $r= -0.19$ ,  $p=0.45$ ). The alcohol consumption can induce chromosome aberrations [28], but our sample is too small and without alcoholics to evaluate this aspect. Even so, the exposed group has shown a positive correlation, maybe because the sum of both risk agents (antineoplastic + alcohol) exceeds over the limits of the organic capability in order to repair the damages.

The frequency of micronucleus was evaluated only once, to see if the DNA damage detected in the comet assay also resulted in chromosomal aberrations, once the comet assay detects repairable damages. The increasing chromosome mutations in the workers was confirmed, thus, it can be concluded that the workers are in effective risks, one of which is the cancer, because the correlation of chromosome mutation and cancer is well established [29]. The micronuclei frequency showed positive correlation with the age, what is well established in a lot of studies [28, 30-31], which have shown the correlation of the age and chromosome aberrations. In a small sample as in this study, without extreme ages, it is not expected to find such a correlation. The explanation can be similar to the one presented above, about the correlation between alcohol and DNA damage.

No study is related in the literature concerning the monitoring of oxidative stress in workers handling antineoplastic drugs. However, there is a lot of studies which evaluated the oxidative stress induced by antineoplastics both in vitro and in vivo [15,17,32-40]. The antineoplastic drugs, such as Methotrexate and Vincristine, commonly induce ROS production, which mediate the apoptosis by a mitochondrial controlled pathway with mitochondrial membrane changes [34-38]. In view of what was exposed above, it was expected to find some oxidative stress response in workers with antineoplastic drugs, similarly as the genotoxicity. A study with health professionals exposed to anesthetic gases has shown an increasing lipid peroxidation in relation to the controls, but the antioxidant capacity remained normal [41].

In this study, three parameters of oxidative stress (TBARS, Sod, Cat), were evaluated during the week, on Monday morning after the weekend resting, and from Monday through Friday at the end of the working day. The means of antioxidant enzymes activities showed an increase of Sod and Cat, but only the mean of Cat presented a significant increase in relation to the control. No significant difference was observed in TBARS means between the exposed

and control groups. These results suggest that the antineoplastic drugs induce a modulation in the enzymatic activity of these enzymes, but without alterations of oxidative stress levels. TBARS presented an interesting results, with clearly correlation from Monday morning to Friday ( $r=0.37$ ,  $p=0.000$ ), similarly to the results obtained in the comet assay ( $r=0.27$ ,  $p=0.004$ ). However, there is no correlation between these both parameters ( $r=0.07$ ;  $p=0.48$ ), suggesting that the observed genotoxicity could be induced by others mechanisms not related to oxidative stress.

The main antineoplastic drugs (cyclophosphamide, ifosfamide, cisplatin, oxaliplatin, doxorubicin) handling by the pharmacist and nurses studied in this work, can interact with DNA inducing double and single strand breaks, cross-links, alkylations, DNA intercalations, which could be related, at least, partially, to the observed genotoxicity.

Although the workers handling antineoplastic drugs are using individual protective equipment, which certainly minimized the risks [8], they are not fully protected against them. Maybe a new management of this problem should be taken into account, perhaps by the automation of some parts of the activities that present more risks. In cases where this is not possible, besides the use of protective equipment, a proper natural diet rich in antioxidants and antimutagenics should also be considered. The results presented in this work suggest that in order to improve the occupational risk monitoring, some parameters of oxidative stress, like TBARS, as well as Sod and Cat activities, could also be performed together with the genotoxicity test.

### **Acknowledgements**

The authors express their thanks to all volunteers who participate in this study. This study was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior),

FAPERGS (Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul), and Indústria Mecânica Theodosio Randon Ltda de Caxias do Sul

## REFERENCES

- [1] E.M. Goloni-Bertolo, A.J. Manzato, M. Varella-Garcia. Monitorização biológica por método citogenético em indivíduos expostos profissionalmente a agentes antineoplásicos, *Rev. Bras. Cancerol.* 37(1/4) (1991) 7-17.
- [2] J. Fuchs, J.G. Hengstler, D. Jung, G. Hittl, J. Konietzko, F. Oesch. DNA damage in nurses handling antineoplastic agents, *Mutat. Res.* 343 (1995) 17-23.
- [3] J.Rubeš, S. Kucharová, M. Vozdová, P. Musilová, Z. Zudová. Cytogenetic analysis of peripheral lymphocytes in medical personnel by means of FISH, *Mutat. Res.* 412 (1998) 293-298.
- [4] A. Fucic, A. Jazbec, A. Mijic, D. Šešo-Šimic, R. Tomek. Cytogenetic consequences after occupational exposure to antineoplastic drugs, *Mutat. Res.* 416 (1998) 59-66.
- [5] S. Burgaz, B. Karalal11, P. Bayrak, L. Taskin, F. Yavuzaslan, I. Bökesoy, R.B.M. Anzion, R.P. Bos, N. Platin. Urinary Cyclophosphamide excretion and micronuclei frequencies in peripheral lymphocytes and in exfoliated buccal epithelial cells of nurses handling antineoplastic, *Mutat. Res.* 439 (1999) 97-104.
- [6] Ü. Ündeğer, N. Başaran, A. Kars, D. Güç. Assessment of DNA damage in nurses handling antineoplastic drugs by the alkaline COMET assay, *Mutat. Res.* 439 (1999) 277-285.
- [7] S.W. Maluf, B. Erdtmann. Evaluation of occupational genotoxic risk in a Brazilian hospital, *Genetics and Molecular Biology* 23(2) (2000) 485-488.
- [8] S.W. Maluf, B. Erdtmann. Follow-up study of genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block

- micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay, *Mutat. Res.* 471 (2000) 21-27.
- [9] N. Kopjar, V. Garaj-Vrhovac. Application of the alkaline comet assay in human biomonitoring for genotoxicity: a study on Croatia medical handling antineoplastic drugs, *Mutagenesis* 16(1) (2001) 71-78.
- [10] R. Turci, C. Sottani, A. Ronchi, C. Minoia. Biological monitoring of hospital personnel occupationally exposed to antineoplastic agents, *Toxicology Letters* 134 (2002) 57-64.
- [11] F. Faust, F. Kassie, S. Kanasmüller, R. H. Boedecker, M. Mann, V. Mersch-Sundermann. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies, *Mutat. Res.* 566 (2004) 209-229.
- [12] H. Deng, M. Zhang, J. He, W. Wu, L. Jin, W. Zheng, J. Lou, B. Wang. Investigating genetic damage in workers occupationally exposed to methotrexate using three genetic end-points, *Mutagenesis* 20(5) (2005) 351-357.
- [13] H. Deng, , J. Lou, , M. Zhang, W. Wu, L. Jin, C. Shijie, W. Zheng, B. Wang, J. He. Detecting the cytogenetic effects in workers occupationally exposed to vincristine with four genetic tests, *Mutat. Res.* 559(1-2) (2006) 152-159.
- [14] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, C. Cairo, L. Gianni. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity, *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 56 (2004) 185-229.
- [15] B.A. Wagner, C.B. Evig, K.J. Reszka, G.R. Buettner, C.P. Burns. Doxorubicin increases intracellular hydrogen peroxide in PC3 prostate cancer cells, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 440 (2005) 181-190.
- [16] M. Murata, T. Suzuki, K. Midorikawa, S. Oikawa, S. Kawanishi. Oxidative DNA damage induced by a hydroperoxide derivative of cyclophosphamide, *Free Radic. Biol. Med.* 37(6) (2004) 793-802.

- [17] Y. Kawai, T. Nakao, N. Kunimura, Y. Kohda, M. Gemba. Relationship of intracellular calcium and oxygen radicals to cisplatin-related renal cell injury, *J. Pharmacol. Sci.* 100 (2006) 65-72.
- [18] B. Halliwell, O. I. Aruoma. DNA damage by oxygen-derived species Its mechanism and measurement in mammalian systems, *Federation of European Biochemical Societies.* 281(1,2) (1991)9-19.
- [19] A.V. Carrano, A.T. Natarajan. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques, *ICPEMC publication 14, Mutat. Res.* 204 (1988) 379-406.
- [20] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184-191.
- [21] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F.Sasaki. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206-221.
- [22] A.R. Collins, V.L. Dobson, M. Dusinská, G. Kennedy, R. Stetina. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat. Res.* 375 (1997) 183-193.
- [23] A. Collins, M. Dusinská, M. Franklin, M. Somorovská, H. Petrovská, S. Duthie, L. Fillion, M. Panayiotidis, K. Raslová, N. Vaughan. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications, *Environ. Mol. Mutagen* 30 (1997) 139-146.
- [24] M. Fenech, N. Holland, W.P. Chang, E. Zeiger, S. Bonassi. The human micronucleus project – an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA in humans, *Mutat. Res.* 428 (1999) 271-283.
- [25] J.V. Bannister & Calabrese. Assays for Sod. *Methods. Biochem. Anal* 32 (1987) 279-312.

- [26] H. Aebi. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121-126.
- [27] E.D. Wills. Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochem J* 99 (1966) 667-676.
- [28] G. Obe, D. Gobel, H. Engein, J. Herha, A.T. Natarajan. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of alcoholics, *Mutat. Res.* 73(2) (1980) 377-386.
- [29] S. Bonassi, A. Znaor, M. Ceppi, C. Lando, W.P. Chang, N. Holland, M. Kirsch-Volders, E. Zeiger, S. Ban, R. Barele, M.P. Bigatti, C. Bolognese, A. Cebulska-Wasilewska, E. Fabianova, A. Fucic, L. Hagmar, G.Joksic, A. Martelli, L. Migliore, E. Mirkova, M.R. Scarfi, A. Zijno, H. Norppa, M. Fenech. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans, *Carcinogenesis Advance Access* (2006) 1-30.
- [30] L. Migliore, M. Parrini, I. Sbrana, A. Battaglia, N. Loprieno. Micronucleated lymphocytes in people occupationally exposed to potential environmental contaminants: the age effect, *Mutat. Res.* 256(1) (1991) 13-20.
- [31] M. Fenech. The Cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations, *Environ. Health Perspect.* 101(3) (1993) 101-107.
- [32] P. Evans, B. Halliwell. Free radicals and hearing. Cause, consequence and criteria, *Ann. N Y Acad. Sci.* 28(884) (1999) 19-40.
- [33] V.E.Kagan, A.I. Kuzmenko, Y.Y. Tyurina, A.A. Shvedova, T. Matura, J.C. Yalowich. Pro-oxidant and antioxidant mechanisms of etoposide in HL-60 cells: role of myeloperoxidase, *Cancer Res.* 61 (2001) 7777-7784.
- [34] E. Groninger, G.J. Meeuwse-de Boer, S.S.N. De Graff, W.A. Kamps, E.S.J.M. De Bont. *Int. J. of Oncology* 21 (2002) 1339-1345.
- [35] G. Kadikoylu, Z. Bolaman, S. Demir, M. Balkaya, N. Akalin, Y. Enli. The effects of

- desferrioxamine on cisplatin-induced lipid peroxidation and the activities of antioxidante enzymes in rat kidneys, *Hum. Exp. Tox.* 23(1) (2004) 29-34.
- [36] F. Suzuki, K. Hashimoto, H. Kikuchi, H. Nishikawa, H. Matsumoto, J. Shimada, M. Kawase, K. Sunaga, T. Tsuda, K. Satoh, H. Sakagami. Induction of tumor-specific cytotoxicity and apoptosis by doxorubicin, *Anticâncer Research* 25 (2005) 887-894.
- [37] L. Wojnoeski, B. Kulle, M. Schirmer, G. Schlüter, A. Schmidt, A. Rosenberger, S. Vonhof, H. Bickebölller, M.R. Toliat, E. Suk, M. Tzvetkov, A. Kruger, S. Seifert, M. Kloess, H. Hahn, M. Loeffler, P. Nürnberg, M. Pfreundschuh, L. Trümper, J. Brockmöller, G. Hasenfuss. NAD(P)H Oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphisms are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity, *Circulation*. 112 (2005) 3754-3762.
- [38] S. Herman, N. Zurgil, M. Deutsch. Low dose methotrexate induces apoptosis with oxygen species involvement in T lymphocytic cell lines to a greater extent than in monocytic lines, *Inflamm. Res.* 54 (2005) 273-280.
- [39] B. Ramanathan, K. Jan, C. Chen, T. Hour, H. Yu, Y. Pu. Resistance to Paclitaxel is proportional to cellular total antioxidant capacity, *Cancer Res.* 65(18) (2005) 8455-8460.
- [40] J. Alexandre, C. Nicco, C. Chéreau, A. Laurent, B. Weill, F. Goldwasser, F. Batteux. Improvement of the therapeutic index of anticancer drugs by the superoxide dismutasemimic mangafodipir, *J. Natl. Cancer Inst.* 98(4) (2006) 236-244.
- [41] A.M. Akbar, A. Ranjbar, K. Rahzani, M. Kadkhodae, A. Rezaie, B. Taghavi, M. Abdollahi. Oxiadtive stress in operating room personnel: occupational exposure to anesthetic gases, *Hum. Exp. Toxicol.* 24(11) (2005) 597-601.



Table 1 – Characterization of hospital workers exposed to antineoplastics drugs and controls.

	<b>Controls (n=20)</b>	<b>Exposed (n=20)</b>	p
<b>Sex</b>			
Men	2 (10%)	2 (10 %)	0.96
Women	18(90%)	18 (90 %)	
<b>Age</b>			
Mean ± sd (years)	28.23 ±6.30	31.50 ±9.34	0.20
<b>Time of exposure (month)</b>			
Mean ± sd	–	34.75 ± 36.2	–
Range		06 – 120	
<b>Smoking status</b>			
No. of non-smokers	18 (90%)	18 (90%)	0.60
No. of smokers	2 (10%)	2 (10%)	
<b>Alcohol drinking status</b>			
No. of never drinkers	4 (20%)	6 (30%)	0.80
No. of non-habitual drinkers (1 time week)	14 (70%)	10 (50%)	
(2 time week)	2 (10%)	4 (20%)	

Table 2. An overview of whole data of oxidative stress and cytogenetic parameters of workers exposed to antineoplastic drugs and their controls, during one working week (week means)

	<b>Damage index</b>	<b>Micronuclei frequency</b>	<b>TBARS (nmol/mL)</b>	<b>Superoxide dismutase (USod/g protein)</b>	<b>Catalase (UCat/mg protein)</b>
<b>Exposed</b>	18.86 ±8.62**	4.94 ±1.95*	5.72 ±1.93	3.17 ±3.55	1.38 ±1.71**
<b>Control</b>	6.21 ±2.78	2.88 ±0.78	5.12 ±1.38	2.76 ±2.40	0.77 ±0.47

Significance by t-test in relation to the control group: \*  $p = 0.001$ , \*\*  $p \leq 0.002$

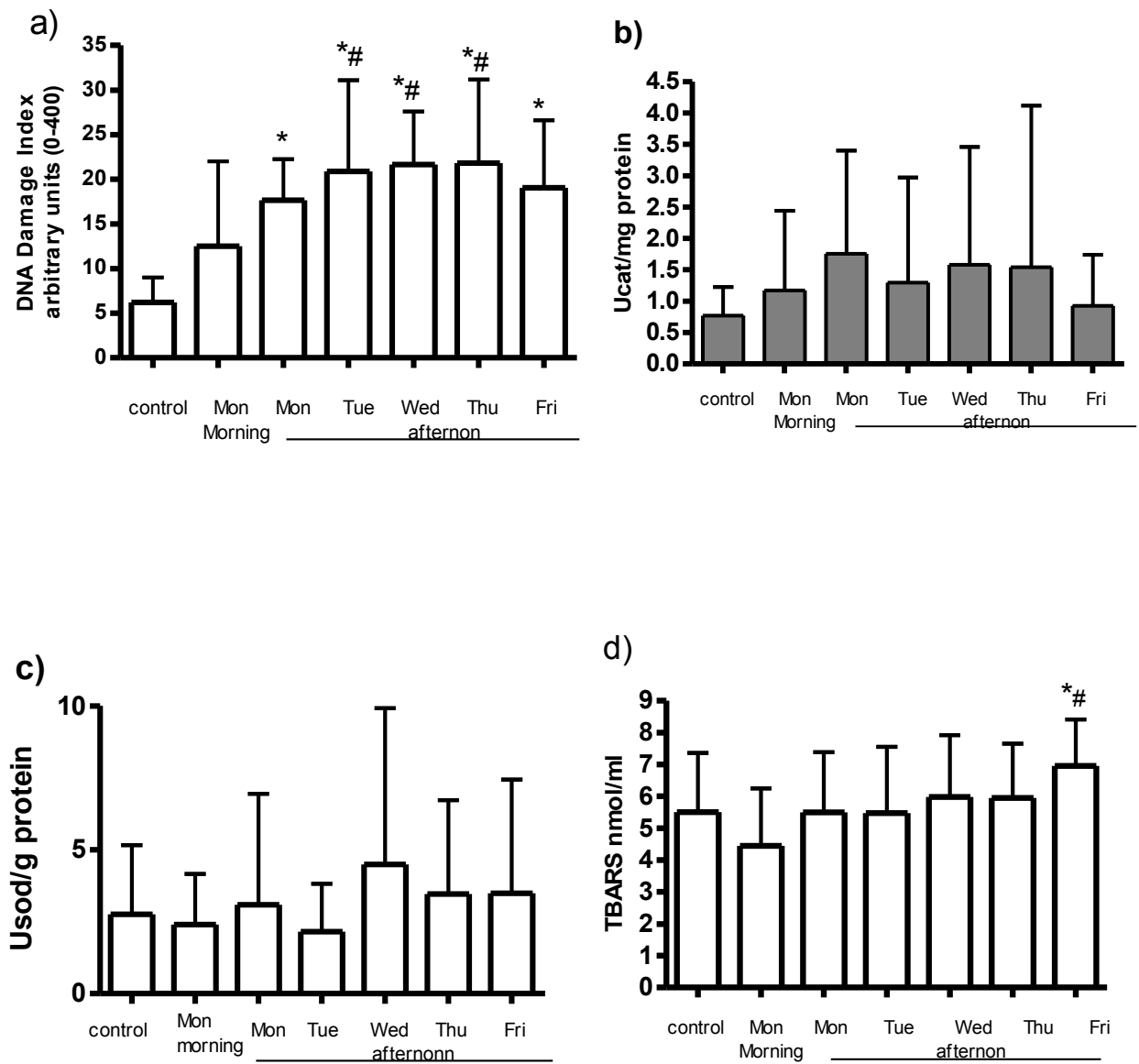


Figure 1 - Variability of the parameters of oxidative stress and comet assay in the different days in one week: (a) DNA damage index presenting significant increasing in relation to the control group at  $p < 0.001$  and # in relation to the Monday morning at  $p < 0.05$ . (b) serum Catalase activity without significant difference among the days on the control; (c) serum Superoxide Dismutase activity without significant difference among the days on the control. (d) serum TBARS in exposed group and control, with a significant difference \* in relation to the control group at  $p < 0.05$ , and also # to the Monday morning at  $p < 0.001$ .

## 4.2 Discussão Complementar

Os agentes antineoplásicos, também denominados citotóxicos, como uma classe, incluem agentes químicos não relacionados que podem inibir o crescimento de tumores através da inibição do crescimento celular ou pela morte das células que estão crescendo ativamente. Segundo dados do INCA (Instituto Nacional do Câncer), o câncer é a segunda maior causa de morte por doenças no mundo e, no Brasil, perdendo apenas para distúrbios cardíacos. Sendo que, para o ano de 2006, estima-se que 472.050 novos casos de câncer na população brasileira (Brasil, consolidado), e para o Rio Grande do Sul a estimativa deste ano é de 49.700 novos casos de neoplasia (INCA, 2006).

Diferentemente da exposição ocupacional a radiações ionizantes, ainda são inexistentes dosímetros para avaliar a exposição a agentes antineoplásicos, o que reforça a necessidade de serem desenvolvidos métodos cada vez mais sensíveis para a detecção de risco ocupacional a estes medicamentos (Fucic *et al.*, 1998).

Neste estudo, diferentemente de outros, o monitoramento avaliou o risco dos profissionais durante uma semana de trabalho, na qual os trabalhadores manipularam uma variedade de medicamentos, entre eles os mais utilizados foram os agentes alquilantes (ciclofosfamida, ifosfamida), derivados da platina (cisplatina, oxaliplatina), antimetabólitos (5-fluoracil, metrotexate, citarabina, gencitabina), inibidores ou estabilizadores da polimerização da tubulina (vincristina, vinorelabine, paclitaxel, docetaxel), geradores de radicais livres (doxorrubicina) e inibidores da topoisomerase (etoposide), entre outros. Em geral, estes medicamentos são teratogênicos e frequentemente mutagênicos. Atualmente são desconhecidos os possíveis mecanismos de ação destas misturas de drogas em doses não terapêuticas e crônicas. O benefício do uso de antineoplásicos no tratamento de câncer, para o paciente parece ser óbvio. Porém, para os profissionais que estão diariamente em contato com

estas medicações, o risco ocupacional merece ser avaliado, visto que há registros, na literatura, de farmacêuticos e enfermeiros que apresentaram sintomas clínicos coincidentes com os dos pacientes submetidos à quimioterapia, como náusea, vômito, cefaléia, perda de cabelo, manifestações alérgicas e toxicidade hepática (Ladik *et al.*, 1980; Sotanieme, *et al.*, 1983). Estes indivíduos podem ser expostos aos antineoplásicos por inalação de aerossóis, absorção cutânea e, até mesmo, por ingestão acidental. O uso de cosméticos, além do mau hábito de ingerir alimentos (café, água ou lanches rápidos) nos setores próximos aos de aplicação, pode também aumentar o risco de contaminação acidental do profissional.

#### **4.2.1 Genotoxicidade**

Da mesma maneira que o estresse oxidativo, os ensaios que avaliam o dano ao DNA sofrem a influência de fatores como estilo de vida, hábitos alimentares, medicações e fatores associados ao genótipo (Hartmann *et al* 1998). Os fatores biológicos, na maioria das vezes, não podem ser controlados. Para isso, busca-se selecionar indivíduos controles pareados por sexo e idade e, se possível, que se assemelhem no estilo de vida. Ao interpretarmos os resultados, procuramos levar em consideração esses fatores (Maluf 2004)

Praticamente todos os estudos publicados sobre avaliação de profissionais que trabalham com quimioterápicos mostram um aumento na genotoxicidade (Goloni-Bertollo *et al.*, 1991; Fuchs *et al.*, 1994; Machado-Santelli *et al.*, 1994; Sorsa & Anderson, 1996; Fuci, *et al.*, 1998; Rubes *et al.*, 1998; Burgaz *et al.*, 1999; Undeger *et al.*, 1999; Maluf & Erdtmann, 2000a; Maluf & Erdtmann, 2000b; Kopjar & Garaj-Vrhovac, 2001; Faust *et al.*, 2003; Deng *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2006). Eventualmente, em um tipo de avaliação (Maluf & Erdtmann, 2000b), ou em parte da amostra (Fuchs, *et al.*, 1995), não é detectada genotoxicidade. É interessante observar que, em estudos os quais possuíam profissionais que não utilizavam

adequadamente os equipamentos de proteção individual (EPIs), (Fuchs *et al.*, 1995; Undeger *et al.*, 1999; Kopjar *et al.*, 2001), o aumento da genotoxicidade foi significativamente maior. No entanto, o uso apropriado dos EPIs ou, então, o aprimoramento do manejo dos profissionais mostraram que o risco de genotoxicidade pode ser reduzido (Fuchs *et al.*, 1995; Maluf & Erdtmann, 2000b).

Neste estudo, como em tantos outros, todos os profissionais utilizam todos os equipamentos de proteção individual e coletivo preconizados para o preparo e a administração destes medicamentos (Resolução 220, Agência Nacional de Vigilância Sanitária), mas ainda assim, foi observado aumento da genotoxicidade.

Diferentes parâmetros para avaliar a genotoxicidade foram usados, o que dificulta bastante a comparação dos resultados. O estudo de aberrações cromossômicas é em média o mais sensível, detectando aumentos de genotoxicidade, de 70% a 260% (Goloni-Bertollo *et al.*, 1991; Fucic, *et al.*, 1998; Rubes *et al.*, 1998). Rubes *et al.*, (1998), além da análise clássica de aberrações cromossômicas, empregaram também o método FISH (Hibridização fluorescente *in situ*), corando apenas dois cromossomos (par 1 e 4), e sendo capaz de detectar um aumento de 286% de aberrações em profissionais expostos a antineoplásicos em relação ao controle, enquanto na análise convencional dos 23 pares detectou-se apenas 70% em relação ao controle.

Os parâmetros mais utilizados para avaliar o risco destes profissionais são o teste de Micronúcleo (MN)s e o Ensaio Cometa (EC), os quais também foram utilizados neste estudo. Como a maioria dos agentes antineoplásicos comumente utilizados são clastogênicos ou aneugênicos, o teste de micronúcleo em cultura de linfócitos e o bloqueio da citocinese com citocalasina-B tem a vantagem de detectar fragmentos cromossômicos acêntricos resultantes da quebra do DNA, bem como perda cromossômica durante a anáfase. O micronúcleo

expressa uma mutação, porém este método necessita de células em divisão para que ele possa ser visualizado. Como são avaliadas as células após sua primeira divisão *in vitro*, os MN em sua grande maioria devem ser resultantes de um dano causado por alguma exposição ocorrida alguns meses antes da coleta de sangue, *in vivo*. Os resultados obtidos em outros estudos, no teste de MN, variam desde aumento não significante (14% Maluf & Erdtmann, 2000b) a muito significantes (377% Deng *et al.*, 2006) nestes profissionais.

O dano recente ao DNA, ocorrido horas ou no máximo 2-3 dias anteriores, pode ser avaliado através do Ensaio Cometa, que não detecta mutações, mas sim lesões no DNA, que podem ser reparadas, e se não reparadas, podem resultar em mutação. É um método simples, rápido e de baixo custo (Contijo & Tice, 2003), e que possui aplicabilidade para os mais variados tecidos e/ou tipos especiais de células. Além de ser sensível o bastante para detectar baixos níveis de dano ao DNA, requer um número baixo de células por amostra (Tice *et al.*, 2000). Os resultados obtidos nos estudos realizados em trabalhadores com quimioterápicos variam de um aumento não significante de dano ao DNA em alguns dos parâmetros do teste cometa, como o tamanho da cauda (Deng *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2006) para muito significativo (160% - Maluf & Erdtmann, 2000b).

É importante ressaltar que alguns estudos, os quais não detectaram um risco aumentado em algum parâmetro, encontraram um risco maior para outro parâmetro. Neste estudo, foi avaliado o risco genotóxico de profissionais expostos a drogas anticâncer durante uma semana de trabalho, pelo teste cometa, além do teste de MN, que foi realizado apenas uma vez. Se forem considerados os resultados totais do ensaio cometa, durante toda semana, o aumento encontrado neste estudo foi ligeiramente acima de 200% em relação ao controle, que é a maior diferença, se comparada com os dados da literatura. O aumento no teste de MN

ficou em 71% em relação ao controle, que permanece dentro da variação encontrada na literatura.

Neste estudo, foi encontrada uma correlação positiva entre dano ao DNA e dias da semana (0,27;  $p=0,004$ ), com o nível mais baixo de dano na segunda-feira de manhã, antes do início da jornada de trabalho. Este resultado mostra a importância do descanso do final da semana, ou então na redução no tempo de exposição aos antineoplásicos, já relacionada no estudo de Maluf & Erdtmann, 2000b. O ensaio cometa também mostrou correlação positiva associada ao consumo de álcool ( $r=0,228$ ;  $p=0,014$ ), permanecendo significativa ( $p=0,024$ ) mesmo quando foi realizada a regressão linear múltipla ajustada para eliminar outros fatores que poderiam influenciar nesta correlação. O aumento da frequência de aberrações cromossômicas em alcoólatras já foi bem avaliada (Obe, 1980), mas nesta amostra reduzida e sem alcoólatras, não se esperava esta associação. Talvez seja resultante da soma da exposição aos antineoplásicos e ao álcool, pois, nos controles que apresentaram consumo similar esta correlação é negativa e não significativa ( $r=-0,19$ ;  $p=0,45$ ).

A formação de anomalias nucleares como o MN, rearranjos cromossômicos e pontes anafásicas são eventos comumente observados nos estágios iniciais da Carcinogênese (Bonassi *et al.*, 2006). A frequência de MN foi avaliada apenas uma vez para vermos se o dano ao DNA detectado pelo ensaio cometa resultou em mutações cromossômicas ou se foram detectados apenas danos reparáveis. O aumento de aberrações cromossômicas foi confirmado. Dessa forma pode-se concluir que os profissionais estão em risco efetivo, dos quais um deles é o câncer, já que a correlação a entre AC e câncer é bem estabelecida e muito estudada (Bonassi *et al.*, 2006).



### 4.2.3 Estresse Oxidativo

Não há relatos na literatura sobre estudo com estresse oxidativo em profissionais que manipulam drogas citostáticas. Existem, no entanto, muitos estudos avaliando a indução de estresse oxidativo por antineoplásicos *in vitro* e *in vivo* (Evans e Halliwell, 1999; Kadikoylu *et al.*, 2004; Kawai *et al.*, 2006; Ramanathan *et al.*, 2005; Alexandre *et al.*, 2006; Conklin, 2004; Wojnowski *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2005; Herman *et al.*, 2005). Espécies reativas do oxigênio afetam a funcionalidade celular agindo diretamente em seus componentes, incluindo lipídeos, proteínas e DNA, podendo alterar ou destruir estas estruturas (Halliwell & Whiteman, 2004). O estresse oxidativo ocorre quando as espécies reativas não são adequadamente neutralizadas ou removidas (Sies, 1993). Quando se determina o nível de antioxidantes de um indivíduo, pode-se relacionar este resultado com possíveis doenças, ou ao efeito colateral de drogas (Evans e Halliwell, 1999). Há evidências que relacionam radicais livres produzidos por aminoglicosídeos e derivados de cisplatina com ototoxicidade (Evans e Halliwell, 1999), também na nefrotoxicidade (Kadikoylu *et al.*, 2004; Kawai *et al.*, 2006) e hepatotoxicidade (Pratibha *et al.*, 2006). O antineoplástico muito usado, Paclitaxel, aumenta os níveis de superóxidos, peróxido de hidrogênio, produzindo adutos no DNA, e aumenta a fragmentação nuclear, sendo sugerido que a citotoxicidade desta droga se deva aos radicais livres (Ramanathan *et al.*, 2005; Alexandre *et al.*, 2006). Methotrexate tanto em doses altas como em baixas pode induzir apoptose pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Herman *et al.*, 2005). Groninger *et al.*, (2002) demonstraram que a Vincristina, uma droga usada para o tratamento da anemia linfoblástica em crianças, apresenta como primeira reação

a formação de ERO, que induzem a apoptose. Esta indução de apoptose se dá pela alteração da função da membrana mitocondrial. Experimentos *in vitro* com a droga antineoplásica Doxorubicina, que ativa os fagócitos através de ERO, sendo a fagocitose inibida pela adição de catalase, demonstraram que o efeito tóxico deve ser através de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Já a superóxido dismutase não inibe tão bem, indicando que talvez ela não consiga penetrar tão facilmente na célula (Halliwell & Aruoma 1991).

Considerando os dados acima apresentados, era esperado encontrar no monitoramento de trabalhadores com antineoplásicos uma resposta do estresse oxidativo, de forma similar a encontrada para a genotoxicidade. Em nosso estudo, foram usados três parâmetros de estresse oxidativo: a) avaliação dos níveis de lipoperoxidação através dos produtos da reação do ácido tiobarbitúrico (TBARS); b) atividade da enzima superóxido dismutase (Sod); c) atividade da enzima catalase (Cat). Ao contrário dos estudos de monitoramento em geral, que fazem apenas uma avaliação, neste estudo os expostos foram avaliados durante uma semana de trabalho, ou seja, segunda-feira de manhã antes do início da jornada de trabalho, e no final das jornadas de trabalho, de segunda à sexta-feira.

Considerando a média da semana dos três parâmetros avaliados, a catalase e a superóxido dismutase apresentaram aumento, mas somente a Cat apresentou uma média significativamente superior aos controles. No entanto, considerando os dias individualmente, a catalase não apresentou nenhum aumento significativo em relação aos controles. Nenhuma diferença significativa na média da semana entre TBARS e controle foi observada. Estes resultados sugerem que as drogas antineoplásicas estão induzindo uma modulação na atividade enzimática antioxidante, porém sem alterar expressivamente os níveis de estresse oxidativo. O TBARS apresentou uma variação interessante durante a semana. Na segunda-feira de manhã antes do turno de trabalho os níveis de TBARS foram os mais baixos,

aumentando para o fim deste turno e nos dias subseqüentes. Disto resultou uma clara correlação positiva entre a lipoperoxidação e dias continuados de trabalho ( $r=0,37$ ,  $p=0,000$ ). Considerando as avaliações individualmente, a média TBARS dos expostos na sexta-feira foi significativamente superior aos controles ( $p=0,02$ ), e também em relação à segunda feira de manhã ( $p=0,000$ ). O ensaio cometa também apresentou correlação similar com os dias da semana, contudo os resultados do TBARS e do ensaio cometa não apresentaram correlação ( $r=0,07$ ,  $p=0,48$ ), sugerindo que a genotoxicidade observada pode ser induzida por outros mecanismos além do estresse oxidativo.

A maioria dos estudos de monitoramento de trabalhadores com antineoplásicos mostra que eles usavam todos os equipamentos de segurança individual recomendado. Mesmo assim os resultados de genotoxicidade estavam significativamente aumentados, indicando que esta problemática deve receber nova atenção. Maluf & Erdtmann (2000b) relatam que através da modificação do manejo, com redução de tempo de atividade de maior risco, rigor no uso dos equipamentos de segurança pelos trabalhadores e redução da jornada de trabalho conseguiu-se reduzir a não significativa o parâmetro de mutações cromossômicas pelo teste de micronúcleos, mas o ensaio cometa continuou a apresentar resultados positivos. Talvez uma automatização das fases de maior risco neste tipo de atividade, que é a mistura das drogas, possa oferecer uma maior proteção aos trabalhadores. Outro aspecto importante a ser pensado seria o uso de uma dieta natural rica em substâncias antioxidantes por estes trabalhadores, que poderia colaborar em reduzir o estresse oxidativo e provavelmente também a genotoxicidade.

## 5. CONCLUSÕES

Neste estudo, 20 farmacêuticos e enfermeiras que lidavam diariamente com antineoplásicos em setores de oncologia hospitalar foram monitorados durante uma semana de trabalho em relação ao risco de genotoxicidade (pelo ensaio cometa, além de uma avaliação de micronúcleos em linfócitos) e estresse oxidativo por três parâmetros (TBARS – produtos da reação com o ácido tiobarbitúrico e as enzimas superóxido dismutase e catalase). Foram realizadas coletas segunda-feira de manhã, antes do início da jornada de trabalho, e, após a jornada, de segunda à sexta-feira. Vinte trabalhadores administrativos dos mesmos hospitais serviram de controle. As principais conclusões foram as seguintes:

1. Quanto ao risco de genotoxicidade:

- a) – O índice de dano no DNA dos trabalhadores com antineoplásicos foi significativamente superior em relação aos controles, sendo que, nas avaliações dos dias, de terça à sexta-feira, os expostos apresentaram dano no DNA superior em relação à segunda de manhã e ao grupo controle. Os resultados do teste cometa aumentaram do início para o fim da semana, apresentando uma correlação positiva ( $r=0,27$ ,  $p=0,004$ ); havendo também uma correlação positiva entre o consumo de álcool e índice de dano no DNA ( $r=0,23$ ,  $p=0,014$ ).

- b) – A frequência de micronúcleos nos trabalhadores expostos foi significativamente aumentada em relação aos controles ( $p=0,01$ ), sendo que esta frequência estava positivamente associada à idade e tempo de serviço. Estes dois últimos parâmetros estavam também altamente correlacionados, sendo feita uma regressão múltipla pela qual se viu que a idade era o principal fator da correlação.

c) – Destes resultados de genotoxicidade pode-se deduzir que os trabalhadores estão sujeitos um risco real dos efeitos resultantes da genotoxicidade, um dos quais é o câncer, pois a correlação entre mutações cromossômicas e câncer está bem estabelecida.

## 2. Quanto ao estresse oxidativo:

a) – Consirendo todos os resultados da semana, apenas a enzima catalase apresentou dados significativamente superiores nos expostos em relação ao controle.

b) – Considerando os dias de coleta, as enzimas Cat e Sod não apresentam diferença significativa em relação ao controle nos diferentes dias de coleta.

c) – O TBARS apresentou resultados crescentes de segunda feira de manhã até sexta feira com correlação positiva significante ( $r=0,37$ ,  $p=0,000$ ), sendo que o resultado de sexta feira era significativamente superior ao controle e à segunda feira de manhã dos próprios expostos.

d) – O parâmetro de estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes, mostraram-se informativos. Este estudo é o primeiro da literatura a fazer um monitoramento de estrsse oxidatixo em manipuladores de quimioterápicos. Quando se for monitorar riscos de genotoxicidade, seria interessante monitorar conjuntamente o estresse oxidativo, pois ambos podem ser produzidos pelos mesmos fatores.

3. Como conclusão geral, pode-se afirmar que, baseando-se neste estudo e nos dados da literatura, os manipuladores de quimioterápicos merecem uma atenção do sistema de saúde de segurança do trabalho, no sentido de, minimizar os seus riscos, uma vez que essas atividades não podem ser suspensas pois são essenciais ao moderno sistema de saúde. O manejo adequado dos horários e tipos de atividade na manipulação dos quimioterápicos, a redução da jornada, associados ao rigor no uso dos equipamentos de segurança e os descansos intermitentes podem reduzir estes riscos.

## 6. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

Abuja, P.M.; Albertini, R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. **Clinica Chimica Acta**, 306: 1-17.

Adegoke, G.O.; Kumar, M.V.; Krishna, A.G.G.; Varadaj, M.C.; Sambaiah, K.; & Lokesh, B.R. (1998). Antioxidants and lipid oxidation in food- a critical appraisal. **J. Food. Sci. Technol.** 35(4):283-296.

Ames, B.N.; & Gold, L.S.; (2000). Paracelsus to parascience: the environmental cancer distraction. **Mutation Research.** 447: 3-13.

Andreazza, A.C.; Soares, D.G.; Kehl, L.F.; Borella, M.L.L.; Salvador, M. (2004). **Transtorno Neuropsiquiátricos E Estresse Oxidativo**. In: Kapczinski, F.; Quevedo, J.; Isquierdo, I. (2 Ed.) **Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos**. Artmed, Porto Alegre.

Arbak, P.; Yavuz, O.; Bukan, N.; Balbay, O.; Ulger, F.; Annakkaya, A.N.; (2004). Serum oxidant and antioxidant levels in diesel exposed toll collectors. **Journal of Occupational Health.** 46: 281-288.

Au, W.W.; (1991). Monitoring human populations for effects of radiation and chemical exposures using cytogenetics techniques. **Occupational Medicine.** 6(4): 597-611

Beckman, K.B.; Ames, B.N.; (1998). The free radical theory of aging matures. **Physiol Rev.** 78(2):547-81.

Betti, C.; Davini, T.; Giannesi, L.; Loprieno, N.; Barale, R.; (1994). Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. **Mutation Research** 307(1):323-33.

Beretta, G. (1991). *Câncer treatment medical guide*, 10<sup>th</sup> edn., Farmitalia Carlo Erba-Erbamont, Milan. In: Gentile, J.M., Rahimi, S., Zwiesler, J., Gentile, G.J., Ferguson L.R. Effect of selected antimutagens on the genotoxicity of antitumor agents.(1998) **Mutation Research** 402, 289-298.

Binková, B.; MracKov, G.; GajdoSová, D.; Vidová, P.; Stávková, Z.; Peterka, V.; Pilčík, T.; Dobiás, L. *et al.*, (1998). Coke oven workers study: the effect of exposure and GSTM1 and NAT2 genotypes on DNA adduct in white blood cells and lymphocytes as determines by 32 P-postlabelling. **Mutation Research** 416: 67-84,

Bonnefooy, M.; Draim J.; & Kostka, T. (2002). Antioxidamts to slow aging, facts and perspectives. **Presse. Med.** 31(25):1174-84

Calabresi, P.; Chabner, B.A. (1996). **Quimioterapia da Doenças Neoplásicas**. In: Hardman JG, Limbird LE (9 Ed.). In: **Goodman e Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica**.Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, cap. 24: 395 – 407.

Chance, B.; Machley, A.L. (1954). Assay of catalases and peroxidases. **Meth Enzimol** 2:764-775.

ConKlin, K.A. (2004). Cancer Chemotherapy and antioxidants. **J. Nutr.** 134: 3201-3204.

Contijo, A.M.M.; Tice, R. (2003). Teste do cometa para detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F., Marques, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora da ULBRA.

Cunha, K.S.; Lehnann, M. (2003). **Drogas anticâncer e seus efeitos genotóxicos**. In: Silva, J.; Erdtmann, B.; Henriques, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, pp 343-364.

Dizdaroglu, M. (1993). Quantitative determination of oxidative base damage in DNA by stable isotope-dilution mass spectrometry. *FEBS Lett*; 315:1-6. In: Cooke MS, Olinski R,

Doll, R.; Peto, R. (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **J. Natl Cancer Institut.** 66:1191-1308.

Droge, W.; (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev.** 82(1):47-95.

Epidemiologia (2006). **Disponivel (online)**

<http://www.inca.gov.br> (01 de outubro)

Esterbauer, H.; Schaur, R.J.; Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radic Biol Med.** 11(1):81-128.

Evans MD. (2005) Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clinica Chimica Acta*, article in press.

Farbairn, D.W.; Olive, P.L.; O'Neill, K.L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. **Mutat. Res.** 339:37-59.

Fenech, M.; & Morley, A.A. (1985). The effects of donor age on spontaneous and induced micronuclei. **Mutation Research**, 148:99-105

Fenech M. (1997): The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutat Res.** 392(1-2):11-8.

Fridovich, I. (1978). Oxygen free radicals and tissue damage: chairman's introduction. **Ciba Found Symp.** 6-8;(65):1-4.

Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. **J. Exp. Biol.** 201:1203-1209.

Fujikawa, K.; Kamiya, H.; Kassay, H.; (1998). The mutatojns induced by oxidatively damage nucleotides, 5-formyl-dUTP and 5-hydroxil and 5-hydroxy-dCTP, in Escherichia coli. **Nucleic Acidis Res.** 26: 4582-87.



Gewirtz, D.A. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochemical Pharmacology**. 57: 727-741.

Halliwell, B.; & Gutteridge, J.M. (1984). Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. **Lancet**. 10(2): 8411-1095.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.C.; (1999). **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3.Ed. New York: Oxford.

Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging**. 18: 685-716.

Halliwell B, Whiteman M. (2004): Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 142(2):231-55.

Hartmann A, Fender H, Speit G. (1998): Comparative biomonitoring study of workers at a waste disposal site using cytogenetic tests and the comet (single-cell gel) assay. *Environ Mol Mutagen*. 32(1):17-24.

Hartmann, A.; Speit, G. (1994). Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchanges (SCE). **Mutation Research**. 346: 49-56.

Heuser, V.D.; Andrade, V.M.; Silva, J.; Erdtmann, B. (2005). Comparison of genetic damage in brazilian footwear-workers exposed to solvent-based or water-based adhesive. **Mutat. Res**. 588: 85-94.

Hug, H.; Strand, S.; Grambihler, A.; Galle, J.; Hack, V.; Stremmel, W.; Krammer, P.H.; Galle, P.R. (1997). Reactive oxygen intermediates are involved in the induction of CD95

ligand mRNA expression by citostatic drugs in hepatoma cells. **J Biol Chem.** 272: 28191-28193.

Inoue, M. (1994). Protective mechanism against reactive oxygen species. In: *The Liver. Biology and Pathology*. Ed Arias, I. M, Boyer JL, Fausto N, Jacoby WB, Schachter D A, Shafritz D A. New York: Raven Press. pp 443-460.

Kalina, I.; Brezáni, I.; GajdoSová, D.; Binková, B.; Salagovic, J.; Habalová, V.; MracKová, G.; Dobiás, L.; Srám, R.J.; (1998). Cytogenetic monitoring in coke oven workers. **Mutat. Res.** 417: 09-17.

Kuraoka, I.; Bender, C.; Romieu, A.; et al., (2000). Removal of oxygen free-radical-induced 5',8-purine cyclodeoxynucleosides from DNA by the nucleotide excision-repair pathway in human cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 97:3832-7.

Ladik, C.F.; Stoehr, G.P.; Maurer, M.A. (1980). Precautionary measures in the preparation of antineoplastic. **Am. J. Hosp. Pharm.** 37: 1184-1186.

Llesuy, S.F. (2002). **Estresse oxidativo e antioxidantes**. Canoas: Ed. Ulbra. pp.23-28.

Maluf S.W. (2004): Monitoring DNA damage following radiation exposure using cytokinesis-block micronucleus method and alkaline single-cell gel electrophoresis. **Clin Chim Acta.** 347(1-2):15-24.

Maluf, S.W.; Erdtmann, B. (2003), **Biomonitorização do Dano Genético em Humanos**. In: Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 183-205.

Mates, J.M.; Sanches-Jimenez, F.M. (2000). Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. **Int J Biochem Cell Biol.** 32: 157-170.

McCord, J.M.; Edeas, M.A. (2005). SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. **Biomed Pharmacother.** 59(4):139-42. *Medicine* 351, 476-486.

Mirsa, H.P.; Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the antioxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem.** 217:3170-3175.

Pawlak, W.; Kedziora, J.; Zolynski, K.; Kedziora-Kornatowska, K.; Blaszczyk, J.; Witkowski, P. (1998). Free radicals generation by granulocytes from men during bed rest. **J Gravit Physiol** 5(1):P131-2.

Pincu, M. et al., (1984) An improved micronucleos assay in lymphocytes. **Mutat. Res.** 139: 61-65.

Piperakis, S.M.; Petrakou, E.; Tsilimigaki, S.; Sagnou, M.; Monogiudis, E.; Haniotakis, G.; Karkaseli, H.; Sarikaki, E.; (2003). Biomonitoring with the comet assay of Greek greenhouse workers exposed to pesticides. **Environ Mol Mutagen.** (2): 104-10.

Pratiha, R.; Sameer, R.; Rataboli, P.V.; Bhiwgade, D.A.; Dhume, C.Y. (2006). Enzymatic studies of cisplatin induced oxidative stress in hepatic tissue of rats. **Eur. J. Pharmacol.** 532(3): 290-293.

RDC 220 (2005). **Disponível (online)**

<http://www.anvisa.gov.br> (01 de outubro de 2006)

Ribeiro, L.R.; Marques, E.K.A. (2003). **Importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana.** In: Ribeiro, L.R.; Salvadori, D.M.F.; Marques, E.K.; **Mutagênese Ambiental.** Canoas: Editora ULBRA.

Rombaldi, F. (2003). Avaliação do risco ocupacional/genotoxicidade nos serviços de oncologia (hospital e clínicas) de Caxias do Sul. **Trabalho de Conclusão.** Pós-graduação Latu Sensu. Universidade Luterana do Brasil. Canoas, Brasil.

Saffi, J.; Henriques, J.A.P. (2003) Reparação de DNA em células eucarióticas. In: Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP. In: **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 183-205.

Salmon, S.E.; Sartorelli, A.C. (2003). **Quimioterapia do Câncer**. In: Katzung, B.G.; (8 Ed.) **Farmacologia Básica e Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 24:803-832.

Salvador, M.; Henriques, J.A.P. (2004). **Radicais livre e a resposta celular ao estresse oxidativo**. Canoas: Editora ULBRA.

Salvador, M.; Poletto, N.P.; Andreazza, A.C.; Soares, D.G.; (2004). **Estresse oxidativo e doenças**. In: **Radicais Livres e a resposta células ao estresse oxidativo**. Canoas: Editora ULBRA.

Santos-Mello R, Silva JC, Nunes MH, Braga MA. (1992) Cytogenetics study on oven workers with abnormal blood counts. **Mutat. Res.** 280: 261-269.

Sies H. (1993): Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem.* 15;215(2):213-9

Silva, J.; Freitas, T.R.O.; Marinho, J.R.; et al., (2000) Alkaline single-cell gel electrophoresis (comet assay) to environmental in vivo biomonitoring with native rodents. **Genetics and Molecular Biology**, 23(1):241-245.

Singh, N.P.; Danner, D.B.; Tice, R.R.; Pearson, J.D.; Brant, L.J.; Morrell, C.H.; Schneider, E.L.; (1991). Basal DNA damage in individual human lymphocytes with age. **Mutat. Res.** 256(1):1-6.

Sorsa M, Hayashi M, Norppa H, Vainio H. (1999). Human biomonitoring in exposure to environmental genotoxicants, In: Kuroda Y, Shankel DM, Waters MD, (Eds) **Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms II**. Plenum Press, New York and London, 79-86.

Sotaniemi, E.A.; Sutinen, S.; Arranto, A.J. (1983). Liver damage in nurses handling cytostatic agents. **Acta Med. Scand.** 214: 181-189.

Srám, R.J.; Binková, B. (2000). Molecular epidemiology studies on occupational and environmental exposure to mutagens and carcinogens, 1997-1999. **Environmental Health Supplements** 108, S1.

Tucker, J.D.; Preston, R.J. (1996). Chromosome aberrations, micronuclei aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. **Mutation Research**. 365:147-59.

Turchi, J.J. (2006). Nitric oxide and cisplatin resistance: NO easy answers. **PNAS**. 103(12): 4337-4338.

Ursini, M.V.; Parrella, A.; Rosa, G.; Salzano, S.; Martini, G.; (1997). Enhanced expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human cells sustaining oxidative stress. **Biochem. J**. 323:801-806

Von Sonntag, C. (1987). **The chemical basis of radiation biology**. London: Taylor and Francis.

Villela, I.V.; Lau, A.; Silveira, J.; Pra, D.; Rolla, H.C.; Silveira, J. (2003). **Bioensaios para Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental**. In: silva, J.; Erdtmann, B.; Henriques, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance.

Zelko, I.N.; Mariani, T.J.; Folz, R.J.. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radic Biol Med**. 33(3):337-49.



## ANEXO I

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### 1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA

##### 1.1 Título

“AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESTRESSE OXIDATIVO E GENOTOXICIDADE EM MANIPULADORES DE QUIMIOTERÁPICOS EM SERVIÇOS DE ONCOLOGIA.”

##### 1.2 Unidade executora

Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul

##### 1.3 Coordenação

Prof. Dr. Bernardo Erdtmann (INBI e DCBI / UCS)

Prof.<sup>a</sup> Dra. Jenifer Saffi (ULBRA)

##### 1.4 Colaboração

Farmacêutica Fernanda Rombaldi (INBI / UCS)

Prof.<sup>a</sup> Dra Mirian Salvador (INBI e DCBI / UCS )

##### 1.5 Endereço para contato

Prof.<sup>a</sup> Dra. Mirian Salvador

Instituto de Biotecnologia/UCS.

Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130. CEP.: 95079-560

**Fone/Fax: (54) 2182293**

E-mail: [msalvado@ucs.tche.br](mailto:msalvado@ucs.tche.br)

Farm. Fernanda Rombaldi

Rua Pinheiro Machado, 2567, sl 31. CEP.: 95020-110

**Fone: (54) 99672689**

E-mail: [ferrom@terra.com.br](mailto:ferrom@terra.com.br)



## **INFORMAÇÕES AO VOLUNTÁRIO**

### **2.1 Participação no projeto**

O voluntário participará deste projeto através de doação de sangue (em sete momentos diferentes) para realização de análises bioquímicas e de genotoxicidade. Também será solicitado o preenchimento do questionário de saúde ocupacional em anexo.

### **2.2 Duração da atividade**

Aproximadamente 10 minutos para cada coleta de sangue, e cerca de 15 minutos para responder ao questionário de saúde ocupacional.

### **2.3 Riscos e desconfortos**

Não há riscos para o voluntário participante do projeto. O desconforto previsto resume-se à retirada de uma amostra de, aproximadamente, 10 ml de sangue venoso do braço direito ou esquerdo, feita por profissional capacitado. Eventualmente poderão ocorrer dor e hematomas na região da picada da agulha.

### **2.4 Benefícios esperados**

O resultado do exame laboratorial será comunicado ao voluntário, que ficará ciente dos resultados obtidos.

### **2.5 Critérios de confidencialidade, privacidade e anonimato**

Todas as análises bioquímicas e de genotoxicidade serão realizadas de forma confidencial, não sendo identificado o voluntário. As publicações não incluirão qualquer referência ao nome do doador ou outros dados que possam identificá-lo.

## **2.6 Destino do material biológico coletado**

Após a realização das análises previstas as amostras de sangue serão descartadas, não podendo ser utilizadas para outros fins.

## **2.7 Interrupção da participação**

A qualquer momento o voluntário, se for de sua vontade, poderá interromper sua participação no projeto de pesquisa, bastando para tanto informar a coordenação do projeto.

## **TERMO DE CONSENTIMENTO**

### **3.1 Consentimento do voluntário**

Eu,....., após ler este documento e uma vez esclarecida a minha participação no projeto de pesquisa aqui referido, concordo em:

- a- Responder adequadamente ao questionário em anexo;
- b- doar sete amostras de sangue venoso, coletada por pessoa tecnicamente habilitada, com material totalmente descartável, as quais serão utilizada para realização de análises bioquímicas e de genotoxicidade.

Assinatura do voluntário:

Assinatura do responsável pela coleta:

Local e data:

## ANEXOII

### QUESTIONÁRIO DE SAÚDE OCUPACIONAL

**Código:**

#### **HISTÓRIA PESSOAL**

1. Data: \_\_\_\_\_
2. Idade: \_\_\_\_\_(em anos).
3. Sexo: ( ) Masculino ( ) Feminino
4. Grupo étnico: \_\_\_\_\_.
5. Número de filhos naturais: \_\_\_\_\_.

#### **HISTÓRIA OCUPACIONAL**

6. Local de trabalho: \_\_\_\_\_.
7. Tempo de trabalho neste local: \_\_\_\_\_.
8. Atividade que realiza: \_\_\_\_\_.
9. Onde você trabalhou previamente, qual atividade que realizava e por quanto tempo:  
\_\_\_\_\_

Responda as questões 10 a 12 apenas se trabalha com quimioterápicos

10. Qual a sua carga horária diária? \_\_\_\_\_
11. Neste período, quantas horas você está exposto aos quimioterápicos? \_\_\_\_\_
12. Quais são os equipamentos de proteção individual usados por você?  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

#### **HISTÓRIA DE FUMO**

13. Alguma vez você fumou? ( ) Sim ( ) Não

Se não, passe para questão 14. Se sim:

- a. Quanto tempo você fumou? \_\_\_\_\_
- b. Você fuma atualmente? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, passe para a 13c.

Se não: Quando você parou de fumar? \_\_\_\_\_ (mês e ano).

c. Que tipo de fumo consome, e qual a quantidade diária?

\_\_\_\_\_.

### **MEDICAMENTOS E DOENÇAS**

14. Você tem tomado algum medicamento prescrito pelo médico no último ano (por exemplo, comprimidos para pressão, insulina, tranqüilizantes, relaxantes musculares, etc.)?

Tipo de medicamento: Dose: Quantos por dia: Início(mês) Término (mês)

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

15. Você tem tomado algum medicamento não prescrito por médico no último ano (por exemplo, aspirina, anti-ácidos, anti-histamínicos, sedativos ou outras drogas)?

Tipo de medicamento: Dose: Quantos por dia: Início(mês) Término (mês)

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

16. Você toma ou tomou alguma vitamina nos últimos 6 meses?

Tipo de vitamina: Dose: Quantos vezes por semana:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

17. Você teve ou tem alguma doença?

Se sim, indique abaixo:

Doença: Período da doença: Tratamento:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

18. Liste as vacinações que você recebeu nos últimos 12 meses.

Vacina: Data:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_.

19. Liste os raios-X diagnósticos e terapêuticos, se você recebeu no último ano.

Razão para o raio-X

Data:

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

20. Fez alguma cirurgia durante o último ano?

Data:

Razão:

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

21. Teve febre nos últimos 06 meses.

Data(mês):

Doença associada:

Medicamento tomado:

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**DIETA** (deve refletir apenas os hábitos freqüentes)

22. Você come apenas vegetais?       Sim       Não

23. Você come carne?       Sim       Não

Se sim, com que freqüência você come as seguintes:

Carne bovina:

Peixe:

Galinha:

Porco:

24. Como você prefere sua carne?

Mal passada

No ponto

Bem passada

25. Você usa adoçante?

Sim

Não

Se sim, quantos por dia? \_\_\_\_\_.

26. Comente sobre sua dieta, caso ela tenha algo de especial ( por exemplo, dieta rica em proteínas e pobre em carboidratos, etc.).

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

27. Você bebe cerveja?

Sim

Não

Se sim, indique sua média de consumo semanal: \_\_\_\_\_

28. Você bebe vinho? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, indique sua média de consumo semanal:

29. Você bebe outras bebidas alcoólicas (excluindo cerveja e vinho)?

( ) Sim ( ) Não

Se sim, qual ou quais? \_\_\_\_\_

Indique a sua média de consumo semanal: \_\_\_\_\_

### HISTÓRIA GENÉTICA

30. Você tem conhecimento de algum defeito de nascimento ou outra desordem genética ou doença hereditária que tenha afetado seus pais, irmãos, irmãs ou seus filhos?

( ) Sim ( ) Não

Se sim, por favor especifique: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

31. Você já teve um filho que tenha nascido prematuramente ou tenha sido abortado?

( ) Sim ( ) Não

32. Você tem um gêmeo idêntico vivo?

( ) Sim ( ) Não

Medicamentos manipulados durante o período de \_\_\_\_\_

Segunda feira:

_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

Terça feira:

_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

Quarta feira:

_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

Quinta feira:

_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

Sexta feira:

_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____