

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



“Implementação de uma metodologia para genotipagem da região promotora do gene do TNF- α e sua aplicação em uma população exposta à sílica”

por

Daniel Santos Souza

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Saúde Pública.

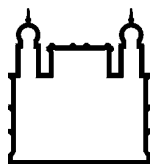
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos

Rio de Janeiro, maio de 2010.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA

SERGIO AROUCA

ENSP

Esta dissertação, intitulada

“Implementação de uma metodologia para genotipagem da região promotora do gene do TNF- α e sua aplicação em uma população exposta à sílica”

apresentada por

Daniel Santos Souza

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Eduardo Mere Del Águila

Prof. Dr. Sergio Rabello Alves

Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos – Orientadora

Dissertação defendida e aprovada em 07 de maio de 2010.

Catálogo na fonte

Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica

Biblioteca de Saúde Pública

S729 Souza, Daniel Santos

Implementação de uma metodologia para genotipagem da região promotora do gene do TNF- α e sua aplicação em uma população exposta à sílica. / Daniel Santos Souza. Rio de Janeiro: s.n., 2010.

80 f., il., tab., graf.

Orientador: Mattos, Rita de Cássia Oliveira da Costa

Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2010

1. Poluentes Ocupacionais do Ar - toxicologia. 2. Exposição Ocupacional. 3. Polimorfismo Genético. 4. Dióxido de Silício - toxicidade. 5. Silicose - genética. 6. Fator de Necrose Tumoral Alfa - genética I. Título.

CDD - 22.ed. - 363.11

"Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende".
João Guimarães Rosa

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus, por ter estado do meu lado nos vários momentos difíceis que passei no decorrer desta caminhada, não me deixando desistir.
 - Aos meus pais, Creuza e Jarde, por sempre me apoiarem e incentivarem, por serem meus heróis e minha referência, tanto na minha vida profissional quanto pessoal. Amo muito vocês...
 - À minha querida esposa, que soube compreender os momentos difíceis dessa caminhada e por tê-la feito mais fácil. Por ter mantido seu sorriso lindo e seu bom humor ao meu lado. Por ter sido uma companheira perfeita. Amo você...
 - Ao meu querido Átila, por ter estado ao meu lado em cada momento da escrita deste trabalho e por se comportar como se estivesse entendendo tudo o que eu dizia e sentia. Amo você...
 - Ao meu querido avô Geraldo, que me ensinou muito do que é ser uma pessoa com caráter e como devemos amar as pessoas. Gostaria muito que você ainda estivesse ao meu lado. Amo você...
 - À minha querida avó Carmem, que sempre foi doce e meiga, mesmo tendo passado por momentos tão difíceis. Gostaria muito que você ainda estivesse ao meu lado. Amo você...
 - À minha querida avó Esmeralda, que sempre foi minha mãe e uma das grandes responsáveis por eu ter chegado até aqui. As sextas-feiras serão sempre suas, minha linda. Amo você...
 - À minha orientadora Rita, pela grande oportunidade, dedicação e amizade, por ter me recebido com grande carinho como orientando e me ensinado muito em minha vida profissional e pessoal.
 - Ao amigo Moacélio, pela dedicação, pela atenção, orientação e ajuda, que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho. Muito obrigado.
 - Ao amigo Lelê, por ter sido muito mais que um chefe nesse difícil período.
 - Ao amigo Flávio, por estar presente quando poucos estavam, me ajudando muito mais do que precisava.
 - Ao Mário, por toda a ajuda, fundamentais para a realização desse trabalho.
-

- Aos meus colegas (novos amigos): Helena, Ana Luiza, Isabele, Leandro, Vinício, Murata, Francisco, Juliana, por todo o conhecimento compartilhado, os momentos alegres e não tão alegres.
 - Ao Ely, em especial, por toda ajuda prestada na realização deste trabalho.
 - Aos professores e amigos do mestrado, em especial à Débora, Bia, Deise e Dani, que me auxiliaram muito no cumprimento dessa jornada.
 - À amiga Dani, em especial, por ter estado ao meu lado em vários momentos de dificuldade, sempre me ajudando mais do que precisava. Muito obrigado.
 - A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade.
-

RESUMO

A silicose é uma pneumoconiose provocada pela inalação da poeira de sílica e consiste em uma lesão pulmonar com participação de citocinas como o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α). Há dois polimorfismos nos sítios -238 e -308 do promotor do gene da TNF- α (substituição de uma guanina por uma adenina) que têm sido investigados como possíveis fatores de susceptibilidade para a silicose. A mutação na posição -308 tem sido associada com altos níveis da citocina no sangue, enquanto que a posição -238, com formas mais graves da doença. A exposição ocupacional à sílica continua sendo um problema de Saúde Pública no Brasil. O Centro de Estudos de Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEh)/FIOCRUZ acompanha trabalhadores do Rio de Janeiro expostos à sílica. Este trabalho teve como objetivo a implementação de uma metodologia para determinação do polimorfismo dos sítios -308 e -238 do promotor da TNF- α para futura utilização na avaliação da exposição à sílica. A genotipagem foi feita através da técnica de PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism) usando NcoI para -308 e BamHI para -238. Foram realizados ensaios para a implementação da metodologia, sendo esta aplicada em uma amostra populacional de 79 trabalhadores assistidos no ambulatório do CESTEh, sendo todos do sexo masculino e maiores de 18 anos. Como resultados foram fixadas as seguintes condições (para ambos os sítios): 100ng de DNA extraído de 500 μ L de sangue total é utilizado como molde para a PCR, junto com 1,5U de Taq-DNA Polimerase Recombinante em um volume final de 50 μ L. Como *primers*, foram usados: 5'AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT e 5'TCCTCCCTGCTCCGATTCCG como senso e antisenso para -308 e 5'AAACAGACCACAGACCTGGTC e 5'CTCACACTCCCCATCCTCCCGGATC para -238. Os parâmetros da PCR para -308 foram: 35 ciclos de 94°C/40s, 60°C/50s e 72°C/60s, gerando um fragmento de 107pb; sítio -238: 35 ciclos de 94°C/40s, 58°C/90s e 72°C/60s, gerando um fragmento de 165 pb. Na digestão foi utilizada a proporção de 5U da enzima para cada 1 μ g de DNA, sendo incubada a 37°C por 1 hora. Os indivíduos com o alelo mutante perdem o sítio atacado pela enzima de restrição. Os trabalhadores genotipados para o sítio -308 apresentaram 16,4% (n=13) para o genótipo GA, 82,3% (n=65) para GG e 1,3% (n=1) para o genótipo AA. O sítio -238 apresentou as frequências de 2,3% (n=2) para GA, 97,7% (n=77) para GG e zero para AA. Nesse estudo, demonstrou-se que a presença do alelo mutante (A) está associada a maiores quantidades da citocina no sangue. Não foram encontradas diferenças significativas entre as médias da enzima GST e a presença ou não do alelo mutante. A presença do alelo -308A apresentou ainda um risco relativo de 3,697 para o desenvolvimento de silicose. A implementação de um método toxicogenético permite a identificação de possíveis determinantes de suscetibilidade individual ao desenvolvimento da doença, aumentando o alcance das avaliações da saúde do trabalhador.

ABSTRACT

Silicosis is a pneumoconiosis caused by inhalation of silica dust and consists of a lung injury with participation of cytokines, such as Tumor Necrosis Factor *alpha* (TNF- α). There are two polymorphisms at sites -238 and -308 of the gene promoter in TNF- α (replacement of a guanine-adenine), which have been investigated as possible factors of susceptibility for silicosis. The mutation at position -308 has been associated with high levels of cytokine in the blood, while at -238 with severe forms of the disease. Occupational exposure to silica remains a public health problem in Brazil. The Center for Studies on Workers' Health and Human Ecology (CESTEH) / FIOCRUZ follows Rio de Janeiro's workers exposed to silica. This study aimed to implement a methodology for determining the polymorphism of sites -308 and -238 of the promoter of TNF- α for future use in the assessment of exposure to silica. Genotyping was made by PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism) using NcoI for -308 and BamHI for -238. Tests were performed for implementing the methodology, which was applied in 79 employees assisted by CESTEH, all male and aged over 18. After the tests, the following conditions were fixed for both sites: 100ng of DNA, extracted from 500 μ L of whole blood, were used as template for PCR with 1.5 U of Taq-DNA Polymerase Recombinant and a final volume of 50 μ L. The *primers* were: 5'AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT and 5'TCCTCCCTGCTCCGATTCCG as sense and antisense to -308 and 5'AAACAGACCACAGACCTGGTC and 5'CTCACACTCCCCATCCTCCCGGATC to -238. The PCR parameters for -308 site were: 35 cycles using 94°C/40s, 58°C/90s and 72°C/60, generating a fragment of 107 pb. The PCR parameters for -238 site were; 35 cycles using 94°C/40s, 58°C/90s and 72°C/60s, generating a fragment of 165 pb. The digestion was made with 5U of endonuclease for 1mg of DNA incubated at 37°C for 1 hour. Individuals with the mutant allele lose the site which is attacked by the restriction enzyme. Workers genotyped for the -308 site showed 16.4% (n = 13) for the GA genotype, 82.3% (n = 65) for GG and 1.3% (n = 1) for the genotype AA. The -238 site showed the frequencies of 2.3% (n = 2) for GA, 97.7% (n = 77) for GG and zero for AA. This study shows that the presence of the mutant allele (A) is associated with greater amounts of cytokine in the blood. There were no significant differences between the means of the enzyme GST and the presence of the mutant allele. The presence of the -308 mutant allele also showed a relative risk of 3,697 for the development of silicosis. The implementation of a toxicogenetic method allows the identification of possible determinants of individual susceptibility to disease development, increasing the reach of the evaluations of occupational health.

LISTAS DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 - Valores de LEOs recomendados para a sílica.	17
Tabela 2 - Resumo dos experimentos realizados no processo de implementação da metodologia para genotipagem dos polimorfismos dos sítios -238 e -308 da região promotora do TNF- α	41
Tabela 3 - Relação entre o histórico de tuberculose e as formas mais graves de silicose.	45
Tabela 4 - Distribuição genotípica dos polimorfismos nas posições -238 e -308 da região promotora do gene do TNF- α em relação à silicose.	47
Tabela 5 - Indicadores biológicos e sua relação com a presença do alelo mutante em ambos os sítios.	50
Tabela 6 - Polimorfismo x Categoria Sítio -308.	52

Figura 1 - Amplificação dos fragmentos polimórficos dos sítios -238 e -308 da região promotora do gene de TNF- α	36
Figura 2 - Digestão por endonucleases de restrição dos fragmentos polimórficos dos sítios -238 da região promotora do gene de TNF- α depois de amplificados.	38
Figura 3 - Genotipagem do polimorfismo do sítio -238 da região promotora do gene do TNF- α por digestão pela enzima BamHI.	39
Figura 4 - Genotipagem do polimorfismo do sítio -308 da região promotora do gene do TNF- α por digestão pela enzima NcoI.	39
Figura 5 - Distribuição das categorias de silicose	44

ABREVIATURAS

A	Adenina
ABHO	Associação Brasileira de Higienistas Ocupacionais
ACGIH	<i>American Conference of Governmental Industrial Hygienists</i> (Conferência Americana de Higienistas Industriais Governmentais)
ATS	<i>American Thoracic Society</i> (Sociedade Americana Torácica)
CEP	Conselho de Ética em Pesquisa
CESTEH	Centro de Estudo da Saúde Trabalhador e Ecologia Humana
CPH	Complexo Principal de Histocompatibilidade
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucléico)
dNTP	<i>Deoxyribonucleotide Phosphate</i> (Desoxirribonucleotídeo Fosfatado)
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca
ERO	Espécie reativa de oxigênio
EPIs	Equipamentos de Proteção Individual
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Gramas
G	Guanina
GF	<i>Growth Factors</i> (Fatores de Crescimento)
GST	Glutathionas S-Transferases
GSTM1	Glutathiona S-Transferase M1
GSTP1	Glutathiona S-Transferase P1
GSTT1	Glutathiona S-Transferase T1
h	Hora
IARC	International Agency for Research on Cancer (Agência Internacional de Pesquisa do Câncer) □
IC	Intervalo de Confiança

IFN	Interferon
IL	Interleucina
ILO	<i>International Labour Organization</i> (Organização Internacional do Trabalho)
Kb	Quilobases
LEO	Limite de Exposição Ocupacional
M	Molar
mA	Miliampéres
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
n	Número
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NIOSH	<i>National Institute for Occupational Safety and Health</i> (Instituto Nacional de Saúde e Segurança Ocupacional)
NR-6	Norma Regulamentadora 6
NR-15	Norma Regulamentadora 15
O₂	Gás Oxigênio
OSHA	<i>Occupational Safety & Health Administration</i> (Administração de Segurança e Saúde Ocupacional)
pb	Par de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PCR-RFLP	<i>Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição)
PEL-TWA	<i>Permissible Exposure Limit-Time-Weighted Average</i> (Limite de Exposição Permitida – Tempo de Exposição Tolerada)
PNES	Programa Nacional de Eliminação da Silicose

RAIS	Relação Anual de Informações Sociais
REL-TWA	<i>Recommended Exposure Limit - Time-Weighted Average</i> (Limite de Exposição Recomendada – Tempo de Exposição Tolerada)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucléico)
s	Segundos
SiO₂	Sílica
SNPs	<i>Single Nucleotide Polimorphisms</i> (Polimorfismo de Base Única)
t.a.	Temperatura Ambiente
TEL- TWA	<i>Permissible exposure limit-time-weighted average</i> (limite de exposição permitido - tempo de exposição tolerada)
TLV-TWA	<i>Threshold limit value- limit-time-weighted average</i> (limite de tolerância - tempo de exposição tolerada)
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de Necrose Tumoral)
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> (Fator de Necrose Tumoral alfa)
TNF-β	<i>Tumor Necrosis Factor beta</i> (Fator de Necrose Tumoral beta)
U	Unidades
UFF	Universidade Federal Fluminense
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)
μg	Microgramas
μL	Microlitros
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
°C	Grau Celcius
χ^2	Chi-Quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Aspectos gerais	12
1.2	A Sílica	13
1.3	Exposição ocupacional à sílica	14
1.4	Silicose	18
1.4.1	Pneumoconiose	18
1.4.2	Fisiopatologia e mecanismos celulares da silicose	19
1.4.3	Manifestações clínicas e alterações histopatológicas	21
1.4.4	Diagnóstico	22
1.5	Susceptibilidade genética a silicose	23
1.6	Fator de necrose tumoral (TNF)	23
1.7	Polimorfismos -238 e -308 da região promotora do gene TNF- α	25
2	OBJETIVOS	26
2.1	Geral	26
2.2	Específicos	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Delineamento do estudo	27
3.2	Reagentes e equipamentos	27
3.3	Implementação das metodologias para determinação dos polimorfismos -238 e -308	28
3.3.1	Extração de DNA	29
3.3.2	Genotipagem do sítio -238	29
3.3.3	Genotipagem do sítio - 308	31
3.4	Aplicação da metodologia na população	32
3.4.1	População	32
3.4.2	Avaliação física e clínica	32
3.4.3	Determinação dos genótipos -238 e - 308	33
3.4.4	Estatística	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	Implementação da genotipagem	34
4.1.1	Extração de DNA genômico	34
4.1.2	Amplificação do DNA	34
4.1.3	Digestão do DNA	37
4.2	Avaliação da população estudada	43
4.2.1	Características sócio-demográficas da população e silicose	43
4.2.2	Genotipagem da população de trabalhadores expostos à sílica	46
4.2.3	Indicadores biológicos	49
4.2.4	Polimorfismo e categorias de silicose	52
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
6	CONCLUSÕES	55
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

Dois dos principais elementos químicos mais abundantes no planeta são o oxigênio e o silício. A união destes dois elementos forma o dióxido de silício (SiO_2), composto natural conhecido como sílica. Sua manipulação é muito comum em diferentes ramos da economia brasileira, como mineração, jateamento de areia, indústria de cerâmica e abrasivos, escavação de poços, pedreiras, moagem de granito, fundição e lapidação de pedras. Todas essas ocupações profissionais podem apresentar etapas no processo que geram uma nuvem de partículas em suspensão com alto teor de sílica. A exposição à poeira de sílica pode levar ao desenvolvimento de várias doenças, tais como câncer de pulmão, insuficiência renal, aumento do risco de tuberculose pulmonar, doença pulmonar obstrutiva crônica e silicose ⁽¹⁾. A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) tem classificado a sílica como substância cancerígena para humanos desde 1997 ⁽²⁾.

Uma das principais pneumopatias ocupacionais presentes no país e no mundo é a silicose. A silicose tornou-se uma doença de grande importância em função do aumento da morbidade e, em alguns casos, da mortalidade, tendo ocorrido principalmente entre os trabalhadores de jateamento de areia. Este fato acabou por estimular a busca por um maior entendimento dos processos biológicos, epidemiológicos e sanitários envolvidos com a doença ^(2, 3).

No Brasil, a silicose tem se configurado como a pneumoconiose com maior prevalência do país. Não existe uma dimensão exata da exposição ocupacional à sílica, em função da falta de inquéritos de avaliação ambiental que permitam a configuração da situação a nível nacional ⁽⁴⁾.

Segundo as estimativas feitas pelo estudo de Ribeiro, 2004 ⁽⁵⁾, cerca de 5.447.828 trabalhadores são expostos à sílica com frequência superior a 1% da jornada de trabalho semanal no Brasil. Ainda segundo o mesmo trabalho, o número de trabalhadores expostos representou 14,6% do total quantificado no setor formal, tendo sido utilizado como fonte de dados a Relação Anual das Informações Sociais ⁽⁶⁾. Um outro estudo de Ribeiro, 2008 ⁽²⁾, demonstra ainda a maior prevalência de trabalhadores definitivamente expostos à sílica o Brasil quando comparada a de países europeus. Estas informações permitem a percepção de que, apesar dos avanços no campo de segurança do trabalho e das alternativas

técnicas à utilização de processos que gerem a poeira de sílica, a exposição de trabalhadores a este agente tóxico ainda é muito frequente em nosso país ⁽³⁾. Sua importância é tamanha que em 1997 foi criado o “Manual de Normas para o Controle das Pneumoconioses” e o “Programa Internacional da ILO/WHO (International Labour Organization/World Health Organization) para a Eliminação Global da Silicose” ^(7, 8).

Por conta desta ampla distribuição e participação da sílica no ambiente laboral de significativa parcela da população brasileira, levando em conta ainda seus potenciais efeitos danosos à saúde humana, ficam claros os riscos da exposição ocupacional a esse agente e sua caracterização como um grave problema de Saúde Pública.

1.2 A Sílica

A sílica é uma expressão utilizada para denominar um grupo de compostos formados por dióxido de silício, composto binário formado por silício e oxigênio (SiO_2). Pode ter origem mineral, sintética ou ainda ser produzida por organismos vivos. Cerca de 60% de toda a crosta terrestre é formada por sílica, podendo se apresentar na forma livre, na forma de silicatos (quando combinada com óxidos metálicos) e em rochas. Quanto à sua estrutura podemos ter duas classificações: cristalina e amorfa ⁽⁹⁾.

A forma cristalina é o componente predominante na crosta terrestre. Estes compostos se unem a outros de igual geometria molecular, formando compostos cuja fórmula mínima é SiO_2 . Devido a diferentes arranjos estruturais, diferentes formas da sílica podem ser encontradas na natureza como o quartzo, a cristobalita, o silicato, a trimidita, a noganita, a kealita, dentre outras. As diferenças na estrutura da sílica cristalina, bem como diferenças em sua composição resultam em distintas propriedades físico-químicas, como solubilidade, morfologia e características de superfície do composto ^(9, 10).

A sílica amorfa pode ser encontrada na sua forma natural (opala), como sílica biogênica (proveniente de organismos vivos) e como sílica vítrea (formada pela fusão de materiais que contém silício) ⁽¹¹⁾.

As formas de quartzo e cristobalita da sílica cristalina inaladas são consideradas carcinogênicas desde 1997, sendo classificadas como pertencentes ao

Grupo 1 e tendo importante participação na exposição ocupacional à sílica ⁽¹¹⁾. Quando comparada com a forma cristalina, a sílica amorfa apresenta-se menos tóxica, com menor potencial fibrinogênico no pulmão ^(1, 12), sendo classificada como não cancerígena – Grupo 3 – para humanos ⁽¹¹⁾. Particulados da forma cristalina com superfície recém-fraturada apresentam maior toxicidade às células do pulmão do que as que apresentam superfícies definidas há algum tempo ⁽¹³⁾.

1.3 Exposição ocupacional à sílica

Várias são as atividades econômicas onde ocorre a exposição ocupacional à poeira que contém a sílica cristalina. Alguns dos principais setores são: mineração, construção civil, indústria de cerâmicas e indústria naval. O jateamento de areia na indústria naval configurou um dos principais processos de exposição ocupacional à poeira de sílica no estado do Rio de Janeiro. Sua prática acabou por ser proibida pela Lei nº 1979, de 23 de março de 1992 ⁽¹⁴⁾.

Apesar de não existirem estudos que determinem valores exatos, uma estimativa do número de trabalhadores expostos à sílica ocupacionalmente gira em torno de seis milhões, estando grande parte concentrada na construção civil, mineração e garimpo. Mais de 30% desses trabalhadores ocupam os setores de metalurgia, indústrias de cerâmicas e vidro ^(1, 2).

Apesar da abrangência de processos laborais que utilizam materiais silicogênicos, os riscos inerentes podem ser reduzidos por algumas medidas de controle do ambiente de trabalho. A utilização de equipamentos de proteção individual (EPIs) respiratórios adequados, a compartimentalização e sinalização de processos que geram sílica livre respirável ou até mesmo a mudança de matéria prima ou adoção de processos que não a produzam, a correta higienização do ambiente de maneira que não ocorra a suspensão da poeira, programas de cunho preventivo tanto de equipamentos como de comportamento aliados a um eficiente monitoramento do ambiente laboral são os principais fatores que podem levar à diminuição da prevalência da silicose ⁽¹⁵⁾.

No Brasil, as Normas Regulamentadoras relativas à Segurança e Medicina do Trabalho, instituídas pela portaria Nº 3214, regulamentando a Lei Nº 6514, de 22 de dezembro de 1977, representam uma legislação específica que determina uma série de avaliações ambientais e de saúde nos setores definidos como de risco ⁽¹⁾.

A utilização de máscaras ou respiradores é uma das primeiras providências a serem tomadas na redução da exposição a poeiras em ambiente de trabalho. Essa recomendação é regulada pela NR-6, na qual o respirador provém o trabalhador de ar respirável em um ambiente com baixas concentrações de oxigênio. Para que a máscara seja capaz de filtrar poeiras é necessário que possua um filtro mecânico capaz de reter a fração particulada específica ⁽¹⁶⁾.

No caso da exposição à sílica, a NR-15 estabelece os Limites de Exposição Ocupacional (LEO) à poeira de sílica cristalina. Esses limites deveriam ser adotados como valores guia no controle da exposição ⁽¹⁷⁾. No entanto o Brasil, assim como outros países, acaba por adotar tais valores como limites previstos em lei, o que dificulta sua atualização em função de novas descobertas científicas, levando os trabalhadores a serem expostos a concentrações que oferecem alto risco à saúde, apesar de estarem dentro dos limites estabelecidos por lei ^(18, 19).

Atualmente, os LEOs utilizados como referência são valores médios relacionados com a duração das jornadas de trabalho diárias ou semanais, não existindo um valor fixo e de caráter universal. Os limites adotados nos diferentes países são de cunho próprio ou baseados nos valores de diferentes instituições como NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health), ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) e OSHA (Occupational Safety & Health Administration).

A NIOSH estabeleceu em 1974 a REL, Recommended Exposure Limit, de 0,05 mg/m³, fazendo referência às exposições às formas de sílica cristalina, quartzo, tridita e cristobalita. Esse valor foi revisado em 2002, baseado em estudos epidemiológicos, levando a NIOSH a assumir que aproximadamente de 1 a 7 trabalhadores em cada 100 poderiam ser portadores de silicose, sendo estes expostos a uma concentração de sílica cristalina de 0,025 mg/m³, o que representa metade do LEO proposto. Apesar dessas evidências, em função da impossibilidade de análise apurada desses novos dados, o limite de 1974 é mantido até hoje pela NIOSH ⁽¹²⁾.

A classificação da sílica cristalina na forma de quartzo como sendo cancerígena, fez com que ACGIH, em 2000, reduzi-se o valor da LEO de 1,0 mg/m³ para 0,05 mg/m³. Assim como a NIOSH, demonstrou uma intenção em 2004 de modificar o valor de TLV-TWA, Threshold Limit Values-Time-Weighted

Average, também da forma de sílica cristalina na forma de quartzo, para 0,025 mg/m³ (20, 21, 22).

Os limites de tolerância brasileiros para exposição ocupacional à sílica cristalina na forma de quartzo foram baseados nas recomendações da ACGIH publicadas em 1974 ⁽¹⁸⁾, sendo válido desde 1978, no Anexo 12 da NR 15 e corrigido para a jornada de trabalho de 48 horas semanais ⁽²³⁾. Na Tabela 1 são apresentados alguns exemplos de valores de LEO para poeiras respiráveis.

Tabela 1 - Valores de LEOs recomendados para a sílica.

Dados de 2005 de instituições dos Estados Unidos da América e do Ministério do Trabalho do Brasil (Adaptado de Tibiriçá, 2006).

Instituição	Nomeclatura	Substância	LEO (mg/m ³)
NIOSH	REL-TWA <i>(recommended exposure limit-time-weighted average)</i>	Sílica cristalina na forma de quartzo, tridimita ou cristobalita como poeira na fração respirável	REL= 0,05
	Jornada 10 horas diárias ou 40 horas semanais		
OSHA	PEL-TWA <i>(permissible exposure limit-time-weighted average)</i>	Sílica cristalina respirável na forma de quartzo	PEL= 10/ %SiO ₂ + 2
	Jornada 8 horas diárias ou 40 horas semanais	Sílica cristalina respirável na forma de tridimita ou cristobalita	PEL= metade do valor calculado para quartzo
ACGIH	TLV-TWA <i>(threshold limit value-limit-time-weighted average)</i>	Sílica cristalina respirável na forma de quartzo, tridimita ou cristobalita	TLV= 0,05
	Jornada 8 horas diárias ou 48 horas semanais		
TEM ¹	Limite de tolerância	Sílica cristalina respirável na forma de quartzo como poeira na fração respirável	LT= 8/ %SiO ₂ +2
	Jornada 8 horas diárias ou 48 horas semanais		

¹Ministério do Trabalho e Emprego/BrasilNR-15, Anexo 12

1.4 Silicose

1.4.1 *Pneumoconiose*

A silicose é a mais prevalente das pneumoconioses ^(24, 1, 2). O termo pneumoconiose foi proposto por Zenker em 1866 e caracteriza uma doença pulmonar provocada pela inalação de poeiras minerais em ambiente ocupacional ⁽²⁵⁾. As doenças são conhecidas pelo principal agente causador, sendo as principais: a silicose, asbestose, talcose, estanhose, dentre outras ⁽¹⁾. De maneira geral, as pneumoconioses podem ser divididas em dois tipos: fibrogênicas e não fibrogênicas.

Empregado pela primeira vez em 1870 por Visconti ⁽¹⁾, o termo silicose refere-se a uma pneumoconiose fibrogênica incurável, pois se trata de uma reação pulmonar à inalação de poeira contendo particulados de sílica cristalina que levam à fibrose intersticial irreversível do parênquima pulmonar. É uma doença crônica, geralmente com o surgimento de sintomas tardiamente. Como principais características temos alterações radiológicas irreversíveis, que podem evoluir independentemente de novas exposições. Sintomas como dispnéia (falta de ar) e tosse podem aparecer após a detecção das alterações radiológicas, podendo ainda evoluir para quadros de insuficiência respiratória ⁽¹⁸⁾.

Apesar de alguns programas de controle ambiental e de uso de proteções individuais, bem como modificações do processo industrial, a silicose ainda se apresenta como um importante problema de Saúde Pública. Baixos investimentos em fiscalização e controle dos processos de trabalho, bem como o não conhecimento do risco por parte dos trabalhadores e um programa médico de atenção não adequado acaba por impossibilitar a erradicação da doença ⁽³⁾.

O risco de desenvolvimento da doença está relacionado com uma série de fatores. São exemplos o tamanho das partículas de sílica (as partículas menores que 5µm de diâmetro possuem maior penetrância nas vias respiratórias inferiores, sendo, portanto, mais tóxicas), suas características físico-químicas, concentração destas no ar inalado, tempo de exposição dentre outros ⁽²⁷⁾.

É importante ainda observar que, uma vez instalada, a doença é irreversível, sendo progressiva na maioria dos casos mesmo que o indivíduo se afaste da(s) fonte(s) de contaminação ⁽¹⁹⁾.

Nos países periféricos do sistema econômico, onde as condições de trabalho se apresentam de forma precária, quando existentes, os valores de morbidade e mortalidade podem se apresentar altos ⁽²⁸⁾. Muitos pesquisadores têm demonstrado significativos valores de prevalência de silicose em países como a África do Sul, China, Índia e Brasil ^(29, 30, 31, 18). Isto revela a necessidade de uma maior atenção ao problema, buscando um maior controle da exposição assim como diagnósticos mais precisos e abrangentes.

No Brasil, as informações sobre o número de indivíduos com silicose são muito escassas, geralmente se referindo a alguns ramos específicos da economia. Dados da maior casuística nacional de silicose, por exemplo, são oriundos da mineração de ouro subterrâneo em Minas Gerais, com um surpreendente registro de cerca de 4 mil casos ⁽³²⁾. Outros estudos publicados relatam percentuais de prevalência que variam de 3,5% em pedreiras a 23,6% no setor da indústria naval ^(33, 2).

1.4.2 Fisiopatologia e mecanismos celulares da silicose

Fisiopatologicamente, a silicose pode ser explicada, de maneira geral, como um processo inflamatório crônico nos alvéolos (alveolite). Neste processo células inflamatórias e do sistema imunológico são ativadas, liberando mediadores tóxicos, provocando, ao final, fibrose na arquitetura pulmonar. Tal fibrose é provocada em função do acúmulo de produtos do tecido conjuntivo, podendo ainda transformar células pulmonares normais em células tumorais ⁽³⁴⁾.

Ao serem inaladas, as partículas de sílica chegam aos espaços alveolares e entram em contato direto com a água, lipoproteínas e macrófagos presentes na camada de revestimento do espaço bronquioalveolar, provocando a formação e liberação de radicais livres. A maioria das partículas exógenas, ao chegar nos espaços alveolares, é combatida pela ação de anticorpos e enzimas lisossomais de células de defesa. Entretanto, as partículas de sílica não são susceptíveis a tais mecanismos imunológicos e desencadeiam complexos processos celulares e moleculares que levam ao desenvolvimento da fibrose, o que prejudica as trocas gasosas pelo parênquima pulmonar ⁽³⁵⁾.

Atualmente, a exata sequência de eventos que levam ao desenvolvimento da doença após a inalação da sílica não é bem conhecida, mas acredita-se que o

macrófago alveolar desempenhe um papel central, visto que é o primeiro tipo celular a ter um contato significativo com as partículas de sílica, sendo de grande importância nos estudos sobre silicose ⁽³⁶⁾.

A endocitose de sílica por macrófagos alveolares leva à morte dessas células devido à ativação da cascata de reações que levam a apoptose ^(37, 38), o que libera a sílica intracelular novamente para o espaço extracelular. Desta forma, permite-se sua ingestão por outro macrófago, gerando fagocitoses cíclicas que provocam a continuidade do processo ⁽³⁹⁾. Concomitantemente, há a liberação de vários mediadores inflamatórios por macrófagos, fibroblastos e células epiteliais, como proteases, citocinas, metabólitos do ácido aracdônico, além de espécies reativas de oxigênio (ROS) ^(40, 41). Tais compostos provocam o recrutamento de outras células inflamatórias da parede alveolar e da superfície epitelial do alvéolo, provocando a alveolite.

A liberação continuada de ROS e proteases pelas células recém recrutadas acaba por provocar a destruição da matriz extracelular ^(42, 43, 44). Através da ativação desses agentes oxidantes em excesso ocorrem as lesões típicas do parênquima pulmonar que caracterizam a silicose. Além disso, é considerado um importante fator do processo carcinogênico relacionado a deposição de poeiras nos alvéolos, visto que apresentam alta capacidade de lesar o DNA ⁽⁴⁰⁾.

Após o processo inflamatório e o dano celular, o organismo entra em uma etapa de restauração do tecido lesado. No decorrer dessa cascata de eventos há uma reparação da matriz extracelular do tecido conjuntivo, com intensa produção de fibras colágenas, proteoglicanas e fibronectina. Os macrófagos pulmonares, mediante estímulo adequado, são capazes de produzir polipeptídeos que funcionarão como mediadores de crescimento para células mesenquimais. Na silicose, os mediadores podem incluir citocinas fibrogênicas, como o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e a Interleucina 1 (IL-1), o que acaba por ampliar o processo fibrótico ⁽⁴⁵⁾.

Estudos feitos em animais demonstram que o tratamento com sílica fibrogênica sempre leva a algum tipo de dano celular com modificações do epitélio bronquiolar ou alveolar típicas de hiperplasias ⁽⁴⁶⁾. Dessa maneira, o câncer de pulmão se apresenta como um possível e importante desfecho relacionado à exposição à sílica, estreitando sua possível relação com a silicose.

1.4.3 Manifestações clínicas e alterações histopatológicas

Existem várias manifestações clínicas da silicose, como a silicose simples ou nodular, a silicose aguda (silicoproteinose), fibrose massiva progressiva e a fibrose intersticial difusa ^(43, 47). De maneira geral podemos dividi-las em três tipos: aguda, crônica e acelerada ⁽⁴⁸⁾. A forma aguda é provocada por elevadas exposições a partículas de sílica recém quebradas (como ocorre no jateamento de areia), que manifesta-se geralmente após poucos meses de exposição com rápida evolução para o óbito. Os sintomas mais comuns são dispnéia intensa, astenia, perda de peso e hipoxemia. Em exames radiográficos são encontrados espessamento septal liso nas áreas alteradas e imagem de condensação com distribuição geográfica ou regional ⁽¹⁾. Quanto às alterações histopatológicas, observam-se lesões de pneumócitos tipo I, presença de exsudado lipoprotéico no espaço alveolar e aumento de pneumócitos tipo II ⁽⁴⁹⁾.

A forma acelerada é aquela na qual as manifestações clínicas ocorrem após o período de 5 a 10 anos de exposição. As modificações clínicas e de imagens são similares à forma crônica, apresentando, no entanto, nódulos silicóticos como principal alteração patológica ⁽⁴⁹⁾.

Como forma mais comum das manifestações da silicose temos a crônica, que ocorre geralmente após período de exposição superior a 10 e 15 anos. Assintomática em seu início pode evoluir para um quadro muito comum de dispnéia progressiva. Exames por imagem podem revelar a presença de infiltrado micronodular bilateral em estágios iniciais, podendo haver coalescência desses nódulos com a progressão da doença, gerando a chamada fibrose maciça progressiva. Exames tomográficos podem revelar ainda áreas com enfisema, micronódulos centrolobulares e subpleurais e aumento de linfonodos ^(49, 50). A principal alteração histopatológica é o típico nódulo silicótico, que pode ser encontrado no interstício pulmonar, ao redor de bronquíolos e de vasos, em regiões subpleurais, na pleura e em linfonodos. Tal nódulo é caracterizado por partículas de sílica circundadas de forma concêntrica por fibras colágenas envoltas em reticulina, macrófagos e infiltrado linfocitário ⁽⁵¹⁾.

1.4.4 Diagnóstico

Além da análise das alterações radiológicas já citadas, o histórico da exposição ocupacional do indivíduo é de fundamental importância. O conhecimento das características da exposição e de outros possíveis fatores de risco ou de susceptibilidade permite a elaboração de uma casuística mais sólida, permitindo a determinação da relação entre a exposição e o início dos sintomas⁽²⁶⁾.

Em relação ao diagnóstico por radiografia, são utilizados os padrões radiológicos da OIT/2000, sendo qualificada quanto à profusão (abundância) e tipos de lesão⁽²⁶⁾.

A profusão permite a classificação em três diferentes categorias de 0 a 3, podendo ter ainda 3 subdivisões⁽²⁶⁾.

1. 0/-, 0/0 e 0/1 – Resultados considerados normais, apesar da classificação 0/1 já apresentar pequenas regiões de opacidade, consideradas insuficientes para o diagnóstico;

2. 1/0, 1/1, 1/2, 2/1, 2/2, 2/3, 3/2, 3/3, 3/+ - Essas categorias representam uma escala progressiva de perfusão. A categoria 1 representa uma perfusão baixa, com lesões localizadas mas suficiente para o diagnóstico. A categoria 2 representa o início da alteração do padrão vascular do pulmão, padrão esse totalmente alterado na categoria 3.

As lesões podem ser classificadas ainda quanto sua morfologia, valendo-se de letras como símbolos representativos de diâmetros e espessuras em opacidades redondas (regulares) e lineares (irregulares)⁽²⁶⁾. Para opacidades redondas: p – diâmetro médio inferior a 1,5 mm; q – diâmetro médio entre 1,5 e 3,0 mm; r – diâmetro médio entre 3,0 e 10,0 mm. Em relação às opacidades lineares: s – espessura média inferior a 1,5 mm; t – espessura média entre 1,5 e 3,0 mm. u – espessura média entre 3,0 e 10,0 mm.

A radiografia de um paciente é classificada como silicose quando apresenta resultado mínimo de 1/0⁽⁷⁾. Em casos de falta de informações no histórico de exposição do paciente que permita associar as alterações radiológicas com a inalação da poeira de sílica podem ser indicados a tomografia de alta resolução ou a biópsia pulmonar como uma abordagem contributiva para o diagnóstico de outras possíveis doenças ou formas atípicas de apresentação⁽¹⁾.

1.5 Susceptibilidade genética a silicose

Diversos trabalhos têm relacionado fatores genéticos à susceptibilidade a pneumoconioses. O estudo de associações genéticas a doenças pode vir a ajudar na compreensão da complexa interação entre genes e meio ambiente no desenvolvimento de patologias, funcionando como bioindicadores precoces na avaliação do risco de desenvolvimento da patologia. Diferenças individuais na produção de citocinas estão relacionadas com diferenças genéticas, o que pode contribuir com diferentes respostas imunológicas e distintas suscetibilidades a doenças. Essas diferenças genéticas são chamadas de polimorfismos. Estes estudos procuram demonstrar que alterações de apenas um nucleotídeo em posições específicas da região promotora do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) determinam o padrão de expressão do gene e conseqüentemente de produção da citocina ⁽⁵²⁾.

Ao contrário de mutações, que costumam apresentar baixa frequência na população (menores que 1%), algumas variações alélicas, como Polimorfismos de Base Única (SNPs), têm demonstrado uma associação com o risco de desenvolvimento de doenças em uma série de estudos epidemiológicos ^(53, 54, 55, 30, 52, 56, 57, 58, 59, 60, 61). Essas alterações polimórficas podem provocar vantagens ou desvantagens no metabolismo inerente a certos tipos de patologias, contribuindo na determinação de diferentes susceptibilidades ⁽⁶²⁾. Diferentes atividades celulares podem ser promovidas frente alterações na sequência do DNA codificante ou relacionada ao gene.

No caso da silicose, alterações nos genes responsáveis pela produção das citocinas pró inflamatórias TNF- α e IL-1 tem demonstrado associação com o desenvolvimento de formas mais severas da doença ^(52, 55, 63, 64, 61).

1.6 Fator de necrose tumoral (TNF)

Dentre as substâncias que apresentam grandes possibilidades de serem utilizadas como ferramentas complementares na busca de diagnósticos mais precoces e para identificação de grupos mais sensíveis de populações expostas à sílica estão as citocinas.

Existe uma ampla variedade de definições para as citocinas, dependendo das características observadas em sua ação, podendo ser classificadas como

interleucinas (IL), interferon (IFN), fatores de crescimento (GF), fatores de estimulação do desenvolvimento de colônias e fatores de necrose tumoral.

O Fator de Necrose Tumoral (TNF) é uma forte citocina pró-inflamatória, com papel de mediar a regulação da resposta imunológica em diferentes patologias. O gene do TNF localiza-se no braço curto do cromossomo 6, dentro do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) ^(65, 66). O CPH corresponde a um trecho do cromossomo 6 com 4000 kilobases (kb) onde encontramos vários genes que codificam, além do fator de necrose tumoral, antígenos específicos (complexo de Antígenos Leucocitários Humanos), fatores do sistema complemento e proteínas de Choque Térmico (HSP 70), dentre outros.

As duas moléculas conhecidas são a TNF alfa (TNF- α) e a TNF beta (TNF- β ou linfotoxina). Os efeitos biológicos de ambos são semelhantes, mas a TNF- β geralmente é menos potente quando comparada a TNF- α . A TNF- α é secretada por macrófagos e a TNF- β , preferencialmente por leucócitos.

O TNF- α apresenta funções biológicas variadas e complexas, podendo contribuir para a resistência a doenças ou até mesmo provocando maiores complicações. De maneira geral, tem como função estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para as regiões de inflamação e ativá-los para a eliminação de possíveis microorganismos e substâncias nocivas. Estimula ainda células endoteliais e macrófagos a secretarem fatores quimiotáticos para leucócitos e também pode induzir alguns tipos específicos de célula a apoptose ⁽⁶⁷⁾.

Em algumas situações extremas, o TNF- α pode ser produzido em quantidades massivas, o que leva ao desenvolvimento da síndrome da resposta inflamatória sistêmica, podendo ocasionar alterações no funcionamento de vários órgãos ⁽⁶⁶⁾.

Vários estudos têm demonstrado a relação dos diferentes polimorfismos identificados em regiões próximas ou internas ao loco do gene do TNF com o nível de produção da citocina, o que pode representar modificações importantes na resposta inflamatória de várias doenças, dentre elas a silicose ⁽⁶⁶⁾.

1.7 Polimorfismos -238 e -308 da região promotora do gene TNF- α

O gene do TNF- α apresenta várias áreas polimórficas, sendo que muitas das modificações representam Polimorfismos de Base Única (SNPs – Single Nucleotide Polymorphisms) que podem estar localizados na região promotora do gene ou em seu interior ⁽⁶⁸⁾.

Dentre as SNPs da região promotora, os das posições -238 e -308 têm sido os mais estudados, apresentando importantes associações com susceptibilidades para o desenvolvimento de várias doenças fibróticas, inflamatórias e infecciosas ⁽⁶¹⁾. A alteração nucleotídica nesses sítios consiste na troca de uma base guanina (G) por uma adenina (A).

A variação da posição -308 está associada com o aumento da transcrição do gene da TNF- α ^(68, 69). A presença do alelo -308A (chamado de TNF 2) está associada com a suscetibilidade a várias enfermidades, com altos níveis da citocina circundante no sangue periférico ^(70, 71), conferindo um aumento do risco do desenvolvimento da silicose, independente da severidade da doença ^(72, 64). Já na posição -238, a variante -238A têm sido associada com uma depressão da expressão do gene TNF- α in vitro em alguns tipos celulares, mas não em todas as estudadas ^(73, 74). Seu papel na susceptibilidade a silicose ainda é controverso ^(75, 56). Parece estar associado, assim como a variante -308A, com o desenvolvimento de formas mais graves da doença (sendo mais frequentes nos grupos com silicose) ⁽⁶¹⁾, ou seja, indivíduos com esse polimorfismo estariam predispostos a desenvolver de maneira mais rápida formas mais graves de silicose ⁽⁶³⁾.

Os SNPs das posições -308 e -238 da região promotora têm sido estudados ainda em muitos tipos de câncer ^(66, 76). A variante TNF-308A tem sido associada a um aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama ⁽⁷⁷⁾, Linfoma de não-Hodgkin's ⁽⁷⁸⁾, câncer de próstata ⁽⁷⁹⁾, câncer de endométrio ⁽⁸⁰⁾, carcinoma gástrico ⁽⁸¹⁾, carcinoma hepatocelular ^(82, 83) dentre outros. Trabalhos como o de Jang *et al.*, 2001 ⁽⁷⁵⁾, tentam demonstrar a relação entre a variante TNF-238A e o câncer gástrico. Suas observações demonstraram que a frequência do alelo era muito baixa no grupo com câncer, o que pode evidenciar um efeito protetor.

Importantes associações foram observadas entre os polimorfismos TNF-308 G/A e TNF-238 G/A com o desenvolvimento de câncer de pulmão. A variante TNF-

308A demonstrou um efeito promotor e de progressão da doença. Já a variante TNF-238A representou um efeito protetor para câncer de pulmão ⁽⁵⁸⁾.

Um estudo feito sobre o polimorfismo do TNF- α e sua relação com o câncer, compara a frequência dos alelos TNF-308A e TNF-238A em várias populações do mundo. A frequência de TNF-308A foi de 0.038 na Korea ⁽⁷⁵⁾ e 0.017, 0.14, 0.141, 0.16, 0.16, 0.172 e 0.20 nas populações japonesa, taiwanesa, italiana, gambiana, tunisiana, de americanos caucasianos e sueca, respectivamente ^(84, 85, 86). Já para o alelo TNF-238A, a frequência foi de 0.071 na Korea ⁽⁷⁵⁾ e 0.03, 0.02, 0.063 e 0.09 nas populações japonesa, sueca, italiana e de negros da América do Sul, respectivamente ^(84, 85).

Dessa maneira, os diferentes polimorfismos têm sido associados como fatores de susceptibilidade para diversas patologias que possuem essa citocina como fator participante, incluindo a silicose.

Estudos de exposição a agentes tóxicos são estudos interdisciplinares e multifatoriais. Muitos trabalhos do campo da Epidemiologia nos fornecem informações importantíssimas sobre a relação entre o ambiente social ou ocupacional e a doença. No entanto, muitas vezes não contemplam os conhecimentos sobre mecanismos celulares, biológicos ou genéticos no processo de adoecimento. Neste contexto, entendendo o diálogo entre os diferentes campos e ferramentas de análise como sendo vital no avanço dos estudos da área de Saúde-Trabalho-Ambiente, os estudos biomoleculares no campo da saúde ocupacional ganham grande expressão, demonstrando a importância dos indicadores biológicos para um diagnóstico precoce.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Este trabalho tem como principal objetivo a implementação da metodologia para determinação dos polimorfismos da região promotora do TNF- α , especificamente em dois sítios: -308 e -238, a ser aplicada em uma população de trabalhadores expostos à sílica. Este estudo faz parte de um amplo projeto que visa avaliar os parâmetros toxicogenéticos e relacionados ao estresse oxidativo em

trabalhadores expostos à sílica.

2.2 Específicos

- Implementação de uma metodologia para genotipagem dos sítios -238 e -308 da região promotora do gene da TNF- α através do método de PCR-RFLP;
- Genotipagem dos polimorfismos dos sítios -238 e -308 da região promotora do gene do TNF- α nesta população;
- Associação dos resultados da genotipagem com indicadores biológicos, diferentes estágios da silicose e outras informações sócio-demográficas.
- Aplicação de um questionário a uma população para levantar dados sócio-demográficos e informações sobre a exposição ocupacional à sílica;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Toxicologia e no Ambulatório do Centro de Estudo da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), tendo sido submetido ao Conselho de Ética em Pesquisa (CEP) da ENSP/FIOCRUZ, recebendo aprovação com parecer 95/07. Faz parte de um projeto maior que apresenta como objetivo a avaliação dos parâmetros toxicogenéticos e da resposta ao estímulo oxidativo em trabalhadores expostos à sílica. O anexo 1 apresenta as metodologias utilizadas no projeto para a determinação de Glutathione S-transferase (GST) e Ensaio Cometa ⁽⁸⁷⁾. O anexo 2 apresenta a metodologia utilizada pelo projeto para a dosagem de TNF- α no sangue ⁽⁸⁸⁾.

O trabalho foi dividido em dois momentos: implementação de um método para genotipagem do polimorfismo da região promotora do gene do TNF- α e aplicação deste método em uma amostra populacional.

3.2 Reagentes e equipamentos

Reagentes

- Desoxiribonuclease (DNAase, RNAase free), Invitrogen Life Technologies;
-

- Taq DNA Polimerase, Invitrogen Life Technologies;
- Endonucleases de restrição *NcoI* e *BamHI*, Fermentas Ltd;
- Padrão de tamanho de DNA 100pb (1,0ug/uL). Invitrogen Life Technologies;
- Padrão de tamanho de DNA 50pb (1µg/µL). Invitrogen Life Technologies;
- Desoxinucleosídeos 5'-trifosfato (100mM pH=7,5), Invitrogen Life Technologies;
- Oligonucleotídeos liofilizados (*primers*), Invitrogen Life Technologies;
- Proteinase K (20mg/ml), Invitrogen Life Technologies;
- DNase-free RNase (4mg/mL); Ribonuclease A tipo I-A de pancreas bovino; Sigma;
- Ultra Pure Agarose - Invitrogen Life Technologies.

Equipamentos

- Espectrofotômetro UV-Visível 1601 A, Shimadzu;
- Termociclador PCR Mastercycler, Eppendorf;
- Aparelho de fotodocumentação, DNR MiniBis Pro;
- Transiluminador 3 UVTM, UVP;
- Centrífuga 5415 R, Eppendorf.

3.3 Implementação das metodologias para determinação dos polimorfismos -238 e -308

A padronização dessa metodologia foi baseada no método desenvolvido por Wilson *et al.*, 1992 ⁽⁸⁹⁾. A técnica de genotipagem utilizada foi a de PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism), sendo composta pelas etapas de extração de DNA genômico, amplificação do fragmento polimórfico, purificação do fragmento e digestão enzimática. Diversos parâmetros experimentais foram testados de modo a adequar as metodologias às condições laboratoriais específicas, conforme descrito nos itens 3.3.2 e 3.3.3.

3.3.1 *Extração de DNA*

A técnica de extração utilizada foi baseada no manual de técnicas de laboratório de Sambrook e Russel, 2001⁽⁹⁰⁾, modificado por Mitri, 2003⁽⁹¹⁾, sendo descrito a seguir:

Quinhentos microlitros de sangue total foram adicionados com 1500µL de uma solução tampão de lise de eritrócitos (Tris-HCl 20mM, pH 7,6) seguido de centrifugação a 16.000g por 30s e descarte do sobrenadante. Este procedimento foi repetido e, posteriormente o pellet formado foi tratado com 600µL de tampão de lise celular (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1mM, pH 8,0; SDS 0,1%). Após homogeneização, foram adicionados 7µL de proteinase K (20mg/mL) seguindo-se uma incubação por 2 horas a 56°C. Em seguida foram adicionados 3µL de RNase (4mg/mL) e os tubos foram novamente incubados por 40 minutos a 37°C. A solução obtida foi então tratada com 200µL de acetato de potássio (3M de Potássio e 5M de Acetato) e centrifugada (16.000g/3min/4°C). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e lavado com 600µL de isopropanol e centrifugado em temperatura ambiente por 1 minuto na mesma velocidade. Em seguida foram acrescentados 600µL de etanol a 70% e os tubos foram centrifugados por 1 minuto na temperatura ambiente na velocidade anterior. O precipitado de DNA obtido foi ressuspenso em 100µL de tampão TE (Tris-HCl 10mM, pH 7,6; EDTA 1 mM, pH 8,0).

A concentração da amostra obtida foi determinada por espectrofotometria em 260nm a partir da seguinte relação: 1,0 de Absorvância=50µg/mL de DNA. Ao final, a solução extraída foi estocada a -20°C e posteriormente utilizada como molde na amplificação de ambos os sítios polimórficos, -238 e 308.

3.3.2 *Genotipagem do sítio -238*

3.3.2.1 *Amplificação do fragmento polimórfico do sítio -238*

A amplificação foi realizada através da técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR), utilizando como primers as seqüências descritas a seguir, na concentração de 10µM, segundo Ozen *et al.*, 2002^{1 (60)}:

¹ Condições utilizadas por Ozen *et al.* 2002: 2,5µL de solução tampão da enzima *Taq* polimerase, 1µL de cada *primer*, 2µL de dNTP, 0,2µL de magnésio e 0,2µL de *Taq* polimerase; PCR: desnaturação a 94°C por 3min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 59°C por 1min e extensão a 72°C por 5min.

5'-AAACAGACCACAGACCTGGTC-3'(senso)

5'-CTCACACTCCCCATCCTCCCGGATC-3 (antisenso)

Para determinar as condições ideais do processo de amplificação do DNA por PCR, foram realizados 4 testes experimentais, descritos a seguir:

Experimento 1

Duas quantidades de DNA foram testadas no processo de amplificação: 200ng e 100ng. Os parâmetros fixados no termociclador foram: 35 ciclos de 94°C por 40s, 59°C por 1min e 72°C por 1min ⁽⁶⁰⁾.

Experimento 2

Duas diferentes concentrações de *primers* foram testadas: 0,2µM e 0,4µM (respectivamente 1µL e 2µL de uma solução de concentração 10µM).

Experimento 3

Para aumentar a especificidade da reação foram testadas 3 temperaturas de anelamento distintas: 58°C, 59°C, e 60°C, sendo mantidas constantes todas as outras condições. Foram ainda testados dois diferentes tempos de anelamento (60s e 90s) e dois diferentes números de ciclos (35 e 40).

Experimento 4

Ao final dos experimentos descritos acima, foi organizado um protocolo que foi aplicado em 14 amostras de uma única vez em um mesmo dia.

Os resultados foram analisados e em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo 0,5µg/mL, gerando um fragmento de 165pb.

Após a amplificação, foi realizada purificação do produto de PCR com fenol-clorofórmio (proporção 1:1) e NaCl 5M, obtendo um volume final de 50µL.

3.3.2.2 Digestão por endonucleases de restrição

O produto gerado na PCR com 165pb foi incubado com a enzima de restrição BamHI ⁽⁶⁰⁾. A análise do resultado foi feita por eletroforese em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo 0,5µg/mL.

Foram testados dois diferentes tempos de duração: 1h e *overnight*. A paralização da reação foi feita com a adição de 0,4µL de EDTA 0,5M a 65°C.

3.3.3 Genotipagem do sítio – 308

3.3.3.1 Amplificação do fragmento polimórfico do sítio -308

A amplificação foi realizada através da técnica de PCR, utilizando os *primers* descritos a seguir, na concentração de 10 μ M, segundo Yucesoy *et al.*, 2001b² (64):

5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3' (senso)

5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3' (antisenso)

Para determinar as condições ideais do processo de amplificação do DNA por PCR, foram realizados 3 testes experimentais, descritos a seguir:

Experimento 1

Duas quantidades de DNA foram testadas no processo de amplificação: 200ng e 100ng. Os parâmetros fixados no termociclador foram: 35 ciclos de 94°C por 1min, 60°C por 1min e 72°C por 1min (64).

Experimento 2

Duas diferentes concentrações de *primers* foram testadas: 0,2 μ M e 0,4 μ M (respectivamente 1 μ L e 2 μ L de uma solução de concentração 10 μ M).

Experimento 3

Ao final dos experimentos descritos acima, foi organizado um protocolo que foi aplicado em 14 amostras de uma única vez em um mesmo dia.

Os resultados foram analisados e em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo 0,5 μ g/mL, gerando um fragmento de 107pb.

Após a amplificação, foi realizada purificação do produto de PCR com fenol-clorofórmio (proporção 1:1) e NaCl 5M, obtendo um volume final de 50 μ L.

3.3.3.2 Digestão por endonucleases de restrição

O produto gerado na PCR com 107pb foi incubado com a enzima de restrição NcoI (64). A análise do resultado foi feita por eletroforese em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo 0,5 μ g/mL. Foram testados dois

² Condições utilizadas por Yucesoy *et al.* 2001b: primers a 0,2mM, 1,5mM de MgCl₂, 10mM de Tris-HCl, 50mM de tampão KCl contendo 0,2mM de cada dNTP, 1,25U de *Taq* polimerase e 0,05% de detergente W-1; PCR: 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1min, anelamento a 60°C por 1min e extensão a 72°C por 1min, seguido de 95°C por 1min e 72°C por 5min.

diferentes tempos de duração: 1h e overnight. A paralização da reação foi feita com a adição de 0,4μL de EDTA 0,5M a 65°C.

3.4 Aplicação da metodologia na população

3.4.1 População

A amostra populacional foi composta por trabalhadores atendidos no ambulatório do CESTEH. Após o aceite da participação no estudo através de assinatura de um termo de consentimento, os trabalhadores passaram pelas seguintes etapas: preenchimento de questionários; exame clínico; radiografia do tórax; espirometria; e coleta de amostras de sangue.

3.4.2 Avaliação física e clínica

3.4.2.1 Exame físico e entrevista

Um questionário (Anexo 3) foi aplicado com a finalidade de obtenção de informações sócio-demográficas e sobre o histórico ocupacional de exposição e da saúde do trabalhador, complementadas com o exame físico. Este questionário teve como propósito a avaliação do grau de acometimento dos indivíduos e a evolução clínica dos sintomas, além da identificação de outras co-morbididades e possíveis fatores de confundimento, como o tabagismo, uso de medicamentos e outras possíveis exposições.

3.4.2.2 Exames radiográficos do tórax

Foi utilizada uma técnica radiológica padronizada pela ILO, 2000 ⁽⁷⁾. A radiografia do tórax foi classificada em função da profusão das lesões e do tipo de lesão no parênquima pulmonar, tendo sido divididas em categorias de 0 a 3. As leituras de Raios-X com médias superiores a 1/0 foram consideradas alteradas.

3.4.2.3 Teste espirométrico

Foi realizada espirometria, que, de acordo com a orientação da *American Thoracic Society - ATS* consiste numa expiração forçada até o limite do volume de reserva expiratória, após inspiração máxima. Este teste avalia a função ventilatória de modo a refletir dados sobre a distensibilidade do aparelho respiratório e sobre a

resistência ao fluxo aéreo. É um teste que auxilia na prevenção e permite o diagnóstico e a quantificação dos distúrbios ventilatórios, tendo um importante papel na pneumologia ocupacional ⁽⁹²⁾.

3.4.2.4 Coleta das amostras de sangue

Para a realização das análises dos polimorfismos do TNF- α foram coletados em tubos com EDTA cerca de 10mL de sangue através de punção venosa. As amostras foram acondicionadas a -20°C até o momento das análises.

3.4.3 Determinação dos genótipos -238 e - 308

Os genótipos foram determinados de acordo com a metodologia padronizada neste estudo, que será descrita no capítulo de Resultados e Discussão da padronização da genotipagem.

3.4.4 Estatística

Para todas as análises foi utilizado o programa estatístico SPSS 13. A análise realizada nas comparações entre dois grupos foram o Teste de Fisher e χ^2 .

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Implementação da genotipagem

4.1.1 Extração de DNA genômico

O protocolo de Sambrook e Russel, 2001, modificado por Mitri (2003) mostrou-se eficiente para a extração de DNA genômico a partir de sangue periférico. Foi alcançado um rendimento médio aproximado de 20µg de DNA para cada 100µL de solução final, quantidade suficiente para a realização da amplificação por PCR com menos interferentes. Como volume adequado para a extração ficou estabelecido 500µL de sangue total, quantidade suficiente para alcançar o rendimento acima citado.

4.1.2 Amplificação do DNA

As alterações no processo de amplificação do DNA genômico de células sanguíneas, tendo por base as indicações de Yucesoy *et al.*, 2001b e Ozen *et al.*, 2002, resultaram em uma metodologia simples e de fácil execução, compatível com as necessidades de um método a ser usado em rotinas de acompanhamento da silicose.

A quantidade de 100ng de DNA mostrou-se suficiente para o processo de amplificação, apesar dos melhores resultados obtidos com 200ng. Desta maneira, visando um maior aproveitamento do sangue coletado, ficou estabelecido à utilização de 100ng de DNA para o processo de amplificação.

Em relação à quantidade de *primer* a ser utilizada, os melhores resultados foram obtidos com 1µL.

Os melhores resultados para a especificidade do processo de amplificação do sítio -238 foram obtidos com: 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 40s, anelamento a 58°C por 90s e extensão à 72°C por 60s. Um fragmento de 165pb foi gerado como produto da amplificação do sítio -238, tendo sido armazenado a -20°C.

Depois dos experimentos descritos anteriormente, a etapa de amplificação desta genotipagem ficou da seguinte forma: A reação foi preparada juntando-se: 100ng de DNA, 1,5U de Taq-DNA polimerase recombinante comum, dNTPs, tampão Tris-HCl, cloreto de magnésio, 1µL da mistura de primers e água destilada estéril para completar o volume final para 50µL.

Na Figura 1 estão mostrados alguns resultados destes experimentos. Os *primers* utilizados, escolhidos depois de uma consulta bibliográfica ^(60, 64) foram adequados ao processo de amplificação do DNA extraído para a avaliação do polimorfismo da região promotora do gene para TNF- α , tendo hibridizado corretamente com a sequência alvo do DNA. Uma possível explicação para o problema encontrado na temperatura de anelamento dos *primers* utilizados na amplificação do sítio -238 seria a grande diferença da temperatura de anelamento entre as fitas senso (59°C) e antisenso (74°C). Tal diferença pode ter levado a um não total aproveitamento do *primer* no processo de amplificação, provocando um acúmulo de *primers* não anelados que aparecem como uma banda não específica abaixo do fragmento amplificado na revelação por eletroforese. A Figura 1D mostra que das 14 amostras testadas, apenas duas amostras para o sítio -308 e quatro para o sítio -238 não apresentaram a amplificação esperada. Estes resultados demonstram a reprodutibilidade desta metodologia e garante o seu uso para a genotipagem dos sítios polimórficos escolhidos.

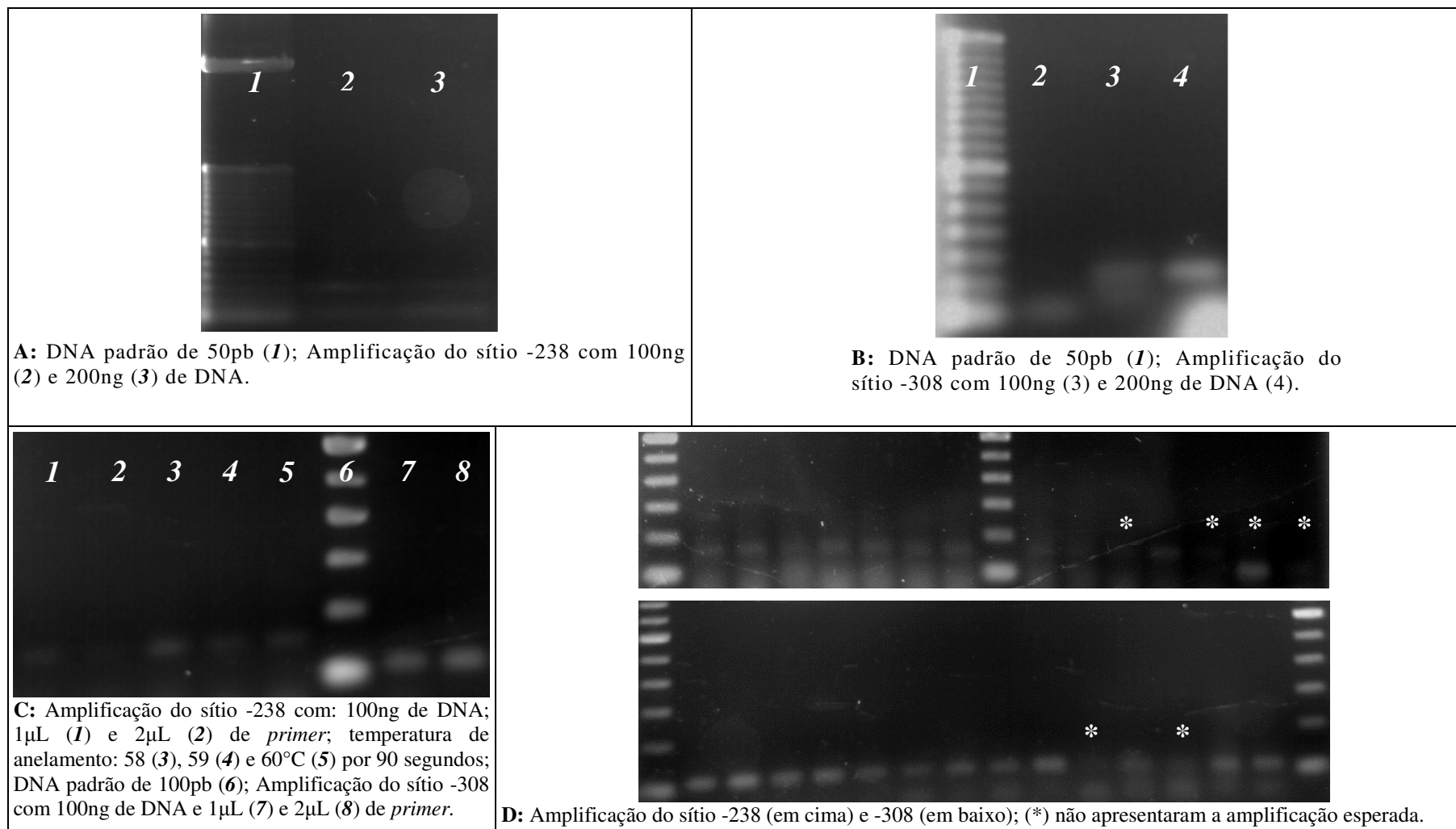


Figura 1 - Amplificação dos fragmentos polimórficos dos sítios -238 e -308 da região promotora do gene de TNF- α . Resultados dos experimentos de implementação da amplificação de DNA descritos do item 4.1.2.

4.1.3 Digestão do DNA

Depois dos experimentos descritos em Material e Métodos, a etapa de digestão desta genotipagem ficou da seguinte forma: para a digestão dos fragmentos do sítio -308 foi utilizada a enzima NcoI e para o -238, a enzima BamHI. No processo de digestão para os produtos de amplificação da região -308 e -238 foi utilizada a proporção de 10 unidades da enzima para 10µL da mistura da reação de PCR (uma quantidade de DNA entre 0,1 a 1µg), 2µL de tampão e 18µL de água estéril por no mínimo 1 hora neutralizando-se a digestão com 0,4µL de EDTA 0,5M por 20 minutos a 65°C. A Figura 2 mostra o resultado obtido no experimento descrito para a etapa de digestão.

Os indivíduos que possuem o alelo mutante na posição -308 (-308A) eliminam o sítio de restrição do fragmento atacado pela enzima de restrição NcoI. Desta maneira, ao realizar a digestão com esta enzima, os alelos selvagens (-308G) geram dois fragmentos de tamanhos diferentes: 87 e 20pb, e os alelos mutantes (-308A) geram um só fragmento de 107pb, o que denuncia a não clivagem do DNA. Os indivíduos que possuem a modificação na posição -238 (-238A) eliminam o sítio de atuação da enzima BamHI. Assim, ao realizar a digestão com essa enzima, os alelos selvagens (-238G) geram dois fragmentos de tamanhos diferentes: 123 e 42pb, e os alelos mutantes (-238A) geram um só fragmento de 165pb, o que denuncia a não clivagem do DNA. As Figuras 3 e 4 demonstram os genótipos GG, GA e AA encontrados para os sítios -238 e -308.

As alterações no processo de digestão do DNA amplificado também resultaram em uma metodologia mais rápida com a mesma eficiência. Com a utilização das enzimas NcoI e BamHI, respectivamente para os sítios -308 e -238, segundo Yucesoy et al., 2001b ⁽⁶⁴⁾ e Ozen et al., 2002 ⁽⁶⁰⁾, foi observado a formação de fragmentos de 87pb e 20pb (-308) e 123pb e 42pb (-238). A repetição da nova rotina, com todas as modificações que foram introduzidas, em um pequeno grupo de amostras em um mesmo dia serviu como parâmetro final desta padronização.

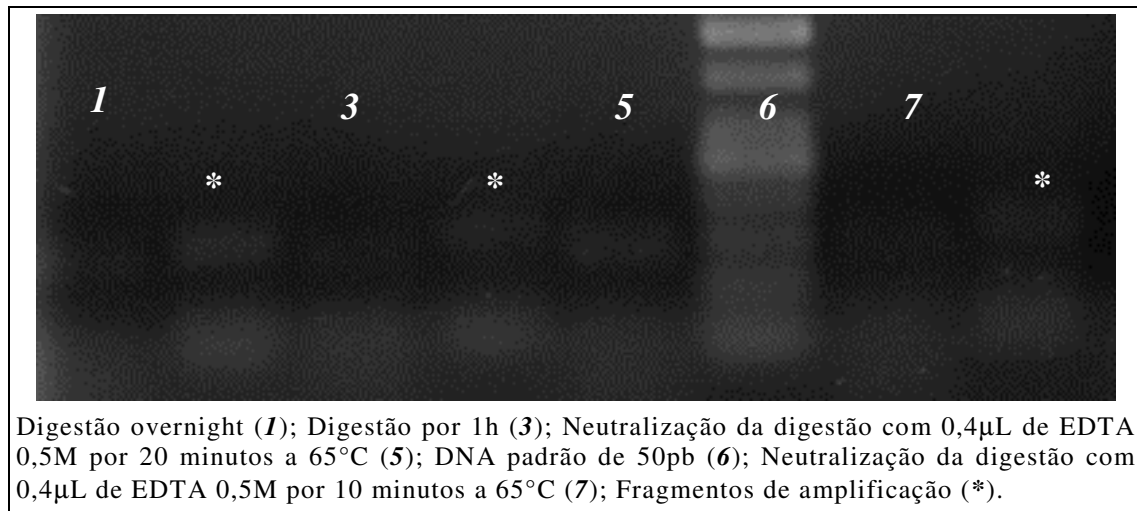


Figura 2 - Digestão por endonucleases de restrição dos fragmentos polimórficos dos sítios -238 da região promotora do gene de TNF- α depois de amplificados.

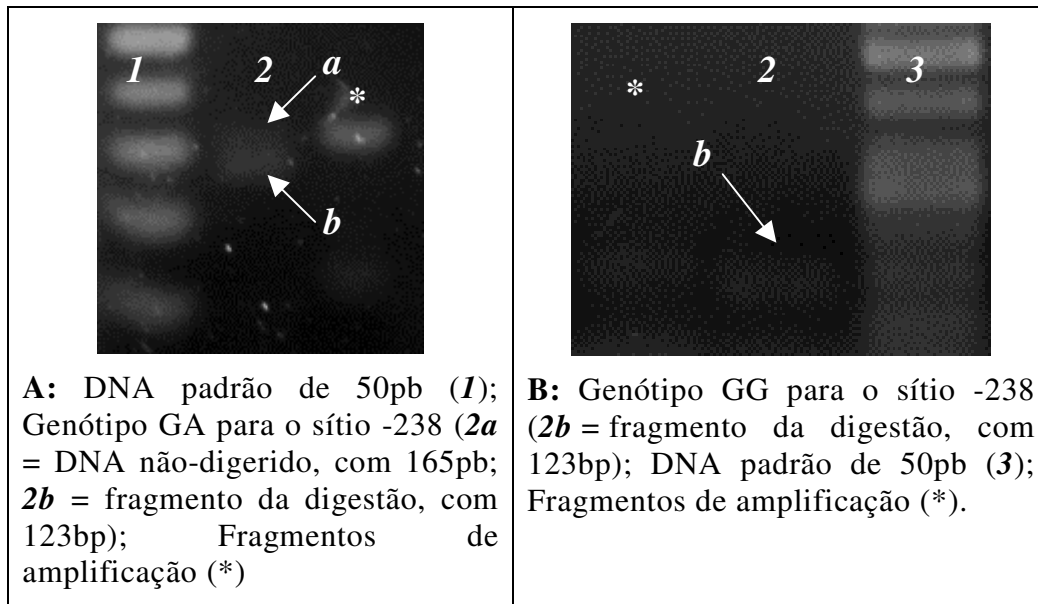


Figura 3 - Genotipagem do polimorfismo do sítio -238 da região promotora do gene do TNF- α por digestão pela enzima BamHI.

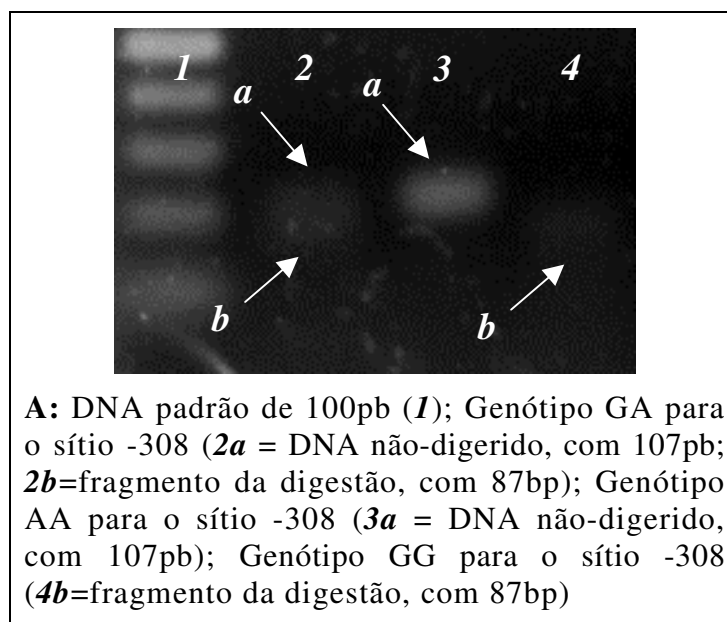


Figura 4 - Genotipagem do polimorfismo do sítio -308 da região promotora do gene do TNF- α por digestão pela enzima NcoI

Conforme Hajeer & Hutchinson, 2001 ⁽⁷⁶⁾, existem diversas posições com mutações pontuais tendo sido escolhidas as posições -308 (G→A) e -238 (G→A), numeradas à partir do início da transcrição. Mas, segundo estes autores, a citocina TNF- α pode ter uma dupla função no processo inflamatório sendo pró-inflamatório no início de processos infecciosos e antiinflamatório ou imunorregulador nas fases mais tardias da doença. Esta questão terá que ser levada em conta na associação destes polimorfismos com a silicose. Mas, é possível inferir que estes dois marcadores do polimorfismo do gene para TNF- α podem ser usados nas rotinas de acompanhamento e de predição desta doença. A Tabela 2 sumariza os experimentos realizados no estudo para implementação da metodologia, bem como seus melhores resultados.

Tabela 2 - Resumo dos experimentos realizados no processo de implementação da metodologia para genotipagem dos polimorfismos dos sítios -238 e -308 da região promotora do TNF- α .

Etapas	Teste	Resultados
Amplificação		
Sítio -238		
Experimento 1	Duas quantidades de DNA: 200ng e 100ng	A quantidade de 100ng de DNA mostrou-se suficiente para o processo de amplificação
Experimento 2	Quantidade de <i>primer</i> : 1 μ L e 2 μ L de uma solução 10 μ M	Melhores resultados obtidos com 1 μ L de <i>primer</i>
Experimento 3	Temperatura de anelamento para o sítio -238: 58°C, 59°C, e 60°C	Melhores resultados com: 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 40s, anelamento a 58°C por 90s e extensão a 72°C por 60s
Experimento 4	Amplificação de 14 amostras de uma única vez em um mesmo dia (garantia de reprodutibilidade)	Amplificação esperada em 10 amostras
Sítio -308		
Experimento 1	Duas quantidades de DNA: 200ng e 100ng	A quantidade de 100ng de DNA mostrou-se suficiente para o processo de amplificação
Experimento 2	Quantidade de <i>primer</i> : 1 μ L e 2 μ L de uma solução 10 μ M	Melhores resultados obtidos com 1 μ L de <i>primer</i>
Experimento 3	Amplificação de 14 amostras de uma única vez em um mesmo dia (garantia de reprodutibilidade)	Amplificação esperada em 12 amostras
Digestão (sítios -238 e -308)		
Experimento 1	Tempo de duração: 1h e <i>overnight</i>	Digestão por no mínimo 1 hora

Depois destas etapas, a metodologia final para genotipagem da região promotora de TNF- α pode ser descrita da seguinte forma:

Etapas 1: Alíquotas de 500 μ L do sangue venoso coletados com heparina foram tratados duas vezes com 1500 μ L de tampão de lise de eritrócitos (Tris-HCl 20mM, pH 7,6) por centrifugação (16.000g/30s/t.a.) remoção dos sobrenadantes e lavagem com 600 μ L de tampão de lise celular (Tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 1mM, pH 8,0; SDS 0,1%); incubação com proteinase K (20mg/mL) por 2 horas a 56°C; incubação com RNase (4mg/mL) por 40 minutos a 37°C; adição de 200 μ L de acetato de potássio (3M Potássio, 5M Acetato), centrifugação (16.000g/3 min/4°C) e coleta do sobrenadante; adição de 600 μ L de isopropanol e centrifugação (16.000g/3 min/4°C); descarte do sobrenadante e tratamento do precipitado com 600 μ L de etanol 70%; centrifugação (16.000g/1 min/t.a.) e descarte do sobrenadante; secar e ressuspender em 100 μ L de TE (Tris-HCl 10mM, pH 7,6; EDTA 1mM, pH 8,0); estocar a -20°C.

Etapas 2: Quantificação do DNA depois de uma diluição de 10 vezes com água destilada (1,0 de absorvância 260nm = 50 μ g/mL de DNA)

Etapas 3: Amplificação do DNA misturando: 5 μ L de solução tampão Tris-HCl 10mM, pH 9,0, 1 μ L de dNTP 200 μ M, 2 μ L de cloreto de magnésio 1,5mM, 1 μ L de *primer* (*mix* contendo 10 μ M das fitas senso e antisenso), 1,5U da Enzima *Taq* Dna polimerase, 100ng da amostra de DNA e água Mile Q autoclavada para completar 50 μ L. Condições do termociclador: -308) 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 40s, anelamento a 60°C por 50s e extensão a 72°C por 60s; -238) 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 40s, anelamento a 58°C por 90s e extensão a 72°C por 60s.

Etapas 4: Eletroforese em gel de agarose 2%, com tampão TAE (Tris-acetato 40mM/EDTA 1mM, pH 8,0). Condições da fonte: 85 volts, 220mA, por 1:30h. Coloração com brometo de etídeo 0,5 μ g/mL (em tampão TAE).

Etapas 5: Preparo da solução de digestão com 10 unidades da enzima (solução estoque 5U/0,5 μ L) para 10 μ L da mistura da reação de PCR, 2 μ L de tampão (NcoI: 33mM Tris-Acetato pH=7,9, 10mM acetato de magnésio, 66mM acetato de potássio, 0,1mg/mL BSA; BamHI: 10mM Tris-HCl pH=7,4, 50mM KCl, 0,1mM EDTA, 1mM DTT, 200 μ g/mL BSA) e 18 μ L de água estéril; incubação a 37°C por 1 hora; paralisação pela adição de 0,4 μ L de EDTA 0,5M, pH 8,0 e incubação a 65°C por 20min.

Etapas 6: Revelação do polimorfismo por eletroforese em gel de agarose 3% com tampão TAE. Condições da fonte: 60 volts, 220mA por 1:30h. Coloração com brometo de etídeo 0,5 μ g/mL (em tampão TAE).

4.2 Avaliação da população estudada

4.2.1 Características sócio-demográficas da população e silicose

As informações obtidas a partir do questionário são de fundamental importância para a identificação de possíveis fatores de risco e de confundimento na avaliação da exposição à sílica. O adequado tratamento destes dados permite a percepção de que o desenvolvimento de uma patologia se apresenta de forma multifatorial, reforçando a importância da aplicação de novas metodologias na avaliação da exposição ocupacional a substâncias tóxicas.

Os trabalhadores da população estudada eram residentes no Estado do Rio de Janeiro com as seguintes ocupações: trabalhadores da indústria naval, artesões, vidraceiros, metalúrgicos e trabalhadores de pedreiras. Todos os trabalhadores eram do sexo masculino e maiores de 18 anos. Participaram deste trabalho indivíduos "expostos e doentes" e "expostos e não doentes". Os indivíduos doentes estavam em diferentes estágios da doença. A presença de apenas indivíduos masculinos na amostra populacional avaliada reforça a característica de predominância dos homens nas atividades profissionais que envolvem a exposição à sílica, com pequena participação feminina, que fica limitada a atividades de lapidação e artesanato familiar ⁽⁹³⁾.

Estes trabalhadores ocupavam diferentes atividades profissionais e a grande maioria (72%) relatou ter trabalhado em diferentes ramos da indústria naval. Do grupo estudado, 34% são profissionais ainda ativos e 66% aposentados. O tempo médio de exposição foi de 19 anos, com variação de 10 meses a 44 anos.

A maior parte dos indivíduos encontrava-se na faixa etária de 40 a 49 anos (34%) e 50 a 59 anos (48%), sendo o valor mínimo de 26 e o valor máximo de 71, com alta incidência de baixo nível de escolaridade (32% de analfabetos funcionais e 23% com ensino fundamental incompleto). Alguns autores, como Lima e colaboradores, 1999 ⁽⁹⁴⁾, demonstram que a baixa escolaridade pode se comportar como uma importante variável preditora de acidentes de trabalho. Outro estudo feito por Zwerling *et al.*, 1996 ⁽⁹⁵⁾ demonstrou que a baixa escolaridade (considerada baixa quando menor que quatro anos) gerava um risco cinco vezes maior de acidentes ocupacionais. No presente estudo, 83% do grupo de indivíduos doentes só tinham o ensino fundamental completo ou incompleto enquanto que no grupo de não-doentes 57% tinham esta escolaridade. Diante deste baixo nível de escolaridade, a busca de melhorias destas condições educacionais, com cursos de especialização profissional que apresentam como foco principal a prevenção de riscos à saúde, é um importante caminho a ser tomado. A participação conjunta de sindicatos e de

escolas de educação profissional torna-se fundamental, tendo em vista a importância da silicose em uma série de atividades profissionais.

Outros dados importantes levantados pelo questionário aplicado foram os relacionados com o estilo de vida dos trabalhadores. Dentre os trabalhadores entrevistados, 49,1% relataram consumir bebidas alcoólicas. Já em relação ao tabagismo, 15,9% declararam ser fumantes, 35,4% declararam não ser fumantes e 42,7% declararam que eram ex-fumantes. Estes resultados se assemelham com os obtidos por Caracciolo, 1992 ⁽⁹⁶⁾, no qual foi realizada uma análise de prontuários de todos os pacientes atendidos no ambulatório de Saúde Ocupacional do Hospital Universitário Antonio Pedro da Universidade Federal Fluminense. O trabalho indica uma frequência de 66,7% de indivíduos fumantes em uma população, e um possível sinergismo entre o hábito de fumar e o risco de desenvolvimento da silicose.

Nas categorias de classificação radiológica da silicose, de acordo com os padrões técnicos da ILO (2000), entre os 78 indivíduos que foram genotipados, foram observadas as seguintes frequências: 47 indivíduos (60%) com categoria 0 (normal); 12 (15%) com categoria 1; 13 (17%) com categoria 2; e 5 (6,5%) com categoria 3. Um indivíduo do estudo não foi categorizado pelo exame de Raios-X (Figura 5).

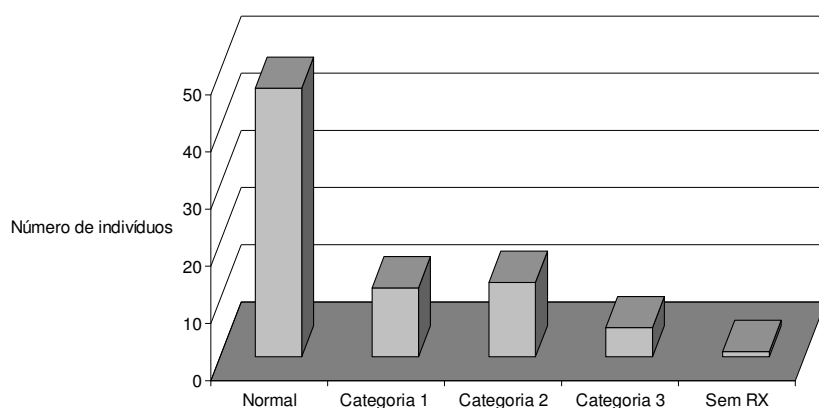


Figura 5 - Distribuição das categorias de silicose

A tuberculose se apresenta como uma das principais comorbidades relacionada com a silicose ^(97, 98). A associação entre essas duas doenças já tem sido estudada desde o início do século 20 ⁽⁹⁹⁾. Sua presença foi avaliada em todos os trabalhadores do estudo, tendo sido encontrado um resultado de 20,8% (16 indivíduos) com histórico passado da doença.

Somente um indivíduo da amostra populacional não foi categorizado em relação ao histórico de tuberculose. Segundo teWaternaude *et al.*, 2006 ⁽¹⁰⁰⁾ e Calvert *et al.*, 2003 ⁽¹⁰¹⁾, o risco de desenvolvimento da tuberculose é aumentado em 2.8 a 39 vezes em indivíduos com silicose quando comparados a indivíduos saudáveis. Joca, 2009 ⁽⁸⁸⁾, ao avaliar a associação entre ambas as doenças na mesma população deste estudo, encontrou um risco relativo de 3,8 para os trabalhadores com silicose desenvolverem a tuberculose. Em um estudo realizado na África do Sul com mineiros de ouro ⁽¹⁰⁰⁾, o risco relativo de ter tuberculose foi 2,8 vezes maior (Intervalo de Confiança, ou IC, de 1,9 a 4,1; $p=0,05$) quando comparados silicóticos e não-silicóticos. Alguns estudos relacionam ainda uma maior incidência da presença da micobactéria com as formas agudas e mais avançadas de silicose ⁽⁹²⁾. No presente estudo, a frequência de indivíduos com categorias mais avançadas de silicose (categoria 2 e 3) que já haviam desenvolvido tuberculose foi maior quando comparada às formas mais leves e aos indivíduos normais (62,5% e 37,5%, respectivamente). A Tabela 3 apresenta estes dados comparativos entre as categorias de Raio-X para silicose e o histórico de tuberculose.

Tabela 3 - Relação entre o histórico de tuberculose e as formas mais graves de silicose.

Raio X para silicose	Tuberculose	
	Presença	Ausência
Normal + Categoria 1	6	53
Categorias 2 e 3	10	8

Diferenças significativas, $p=0,0002$ para o Teste de Fisher

Os resultados confirmam que a presença passada ou presente da tuberculose em relação a silicose pode representar um importante fator a ser analisado ⁽¹⁾. A prevenção de possíveis reincidências da tuberculose ou a possibilidade de uma maior susceptibilidade no desenvolvimento da silicose são fatores que podem ser evitados mediante testes tuberculínicos prévios em períodos iniciais da evolução da doença, visto que a presença da silicose provoca maior prejuízo da função pulmonar.

4.2.2 Genotipagem da população de trabalhadores expostos à sílica

No presente estudo, foram identificados os polimorfismos dos sítios -238 e -308 da região promotora do gene do TNF- α nos 79 indivíduos da amostra populacional selecionada utilizando a metodologia de PCR-RFLP implementada. Para o sítio -238 foram encontrados as seguintes frequências genotípicas: 2,6% (2 indivíduos) para o genótipo GA, 97,4% (77 indivíduos) para o genótipo GG e zero para o genótipo AA. Para o sítio -308, as frequências encontradas foram: 16,7% (13 indivíduos) para o genótipo GA, 82% (65 indivíduos) para o genótipo GG e 1,3% (1 indivíduo) para o genótipo AA. A frequência dos genótipos AA/GA na população total foi de 17,9% para o sítio -308 e 2,6% para o sítio -238. A frequência alélica na população de expostos à sílica para o sítio -308, foi de 0,905 para o alelo selvagem -308G e 0,095 para o alelo mutante -308A. Para o sítio -238, a frequência foi de 0,987 para o alelo selvagem -238G e 0,013 para o alelo mutante -238A.

O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) baseia-se em algumas premissas, como cruzamentos aleatórios, ausência de mutação, migração, deriva genética, seleção e tamanho infinito das populações. Quando algum desvio é encontrado entre os valores observados de frequência em relação aos valores esperados em equilíbrio, deve-se a algum tipo de violação dessas premissas. As frequências encontradas para o sítio -308 e -238 demonstram que a população encontra-se no Equilíbrio de Hardy-Weinberg, sugerindo que a mesma não está sofrendo pressão evolutiva, fluxo de migração ou mutações significativas.

Considerando o diagnóstico de silicose, 33 trabalhadores possuíam silicose (42,3%) e 45 foram classificados como não doentes (57,7%). Um dos pacientes da população não foi categorizado para a presença da doença. Os pacientes foram considerados doentes de acordo com os resultados do exame de Raio-X. A análise dos polimorfismos nas posições -238 e -308 feita no presente estudo não apresentou diferença significativa na frequência do alelo mutante ou dos possíveis genótipos em relação a presença ou não da silicose. A distribuição genotípica dos polimorfismos de ambos os sítios entre os pacientes silicóticos e não-silicóticos está demonstrada na Tabela 4.

Tabela 4 - Distribuição genotípica dos polimorfismos nas posições -238 e -308 da região promotora do gene do TNF- α em relação à silicose.

SNP -308	Doente		Não doente	
	n	%	n	%
GG	27	81,8	37	82,3
GA	6	18,2	7	15,5
AA	0	0,0	1	2,2
Totais	33	100	45	100

SNP -238	Doente		Não doente	
	n	%	n	%
GG	33	100	43	56,4
GA	0	0,0	2	2,6
AA	0	0,0	0	0,0
Totais	33	100	45	100

Os resultados encontrados por Yucesoy *et al.*, 2001b ⁽⁶⁴⁾, demonstraram uma associação significativa entre a distribuição genotípica e a frequência dos alelos mutantes com as diferentes extensões da doença. Neste estudo, Yucesoy *et al.* demonstraram que a frequência do alelo mutante (-308A) foi maior em formas moderadas de silicose (0,37, 97 indivíduos) e um pouco menor (0,24, 74 indivíduos) em casos severos quando comparados ao grupo controle (0,27, 79 indivíduos). Em relação ao sítio -238, no mesmo estudo, a frequência do alelo mutante (-238A) apresentou-se aumentado em formas mais severas (0,40, 141 indivíduos) quando comparados com os controles (0,24, 73 indivíduos), porém bem diminuído em casos moderados (0,16, 41 indivíduos). Estes autores determinaram estes polimorfismos em amostras de biópsia de pulmão de trabalhadores mineiros.

Um estudo feito com mineiros da África do Sul ⁽⁶¹⁾, apresentou uma baixa frequência de indivíduos doentes portadores do alelo mutante (GA e AA), tendo sido 8 trabalhadores com o genótipo GA e 2 com AA para o sítio -238, e 41 trabalhadores com o genótipo GA e 7 com AA para o sítio -308, em um universo de 121 indivíduos. Neste trabalho, Corbett e colaboradores realizaram um estudo caso-controle com 241 indivíduos no total (121 casos e 120 controles), sendo todos mineiros, homens da África do Sul. Foram encontradas frequências para os genótipos AA/GA, respectivamente em casos e controles, de 40% e 39% para o sítio -308 e de 8,3% e 5,8% para o sítio -238.

No presente estudo, a frequência dos genótipos AA/GA entre os indivíduos doentes foi de 0,21 (7 indivíduos) para o sítio -308 e zero para o sítio -238. Para avaliar se estes resultados se assemelham aos encontrados por Corbett e colaboradores ⁽⁶¹⁾, foi realizado um teste de qui-quadrado. Foram comparadas as frequências gênicas dos indivíduos expostos doentes, sendo as frequências genotípicas esperadas as encontrados pelo autor e as observadas encontradas no presente estudo. No trabalho de Corbett e colaboradores foi encontrada uma frequência de 0,4 (48 indivíduos) para a presença do alelo mutante no sítio -308 (AA/GA) e 0,6 (73 indivíduos) para o genótipo GG. Não foi encontrada diferença significativa entre as frequências do alelo -308A ($p > 0,05$, $\chi^2_{\text{total}} = 0,142$). Quanto ao alelo -238A, não foi possível determinar, pois sua frequência para doentes foi igual a zero. Os resultados de genotipagem do alelo -308A deste estudo estão de acordo com o esperado neste trabalho de Colbett *et al.* 2002 ⁽⁶¹⁾.

As relações existentes entre os polimorfismos e algumas patologias não são fáceis de analisar. Podem estar ligadas a influência dos polimorfismos sobre a expressão do gene ou de sua atuação de maneira epistásica com outros genes situados no mesmo ou em outros cromossomos. Esta interação poderia levar a formação de haplótipos que poderiam estar associados a formas mais severas da doença ^(52, 76). O universo amostral do presente estudo pode estar gerando uma dificuldade no tratamento dos dados obtidos em relação à

associação dos diferentes genótipos e o desenvolvimento de formas mais graves de silicose.

4.2.3 *Indicadores biológicos*

Este estudo faz parte de um projeto mais amplo que visava avaliar a exposição de trabalhadores à sílica através de indicadores de exposição e susceptibilidade. Desta forma, buscou-se relacionar os resultados da genotipagem dos polimorfismos dos sítios -238 e -308 com os indicadores biológicos já avaliados nesta população. A Tabela 5 mostra os níveis dos indicadores e sua relação com a presença do alelo mutante em ambos os sítios.

O ensaio cometa é um teste de genotoxicidade no qual células individualizadas são lisadas e submetidas à eletroforese. O deslocamento do DNA provocado pela eletroforese configura uma cauda que se assemelha a um cometa. Quanto maior o tamanho da cauda formada, maior terá sido o dano causado ao DNA pelo agente tóxico ⁽¹⁰²⁾. Os valores de Cometa UA e Cometa % não apresentaram diferenças em relação à presença ou não do alelo -308A. Este resultado é confirmado por alguns estudos como Joça, 2009 ⁽⁸⁸⁾ e Başaran e colaboradores, 2003 ⁽¹⁰³⁾, pois mostram o Ensaio Cometa como sendo um confiável indicador biológico de exposição, mas não de doença. Başaran e colaboradores, 2003 ⁽¹⁰³⁾ realizaram o estudo com uma população de trabalhadores de indústrias de cerâmica e fundição e demonstraram o uso da técnica de Ensaio Cometa como sendo uma promissora ferramenta para o monitoramento biológico na avaliação de populações expostas ocupacionalmente à sílica. Joça, 2009 ⁽⁸⁸⁾, utilizando a mesma população do presente estudo, encontrou a média do indicador Cometa da população exposta à sílica significativamente maior que a média do grupo não exposto, confirmando a técnica como sendo um método sensível e confiável para a detecção de danos no DNA. No entanto, o dano causado ao DNA não foi relacionado significativamente com os diferentes estágios da doença, fortalecendo a indicação do uso do Cometa como um indicador relacionado à exposição à sílica ⁽⁸⁸⁾.

Tabela 5 - Indicadores biológicos e sua relação com a presença do alelo mutante em ambos os sítios.

Indicadores Biológicos	SNPs	Número	Média	Desvio Padrão
Sítio -308				
Cometa UA	GG	26	56,6	17,9
	AG/AA	3	53,3	17,6
Cometa %	GG	26	47,5	13,3
	AG/AA	3	44,0	7,0
GST	GG	52	1,6	0,6
	AG/AA	12	1,9	0,5
Log TNF*	GG	16	1,7	0,6
	AG/AA	3	2,0	0,15
Sítio -238				
Cometa UA	GG	27	56,7	18,2
	AG/AA	2	50,5	9,2
Cometa %	GG	27	47,6	13,1
	AG/AA	2	41,0	4,2
GST	GG	63	1,7	0,6
	AG/AA	1	1,8	-
Log TNF	GG	18	1,7	0,53
	AG/AA	1	2,2	-

* diferenças entre GG e AG/AA, $f= 0,087$, $p= 0,087$, Min – 0,098 Máx – 0,397

A Glutathione-S-Transferase (GST) é uma importante enzima relacionada com o estresse oxidativo gerado pela exposição a determinadas substâncias tóxicas. A presença de radicais livres tem sido relacionada com uma série de doenças, dentre elas, a silicose. Esta enzima pode ter um papel fundamental nos processos fisiopatológicos que levam a complicações dos processos da doença ⁽¹⁰⁴⁾. Sua associação com o polimorfismo do sítio -308 pode ser uma importante ferramenta na avaliação de susceptibilidade a silicose. Joça, 2009 ⁽⁸⁸⁾ demonstrou, com a mesma população analisada neste estudo, diferenças significativas nos valores de atividade da GST entre as diferentes categorias da doença. A média da atividade da enzima na categoria normal foi superior à média da categoria 1 ($p=0,029$) e inferior a média da categoria 3 ($p=0,043$). No presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas entre as médias de GST e a presença ou não do alelo mutante no sítio -308. Esta associação entre GST e o polimorfismo -308A fica dificultada em função do baixo número de indivíduos com alelos mutantes na amostra populacional analisada.

Em relação ao polimorfismo do sítio -238, não foi possível observar diferenças significativas das médias dos indicadores Cometa UA, Cometa % e GST, pois somente dois indivíduos com genótipo GA foram encontrados, impossibilitando análises estatísticas significativas.

A influência dos polimorfismos na expressão gênica e consequente quantidade de TNF- α produzido têm sido descrito na literatura de maneira conflitante. A maioria dos trabalhos têm associado a presença do alelo mutante na posição -308 com um aumento da produção do TNF- α ^(105, 106, 107, 108). No presente estudo, foi feita a comparação entre a quantidade de TNF no sangue, ajustados em Log TNF, e a presença do alelo A no sítio -308. As análises demonstraram uma maior média do Log de TNF para os portadores do alelo mutante no sítio -308 quando comparados com o alelo selvagem (sig. $f=0,087$, $p=0,087$), o que sugere que este alelo possa estar contribuindo para a maior produção da citocina na presença do alelo -308A, embora esta diferença esteja perto da significância. Na Tabela 5 pode ser observado que apenas 3 indivíduos apresentaram o alelo -308A e obtiveram estes níveis mais elevados de TNF. Segundo Yucesoy *et al.* ^(72, 64) valores mais altos de TNF- α podem provocar o aumento do processo fibrogênico característico da silicose, estando o alelo A relacionado com um maior risco de desenvolvimento da doença.

Assim como para o sítio -308, os resultados nas avaliações da presença do alelo A na posição -238 têm sido conflitantes. Em Huizinga *et al.*, 1997 ⁽⁷⁴⁾ a presença do alelo selvagem (-238G) mostrou-se relacionado com a alta produção de TNF- α , achado este não

corroborado pelo trabalho de Pociot *et al.*, 1993 ⁽¹⁰⁹⁾. No presente estudo, a média do Log de TNF (Tabela 5) mostrou um maior valor para os portadores do alelo mutante na posição -238. No entanto, esta condição foi observada para apenas um indivíduo da população.

4.2.4 Polimorfismo e categorias de silicose

A presença do alelo mutante no sítio -308 tem sido associado com o desenvolvimento das formas mais severas de silicose, o que poderia estar representando um fator de susceptibilidade ao desenvolvimento da doença. De acordo com Yucesoy *et al.*, 2001a ⁽⁷²⁾, a presença do alelo -308A está fortemente associada com as formas moderada e severa da doença (odds ajustadas de 3,6 e 1,6, respectivamente). Este dado se assemelha com o achado no presente estudo, onde a presença do alelo -308A mostrou-se positivamente associada com a categoria 3 da doença, apresentando um risco relativo de 3.7 para o desenvolvimento de formas mais severas de silicose (Tabela 6).

Tabela 6 - Polimorfismo x Categoria Sítio -308

Polimorfismo Sítio -308	Resultados Raio-X		OR
	Normal + Categorias 1 e 2	Categoria 3	
GG	61 (84,7%)	3 (60%)	1,412
AG/AA	11 (15,3%)	2 (40%)	0,382
Risco Estimado			3,697*

*OR= Odds Ratio categoria1/categoria2, 95% IC 0,552 – 24,740.

Este achado pode ser relacionado com os resultados encontrados na associação entre o alelo -308A e a quantidade de TNF. As categorias mais severas de silicose apresentam maior comprometimento do parênquima pulmonar em função do processo fibrogênico mais intenso, o que é provocado, dentre outros fatores, por altos valores de TNF- α no sangue, podendo levar a uma maior susceptibilidade à doença.

Em função do número de indivíduos portadores do alelo mutante na posição -238 (2 indivíduos em 79 trabalhadores), não foi possível a realização da mesma análise de risco feita para o sítio -308.

Doenças multifatoriais configuram um dos principais problemas e um grande desafio da Saúde Pública atualmente. A complexidade das interações entre os mais variados fatores genéticos, fisiológicos e ambientais deve ser considerada em qualquer estudo de exposição ocupacional ⁽¹¹⁰⁾. Características genéticas, quando analisadas isoladamente, não são suficientes para a determinação de um processo patológico. No entanto, uma vez a doença tendo sido iniciada, são capazes de modificar sua extensão e gravidade ⁽⁶³⁾. A interferência destes fatores genéticos, que podem estar relacionados com as diferentes susceptibilidades individuais, atuando em sinergismo com fatores fisiológicos e ambientais podem estar determinando a evolução da silicose até sua forma mais severa ⁽¹¹¹⁾.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No Brasil há uma carência de estudos relacionados com a exposição ocupacional a poeira de sílica. Apesar de existirem dados de alguns trabalhos acerca da exposição ocupacional, com número de casos, prevalência pontual e outras estimativas da silicose no país ⁽¹⁸⁾, estes não são suficientes para que se possa traçar um perfil da prevalência ou incidência de silicose no Brasil.

Após um levantamento bibliográfico constatou-se a escassez de trabalhos que tracem os diferentes polimorfismos da região promotora do gene da TNF- α , bem como da análise do perfil da expressão gênica da citocina, e da resposta ao estímulo oxidativo em trabalhadores expostos à sílica no território nacional. Sendo assim, uma maior apropriação do problema por parte da sociedade, juntamente com o desenvolvimento de ferramentas metodológicas que possam tornar os estudos de exposição à sílica mais abrangentes é de fundamental importância para o planejamento de intervenções mais adequadas.

Mais estudos de determinação dos polimorfismos da região promotora do gene da citocina TNF- α devem ser realizados em populações expostas e não expostas à sílica, pois os resultados encontrados nesta dissertação demonstram a possibilidade de utilizá-los como uma ferramenta complementar nas avaliações da exposição à sílica, visto que fornecem dados relativos às susceptibilidades individuais que podem ser usados para a elaboração de modelos preventivos mais abrangentes e eficientes.

6 CONCLUSÕES

- A metodologia padronizada para genotipagem dos sítios -238 e -308 da região promotora do gene da TNF- α demonstrou ser específica, sensível e adequada para estudos de base populacional, podendo ser aplicada para determinação destes polimorfismos;
 - O protocolo de extração de DNA genômico de Sambrook e Russel, modificado por Mitri, mostrou-se eficiente, alcançando um rendimento médio de 20 μ g de DNA para cada 500 μ L de sangue total;
 - Os *primers* utilizados no processo de amplificação do DNA genômico de células sanguíneas, baseados na literatura, mostraram-se eficientes e específicos para os sítios polimórficos escolhidos;
 - A quantidade 100ng de DNA mostrou-se suficiente para o processo de amplificação de ambos os sítios polimórficos;
 - A concentração de 0,2 μ M de *primers* (1 μ L da solução *mix* dos *primers* senso e antisenso 10 μ M em 50 μ L de solução final da reação de PCR) apresentou os melhores resultados no processo de amplificação para ambos os sítios;
 - A temperatura de 58°C para o anelamento dos *primers* utilizados para amplificação do sítio -238 mostrou maior especificidade, tendo sido o ciclo definido em: 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 40s, anelamento à 58°C por 90s e extensão à 72°C por 60s;
 - O tratamento dos fragmentos polimórficos com endonucleases de restrição apresentou melhores resultados com o procedimento sendo realizado por 1h;
 - O baixo nível de escolaridade apresentou associação positiva com o desenvolvimento da silicose, evidenciando a importância de uma busca por melhorias das condições educacionais, focando a prevenção de riscos;
 - As frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos -238 e -308 da região promotora do gene do TNF- α encontradas após genotipagem da população deste estudo mostraram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg;
 - A frequência genotípica para o sítio -308 encontrada neste estudo, quando comparada a um estudo de literatura, apresentou resultados similares. No entanto, sugere-se o aumento de indivíduos no estudo para a confirmação deste achado;
 - Não foram encontradas diferenças significativas entre os polimorfismos do sítio -308 e o indicador biológico Cometa, confirmando resultados apresentados na literatura onde o Ensaio Cometa se mostra um confiável indicador biológico de exposição e não de doença;
-

- Não foram encontradas diferenças significativas entre os polimorfismos dos sítios -238 e -308 e a atividade da enzima GST. Provavelmente, este resultado reflete o número de indivíduos da amostra populacional;
 - A presença do alelo -308A apresentou associação positiva com a quantidade de TNF- α no sangue, corroborando dados apresentados na literatura, nos quais a presença do alelo mutante no sítio -308 estaria relacionada com a maior produção da citocina;
 - A presença do alelo -308A mostrou-se positivamente associada com a categoria 3 de silicose e com o desenvolvimento de formas mais severas da doença;
 - A aplicação do polimorfismo dos sítios -238 e -308 da região promotora do gene da citocina TNF- α em campanhas de avaliação do risco de silicose em trabalhadores deverá ser associada a outros indicadores biológicos e informações de exposição ambiental, garantindo assim maior eficiência nas previsões.
-

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Filho MT & Santos UP. Silicose. J. Bras. Pneumol. 2006; Supl1: S41-S7.
 - 2- Ribeiro FSN, Camargo EA, Algranti E, Filho VW. Exposição Ocupacional à Sílica no Brasil no Ano de 2001. Rev. Bras. Epidemiol. 2008; 11(1): 89-96.
 - 3- Castro HA, Vicentin G, Gimenes *et al.* Estudo das internações hospitalares por pneumoconioses no Brasil, 1984-2003. Revista Brasileira de Epidemiologia 2005; 8 (2): 150-60.
 - 4- Capitani EM, Algranti E. Outras pneumoconioses. J Bras Pneumol. 2006;32 (Supl 1):S54-S9.
 - 5- Ribeiro FSN. (2004) Exposição ocupacional à sílica no Brasil: tendência temporal entre 1985 e 2001. São Paulo. [Tese de doutorado – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].
 - 6- [RAIS]. Relação Anual das Informações Sociais. Ministério do Trabalho e Emprego. Estatísticas dos últimos três anos (1995-1997). Disponível em: http://www.mte.gov.br/sppe/rais/anuario/estrutu/estab/tab1_1.htm
 - 7- [ILO]. International Labour Office – Guideline for Use of ILO International Classification of Radiographs of Pneumoconiosis. Occupational Safety and Health Series 22. 2000; Geneva: World Health Organization.
 - 8- Goelzer BIF. Silicose. In: Seminário Internacional sobre Exposição à Sílica "Prevenção e Controle"; 6-10 de Novembro de 2000; Curitiba, Brasil. Disponível http://www.fundacentro.gov.br/SES/seminario_1.asp?D=SES
 - 9- Guthrie Jr. GD. Mineralogical Factors Affect the Biological Activity of Crystalline Silica. Appl Occup Environ Hyg 1995; 10 (12): 1126-31.
 - 10- Moreira Lima MMT. (2007) Características da Poeira do processo de fabricação de Materiais Cerâmicos para Revestimento: Estudo no pólo de Santa Gertrudes. Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo. [Dissertação de Mestrado. Campinas. SP].
 - 11- [IARC]. International Agency for Research on Cancer – World Health Organization – Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 1997; 68: 41.
 - 12- [NIOSH]. Hazard Review – Health Effects of Occupational Exposure to Respirable Crystalline Silica – Department of Health and Human Services – Centers for Disease Control and Prevention National Institute for Occupational Safety and Health – April 2002.
 - 13- Bolsaitis PP, Wallace WE. The structure of silica surfaces in relation to cytotoxicity. In: Castranova V, Vallyathan V, Wallace WE, eds. Silica and silica-induced lung diseases. Boca Raton, FL: CRC Press Inc; 1996; p. 79-89
 - 14- Holanda MZM, Felissimo PH. Silicose em cavadores de poços da região de Ibiapaba (CE): da descoberta ao controle J Pneumol. 1999; 25(1).
 - 15- Neto FK, Gronchi CC, Saad IFSD, Cunha IA, Possebon J, Texeira MM, Amaral NC. Sílica: Manual do Trabalhador. Fundacentro, 1995; 43p.
-

-
- 16- [BRASIL]. Ministério do Trabalho. Secretaria de Segurança do Trabalho. Portaria No. 3214, 1978. Norma Regulamentadora No. 6: Equipamentos de proteção individual – EPI 103. Disponível em http://www.mte.gov.br/legislacao/normas_regulamentadoras (2010 Jan 09).
 - 17- Gruenzner G, Eston SM. Avaliação da poeira de sílica: um estudo de caso em uma pedreira na região metropolitana de São Paulo. São Paulo: EPUSP, 2003. 18 p.. (Boletim Técnico da Escola Politécnica da USP. Departamento de Engenharia de Minas e de Petróleo, BT/PMI/202). [Dissertação de mestrado].
 - 18- Algranti E, Handar Z, Ribeiro FSN, Bom AMT, Santos AM, Bedrikow B. Exposição à sílica, silicose e o Programa Nacional de Eliminação da Silicose no Brasil (PNES). Cienc. Trab;6(11):1-13, ene.-mar. 2004. ilus, tab.
 - 19- Tibiriçá Bon AM (2006). Exposição ocupacional à sílica e silicose entre trabalhadores de marmorarias, no município de São Paulo. São Paulo [Tese de Doutorado – Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].
 - 20- [ACGIH]. American Conference of Governmental Industrial Hygienists. 2000 - Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposures Indices. 2000; Cincinnati: ACGIH.
 - 21- [ACGIH]. American Conference of Governmental Industrial Hygienists. 2005 - Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposures Indices. 2005; Cincinnati: ACGIH.
 - 22- [ABHO]. Associação Brasileira de Higienistas Ocupacionais. Limites de Exposição (TLVs) para Substâncias Químicas e Agentes Físicos & Índices Biológicos de Exposição (BEIs). 2005; São Paulo: ABHO.
 - 23- [BRASIL]. Ministério do Trabalho. Secretaria de Segurança do Trabalho. Portaria No. 3214, 1978. Norma Regulamentadora No. 15: Atividades e Operações Insalubres. Disponível em http://www.mte.gov.br/legislacao/normas_regulamentadoras/nr_15.asp (2010 Jan 09).
 - 24- Rosenberg B, Levenstein C, Pangler ES. Change in the world of occupational health: silica control, then and now. Journal of Public Health Policy. 2005; 26: 192-202.
 - 25- Corn JK. Historical aspects of industrial hygiene--II. Silicosis. Am Ind Hyg Assoc J. 1980;41(2):125-33.
 - 26- Castro HA. (2000). Busca de Marcadores Inflamatórios Il-1 β , il-6 e tnf- α em Trabalhadores Expostos a Poeiras Minerais. Rio de Janeiro. [Tese de Doutorado – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca].
 - 27- Greaves IA. Not-so-simple silicosis: a case for public health action. Am J Ind Méd. 2000; 37(3):245-51.
 - 28- [ILO]. International Labour Organization. Global elimination of Silicosis: The ILO/WHO International Programme, by Igor A. Fedotov. Mineral dusts and prevention of silicosis. Asian-Pacific Newsletter on Occupational Health and Safety 1997; 4(2): 34-5. Disponível em <http://www.ilo.org/public/english/...aosh/newsletr/silicose/asialtr.htm>
-

-
- 29- Murray J, Kielkowski D, Reid P. Occupational disease trends in black South African gold mines. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 706-10.
 - 30- Wu F, Qu Y, Tang Y, Cao D, Sun P, Xia Z. Lack association between Cytokine Gene Polymorphisms and Silicosis and Pulmonary Tuberculosis in Chinese Iron Miners. *J Occup Health*. 2008; 50:445-454.
 - 31- Kulkarni GK. Prevention and control of silicosis: A national challenge. *Indian J Occup Environ Med* 2007;11:95-6.
 - 32- Souza VF, Quelhas OLG. Avaliação e controle da exposição ocupacional à poeira na indústria da construção. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2003; 8(3): 801-807.
 - 33- Algranti E. Epidemiologia das Doenças Ocupacionais Respiratórias no Brasil. In: Menezes AMB. *Epidemiologia das Doenças Respiratórias – Série Pneumologia Brasileira*. Rio de Janeiro: Revinter;p. 119-43. 2001.
 - 34- Rimal B, Greenberg AK, Rom WN. Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 2005; 11: 169-173.
 - 35- Davis, G. S. The pathogenesis of silicosis: state of the art. 1986; *Chest* 89: 166S-169S.
 - 36- Raymond F, Hamilton Jr, Thakur AS, Holian A. Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. *Free Radical Biology & Medicine* 445, 2008; 1246-1258.
 - 37- Thibodeau MS, Giardina C, Knecht DA, Helble J, Hubbard AK. Silica-induced apoptosis in mouse alveolar macrophage in initiated by lysosomal enzyme activity. *Toxicol Sci*. 2004; 80: 34-48.
 - 38- Hu S, Zhao H, Al-Humandi NH, Yin XJ, Ma JK. Silica-induced apoptosis in alveolar macrophages: evidence of in vivo thiol depletion and the activation of mitochondrial pathway. *J. Toxicol. Environ. Health A*. 2006; 69: 1261-1284.
 - 39- Balaan MR, Banks DE. Silicosis. In: Rom, W. N., editor. *Environmental and occupational medicine*. 3rd ed. Boston, M. A.: Little Brown; 1998. pp 345-358
 - 40- Fubini B, Hubbard A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radical Biology & Medicine*. 2003; 34 (12) 1507-1516 .
 - 41- Gilberti RM, Joshi GN, Knecht DA. The Phagocytosis of Crystalline Silica Particles by Macrophages. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol*. 2008; Vol 39. pp 619-627.
 - 42- Knaapen AM, Albrecht C, Becker A. *et al.* DNA damage in lung epithelial cells isolated from rats exposed to quartz: role of surface reactivity and neutrophilic inflammation. *Carcinogenesis* 2002; 23: 1111-1120.
 - 43- Weill H, Jones RN, Parkes WR. Silicosis and related diseases. In: WR Parkes, editor. *Occupational lung disorders*. 3rd ed. London: Butterworths. 1994; pp 285-339.
 - 44- Becklake MR. Occupational exposures: evidence for a casual association with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. Rev. Respir. Dis*, 1989; 140: S85-S91
-

-
- 45- Huaux F. New developments in the understanding of immunology in silicosis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2007; 7:168-173.
 - 46- Saffiotti U. Silicosis and lung cancer: a fifty-year perspective. *Acta Biomed* 2005; Suppl 2; 30-37.
 - 47- Gibbs AR, Wagner JC. Diseases due to silica. In: A Churg and FHY Green, editors. *Pathology of occupational lung diseases*. New York: Igaku-Shoin Medical Publishers; 1988. pp 155-176.
 - 48- Algranti E, De Capitani EM, Carneiro APS, Saldiva PHN. *Patologia Respiratória Relacionada com o Trabalho*. In René Mendes editor: *Patologia do Trabalho*. 2a. ed. São Paulo; 2003. p. 1330-97.
 - 49- Barazzutti L.D. (2004). *Silicose em Processos de Fundição de Peças Frente à Nova Tecnologia*. Porto Alegre. [Dissertação de Mestrado Profissionalizante – Universidade Federal do Rio Grande do Sul].
 - 50- Webb WR, Muller NL, Naidich DP. High-resolution CT technique. In: Webb WR, Muller NL, Naidich DP. *High-resolution CT of the lung*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p. 149-91.
 - 51- Mendes R. *Patologia do Trabalho*. 2007; 2a. Edição. Atheneu.
 - 52- Yucesoy B. & Luster MI. Genetic susceptibility in pneumoconiosis. *Toxicology Letters* 168. 2007; 249-254.
 - 53- Karimi M, Goldie LC, Cruickshank MN, Moses EK, Abraham LJ. A critical assessment of the factors affecting reporter gene assays for promoter SNP function: a reassessment of -308 TNF polymorphism function using a novel integrated reporter system. *European Journal of Human Genetics*, 2009; 1-9.
 - 54- Akkiz H, et al. G-308A TNF- α polymorphism is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma in the Turkish population: Case-control study. *Cancer Epidemiology*. 2009; doi: 10.1016/j.canep.2009.06.001
 - 55- Qu Y, Tang Y, Cao D, Wu F, Liu J, Lu G, Zhang Z, Xia Z. Genetic polymorphisms in alveolar macrophage response-related genes, and risk of silicosis and pulmonary tuberculosis in Chinese iron miners. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 210, 2007; 679-689.
 - 56- Bisson BF, Wolever TMS, Chiasson JL, Lhoret RR, Maheux P, Josse RG, Leiter LA, Rodger NW, Ryan EA, Soheymy AE. Tumor necrosis factor α -238G>A genotype alters postprandial plasma levels of free fatty acids in obese individuals with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism Clinical and Experimental* 56. 2007; 649-655.
 - 57- Lv L. *et al.* The TNF- α 238A polymorphism is associated with susceptibility to persistent bone marrow dysplasia following chronic exposure to benzene, *Leuk Res* 2007; doi: 10.1016/j.leukres.2007.01.014.
 - 58- Shih CM, Lee YL, Chiou HL, Chen W, Chang GC, Chou MC, Lin LY. Association of TNF- α polymorphism with susceptibility to and severity of non-small cell lung cancer. *Lung cancer*. 2006; 52, 15-20.
-

-
- 59- Song Y, Wu KC, Zhang L, Hao ZM, Li HT, Zhang LX, Qiao TD, Li CN, Fan DM. Correlation between a gene polymorphism of tumor necrosis factor and inflammatory bowel disease. *Chinese Journal of Digestive Diseases*. 2005; 6; 170-174.
- 60- Ozen S, Alikasifoglu M, Bakkaloglu A, Duzova A, Jarosova K, Nemcova D, Besbas N, Vencovsky J, Tuncbilek E. Tumor necrosis factor α G $\rightarrow$ A -238 and G $\rightarrow$ A -308 polymorphisms in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology* 2002; 41:223-227.
- 61- Corbett EL, Mozzato-Chamay N, Butterworth AE, De Cock KM, Williams BG, Churchyard GJ, Conway DJ. Polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter may predispose to severe silicosis in black South African miners. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2002; 165 (5), 690-693.
- 62- Andrade VSS. (2006) Polimorfismos Genéticos, Susceptibilidade e Resposta ao Tratamento em Crianças Portadoras de Leucemia Linfoblástica Aguda. Riberão Preto [Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo].
- 63- Yucesoy B, Vallyathan V, Landsittel, Simenova P, Luster, MI. Cytokine polymorphisms in silicosis and other pneumoconiosis. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2002; 234/235: 219-224.
- 64- Yucesoy B, Vallyathan V, Landsittel DP, Sharp DS, Weston A, Burleson GR, Simenova P, McKinstry M, Luster MI. Association of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 gene polymorphisms with silicosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2001b; 172 (1), 75-82.
- 65- Carroll MC, Katzman P, Alicot EM, Koller BH, Geraghty DE, Orr HT, Strominger JL, and Spies T. Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84. 1987; 8535–8539.
- 66- Hajeer AH, Hutchinson IV. TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications. *Microsc. Res. Tech.*, 2000; v.50, n.3, p. 216-228.
- 67- Bárbara JA, Van Ostade X, Lopez A. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha): the good, the bad and potentially very effective. *Immunol. Cell Biol.*, v. 74, n.5, p. 434-443, 1996 Oct.
- 68- Kroeger KM, Carville KS. The -308 Tumor necrosis factor promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol*. 1997;34: 391-9.
- 69- Kaijzel E, van Krugten M, Brinkman Bec. Functional analysis of a human tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) promoter polymorphism related to damage in rheumatoid arthritis. 1998; *Mol Med*. 4.
- 70- McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature*. 1994; 371:508-10.
- 71- Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, et al. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med*. 1995;182:1259-64.
-

-
- 72- Yucesoy B, Vallyathan V, Landsittel DP, Sharp DS, Matheson J, Burleson F, Luster MI. Polymorphisms of the IL-1 gene complex in coal miners with silicosis. *Am. J. Ind. Med.* 2001a; 39 (3), 286-291.
- 73- Kaluza W, Reuss E, Grossmann S, Hug R, Schopf RE, Galle PR, Hermann ME, Hoehler T. Different transcriptional activity in vitro TNF-alpha production in psoriasis patients carrying the TNF-alpha 238A promoter polymorphism. *J. Invest. Dermatol.* 114, 2000; 1180-1183.
- 74- Huizinga TW, Westendorp RG, Bollen EL, Keijsers V. *et al.* TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol*, 1997; Feb v. 72, n. 2, p. 149-153.
- 75- Jang WH, Yang YI, Yea SS, Lee YJ, Chun JH, Kim, HI, Kim MS, Paik KH. The -238 tumor necrosis factor- α promoter polymorphism is associated with decreased susceptibility to cancers. *Cancer Letters* 166, 2001; 41-46.
- 76- Hajeer AH, Hutchinson IV. Influence of TNF alpha gene polymorphisms on TNF alpha production and disease. *Hum. Immunol.* 2001; 62: 1191-9.
- 77- Mestiri S, Bouaouina N, Ahmed SB, Khedhaier A, Jrad BB, Remadi S. *et al.* Genetic variation in the tumor necrosis factor-a promoter region and in the stress protein hsp70-2: susceptibility and prognostic implications in breast carcinoma. *Cancer* 2001; 91; 672-8.
- 78- Warzocha K, Ribeiro P, Bienvenu J, Roy P, Charlot C, Rigal D. *et al.* Genetic polymorphisms in the tumor necrosis factor locus influence non-Hodgkin's lymphoma outcome. *Blood* 1998; 91: 3574-81.
- 79- Oh BR, Sasaki M, Perinchery G, Ryu SB, Park YI, Carroll P. *et al.* Frequent genotype changes at -308, and 488 regions of the tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) gene in patients with prostate cancer. *J. Urol.* 2000; 163.
- 80- Sasaki M, Nakajima K, Perinchery G, Fujino T, Oh BR, Fujimoto S. *et al.* Frequent genotype changes at -308 of the human tumor necrosis factor-alpha promoter region in human uterine endometrial cancer. *Oncol. Rep.* 2000; 7:369-73.
- 81- Machado JC, Figueiredo C, Canedo P, Pharoah P, Carvalho R, Nabais S. *et al.* A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2003; 125(2): 364-71.
- 82- Ho SH, Wang YJ, Chen HL, Chen CH, Chang CJ, Wang PJ. Increased risk of developing hepatocellular carcinoma associated with carriage of the TNF2 allele of the -308 tumor necrosis factor-alpha promoter gene. *Cancer Causes Control* 2004; 15:657-63.
- 83- Jeng JE, Tsai JF, Chuang LY, Ho MS, Lin ZY, Hsieh MY. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha 308 2 polymorphism is associated with advanced hepatic fibrosis and higher risk for hepatocellular carcinoma. *Neoplasia* 2007; 9: 987-92.
- 84- Higuchi T, Seki N, Kamizono S, Yamada A, Kimura A, Kato H, Itoh K. Polymorphism of the 5' flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)-alpha gene in Japanese. *Tissue Antigens* 51 (1998) 605-612.
-

-
- 85- Skoog T, van't Hooft FM, Kallin B, Jovinge S, Boquist S, Nilsson J, Eriksson P, Hamsten A. A common functional polymorphism (C→A substitution at position -863) in the promoter region of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene associated with reduced circulating levels of TNF-alpha. *Hum Mol. Genet.* 8. 1999; 1443-1449.
- 86- Chouchane L, Ahmed SB, Baccouche S, Remadi S. Polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha promoter region and in the heat shock protein 70 genes associated with malignant tumors. *Cancer* 80. 1997; 1489-1496.
- 87- Costa IC (2009). Efeito dos estudos genotóxicos do amianto em trabalhadores expostos. Rio de Janeiro. [Dissertação de Mestrado – Escola Nacional de Saúde Publica Sérgio Arouca].
- 88- Joca FJG (2009). Avaliação de genotoxicidade de trabalhadores expostos à sílica. Rio de Janeiro. [Dissertação de Mestrado – Escola Nacional de Saúde Publica Sérgio Arouca].
- 89- Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AIF, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor (TNF) alpha gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet.* 1992; 1:353.
- 90- Sambrook J, Russel D. (2001). *Molecular cloning: A laboratory Manual*.
- 91- Mitri SN. (2003) Padronização e aplicação de uma metodologia para determinação do polimorfismo da enzima δ -aminolevulínico desidratase na avaliação de exposição ao chumbo. [Dissertação de Mestrado em Saúde Pública – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, RJ].
- 92- [ATS]. American Thoracic Society. Adverse Effects of Crystalline Sílica Exposure. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;155:761-5.
- 93- Carneiro APS, Campos LO, Gomes MFCE, Assunção AA. Perfil de 300 Trabalhadores Expostos à Sílica atendidos ambulatorialmente em Belo Horizonte. *J Pneumol* 2002; 28(6):329-334.
- 94- Lima RC *et al.* Associação entre as características individuais e sócio-econômicas e os acidentes do trabalho em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cad. Saúde pública.* 1999; 15(3): 569-580.
- 95- Zwerling C, Sprince NL, Wallace RB, Davis CS, Whitten PS, Heeringa SG. Risk factors for occupational injuries among older workers: An analysis of health and retirement study. *American Journal of Public Health.* 1996; 86:1306-1309.
- 96- Caracciolo CLH. O fumo como fator de risco nos portadores de silicose. Universidade Federal Fluminense. 1992.
- 97- Rees D, Murray J. Silica, silicosis and tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007;11(5):474-484.
- 98- Terra Filho M, Santos UP. Silicosis. *J Brás Penumol.* 2006;32(1):S41-S7.
- 99- Hnizdo E, Murray J. Risk of pulmonary tuberculosis relative to silicosis and exposure to silica dust in South African gold miners. *Occup Environ Med.* 1998;55(7):496-502. Erratum in: *Occup Environ Med* 1999;56(3):215-6.
-

-
- 100- teWaternaude JM, Ehrlich RI, Churchyard GJ, Pemba L, Dekker K, Vermeis M, et al. Tuberculosis and sílica exposure in South African gold miners. *Occup Environ Med.*2006;63(3):187-92.
- 101- Calvert G, Rice FL, Boiano JM, Sheehy JW, Sanderson WT. Occupational silica exposure and risk of various diseases: an analysis using death certificates from 27 states of the United States. *Occup Environ Med.* 2003;60(2):122-9.
- 102- Kumaravel TS, Vilhar B, Faux SP, Jha AN. Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biol Toxicol.* 2009; 25 (1): 53-64.
- 103- Başaran N, Shubair M, Ündeğer U, Kars A. Monitoring of DNA damage in foundry and pottery workers exposed to silica by the alkaline comet assay. *America, Journal of Industrial Medicine.* 2003; 43: (6)602-610.
- 104- Barreiros ALBS & David JM. Estresse Oxidativo: Relação de Espécies Reativas e Defesa do Organismo. *Quim. Nova.* 2006; 29(1): 113-123.
- 105- Bouma G, Xia B, Crusius JB, Bioque G, Koutroubakis I, von Blomberg BM, Meuwissen SG, Pena AS. Distribution of four polymorphisms in the tumor necrosis factor (TNF) genes in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol.* 1996; 103:391.
- 106- Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, Mahieu P, Malaise M, De Groote D, Louis R, Belaiche J. Tumor necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol,* 1998; 113:401.
- 107- Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, Cheval C, Monchi M, Teboul JL, Riche F, Leleu G, Arbibe L, Mignon A, Delpech M, Dhainaut JF. Association os TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA* 282, 1999; 561-568.
- 108- Reviron D, Dussol B, Andre M. *et al.* TNF-alpha and IL-6 gene polymorphism and rejection in kidney transplantation recipients. *Transplant Proc,* 2001 Feb-Mar; v. 33, n.1-2, p. 350-351.
- 109- Pociot F, Briant L, Jongeneel CV. *et al.* Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF-alpha and TNF-beta by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol,* 1993; v.23, n1, p.224-231.
- 110- Katnelson BA, Polzik EV, Privalova LI. Some aspects of the problem of individual predisposition to silicosis. *Environ Health Perspect* 1986; 68: 175-185.
- 111- Kornman KS, Crane A, Wang H-Y, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson TG, Higginbottom FL, Duff GW. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol,* 1997; 24: 72-77.
-

ANEXO 1

III.4 - Determinações dos parâmetros do estresse oxidativo

III.4.1 - Catalase (CAT)

A determinação da atividade da enzima Catalase (CAT) em eritrócitos humanos foi realizada baseada no método de Aebi, H. (1984), (112) que tem por finalidade quantificar a atividade da enzima CAT através da decomposição de 1 mol de H₂O₂ a uma D.O em 230nm.

Soluções utilizadas

- Solução de tampão fosfato [fosfato de potássio monobásico 50mM; fosfato de sódio dibásico 50mM, pH 7,0];
- Solução de peróxido de hidrogênio [30% de H₂O₂ em solução de tampão fosfato (50mM, pH 7,0)];
- Solução de cloreto de sódio isotônico [0,9% NaCl em água destilada].

Procedimentos

Nota: As amostras de sangue (coletadas em tubos heparinizados) devem ser mantidas a 0°C (banho de gelo) durante toda a elaboração das análises, a serem realizadas no mesmo dia de coleta das amostras para o não comprometimento da atividade enzimática.

Para cada amostra, separa-se uma alíquota de 2mL em tubos e centrifuga-se as amostras por 10 minutos a 3500 rpm (1591 G) a 4°C. Posteriormente, despreza-se o plasma (sobrenadante). Uma alíquota contendo 500µL de sedimento de eritrócitos de cada amostra é transferida para outro tubo de centrífuga refrigerada, onde se acrescenta 5mL de cloreto de sódio (solução salina) para a lavagem dos eritrócitos. Homogeneízam-se os tubos por 15 segundos e, em seguida, centrifuga-se as amostras por 10 minutos a 3500 rpm (1591 G) e a 4°C. Esse processo de lavagem é repetido por mais 2 vezes. Após as 3 lavagens, transfere-se 50µL do sedimento de eritrócitos para um tubo de vidro e adiciona-se 200µL de água deionizada, para a hemólise dos eritrócitos, formando assim o hemolisado concentrado.

Este procedimento é realizado em triplicata. Posteriormente, homogeneízam-se os tubos por 20 segundo, sendo os mesmos mantidos em banho de gelo até o momento da leitura no espectrofotômetro.

Momentos antes da análise espectrofotométrica, preparam-se a solução de peróxido de hidrogênio e o hemolisado diluído, através da adição de 5µL do hemolisado concentrado e 2,5mL de tampão fosfato. A leitura das amostras transcorre no modo cinético por 15 segundos a um comprimento de onda de 230nm.

Para a leitura do branco, adiciona-se na cubeta, 2 mL do hemolisado diluído e 1 mL de tampão fosfato e para a leitura das amostras, adicionar na cubeta, 2 mL do hemolisado diluído e 1 mL de peróxido de hidrogênio.

Cálculos

Não é possível definir uma unidade internacional para a catalase, portanto recomenda-se o uso de uma constante de reação de 1ª ordem (k). Esta constante pode ser relacionada com o teor de hemoglobina presente na amostra (k/g Hb), que serve como uma medida da atividade específica da catalase em eritrócitos. Os cálculos de CAT são baseados nas seguintes fórmulas:

$$k = (2,3/15) (\log A1/A2)$$

$$k = 0,153 (\log A1/A2) (\text{segundos}^{-1})$$

$$k/\text{mL} = k_a$$

$$k/\text{g Hb} = k/\text{mL} (1000/b) = 0,153 (a/b)(\log A1/A2)$$

Onde,

A1 = absorvância no t=0.

A2 = absorvância no t=15 segundos

a = Fator de diluição

b = teor de hemoglobina (Hb) em grama/litro (g/L)

Nota: Para o cálculo da atividade da enzima catalase há a necessidade do valor do teor de hemoglobina nos eritrócitos. Portanto, utilizou-se exame de hemograma completo recente (até 3 meses) ou solicitou-se o pedido do exame através do laboratório.

III.4.2 - Glutathione S-transferase

A determinação da atividade enzimática da GST foi realizado por espectrofotometria UV-Visível, utilizando comprimento de onda de 340nm e 1-cloro-2,4- dinitrobenzeno como substrato universal, de acordo com o método descrito por Habig et al (1981). (113)

Reagentes

- Solução de cloreto de sódio isotônico [0,9% NaCl em água destilada]
- Tampão Fosfato 0,1M [KH₂PO₄ 0,1M; K₂HPO₄ 0,1M; pH=6,5].
- Solução de Etanol (EtOH) 95% (v/v)
- Solução de CDNB 0,3M, preparada em solução de EtOH 95%
- Solução de GSH 0,3M, preparada em Tampão Fosfato 0,1 M.

Procedimentos

Lavagem de Eritrócitos

Logo após a coleta de sangue, transfere-se, para um novo tubo de ensaio, uma alíquota contendo 2 mL de sangue total e centrifuga-se a amostra a 3000 rpm (1169 G) por 30 minutos. Em seguida, retira-se 500µL de eritrócitos (sedimento), sendo transferido para um novo tubo de ensaio, onde adiciona-se 5 mL de NaCl 0,9 %, para a lavagem dos eritrócitos.

Homogeneiza-se cada tubo por 15 segundos, e posteriormente, centrifugam-se os mesmos a 3000 rpm (1169 G) por 10 minutos. Ao término da centrifugação, retira-se a parte sobrenadante, com o auxílio de uma pipeta, tomando cuidado para não aspirar eritrócitos precipitados. Os procedimentos de lavagem de eritrócitos são realizados 3 vezes.

Após a terceira lavagem, transferem-se duas alíquotas de 50 µL de eritrócitos de cada amostra para dois novos tubos, onde adiciona-se 1450µL de Água Milli-Q e, em seguida, homogeneiza-se por 30 segundos, ocorrendo a hemólise.

No momento da leitura, prepara-se a mistura de PBS + GSH + CDNB em um tubo, conforme Tabela 1, homogeneiza-se a mistura, sendo transferida, em seguida, para a cubeta. Para o branco, adicionar 100µL de PBS no lugar do hemolisado e para a amostra, adicionar o hemolisado diretamente na cubeta, fazendo 5 ciclos de aspiração com a pipeta, para homogeneizar. A leitura das amostras foi realizada em modo cinético, a 340 nm, durante 1 minuto.

III.5 - Metodologia do Ensaio Cometa

Soluções Utilizadas

- Solução de Lise celular [NCl 2,5 M; Tris-HCl 10 mM; EDTA 100mM; Lauril Sulfato de sódio 1%; pH 10]
- Tampão de Eletroforese [300mM / 1mM EDTA]
- Tampão de Neutralização [Tris 0,4 M]
- Solução de Brometo de etídeo [40ug/mL]
- Agarose [1,5%]
- Agarose Low Melting Point (LMP) [0,5%]
- Solução A [MMS 80mM]
- Solução B [MMS 0,8mM] Soluções Controle Positivo
- Solução C [MMS 0,4mM]

Procedimentos

Preparo das lâminas

Inicialmente, as lâminas foram lavadas com etanol absoluto e, em seguida, mergulhadas em agarose 1,5% a 60°C. Posteriormente, limpa-se a parte inferior das lâminas e deixa-se a agarose gelificar na parte superior, horizontalmente.

Preparo das amostras controle

- 1- Controle celular – adiciona-se 250uL de sangue total em tubo Eppendorf
- 2- Controle solvente – adiciona-se 50uL de tampão PBS a 200uL de sangue total em Eppendorf
- 3- Controle positivo MMS 1 – adiciona-se 50uL de solução B a 200uL de sangue total em tubo Eppendorf, obtendo-se concentração final de MMS = $16 \times 10^{-5} \text{ M}$ (0,16mM)
- 4- Controle positivo MMS 2 – adiciona-se 50uL de solução C a 200uL de sangue total em tubo Eppendorf, obtendo-se concentração final de MMS = $8 \times 10^{-5} \text{ M}$ (0,08mM) Incuba-se todas as amostras controle junto com as amostras-teste por 2 horas a 37+/-1°C

Preparo das células

Marca-se cada lâmina com o código de identificação do indivíduo e/ou das soluções controle. Em seguida, homogeneiza-se o sangue invertendo o tubo vacutainer várias vezes.

Transfere-se, com o auxílio de um pipetador automático, uma alíquota de 10uL de sangue total ou de solução controle para tubo Eppendorf e adiciona-se, lentamente, 120uL de agarose LMP, previamente aquecida à 37°C, homogeneizando suavemente a suspensão de células.

Posteriormente, espalha-se a suspensão em uma lâmina contendo uma película de agarose à 1,5%, que foi preparada na etapa anterior, e coloca-se sobre ela uma lamínula de 24x60mm, antes que a suspensão de células na agarose se solidifique. Prepara-se 5 lâminas por amostra.

Em seguida, as lâminas são colocadas em uma bandeja e deixadas na geladeira por 5 minutos. Após o tempo determinado, retira-se, cuidadosamente, de cada lâmina as suas lamínulas e, subsequente, acondiciona-se às lâminas, em 130mL de solução de lise, num recipiente tipo Coplin, revestido externamente com papel laminado. A partir desta etapa, evita-se a irradiação de luz direta, para prevenir lesões adicionais ao DNA.

As lâminas são guardadas na geladeira por, no mínimo, 1 hora e, no máximo, 24 horas e, após este período, são arrumadas em fileiras ao lado do anodo (+) da cuba de eletroforese. Adiciona-se, cuidadosamente, a solução de eletroforese à 4°C, pelas laterais da cuba, o suficiente para cobrir as lâminas, deixando-as em contato com o tampão de corrida, por 25 minutos, para possibilitar o desenovelamento do DNA e assim poder expressar as diferentes classes de lesões álcali-lábeis.

Ajusta-se a fonte de eletroforese nas condições de operação (25v/300A) e procede-se a corrida de eletroforese, por 25 minutos. Ao término da corrida, retira-se, cuidadosamente,

as lâminas da cuba, lavando-as com tampão de neutralização, etanol absoluto e água destilada, 3 vezes com intervalos de 5 minutos, para cada lavagem.

Deixam-se as lâminas secarem em contato com o ar, à temperatura ambiente, por horas ou mais, caso haja necessidade. As lâminas secas são guardadas na sua embalagem original e deixadas à temperatura ambiente.

Coloração das lâminas

Com o auxílio de uma pipeta automática, distribui-se 40uL de solução corante de brometo de etídeo (40ug/mL) em cada lâmina, cobrindo-a, posteriormente, com a lamínula.

Imediatamente após, observa-se ao microscópio de fluorescência.

Análise dos cometas ao microscópio

As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência, equipado com lentes oculares e lentes objetivas planocromáticas de 10X e 40X e com filtro de excitação de 560nm (faixa verde) e um filtro de barreira de 590nm. Os cometas foram localizados com a objetiva de 10X e após a sua visualização, os nucleóides examinados, com a objetiva de 40X. Os cometas foram analisados e suas morfologias observadas, scanneando a lâmina da esquerda para a direita. Cada cometa foi classificado visualmente, de acordo a intensidade da cauda, como mostra a Figura 7 e, ao final das análises, fazendo-se o somatório das classificações das caudas dos cometas encontrados, podendo o total de UA variar entre zero e 150.

ANEXO 2

3.7 Fator-alfa de Necrose Tumoral (TNF- α)

A dosagem foi realizada por KIT comercial para a dosagem de TNF- α humana da Invitrogen Corporation, CA, USA.

O método para determinação na TNF- α humana é baseado em um kit de ELISA (Enzyme Lynked-Immuno-Sobent Assay), onde um anticorpo monoclonal específico para a TNF- α humana é adsorvido dentro de cada poço de uma microplaca de leitura. Amostras, incluindo padrões de TNF e controles, e amostras desconhecidas, são adicionadas dentro de cada poço.

Durante a primeira incubação (2 horas) o antígeno da TNF se liga ao anticorpo (captura) adsorvido na parede do poço. Depois da 1ª lavagem, um anticorpo de sinalização, específico para TNF, é adicionado. Já na segunda incubação (1 hora) o anticorpo de sinalização se liga a TNF adsorvida durante a 1ª incubação. Após a remoção do excesso do segundo anticorpo (sinalização), a enzima streptavidina-peroxidase é adicionada no poço. Esta se liga ao anticorpo de sinalização para formar o chamado “sanduíche de 4 membros”. Após a terceira incubação (30 min) e lavagem para remover toda a enzima não ligada, um substrato colorido é adicionado, atuando sobre a ligação da enzima com anticorpo de sinalização, para produzir cor. A intensidade desta coloração produzida é diretamente proporcional à concentração de TNF humana presente na amostra inicial.

ANEXO 3



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio
Arouca

Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia
Humana



QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO DE EXPOSIÇÃO A SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS

1- Número: _____

2-CESTEH número: _____

A) DADOS GERAIS

1. Data de hoje: ____/____/____

Hora do início: _____

2. Nome do voluntário

3. Endereço:

4. CEP: _____ ☐ -9-Faltando

5. Telefone de contato: _____ ☐ -9-Faltando

6. Sexo : 1 - ☐ M 2 - ☐ F

7. Estado Civil :

1-☐ Casado 2-☐ Solteiro 3-☐ União Livre 4-☐ Separado 5-☐ Viúvo

8. Data de nascimento: ____/____/____

9. Idade: _____anos

10. Você sabe ler e escrever? 1-☐ sim 2-☐ não (ir para pergunta 12) 9-☐ Faltando

11. Até que ano você estudou na escola?

1-☐ ensino fundamental completo 2-☐ ensino fundamental incompleto

3-☐ ensino médio completo 4-☐ ensino médio incompleto

5-☐ mais que o ensino médio. Cite: _____

9-☐ Faltando

12. Quantas pessoas moram permanentemente em sua residência?

1-☐ uma 2-☐ duas 3-☐ três 4-☐ quatro 5-☐ mais de quatro

13. Quantos cômodos (quartos e salas) têm a sua casa ?

1- ☐ um 2- ☐ dois 3- ☐ três 4- ☐ quatro 5- ☐ mais de quatro

14. Há quanto tempo você mora nesta casa? ____ anos e ____ meses ☐ 9- ☐ Faltando

15. Como é o piso da sua casa?

1- ☐ “vermelhão” 2- ☐ cimento 3- ☐ madeira (taco)

4- ☐ cerâmica 5- ☐ outros. Especifique: _____ 9- ☐ Faltando

16. Quando sua casa foi pintada pela última vez ? ____ anos ____ meses

1- ☐ nunca foi pintada (ir para pergunta 20) 9- ☐ Faltando

17. Na ocasião da pintura foi usada lixa para o preparo das paredes?

1- ☐ sim 2- ☐ não 9- ☐ Faltando

18. A sua casa possui água encanada?

1- ☐ sim 2- ☐ não (pular para a pergunta 20) 9- ☐ Faltando

19. Os encanamentos da sua casa são de:

1- ☐ plástico 2- ☐ metal 3- ☐ outros. Especifique: _____ 9- ☐ Faltando

20. Qual o destino do lixo da sua casa?

1- ☐ recolhido pelo lixeiro 2- ☐ colocado na caçamba 3- ☐ enterrado 4- ☐ queimado

5- ☐ deixado a céu aberto 6- ☐ outros. Especifique: _____ 9- ☐ Faltando

21. Existe próximo a sua residência:

1- ☐ Indústria de produtos de borracha

2- ☐ Indústria de plásticos

3- ☐ Indústria de cerâmica

4- ☐ Gráfica

5- ☐ Fábrica de tintas

6- ☐ Construção ou renovação de casas

7- ☐ Jateamento de areia

8- ☐ Atividade de derreter metais

9- ☐ Concerto de radiadores

10- ☐ Soldagem

11- ☐ Fábrica de bateria ou recarregadores

12- ☐ Incineração de Lixo

13- ☐ Atividade de contato com gasolina

14- ☐ Pintura de carros e eletrodomésticos

15- ☐ Refinaria

16- ☐ Lavoura (horta/pomar)

17- ☐ Outros. Especifique: _____

18- ☐ Não existe nenhuma atividade acima descrita

22. Você morou em algum lugar que fosse próximo a:

- 1- ☐ Indústria de produtos de borracha
- 2- ☐ Indústria de plásticos
- 3- ☐ Indústria de cerâmica
- 4- ☐ Gráfica
- 5- ☐ Fábrica de tintas
- 6- ☐ Construção ou renovação de casas
- 7- ☐ Jateamento de areia
- 8- ☐ Atividade de derreter metais
- 9- ☐ Concerto de radiadores
- 10- ☐ Soldagem
- 11- ☐ Fábrica de bateria ou recarregadores
- 12- ☐ Incineração de Lixo
- 13- ☐ Atividade de contato com gasolina
- 14- ☐ Pintura de carros e eletrodomésticos
- 15- ☐ Refinaria
- 16- ☐ Lavoura (horta/pomar)
- 17- ☐ Outros. Especifique: _____
- 18- ☐ Não existe nenhuma atividade acima descrita

23. A quanto tempo você mudou deste lugar? _____ anos e _____ meses ☐ 9-Faltando

24. Seu uniforme é lavado em casa? 1- ☐ sim 2- ☐ não

B) DADOS SOBRE O TRABALHO

25. Qual é o seu cargo no trabalho?

26. Como é a sua atividade de trabalho? Descreva todo o processo.

27. Há quanto tempo trabalha neste cargo? _____ anos _____ meses 9- ☐ Faltando

28. Qual é a sua carga horária semanal de trabalho? _____ hs/semana. 9- ☐ Faltando

29. Você usa equipamentos de proteção individual?

1- ☐ sim 2- ☐ não (ir para pergunta 38) 9- ☐ Faltando

30. Quais?

1- ☐ Luvas

2- ☐ Máscara

3- ☐ Protetor auricular

4- ☐ Óculos

5- ☐ Avental

6- ☐ Bota

7- ☐ Capacete

8- ☐ Outros. Especifique: _____

31. Com que frequência você usa luvas?

1- ☐ sempre 2- ☐ frequentemente 3- ☐ raramente

32. Com que frequência você usa máscara?

1- ☐ sempre 2- ☐ frequentemente 3- ☐ raramente

33. Com que frequência você usa protetor auricular?

1- ☐ sempre 2- ☐ frequentemente 3- ☐ raramente

34. Com que frequência você usa óculos?

1- ☐ sempre 2- ☐ frequentemente 3- ☐ raramente

35. Com que frequência você usa avental?

1- ☐ sempre 2- ☐ frequentemente 3- ☐ raramente

36. Com que frequência você usa bota?

1- ☐ sempre 2- ☐ frequentemente 3- ☐ raramente

37. Com que frequência você usa capacete?

1- ☐ sempre 2- ☐ frequentemente 3- ☐ raramente

38. Você fez exame médico admissional?

1- ☐ sim 2- ☐ não

39. Você faz exames médicos periódicos?

1- ☐ sim 2- ☐ não

40. Com qual frequência você faz exames periódicos?

1- ☐ semestral 2- ☐ anual 3- ☐ maior periodicidade _____

41. Você já foi afastado por motivo de doença?

1- ☐ sim 2- ☐ não

42. Qual doença? _____

43. Você já trabalhou em:

- 1- ☐ Indústria de produtos de borracha
- 2- ☐ Indústria de plásticos
- 3- ☐ Indústria de cerâmica
- 4- ☐ Gráfica
- 5- ☐ Fábrica de tintas
- 6- ☐ Construção ou renovação de casas
- 7- ☐ Jateamento de areia
- 8- ☐ Atividade de derreter metais
- 9- ☐ Concerto de radiadores
- 10- ☐ Soldagem
- 11- ☐ Fábrica de bateria ou recarregadores
- 12- ☐ Incineração de Lixo
- 13- ☐ Atividade de contato com gasolina
- 14- ☐ Pintura de carros e eletrodomésticos
- 15- ☐ Refinaria
- 16- ☐ Lavoura (horta/pomar)
- 17- Outros. Especifique: _____
- 18- ☐ Não existe nenhuma atividade acima descrita

44. Você já trabalhou em outro estaleiro?

- 1- ☐ sim 2- ☐ não (ir para pergunta 43)

45. Qual era o cargo que você exercia? _____

C) HÁBITOS

46. Você fuma?

- 1- ☐ sim. 2- ☐ não (ir para pergunta 49) 9- ☐ Faltando

47. Quantos cigarros você fuma por dia? _____ cigarros/dia _____ maços

- 9- ☐ Faltando

48. Há quanto tempo você fuma? _____ anos completos

- 9- ☐ Faltando (ir para pergunta 39)

49. Você já fumou?

- 1- ☐ sim 2- ☐ não (ir para pergunta 51) 9- ☐ Faltando

50. Você parou de fumar há quanto tempo? _____ anos _____ meses

51. Você toma bebida alcoólica? 1- ☐ sim 2- ☐ não (ir para pergunta 51) 9- ☐ Faltando

52. Com que frequência você toma bebidas alcoólicas?

- 1- ☐ 4 ou mais vezes por semana 2- ☐ até 3 vezes por semana 2- ☐ até 2 vezes por semana
3- ☐ 1 vez por mês 4- ☐ parei de beber 5- ☐ não sabe 9- ☐ Faltando
-

53. Na última ocasião em que você tomou bebidas alcoólicas, o que bebeu e em que quantidade?

1- ☐ não sabe 8- ☐ não se aplica 9- ☐ Faltando

	QUANTIDADE				
BEBIDA	Copos	Latas	Cálices	Doses	Garrafas
1- Cerveja ou chopp					
2- Vinho					
3- Destilados (cachaça, rum, vodca, batidas, uísque, etc).					
4- Licores					

54. O que você gosta de fazer nos momentos de lazer?

1- ☐ pinturas em geral 2- ☐ conserto em carros 3- ☐ outros. 9- ☐ faltando

Especifique: _____

55. Você faz ou já fez uso de algum medicamento para tratamento de câncer / tumor?

1- ☐ sim 2- ☐ não

56. Você já faz radioterapia?

1- ☐ sim 2- ☐ não

57. Você fez exame de raio-X nas últimas duas semanas?

1- ☐ sim 2- ☐ não

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)