

ARQUIVOS DO INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE



PRÉMIOS RICARDO JORGE

**I CENTENÁRIO DO INSA
(1901-2001)**

VOL. XXIV | 2001

ARQUIVOS DO INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE



PRÉMIOS RICARDO JORGE

**I CENTENÁRIO DO INSA
(1901-2001)**

VOL. XXIV | 2001

DIRECTOR

João Lavinha

CONSELHO CIENTÍFICO

Maria de Fátima Alpendurada
António Amorim
Francisco Antunes
Luís Archer
Henrique Barros
Mário Bernardo
Victor Manuel Pais Ca-eiro
Joaquim António Machado Caetano
José Manuel Calheiros
Salvador Massano Cardoso
Germano do Carmo
Sérgio Castedo
Hugo David
António Lobato de Faria
Mário Faria
Wanda Canas Ferreira
Maria Odette Santos Ferreira
Jorge Torgal Garcia
Aires Humberto da Penha Gonçalves
Manuel Júdice Halpern
Benvindo Justiça
Henrique Lecour
José Manuel Sousa Lobo
Ana Costa Miranda
Carolino Monteiro
José Augusto Guimarães Morais
José Moniz Pereira
Augusto Franco Pinheiro Pinto
António Mário Rodrigues Ribeiro
Manuel Santos Rosa
José Rueff
Maria Helena Saldanha
Heloísa Santos
Paula Marreilha dos Santos
Mária João Saraiva
Carlos Silveira
Luís Gonçalves Sobrinho
João Carlos Figueiredo Sousa
Frederico José Teixeira
Jaime Santos Dias Travassos

CONSELHO REDACTORIAL

João Lavinha
Mária dos Anjos Catry
Mária José Vaz Dias
Teresa Paixão

SECRETARIADO

Manuela Lopes

REDACÇÃO, ADMINISTRAÇÃO E PROPRIEDADE

INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE
DR. RICARDO JORGE
Av. Padre Cruz
1649-016 LISBOA
PORTUGAL

COMPOSIÇÃO E IMPRESSÃO

Gráfica 2000
Rua Sacadura Cabral, 89-A
1495-703 CRUZ QUEBRADA

VOL. 24 2001

O Instituto Nacional de Saúde não se responsabiliza pelas opiniões expressas nos artigos publicados nos ARQUIVOS, que são da exclusiva responsabilidade dos seus Autores. A utilização destes trabalhos obriga à identificação da sua origem e autoria.

DEPÓSITO LEGAL N.º 13502/86
ISSN 0870 - 2845

© Instituto Nacional de Saúde, 2001

1. Vírus da hepatite delta: transporte entre o núcleo e o citoplasma. Uma via com potencialidades terapêuticas	5
<i>(Prémio Laura Ayres de Controlo de Doenças Transmissíveis/Microbiologia, 2001)</i> <i>(Prémio Ricardo Jorge de Saúde Pública) (ex aequo)</i> João Paulo Tavanez, Celso Cunha e Maria do Carmo Fonseca	
2. Modulação do transporte de insulina em células endoteliais de capilares cerebrais de Rato pela fosfatase alcalina	25
<i>(Prémio Gonçalves Ferreira de Nutrição/Alimentação, 2001)</i> <i>(Prémio Ricardo Jorge de Saúde Pública) (ex aequo)</i> C. Calhau, F. Martel, S. Pinheiro-Silva, P. Soares-da-Silva, C. Hipólito-Reis e I. Azevedo	
3. Efeito genotóxico da exposição prolongada a ruído de baixa frequência e vibração de corpo inteiro	39
<i>(Prémio de Investigação sobre Ambiente e Saúde Aloísio Coelho, 2001)</i> <i>(Prémio Ricardo Jorge de Saúde Pública) (ex aequo)</i> Maria João Silva, Anabela Dias, Ana Barreta, Paulo Nogueira, Nuno Castelo Branco, Maria Guida Boavida	
Bibliografia publicada noutros periódicos, por investigadores e técnicos do INSA	69
Papers published by INSA staff in other scientific journals	
Normas para a preparação de manuscritos	71
Instructions for authors	

Vírus da hepatite delta: transporte entre o núcleo e o citoplasma. Uma via com potencialidades terapêuticas*

João Paulo Tavanez¹

Celso Cunha^{1,2}

Maria do Carmo Fonseca¹

RESUMO

A hepatite delta é uma doença viral disseminada por quase todas as regiões do globo, para a qual ainda não existe uma terapia eficaz. O agente etiológico, o vírus da hepatite delta (HDV) foi descoberto ao estudar biópsias de fígado de doentes infectados com o vírus da hepatite B (HBV) e que revelavam sintomas particularmente graves de doença hepática. Subsequentemente, foi demonstrado que o HDV coinfecta indivíduos já infectados com o HBV causando danos hepáticos mais severos e aumentando o risco de hepatite fulminante. Adicionalmente, a infecção produtiva e transmissão do HDV requerem coinfeção com HBV. Esta associação clínica entre os dois vírus deve-se ao facto de o invólucro do HDV ser constituído por proteínas de superfície do HBV (HBsAg).

O HDV é um vírus cujo genoma é constituído por uma molécula de RNA de cadeia simples, circular, de cerca de 1.7 Kb. O RNA do HDV possui uma actividade autocatalítica de ribozima e replica-se por um mecanismo de círculo rolante. Este RNA possui uma única grelha de leitura aberta que codifica para o antígeno delta (HDAG). Por um mecanismo de "editing" do RNA são expressas duas formas deste antígeno, a pequena (S-HDAG), de 24 kD, e a grande (L-HDAG), de 27 kD. Embora a interacção entre o HDV e o HBV sejam cruciais para a patogénese do primeiro, muito pouco se sabe sobre como esta interacção ocorre na célula hospedeira. Um dos factos particularmente intrigantes diz respeito à observação das ribonucleoproteínas (RNPs) do HDV no núcleo de células que exprimem genomas virais e de HBsAg exclusivamente no citoplasma. Para explicar o modo como estes dois componentes do HDV, separados espacialmente na célula, se encontram para formar partículas virais infecciosas propusemos a seguinte hipótese. Resumidamente, as RNPs do HDV seriam continuamente exportadas do núcleo para o citoplasma onde no caso de se verificar uma coinfeção com HBV, se encontrariam com os HBsAg. Na ausência de HBsAg e, devido à presença de um sinal de localização nuclear (NLS) nos antígenos delta, as partículas delta seriam rapidamente reimportadas para o núcleo. A abordagem experimental que utilizamos para testar este modelo foi baseada em ensaios de heterocariontes. Os resultados obtidos permitem concluir que as RNPs do HDV fazem um vaivém contínuo entre o núcleo e o citoplasma mesmo na ausência de HBsAg. Contudo, nenhum dos antígenos delta tem capacidade para ser exportado para o citoplasma na ausência dos antígenos delta. Estes resultados permitem concluir que o RNA do HDV possui um sinal de exportação nuclear.

As potenciais implicações deste trabalho no desenvolvimento de novas terapias antivirais baseadas em ribozimas são discutidas.

Introdução

Hepatite delta: aspectos clínicos e epidemiológicos

O vírus da hepatite delta (HDV) foi descoberto em meados dos anos 70 pelo gastroenterologista italiano Mario Rizzetto, ao estudar biópsias hepáticas de

doentes infectados pelo vírus da hepatite B (HBV; Rizzetto et al., 1977). Ficou posteriormente demonstrado que o HDV infecta indivíduos previamente infectados pelo HBV, causando lesões hepáticas mais graves e aumentando o risco de ocorrência de hepatites fulminantes (Gorinvadarajan et al., 1984; Jacobson et al., 1985). O HDV é, portanto, considerado um vírus satélite do HBV, uma vez que a pre-

* Prémio Laura Ayres de Controlo de Doenças Transmissíveis/Microbiologia, 2001.

Prémio Ricardo Jorge de Saúde Pública (*ex aequo*).

(Prémios Científicos do I Centenário do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge).

¹ Instituto de Histologia e Embriologia, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

² Unidade de Biologia Molecular, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.

sença deste último é condição indispensável para que se observe a produção de partículas delta infecciosas capazes de propagar a infecção (Rizzetto et al., 1980; Ponzetto et al., 1988).

A associação clínica entre estes dois vírus resulta do facto do genoma do HDV não codificar para as suas próprias proteínas do invólucro. O invólucro do HDV, em vez disso, é constituído por proteínas de superfície do HBV (HBsAg; Smedile et al., 1994). Deste modo, o HDV apenas provoca infecção transmissível na presença do HBV.

O HDV parece apenas replicar-se no fígado e, por isso, as anomalias patológicas directas neste tipo de hepatite estão limitadas a este órgão. Estas anomalias são em tudo semelhantes às observáveis no decurso de outros tipos de hepatites virais agudas ou crónicas e consistem, de um modo geral, em necrose hepatocelular e inflamação. Do ponto de vista histológico não há, pois, diferenças entre a hepatite por HDV e outras formas de hepatite viral provocadas por outros agentes.

O curso clínico da infecção por HDV pode ser bastante variável mas, geralmente, o quadro clínico é mais severo do que o observado noutras formas de hepatite. O período de incubação pode variar entre 3 a 7 semanas após o que se começam a observar os primeiros sintomas que incluem fadiga, letargia, anorexia e náuseas. Cerca de 60% a 70% dos doentes com hepatite delta crónica desenvolvem cirrose. Esta frequência é cerca de três vezes superior à observada em doentes com hepatite B ou outras formas de hepatite (Rizzetto et al., 1983). Os casos de hepatite fulminante, a forma mais severa da doença aguda, associados a HDV, são dez vezes mais frequentes do que os observados noutras hepatites virais. Esta forma grave da doença é caracterizada por encefalopatias hepáticas que se manifestam por mudanças na personalidade, distúrbios do sono, dificuldade de concentração e, em casos mais severos, comportamento anormal, sonolência e coma. A mortalidade em hepatites fulminantes é de cerca de 80%, independentemente do tratamento (Purcell e Gerin, 1990).

Estudos de seroprevalência de anticorpos anti-HDV em indivíduos positivos para HBsAg, têm mostrado uma distribuição generalizada mas não uniforme por todo o mundo (Ponzetto et al., 1985). As áreas descritas como sendo de maior prevalência são a bacia do Mediterrâneo, incluindo o Sul da Europa e o Médio Oriente, a África Ocidental, a bacia do Amazonas e alguns países asiáticos, incluindo o Japão e Taiwan. Nestes dois últimos países existem mesmo algumas zonas endémicas onde a preva-

lência pode atingir valores superiores a 30% em pacientes com hepatite crónica (Huo et al., 1997; Nakasone et al., 1998). Em Portugal, alguns estudos apontam para uma prevalência de cerca de 17% em portadores crónicos de HBsAg (Ramalho et al., 1987), sendo que cerca de 8% de todas as hepatites virais parecem estar associadas ao HDV (Velosa et al., 1993). A hepatite delta afecta indivíduos de todos os grupos etários sendo o seu modo de contágio mais frequente o contacto com produtos de sangue ou sangue de portadores infectados. Neste contexto, têm assumido particular relevo os casos de contágio descritos em toxicodependentes (Hansson et al., 1982; Oliveira et al., 1999), incluindo entre a população portuguesa (Ramalho et al., 1987).

Não existe, hoje em dia, um tratamento específico para a hepatite delta. A terapia imunossupressora não mostrou possuir qualquer valor clínico à semelhança do que acontece para outras formas agudas e crónicas de hepatites virais (Rizzetto et al., 1983). O uso de interferão mostrou inibir a replicação viral (Hoofnagle et al., 1987; Rizzetto et al., 1986; Thomas et al., 1987) mas, à semelhança do que acontece com o HBV, o seu efeito benéfico é transitório. Recentemente, foi descrita a cura de um doente com hepatite delta crónica após doze (12) anos de tratamento diário com interferão alfa (Lau et al., 1999a). Por outro lado, o tratamento com interferão alfa pode, por vezes, estar associado a um agravamento de sintomas nalguns doentes (Crosignani et al., 1999). Algumas drogas antivirais têm sido testadas *in vitro* e em portadores crónicos de HDV. De entre todas, talvez mereça a pena realçar a lamivudina (3-tiacitidina), um análogo de nucleótidos que aprece inibir a replicação do HDV (Lau et al., 1999b). No entanto, tem sido paralelamente descrito o aparecimento de mutantes resistentes a esta droga (Rizzetto, 1999). Uma terapia combinada de lamivudina com outras drogas antivirais poderá vir a trazer alguns benefícios. Mas, neste momento, não existe uma terapia válida para a hepatite delta. Neste contexto de busca de uma estratégia terapêutica antiviral específica, poderá assumir particular importância o facto do RNA do HDV possuir actividade autocatalítica de ribozima. Adiante, esta característica do HDV será abordada mais detalhadamente. Nos últimos anos, as ribozimas têm vindo a revelar um elevado potencial terapêutico devido à sua capacidade de clivar RNAs prejudiciais ao normal funcionamento da célula. Estas propriedades têm vindo a ser intensamente investigadas com o objectivo de serem utilizadas em terapia génica de algumas doenças, nomeadamente alguns tumores e doenças virais.

Recentemente, foi descrito o uso de ribozimas no tratamento de hepatites por HBV, tendo-se verificado uma redução de 83% no número de partículas virais no fígado de doentes (Welch et al., 1997). Também a ribozima do HDV, apesar da falta de um conhecimento preciso sobre a sua estrutura secundária e terciária, tem vindo a ser modificada *in vitro* de modo a poder actuar em *trans* e ser potencialmente usada em terapia génica (Been, 1994; Kawakami et al., 1996). Deste modo, o aprofundamento do conhecimento sobre aspectos fundamentais da biologia do HDV, nomeadamente sobre as propriedades do seu RNA, ou seja a ribozima do HDV, pode contribuir para novas e promissoras abordagens terapêuticas da doença crónica.

Aspectos gerais da biologia do HDV

O HDV possui uma estrutura esférica de cerca de 36 nm de diâmetro. O invólucro viral é constituído por lípidos celulares e pelas proteínas de superfície do HBV. A parte interna do virião corresponde à porção ribonucleoproteica e os seus componentes são codificados pelo genoma viral. O genoma do HDV é constituído por uma molécula de RNA de cadeia simples, circular, com cerca de 1700 nucleótidos (nt). Este RNA possui um elevado número de sequências intramoleculares complementares, cerca de 70% do genoma total, resultando na ocorrência de emparelhamentos internos que culminam na formação de uma estrutura em bastonete semelhante à dos viróides das plantas (Taylor, 1992). Este RNA genómico possui uma única grelha de leitura da qual derivam duas formas de uma única proteína, o antigénio delta. Assim, da transcrição do genoma resulta a formação de um mRNA de 700 nt cuja tradução tem como consequência a produção de uma das formas do antigénio delta, a forma pequena (S-HDAg). Esta forma pequena é uma proteína com 196 aminoácidos e cerca de 24 kD, localizada no núcleo da célula hospedeira. Durante a replicação do vírus, ocorre um mecanismo de "editing" do RNA através do qual um codão stop UAG é convertido num codão triptofano UGG tendo como consequência a extensão da grelha de leitura por mais 19 aminoácidos. Deste modo, é gerada uma proteína de 214 aminoácidos e cerca de 27 kD, o antigénio delta grande (L-HDAg; Taylor, 1992; Monjardino e Lai, 1993). Tal como a forma pequena, também a forma grande do antigénio delta se localiza no núcleo das células. Resumindo, ambos os antigénios apresentam a mesma localização celular e partilham a mesma sequência de aminoácidos, com excepção dos 19

aminoácidos da extremidade carboxilica que a forma grande possui adicionalmente.

Ambos os antigénios delta possuem domínios estruturais específicos, nomeadamente um sinal de localização nuclear (NLS), domínios de ligação a RNA e sequências semelhantes a fechos de leucina. O NLS está localizado entre os aminoácidos 68 e 88 e consiste numa sequência bipartida rica em aminoácidos básicos (Xia et al., 1992). O domínio de ligação ao RNA consiste em dois segmentos ricos em arginina (nt 97 a 107 e nt 136 a 146) sendo que ambos são necessários para a ligação *in vitro* ao RNA do HDV (Lee et al., 1993). Foi demonstrado que as propriedades de ligação ao RNA por parte dos antigénios delta parecem ser específicas para o RNA do HDV e que essas propriedades parecem ser necessárias para a activação da replicação viral (Lee et al., 1993). Dos 19 aminoácidos da extremidade carboxilica que o L-HDAg possui adicionalmente, os 4 últimos constituem um sinal para isoprenilação (Monjardino e Lai, 1993). Estes 19 aminoácidos terminais são necessários para a interacção com os HBsAg. Experiências em que estes 19 aminoácidos foram adicionados à proteína c-Hras permitiram que esta se tornasse co-secretável com os HBsAg. No entanto, a proteína c-Hras não se torna secretável quando a adição se limita aos 4 aminoácidos que constituem o sinal de isoprenilação (Lee et al., 1994, 1995).

Apesar de todas as semelhanças, quer de sequência quer de estrutura, os dois antigénios delta exibem funções biológicas distintas em relação à replicação do vírus. Se o S-HDAg é essencial para a replicação viral (Kuo et al., 1989), o L-HDAg inibe essa replicação por um mecanismo supressor dominante em *trans* (Chao et al., 1990). O L-HDAg, para além disso, é essencial para o empacotamento e montagem dos viriões (Chang et al., 1991; Ryu et al., 1992). Se procurarmos relacionar a estrutura dos antigénios com a respectiva função, podemos dizer que o segundo domínio de ligação ao RNA do S-HDAg é necessário para iniciar a replicação (Lazinski e Taylor, 1993; Lee et al., 1993) enquanto que o primeiro domínio de ligação ao RNA do L-HDAg é o responsável pela inibição da replicação (Lee et al., 1995). O S-HDAg apenas é empacotado no virião na presença de L-HDAg, sugerindo que seja este último que estabelece o contacto directo com os HBsAg (Chen et al., 1992).

A localização predominantemente nuclear das proteínas e do RNA do HDV sugerem que a replicação do vírus ocorra no núcleo da célula hospedeira (Gowans et al., 1988). Esta replicação é totalmente independente de quaisquer sequências e/ou funções fornecidas pelo HBV.

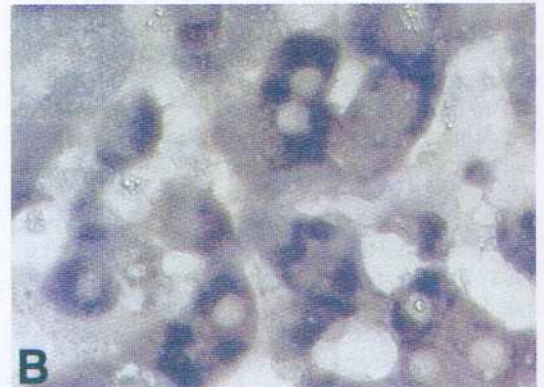
Não é ainda claro se, após a infecção, o RNA do HDV é transportado do citoplasma para o núcleo isoladamente ou em conjunto com os antígenos delta. Tendo em conta o facto do RNA do HDV ser muito semelhante na sua estrutura ao RNA dos viróides que geralmente entram no núcleo sem a ajuda de quaisquer proteínas (Harders et al., 1989); é possível que o RNA do HDV tenha uma capacidade intrínseca de importação nuclear. No entanto, dados mais recentes parecem apontar para uma entrada no núcleo de toda a partícula de RNP viral e não do RNA solado, parecendo mesmo que a importação do RNA do HDV seja a primeira função biológica dos antígenos delta no ciclo de vida do vírus (Chou et al., 1998).

Após entrada na célula, a RNP do HDV é transportada para o núcleo e o RNA é replicado pela RNA polimerase II celular (Macnaughton et al., 1991; Filipovska e Konarska, 2000; Modahl et al., 2000). De acordo com o modelo geralmente aceite para a replicação do vírus, o genoma do HDV serve de molde para a síntese de novas cadeias por um mecanismo de círculo rolante que resulta na produção de moléculas antigenómicas multiméricas (para uma revisão ver Monjardino and Lai, 1993). Estes antigenomas multiméricos nascentes possuem actividade ribozimica, actividade essa que cataliza autoclivagens do RNA em intervalos monoméricos precisos. Dois acontecimentos de autoclivagem libertam um antigenoma monomérico linear que se liga, posteriormente, pelas suas extremidades produzindo

do uma molécula circular designada por antigenoma (Taylor, 1992). O "editing" do RNA ocorre no antigenoma, por acção de uma deaminase de adenosina celular, ADAR 1, a qual é responsável pela conversão da adenosina do codão stop UAG numa inosina (Casey e Gerin, 1995). De seguida, é provável que estes antigenomas sirvam de molde para a subsequente síntese de RNA genómico por um mecanismo de círculo rolante análogo ao acima descrito (Taylor, 1992).

Como atrás foi referido, o RNA viral, os antígenos delta e as RNPs do HDV estão localizadas quase exclusivamente no núcleo das células (Cunha et al., 1998). De facto, o HDV apresenta uma distribuição nucleoplasmática difusa, com acumulação preferencial em focos, e com exclusão nucleolar. Estes focos, que contêm os antígenos delta e o RNA viral, não são, aparentemente, mais do que simples locais de acumulação de RNPs do HDV e não correspondem a quaisquer tipo de locais preferenciais de síntese ou processamento do RNA (Cunha et al., 1998). Por outro lado, os HBsAg do HBV imprescindíveis ao empacotamento e formação de partículas de HDV infecciosas estão localizados exclusivamente no citoplasma, uma vez que são glicoproteínas associadas ao retículo endoplasmático. A separação espacial, dentro da célula, destas moléculas cruciais para a formação de partículas de HDV infecciosas (Figura 1) é uma das observações mais intrigantes da patogenia do HDV. Assim, neste trabalho procuramos abordar este problema tentando responder à

FIGURA 1
DETECÇÃO, POR IMUNOCITOQUÍMICA, DOS ANTIGÉNIOS DELTA E DE HBsAg EM BIÓPSIAS DE PACIENTES COM HEPATITE DELTA. OS ANTIGÉNIOS DELTA PODEM SER OBSERVADOS NO NÚCLEO (A) E OS HBsAg NO CITOPLASMA (B) DAS CÉLULAS DE FÍGADO. OS ANTIGÉNIOS DELTA FORAM DETECTADOS COM O SORO POLICLONAL DE COELHO B3 E OS HBsAg COM O ANTICORPO MONOCLONAL NCL-HBsAg-2. PARA MAIS DETALHES VER MATERIAIS E MÉTODOS



questão: como se encontram as RNPs do HDV e os HBsAg do HBV para formar partículas infecciosas? A hipótese que procuramos testar para responder a esta questão postula que as RNPs do HDV estariam a ser continuamente exportadas do núcleo para o citoplasma. Uma vez no citoplasma e, na ausência de coinfeção com HBV, ou seja, na ausência de HBsAgs, as RNPs do HDV seriam rapidamente reimportadas para o núcleo devido à presença de um NLS nos antígenos delta. Pelo contrário, na presença de HBV, as RNPs do HDV interagiriam com os HBsAg no retículo endoplasmático, formando partículas de HDV infecciosas que sairiam da célula por uma via de secreção, propagando a infecção.

Ao desvendar os processos envolvidos na formação das partículas do HDV e na interacção dos seus componentes, este trabalho poderá vir a representar um contributo importante para o desenvolvimento de novos meios de terapêutica antiviral.

Materiais e métodos

Cultura de células e transfecção

As linhas celulares Huh7, Hela e NIH 3T3 foram cultivadas em monocamada, em meio RPMI 1640, meio mínimo essencial (MEM) e meio mínimo essencial modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco BRL), respectivamente. Todos os meios foram suplementados com 10% de soro bovino fetal (FBS, Gibco BRL) e 1% L-glutamina.

A linha celular Huh7-D12 (Cheng et al., 1993) foi cultivada em monocamada, em meio idêntico ao utilizado para as células Huh7, suplementado adicionalmente com 200 µg/ml geneticina (G418, Sigma).

Todas as culturas foram mantidas a 37° C, numa atmosfera húmida contendo 5% CO₂. O controlo de eventual contaminação com micoplasmas foi regularmente efectuado.

Para transfecção, as células foram cultivadas em lamelas de vidro de 10 x 10 mm até atingirem cerca de 50 a 60% de confluência. Na transfecção foi utilizado o reagente FuGene 6 (Roche Molecular Biochemicals, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados os plasmídios pSVLAg-S, pSVLAg-L, pGFP-C1-Ag-S e pDL542 e em cada ensaio foi usado cerca de 1 µg de cada amostra de DNA. As células foram analisadas por imunofluorescência, cerca de 16 a 24 horas após a transfecção.

Imunofluorescência e anticorpos

Para imunofluorescência, as células, cultivadas em lamelas de 10 x 10 mm, foram lavadas rapidamente em solução salina tamponada (PBS) e fixadas durante 10 min., à temperatura ambiente, em 3.7% formaldeído em PBS. De seguida, as células foram permeabilizadas com 0.5% Triton X-100 (Sigma) em PBS, durante 10 min., à temperatura ambiente e lavadas em PBS contendo 0.05% Tween 20 (PBS-Tw) durante 15 min.

As incubações com anticorpos primários e com os respectivos anticorpos secundários apropriados (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA) foram efectuadas durante 30 a 60 min., à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS-Tw, as preparações foram montadas com Vectashield (Vector Laboratories, UK) e seladas com verniz. Sempre que necessário, as lamelas eram previamente banhadas numa solução de 500 ng/ml diaminofenilindol (DAPI; Sigma) em PBS, durante 5 min., antes da montagem.

Neste trabalho foram usados os seguintes anticorpos primários: soro policlonal de coelho antiproteínas delta, B3 (Saldanha et al., 1990), anticorpo monoclonal anti-HBsAg (NCL-HBsAg-2, NovoCastra Laboratories, UK) e anticorpo monoclonal 4F4 anti-hnRNP C (Choi e Dreyfuss, 1984).

Hibridação *in situ*

A hibridação *in situ* foi efectuada utilizando como sonda o plasmídeo pSVL(D3) (Kuo et al., 1988). Este plasmídeo contém um trimero do cDNA genómico completo do HDV, clonado no vector de expressão eucariota pSVL (Pharmacia Biotech.). Este plasmídeo foi marcado por "nick-translation" (Johnson et al., 1991) com díoxigenina-11-dUTP (Roche Molecular Biochemicals, Germany).

A hibridação *in situ* em preparações citogenéticas de placas metafásicas de células Huh7-D12 foi efectuada de acordo com protocolos previamente descritos (Carvalho et al., 1995). A hibridação em células intactas foi realizada segundo metodologias anteriormente publicadas (Zirbel et al., 1993; Cunha et al., 1998). Resumidamente, antes da hibridação as células são lavadas com PBS, fixadas com 3.7% formaldeído em PBS, durante 10 min., e permeabilizadas com 0.5% Triton X-100 e 0.5% saponina (Sigma) em PBS, durante 10 min. Estes procedimentos foram efectuados à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS, as células foram incubadas com

70% formamida, durante 3 min., a 73° C, seguida de nova incubação com 50% formamida, durante 1 min., à mesma temperatura. A hibridação com a sonda marcada com digoxigenina decorreu durante a noite, a 37° C. A detecção da sonda foi efectuada por incubação das preparações, a 37° C, durante 30 min., respectivamente, com os seguintes anticorpos: monoclonal anti-digoxigenina (Roche Molecular Biochemicals, Germany), monoclonal anti-immoglobulinas de murganho conjugado com digoxigenina e monoclonal anti-digoxigenina conjugado com FITC (Jackson Immunoresearch Laboratories, USA).

Ensaio de transporte em heterocariontes

Para a preparação de heterocariontes Huh7-D12 x NIH 3T3 e Huh7 x NIH 3T3, tanto as células Huh7 δ 12 como as células Huh7, foram cultivadas sobre lamelas de vidro até atingir cerca de 50 a 60% de confluência. As células NIH 3T3 foram então tratadas com tripsina, ressuspensas em meio de cultura e adicionadas a uma das linhas celulares acima referidas, na presença ou ausência de emetina (40 μ g/ml; Sigma). Após adesão das células NIH 3T3, procedeu-se à indução da fusão celular. Para isso, as células foram lavadas com PBS e colocadas sobre uma gota de glicol de polietileno 1500 (PEG 1500; Roche Molecular Biochemicals, Germany), durante 2 min. As lamelas foram então lavadas com PBS e incubadas em DMEM, contendo 10% FBS, na presença ou ausência de emetina, por períodos de tempo entre 2 a 6 horas. Após hibridação *in situ* ou imunofluorescência, todos os heterocariontes foram sujeitos a coloração com DAPI tal como já anteriormente descrito.

Imunocitoquímica

Para imunocitoquímica em cortes de parafina, de fígado de doentes com diagnóstico de hepatite delta, foi utilizado o "kit" comercial "Histostain DS Doublestaining" (Zymed, USA). Este "kit" permite a detecção simultânea de dois antígenos distintos, usando anticorpos primários produzidos em animais de espécies diferentes. Resumidamente, os cortes foram desparafinados com xileno e re-hidratados com etanol após o que foram tratados com H₂O₂ para inibir a actividade endógena de peroxidase. A recuperação antigénica foi efectuada por incubação num forno microondas, durante 15 min., a 750 W. Após arrefecimento com água, os cortes foram lavados rapidamente com PBS-Tw. A inibição da avidina e

biotina endógenas, o bloqueio e todos os procedimentos de detecção e montagem foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Para a detecção dos antígenos delta e do HBsAg, foram utilizados o anticorpo policlonal de coelho, B3, e o anticorpo monoclonal NCL-HBsAg-2, respectivamente. As incubações com anticorpos primários, foram efectuadas à temperatura ambiente, durante 30 min.

Microscopia

A análise das amostras marcadas com fluorocromos foi efectuada num microscópio confocal Zeiss LSM 410, equipado com um laser de argon (488 nm) para excitar FITC, e um laser de hélio-néon (543 nm) para excitar Texas Red. Em experiências de marcação dupla, foram sequencialmente captadas, em diferentes canais, imagens do mesmo plano focal as quais foram posteriormente sobrepostas. Com o objectivo de obter um alinhamento preciso das imagens sobrepostas, o equipamento foi calibrado com o auxílio de microesferas fluorescentes (Molecular Probes, USA) e de um filtro de banda dupla que permite a visualização simultânea de fluorescência verde e vermelha.

Electroforese em géis de poliácridamida e "immunoblotting"

Para a preparação de extractos celulares totais para utilização em electroforese em géis de poliácridamida (SDS-PAGE), as células foram lavadas rapidamente com PBS, após o que foi directamente adicionado tampão de amostra, contendo SDS e benzonase (Sigma). As amostras permaneceram durante 15 min. à temperatura ambiente, após o que foram fervidas durante cerca de 10 min. e guardadas a -20° C até à sua utilização.

A separação de proteínas por SDS-PAGE foi efectuada em mini-géis de 10% ou de 12% de poliácridamida (BioRad Laboratories, USA). Após a separação, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose Protran BA 85 (Schleicher and Schuell, Germany) num aparelho de transferência semi-seca (BioRad Laboratories, USA), a 200 mA, durante 30 min. Após a transferência, as membranas foram lavadas com PBS e bloqueadas, durante pelo menos 1 hora, com 5% de leite magro em PBS. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas a 4° C, durante a noite, com agitação suave, com o anticorpo primário respectivo diluído em PBS contendo 2% de leite magro. De seguida, as

membranas foram lavadas com PBS-Tw contendo 2% de leite magro e incubadas, durante 1 hora, à temperatura ambiente, com um anticorpo secundário apropriado conjugado com peroxidase (BioRad Laboratories, USA). Após lavagem com PBS-Tw contendo 2% de leite magro, procedeu-se à detecção com o auxílio de um sistema quimioluminescente (ECL, Amersham).

Clonagem do cDNA do S-HDAg no vector pGFP-C1

Para clonar o cDNA do S-HDAg no vector pGFP-C1, começamos por digerir o plasmídeo pSVLAg-S que contém o cDNA total para o referido antigénio (Kuo et al., 1988), com a endonuclease Bfa I (New England Biolabs). Foi obtido um fragmento de 806 pb cujas extremidades coesivas resultantes foram preenchidas com nucleótidos de modo a tornarem-se cegas. Este fragmento foi então digerido com a endonuclease Sal I (Roche Molecular Biochemicals, Germany) e, em consequência, foi obtido um segundo fragmento de 642 pb que contém o cDNA com-

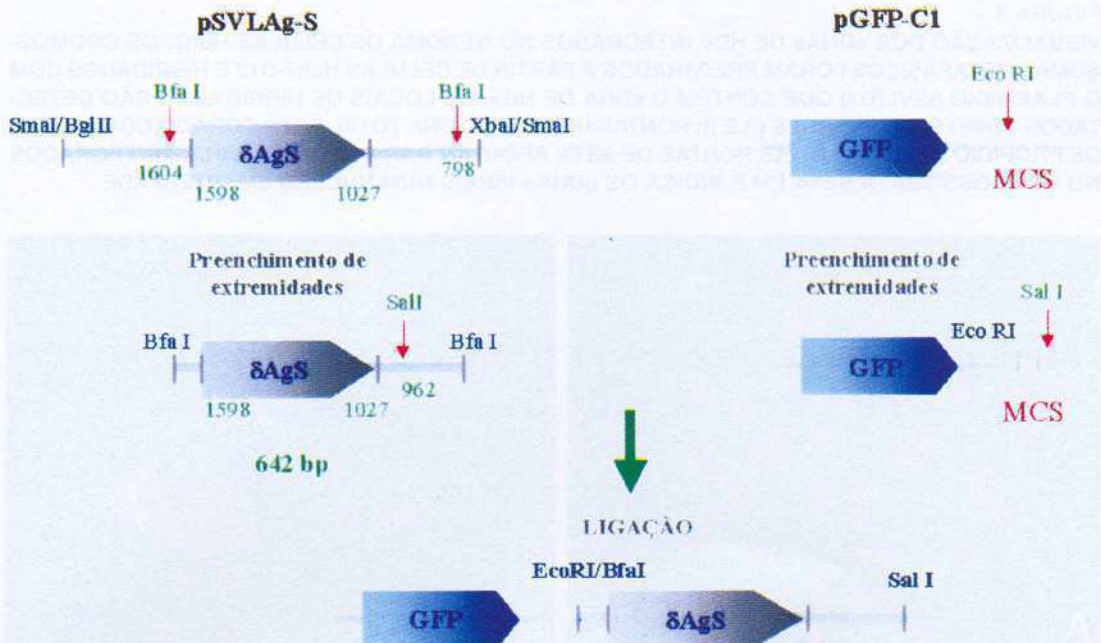
pleto do S-HDAg. Paralelamente, o plasmídeo pGFP-C1 foi digerido com a endonuclease Eco RI (Roche Molecular Biochemicals, Germany) e as extremidades coesivas resultantes foram preenchidas com nucleótidos. De seguida, foi efectuada uma nova digestão com a endonuclease Sal I. Finalmente, o fragmento Sal I, de 642 pb, que contém o cDNA completo do S-HDAg, foi clonado no plasmídeo pGFP-C1 digerido com Sal I. Os plasmídios recombinantes resultantes foram analisados por electroforese em gel de agarose após digestão com endonucleases de restrição apropriadas. Todos os procedimentos e metodologias de clonagem foram feitas de acordo com protocolos padronizados (Ausubel et al., 1995). A figura 2 apresenta o esquema geral de clonagem acima descrito.

Resultados

Distribuição intranuclear das RNPs do HDV

A linha celular derivada de um hepatoma humano, Huh7, foi estavelmente transfectada com o plasmídeo

FIGURA 2
ESQUEMA GERAL DE CLONAGEM DO cDNA QUE CODIFICA PARA O ANTIGÉNIO PEQUENO DO HDV, NO VECTOR pGFP-C1



pSVL(D3) o qual contém um trímico do cDNA genômico completo do HDV clonado no vector de expressão pSVL. Este cDNA foi originalmente sintetizado a partir de RNA total obtido do fígado de uma marmota infectada, previamente inoculada com soro humano que continha partículas de HDV. Este cDNA possui 1679 nucleótidos e codifica exclusivamente para o S-HDAg (Kuo et al., 1988).

Foram obtidos três clones, D8, D12 e D14 os quais foram expandidos (Cheng et al., 1993). Neste trabalho foi utilizado o clone D12.

Com o objectivo inicial de visualizar os genomas do HDV integrados no DNA celular, foram preparados cromossomas metafásicos de células Huh7-D12. Após desnaturação, estas preparações foram hibridadas com a sonda pSVL(D3) marcada com digoxigenina. Os locais de hibridação, correspondentes aos cDNAs de HDV transfectados, foram detectados com anticorpos específicos. Os sinais de hibridação puderam ser observados em todas as preparações e mostraram a existência de múltiplos locais de integração num único cromossoma (Fig. 3A). Para além disso, em núcleos interfásicos os cDNAs virais podem ser observados em agrupamentos correspondentes a 3 a 5 pontos fluorescentes (Fig. 3B). Estes resultados encontram-se em concordância com o facto de o clone Huh7-D12 possuir um número, estimado por "Southern blot", de cerca de

40 cópias do cDNA de HDV integradas no seu genoma (Monjardino et al., resultados não publicados).

Para examinar a distribuição intranuclear das RNPs do HDV, procedemos a experiências de imunofluorescência e hibridação *in situ* nas células Huh7-D12. A imunofluorescência com o soro policlonal de coelho, B3, que reconhece ambas as formas do antígeno delta, mostra a localização nuclear dos antígenos delta (Figs. 4A e B). Para detectar o RNA viral, as células Huh-D12 foram hibridadas com a sonda pSVL(D3) marcada com digoxigenina. Esta sonda hibrida tanto com o RNA genômico como com o RNA antígeno viral, revelando um padrão de marcação em todo o nucleoplasma, com exclusão dos nucléolos (Fig. 4C). Para se obter uma intensidade de sinal mais forte, a hibridação é efectuada em condições desnaturantes (Cunha et al., resultados não publicados). Deste modo, a sonda pSVL(D3) hibrida tanto com o RNA viral como com o cDNA integrado no genoma das células Huh7-D12 (Figs. 4C e D, setas). A detecção simultânea dos antígenos (Fig. 4B) e do RNA (Fig. 4C) do HDV mostrou uma completa co-localização destes dois componentes (Fig. 4D). Tal como anteriormente descrito (Cunha et al., 1998), para além da distribuição nucleoplasmática difusa, as partículas de RNPs do HDV concentram-se igualmente em inclusões esféricas nucleares discretas,

FIGURA 3
VISUALIZAÇÃO DOS cDNAs DE HDV INTEGRADOS NO GENOMA DE CÉLULAS Huh7. OS CROMOSSOMAS METAFÁSICOS FORAM PREPARADOS A PARTIR DE CÉLULAS Huh7-D12 E HIBRIDADOS COM O PLASMÍDIO pSVL(D3) QUE CONTÉM O cDNA DE HDV. OS LOCAIS DE HIBRIDAÇÃO SÃO DETECTADOS COMO SINAIS VERDES (A E B; PONTAS DE SETA). O DNA TOTAL ESTÁ CORADO COM IODETO DE PROPÍDIO (VERMELHO). AS PONTAS DE SETA APONTAM PARA OS cDNAs VIRAIS INTEGRADOS NO CROMOSSOMA. A SETA EM B INDICA OS cDNAs VIRAIS NUM NÚCLEO EM INTERFASE

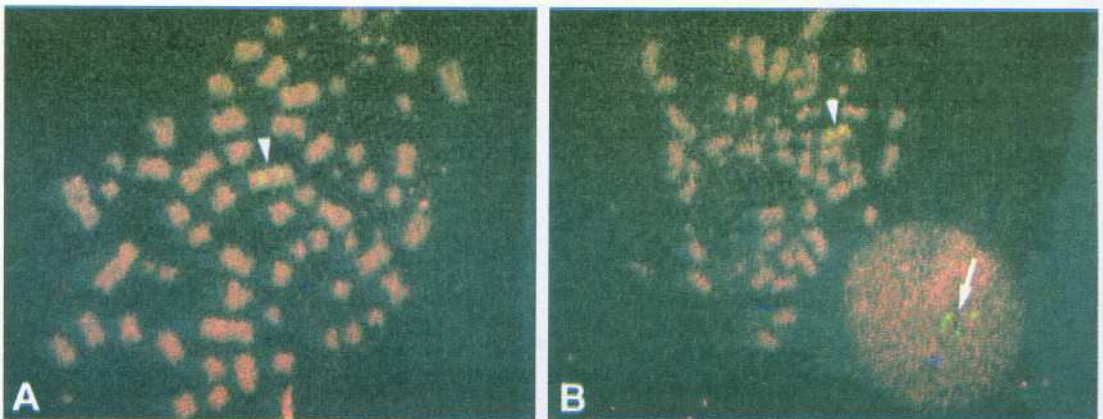
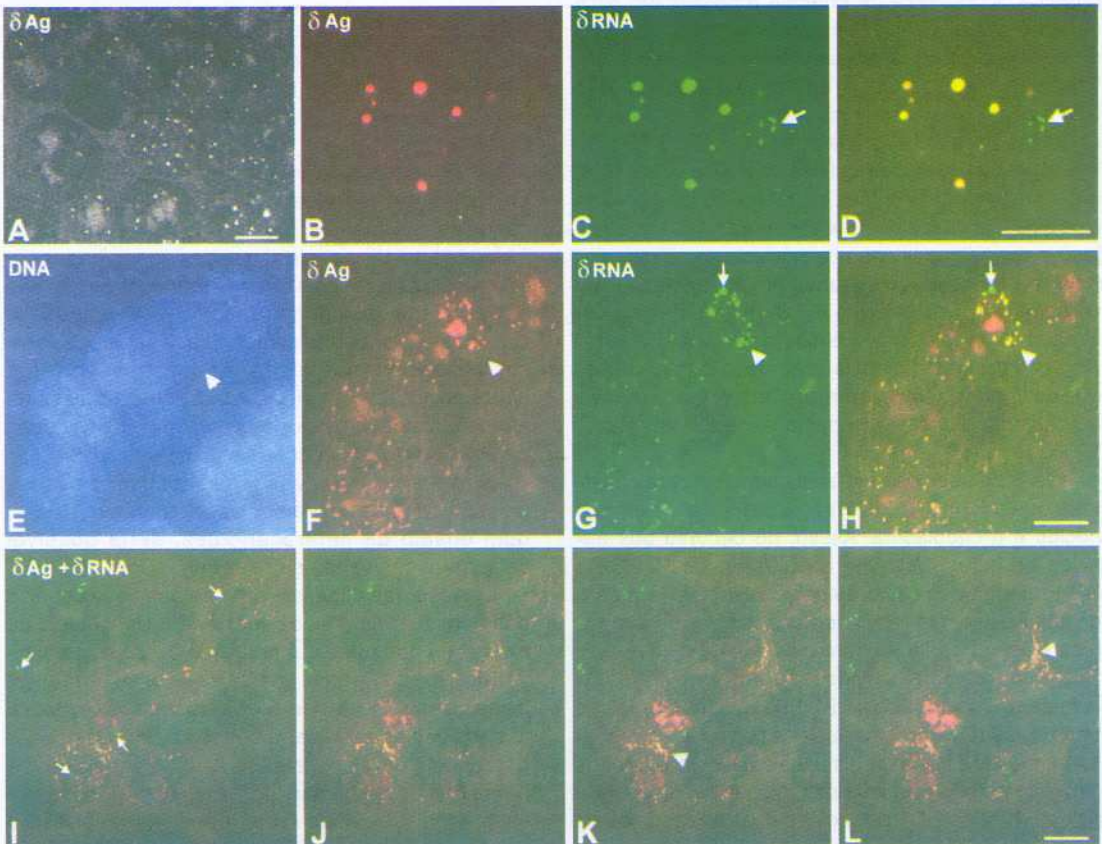


FIGURA 4

LOCALIZAÇÃO INTRACELULAR DAS RNPs DO HDV EM CÉLULAS Huh7-D12 E EM HETEROCARIONTES Huh7-D12/NIH 3T3.

A-D E I-L: CÉLULAS Huh7-D12 FORAM HIBRIDADAS COM A Sonda pSVL(D3) E IMUNODETECTADAS CONTRA O RNA E OS ANTIGÊNIOS VIRAIS. A IMAGEM A MOSTRA A LOCALIZAÇÃO NUCLEAR DOS ANTIGÊNIOS DELTA NUM CONJUNTO DE CÉLULAS. DE NOTAR QUE, NALGUNS NÚCLEOS, OS ANTIGÊNIOS DELTA SE DETECTAM PREDOMINANTEMENTE EM FOCOS NUCLEOPLASMÁTICOS, NOUTROS A DISTRIBUIÇÃO É PREDOMINANTEMENTE NUCLEOLAR E, AINDA NOUTROS, OS ANTIGÊNIOS LOCALIZAM-SE TANTO EM FOCOS NUCLEOPLASMÁTICOS COMO NO NUCLEOLO. AS IMAGENS B A D MOSTRAM, EM MAIOR AMPLIAÇÃO, UMA ÚNICA CÉLULA ONDE SE VISUALIZAM, A VERMELHO, OS ANTIGÊNIOS DELTA (B) E A VERDE O RNA VIRAL (C). A IMAGEM D RESULTA DA SOBREPOSIÇÃO DAS IMAGENS B E C. A COR AMARELA REFLECTE CO-LOCALIZAÇÃO DOS ANTIGÊNIOS E RNA DE HDV NOS FOCOS NUCLEOPLASMÁTICOS. A SETA APONTA PARA O cDNA DE HDV INTEGRADO NO GENOMA CELULAR. AS IMAGENS I-L MOSTRAM PLANOS CONFOCAIS DISTANCIADOS EM 0.1 μM DE UMA MESMA PREPARAÇÃO CELULAR, EM QUE SE OBSERVAM ALGUMAS CÉLULAS COM MARCAÇÃO CITOPLASMÁTICA DE ANTIGÊNIOS E RNA DELTA (PONTA DA SETA). BARRA, 10 μM . E-H: HETEROCARIONTES Huh7-D12/NIH 3T3 HIBRIDADOS COM A Sonda pSVL(D3) E DUPLAMENTE MARCADOS PARA O RNA E ANTIGÊNIOS VIRAIS. A IMAGEM E MOSTRA A COLORAÇÃO COM DAPI DO HETEROCARIONTE. AS IMAGENS F E G MOSTRAM OS ANTIGÊNIOS E O RNA DE HDV NO NÚCLEO HUMANO E NO NÚCLEO DE MURGANHO, RESPECTIVAMENTE. A IMAGEM H REPRESENTA A SOBREPOSIÇÃO DAS IMAGENS F E G. A PONTA DA SETA INDICA A CÉLULA HUMANA E A SETA INDICA O cDNA DE HDV INTEGRADO NO GENOMA CELULAR. BARRA, 10 μM



© 2001 by the American Society for Microbiology. All rights reserved. This article is published with the understanding that copyright in the text, illustrations, and any other material contained herein is retained by the American Society for Microbiology. This article may not be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or by any information storage and retrieval system, without permission in writing from the American Society for Microbiology, 11 Dupont Circle, N.W., Washington, D.C. 20036.

vulgarmente designadas por focos delta. Tendo em conta a co-localização de ambos os antigénios e do RNA do HDV, é muito provável que estes focos representem locais preferenciais de acumulação das RNPs virais.

As partículas de RNPs do HDV são transportadas entre o núcleo e o citoplasma

Para investigar se as RNPs do HDV são retidas permanentemente no núcleo ou, pelo contrário, são transportadas transitoriamente entre o núcleo e o citoplasma, utilizamos um ensaio de heterocariontes com células de espécies diferentes (Borer et al., 1989; Piñol-Roma e Dreyfuss, 1992). A migração das RNPs do HDV foi monitorizada em heterocariontes de células humanas Huh7-D12 e de murganho NIH 3T3, produzidos por fusão celular induzida por glicol de polietileno (Fig. 4, E-H). Estes heterocariontes foram mantidos em cultura até 5 horas após a fusão na presença de emetina, um inibidor de síntese proteica. A presença de emetina é necessária para excluir a possibilidade de importação pelos núcleos de células de murganho, de novas partículas sintetizadas no citoplasma. A detecção específica das RNPs do HDV é inequívoca visto que os anticorpos utilizados para detectar os antigénios virais (Fig. 4, F e H) e para detectar o RNA viral (Fig. 4, G e H) não apresentam reacções cruzadas com as células NIH 3T3 (resultados não apresentados). Com o objectivo de distinguir entre os núcleos de células humanas e de células de murganho, as células foram coradas com DAPI (Fig. 4 E). Com este tipo de coloração, os núcleos de células de murganho apresentam um aspecto mais granuloso como consequência do elevado número de cromossomas acrocêntricos observado nesta espécie (Haugland, 1996).

Os resultados das experiências efectuadas mostram que a RNPs do HDV são transportadas entre o núcleo e o citoplasma. Assim, no decurso dos ensaios de heterocariontes efectuados, as RNPs do HDV migram do núcleo de células Huh7-D12 para o citoplasma comum do heterocarionte, e daí são rapidamente importadas para o núcleo de células NIH 3T3. Curiosamente, quando localizadas no núcleo de células de murganho, as RNPs do HDV mantêm o tipo de distribuição intranuclear tipicamente observado nas células humanas, Huh7-D12. Os primeiros sinais detectados por imunofluorescência, da presença de RNPs do HDV puderam ser observados cerca de 3 horas após a fusão. Esta experiência permitiu concluir que as RNPs do HDV são capazes de ser

exportadas do núcleo para o citoplasma e que este fenómeno é independente da presença de HBsAg. Para além disso e, em concordância com estes resultados, é possível observar RNPs do HDV, consistentemente, no citoplasma numa pequena percentagem de células Huh7-D12 (Fig. 4, I-L, pontas de setas). Esta observação de antigénios virais no citoplasma não é um fenómeno artefactual do sistema experimental utilizado. Em biópsias de doentes com diagnóstico de hepatite delta é possível observar, por imunocitoquímica, utilizando o mesmo anticorpo policlonal anti-proteínas delta (B3), uma marcação exclusivamente nuclear na grande maioria das células. No entanto, e à semelhança do que sucede nas células Huh7-D12, uma pequena percentagem de células destes doentes exhibe o mesmo padrão citoplasmático de distribuição dos antigénios do HDV na ausência de HBsAg (Fig. 5 A-E).

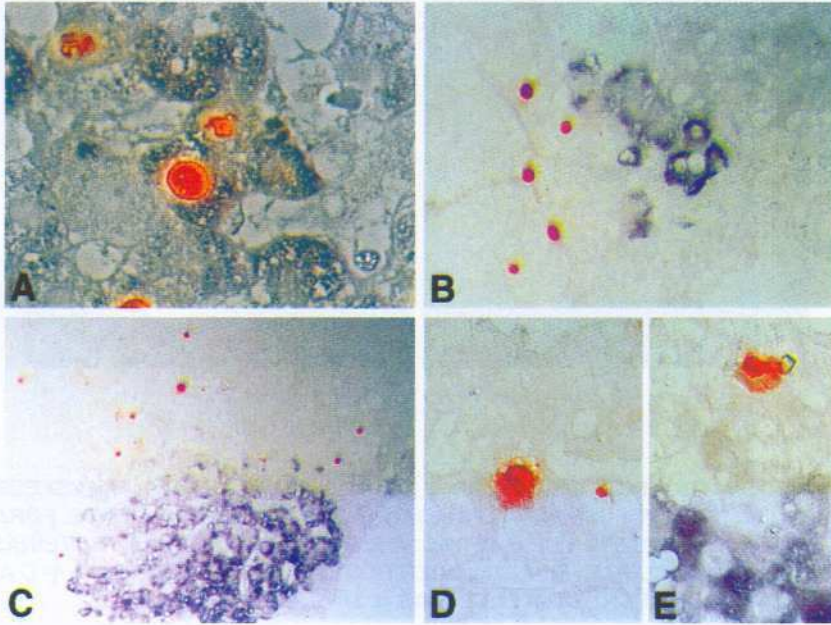
Os antigénios delta são retidos no núcleo quando expressos na ausência do genoma viral

Tendo sido demonstrado nas experiências anteriores que as RNPs do HDV são exportadas para o citoplasma, decidimos averiguar qual a natureza do sinal ou dos sinais que medeiam este transporte. Uma vez que a maior parte das RNPs conhecidas são exportadas para o citoplasma devido a sinais presentes nas proteínas (Gorlich and Kutay, 1999) começamos por investigar se os antigénios delta possuiriam algum sinal capaz de promover a interacção da RNP com receptores celulares que são activamente translocados entre o núcleo e o citoplasma. Por outras palavras, a hipótese que procurámos testar consistia em desvendar se os antigénios delta, para além do NLS, possuiriam igualmente um sinal de exportação nuclear (NES) capaz de promover a exportação das RNPs do HDV.

Se as nossas previsões estivessem correctas, um ou ambos os antigénios delta teriam um NES e, num ensaio de heterocariontes, seria possível detectá-los no núcleo de murganho. Contudo, devido às reduzidas dimensões de ambos os antigénios delta, a observação de marcação no núcleo de murganho poderia ser o resultado de difusão passiva através dos poros nucleares. Por este motivo, investigamos inicialmente se a eventual exportação dos antigénios delta seria consequência de difusão passiva ou, em contraste, seria um mecanismo dependente do dispêndio de energia. A abordagem experimental utilizada foi a do ensaio de mudança de temperatura descrito por Michael et al. (1995). Este ensaio baseia-se no facto de a 4° C, tanto a

FIGURA 5

DETECÇÃO SIMULTÂNEA DOS ANTIGÊNIOS DELTA E DE HBsAg EM CÉLULAS DE FÍGADO DE PACIENTES COM HEPATITE DELTA. A OBSERVAÇÃO DOS ANTIGÊNIOS DELTA (COR LARANJA) NO CITOPLASMA DE ALGUMAS CÉLULAS É INDEPENDENTE DA PRESENÇA DE HBsAg (A-E). PARA DETECTAR OS ANTIGÊNIOS DELTA FOI UTILIZADO O SORO POLICLONAL DE COELHO, B3, E OS HBsAg FORAM DETECTADOS COM O AUXÍLIO DO ANTICORPO MONOCLONAL NCL-HBsAg-2



exportação como a importação nuclear mediada por receptores estarem bloqueadas. Por outro lado, a 4° C a difusão passiva continua a ocorrer. Como controlo positivo, foi utilizada a proteína GFP fundida comum NLS clássico (NLS do antígeno T grande do vírus SV40) a qual foi expressa em células Huh7 após transfecção (Fig. 6, A e B). A proteína GFP possui aproximadamente 27 kD sendo, por isso, suficientemente pequena para difundir através dos poros nucleares. No entanto, devido à presença do NLS ela é activamente importada. À temperatura fisiológica e na presença de inibidores da síntese proteica, a proteína de fusão GFP-NLS difunde para fora do núcleo. Contudo, a proteína é detectada exclusivamente no núcleo uma vez que é activa e rapidamente reimportada (Fig. 6A). Em contraste, a baixas temperaturas e na ausência de síntese proteica, a proteína de fusão GFP-NLS continua a sair do núcleo mas, uma vez que a importação activa mediada pelo NLS se encontra bloqueada, a proteína acumula-se progressivamente no citoplasma (Fig. 6B). Utilizando este tipo de abordagem experi-

mental verificamos, em contraste com o observado para a proteína GFP-NLS que, tanto a 37° C como a 4° C, ambos os antígenos delta estão localizados no núcleo de células Huh7 transfectadas com os respectivos cDNAs (Fig. 7, A-D). Concluímos, assim, que os antígenos delta não difundem passivamente do núcleo para o citoplasma.

Com o objectivo de abordar a questão da possível existência de um NES nos antígenos delta, utilizamos os ensaios de heterocariontes já descritos, desta vez procedendo à fusão entre células Huh7 e NIH 3T3. Assim, as células humanas Huh7 foram transfectadas com os plasmídios pSVLAG-S ou pSVLAG-L e fundidas com as células de murganho NIH 3T3. Os heterocariontes resultantes foram mantidos em cultura até cerca de 3 horas, na presença ou ausência de emetina (Fig. 8, A-L). Como controlo, procedeu-se à detecção, por imunofluorescência, nos heterocariontes resultantes, da proteína hnRNP C, com um anticorpo monoclonal específico. Esta proteína localiza-se sempre no núcleo (Piñol-Roma e Dreyfuss, 1992).

FIGURA 6

CONTROLO DO ENSAIO DE MUDANÇA DE TEMPERATURA COM A PROTEÍNA DE FUSÃO GFP-NLS. AS CÉLULAS Huh7 FORAM TRANSFECTADAS COM O cDNA PARA A PROTEÍNA DE FUSÃO GFP-NLS E INCUBADAS NA PRESENÇA DE EMETINA DURANTE 3 HORAS, A 37° C (A) e a 4° C (B). COMO SE PODE OBSERVAR, A 4° C VERIFICA-SE A ACUMULAÇÃO DE GFP-NLS NO CITOPLASMA (B). BARRA, 10 μ M

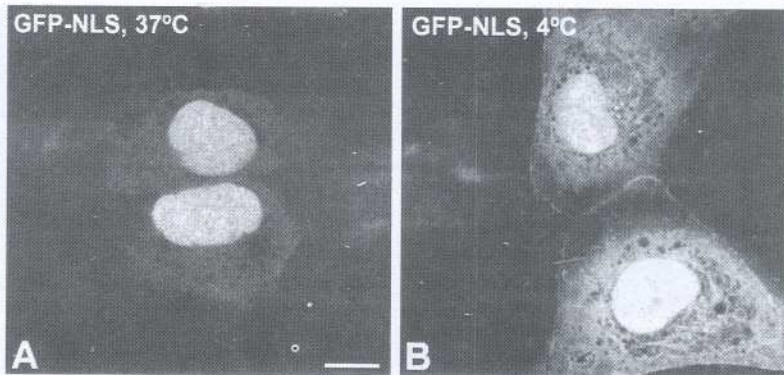
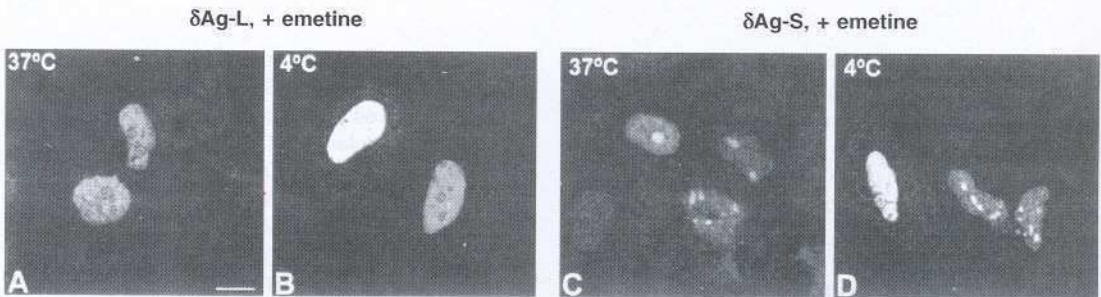


FIGURA 7

LOCALIZAÇÃO DOS ANTIGÉNIOS DELTA A 37° C E A 4° C. CÉLULAS Huh7 TRANSFECTADAS COM OS cDNAs PARA O L-HDAg (A e B) E PARA O S-HDAg (C e D), RESPECTIVAMENTE, FORAM INCUBADAS A 37° C E A 4° C NA PRESENÇA DE EMETINA. A IMUNODETECCÃO DAS PROTEÍNAS FOI EFECTUADA COM O SORO POLICLONAL B3. QUALQUER DOS ANTIGÉNIOS MANTÉM A 4° C A LOCALIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO NUCLEARES PATENTEADAS A 37° C. BARRA, 10 μ M

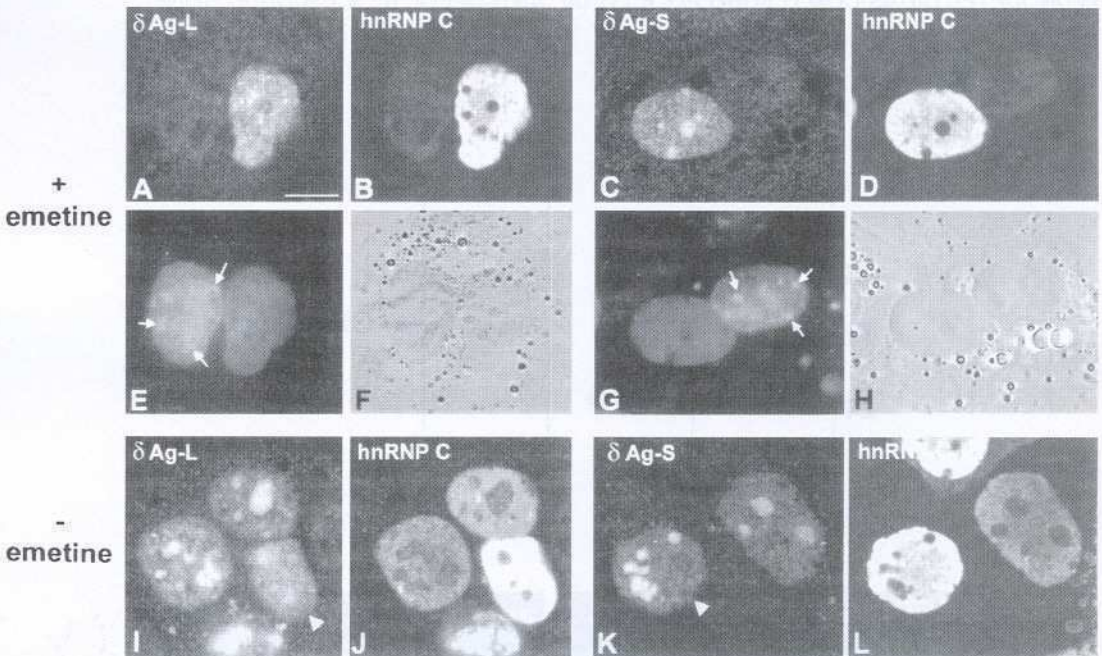


Os resultados obtidos na ausência de emetina, permitiram observar que tanto as proteínas delta como a proteína hnRNP C, sintetizadas no citoplasma dos heterocariontes, se acumulam progressivamente no núcleo da célula de murganho (resultados não apresentados). Pelo contrário e, de acordo com o esperado, quando a síntese proteica é inibida, não é possível detectar a proteína hnRNP C no núcleo de murganho (Fig. 8, B e D). Surpreendentemente, e à semelhança do que sucede com a hnRNP C na presença de emetina, ambas as formas do

antígeno delta também são detectadas exclusivamente no núcleo humano (Fig. 8, A, C, E e G). Podemos, assim, concluir que nenhum dos antígenos delta possui um NES. Como consequência, pre vemos que os sinais para a exportação das RNPs do HDV estejam presentes no RNA viral.

FIGURA 8

LOCALIZAÇÃO DOS ANTIGÉNIOS DELTA EM ENSAIOS DE HETEROCARIONTES. HETEROCARIONTES Huh7/NIH 3T3 TRANSFECTADOS COM OS cDNAs PARA OS S-HDAg E L-HDAg, NA PRESENÇA (A-H) E AUSÊNCIA (I-L) DE EMETINA. O DNA TOTAL FOI CORADO COM DAPI. AS CÉLULAS FORAM DUPLAMENTE MARCADAS COM O SORO POLICLONAL B3 PARA DETECÇÃO DOS ANTIGÉNIOS DELTA, E COM UM ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-hnRNP C COMO CONTROLO. A SETA INDICA AS MASSAS HETEROCROMÁTICAS DO NÚCLEO DE MURGANHO. A PONTA DE SETA INDICA A CÉLULA HUMANA. BARRA, 10 μ M



Haverá um sinal de retenção nuclear nos antígenos delta?

Nas experiências anteriores, observamos que ambos os antígenos delta permanecem retidos no núcleo tanto nos ensaios de mudança de temperatura, a 4° C, como nos de heterocariontes. Uma explicação possível para esta observação poderá ser a presença de um sinal de retenção nuclear (NRS) nos antígenos delta. Com o objectivo de abordar esta questão, utilizamos o plasmídeo pGFP-C1-Ag-S que contém o cDNA que codifica para a proteína de fusão GFP-S-HDAg. A análise por "western blot" em células Huh7 transfectadas com o cDNA que codifica para esta proteína, confirmou a sua correcta expressão em células humanas ao revelar um produto com as dimensões esperadas de aproximadamente 51 kD (Fig. 9A). No entanto, esta construção revelou-se de algum modo instável, como pode ser facil-

mente detectável pelos produtos de degradação observados em "western blot". Apesar disso, as células Huh7 transfectadas com esta construção mostraram uma distribuição exclusivamente nuclear com alguma concentração nos nucléolos (Fig. 9, B e C), um comportamento em tudo semelhante ao observado para a proteína S-HDAg nativa.

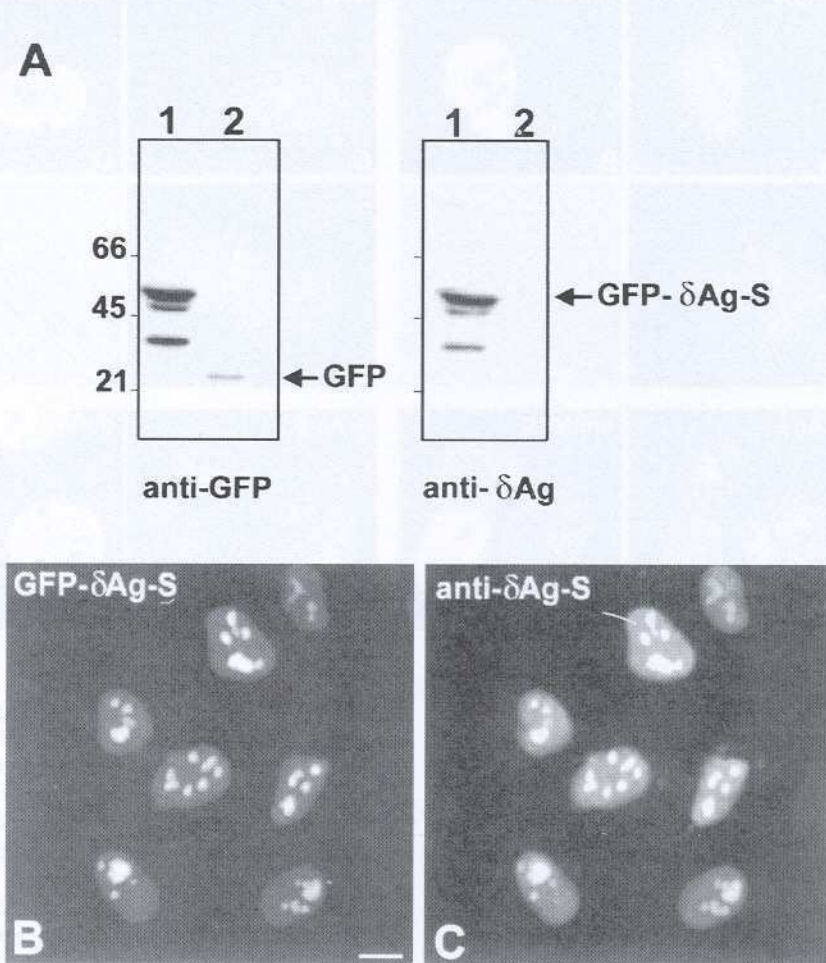
Tendo verificado a correcta expressão da proteína de fusão GFP-S-HDAg, procedemos então a ensaios de transporte para tentar elucidar a questão duma eventual presença de um NRS nos antígenos delta. Nos ensaios de mudança de temperatura, a 4° C, a proteína de fusão GFP-S-HDAg não difunde do núcleo para o citoplasma (Fig. 10 C). Como controlo positivo, foi mais uma vez usada a construção GFP-NLS (Fig. 10, A e B). Por outro lado, em ensaios de heterocariontes, em que células humanas Huh7 que exprimem a proteína GFP são fundidas com células de murganho NIH 3T3, a referida

FIGURA 9

“WESTERN BLOT” E IMUNOLocalização DA PROTEÍNA DE FUSÃO GFP-HDAg-S

A: EXTRACTOS TOTAIS DE CÉLULAS Huh7 TRANSFECTADAS COM OS cDNAs PARA GFP-HDAg-S (POÇO 1) E GFP (POÇO 2), RESPECTIVAMENTE, FORAM SEPARADOS ATRAVÉS DE UM GEL DE 10% DE POLIACRILAMIDA, TRANSFERIDOS PARA UMA MEMBRANA DE NITROCELULOSE E INCUBADOS COM UM ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-GFP (ESQUERDA) E COM O SORO POLICLONAL ANTI-DELTA, B3 (DIREITA). À ESQUERDA ENCONTRAM-SE INDICADOS OS MARCADORES DE PESO MOLECULAR (KD).

B E C: CÉLULAS Huh7 TRANSFECTADAS COM O cDNA PARA GFP-HDAg-S (B E C) E IMUNODETECTADAS COM O SORO POLICLONAL ANTI-DELTA, B3 (C). BARRA, 10 μM



proteína é detectada em todo o heterocarionte (resultados não apresentados). Este facto, esperado, deve-se às pequenas dimensões da GFP e à ausência de um sinal específico que a dirija para um particular compartimento celular (dados não apresentados). Contudo, quando células humanas Huh7 que exprimem a proteína GFP-S-HDAg são fundidas com

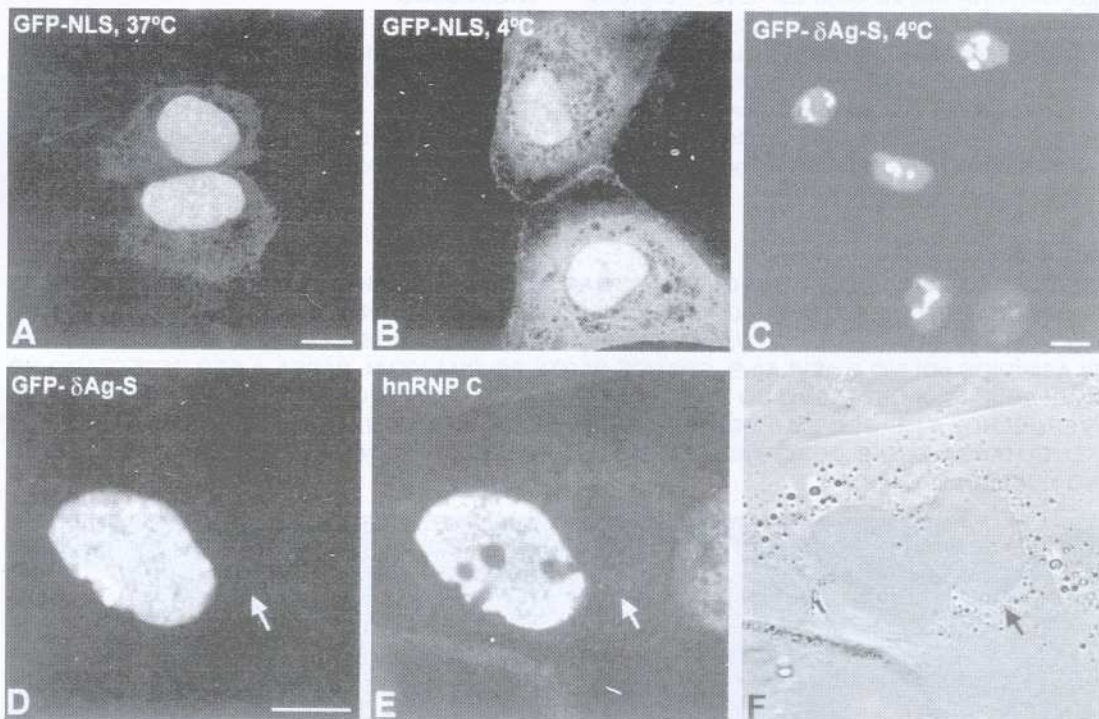
células de murgancho NIH 3T3, esta proteína apenas é detectada no núcleo humano (Fig. 10 D). Deve ser notado que, por si só, as dimensões da proteína de fusão GFP-S-HDAg, cerca de 51 kD, são suficientemente pequenas para poderem eventualmente permitir o transporte por difusão passiva. Como controlo, nestes ensaios, procedeu-se ainda à detecção da

FIGURA 10

A E B: CONTROLO DO ENSAIO DE MUDANÇA DE TEMPERATURA COM A PROTEÍNA DE FUSÃO GFP-NLS. A 3° C OBSERVA-SE A ACUMULAÇÃO DA PROTEÍNA NO CITOPLASMA (B).

C: CÉLULAS Huh7 TRANSFECTADAS COM O cDNA PARA A PROTEÍNA DE FUSÃO GFP-HDAg-S E INCUBADAS NA PRESENÇA DE EMETINA DURANTE 3 HORAS, A 4° C.

D-F: HETEROCARIONTE RESULTANTE DA FUSÃO DE UMA CÉLULA Huh7 TRANSFECTADA COMO cDNA PARA GFP-HDAg-S, COM UMA CÉLULA DE MURGANHO NIH 3T3 (SETA). A IMAGEM EM D MOSTRA A PROTEÍNA DE FUSÃO GFP-HDAg-S, A IMAGEM EM E MOSTRA A DISTRIBUIÇÃO DA PROTEÍNA hnRNP C E, A IMAGEM EM F MOSTRA O HETEROCARIONTE EM MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE. BARRA, 10 μM



proteína hnRNP C, a qual permanece sempre no núcleo (Fig. 10 E).

As diferenças observadas no comportamento da proteína GFP e da proteína GFP-S-HDAg, nas experiências acima descritas, permitem concluir que os antígenos delta possuem um NRS.

O RNA viral é essencial para a exportação das RNPs do HDV

Nas experiências atrás descritas, demonstramos que as RNPs do HDV são exportadas para o citoplasma mas que nenhum dos antígenos delta mediava essa exportação. Neste caso, se os sinais que promovem

a interação da RNP viral com receptores celulares, que são activamente translocados entre o núcleo e o citoplasma, não estão presentes nos antígenos delta, então outra possibilidade será a presença destes sinais específicos no RNA viral. Com o objectivo de investigar esta hipótese, utilizamos o plasmídeo pDL542 (Lazinski e Taylor, 1993). O plasmídeo pDL542 codifica para apenas parte do RNA do HDV, cerca de 1.2 Kb de um total genómico de 1.7 Kb. Este plasmídeo foi construído de tal forma que, após transfecção, não são produzidos antígenos virais mas unicamente pequenas moléculas circulares de RNA incapazes de se replicar dentro da célula. Assim, transfectamos células Huh7 com o plasmídeo pDL542 e procedemos à detecção des-

te RNA viral truncado por hibridação *in situ*. Estes RNAs virais de 1.2 Kb, localizam-se exclusivamente no citoplasma das células Huh7 transfectadas (Fig. 11 A). No entanto, quando procedemos à co-transfecção de células Huh7 com os plasmídios pDL542 e pSVLAg-S, grande parte deste RNA viral de 1.2 Kb pode ser detectado no núcleo (Fig. 11 B). Os resultados obtidos nestas experiências permitem concluir que os sinais para exportação das RNPs do HDV estão presentes no RNA viral. Na realidade, quando o RNA viral truncado, de 1.2 Kb, é expresso isoladamente, é exportado para o citoplasma devido à presença de sinais específicos. No entanto, este RNA não é reimportado para o núcleo devido à ausência dos antígenos delta. Por outro lado, quando as células exprimem simultaneamente os plasmídios pDL542 e pSVLAg-S, o RNA viral de 1.2 Kb conti-

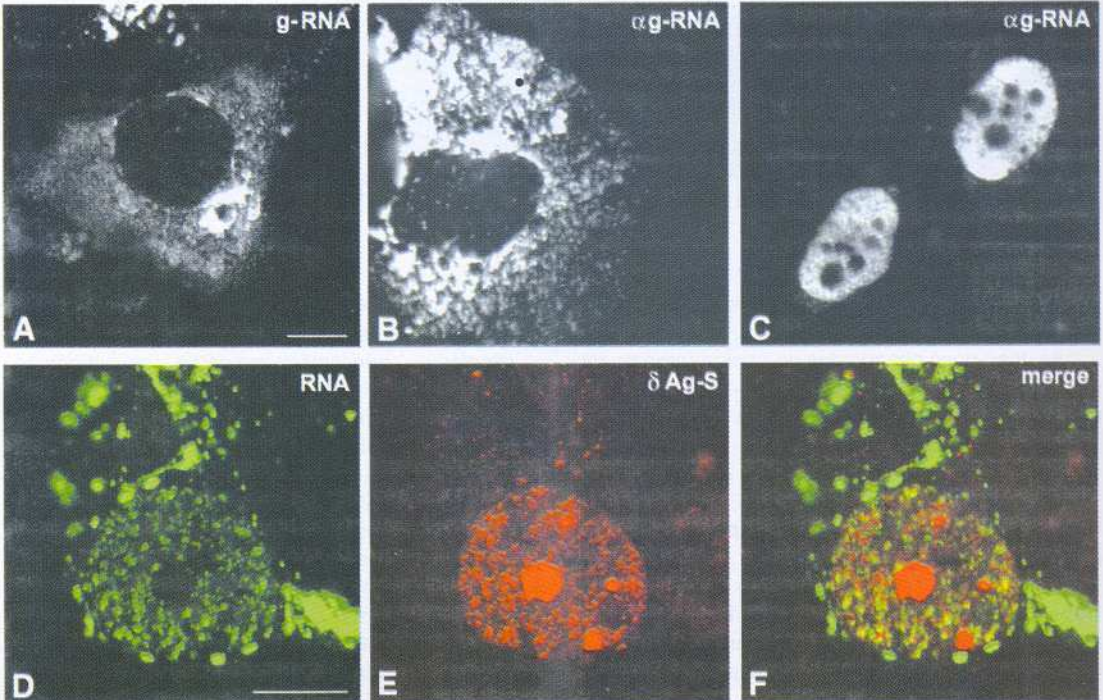
nua a ser exportado para o citoplasma mas uma larga fracção deste RNA é detectada no núcleo como consequência da importação mediada pelo NLS do antígeno delta.

Em conclusão, o RNA viral é essencial para a exportação das RNPs do HDV do núcleo para o citoplasma, de modo a interagir com os HBsAg e formar partículas infecciosas.

Discussão

No presente trabalho, procuramos elucidar o mecanismo que, na célula, permite a interacção entre o HDV e o HBV e, consequentemente, a formação de partículas infecciosas. Tendo em conta que as RNPs do HDV e os HBsAg do HBV se encontram confina-

FIGURA 11
DETECÇÃO DE RNA DO HDV EM CÉLULAS TRANSFECTADAS COMO PLASMÍDIO pDL542. CÉLULAS Huh7 FORAM TRANSFECTADAS COM O PLASMÍDIO pDL542 E O RNA VIRAL (VERDE) FOI DETECTADO POR HIBRIDAÇÃO *IN SITU*, NO CITOPLASMA (A-C). APÓS CO-TRANSFECÇÃO COM OS PLASMÍDIOS pDL542 E pSVLAg-S, GRANDE PARTE DO RNA VIRAL PASSA A SER DETECTADO NO NÚCLEO (D-F). A DETECÇÃO DO ANTIGÉNIO DELTA (E-F) FOI EFECTUADA COM O ANTICORPO B3 (VERMELHO). A IMAGEM EM F MOSTRA A SOBREPOSIÇÃO DAS IMAGENS D E E. DE NOTAR QUE, À SEMELHANÇA COM O OBSERVADO EM CÉLULAS Huh7-D12, O RNA VIRAL NUNCA É DETECTADO NO NUCLÉOLO



dos a compartimentos celulares distintos, pretendemos, como objectivo principal, explicar como estas moléculas se encontram de modo a formar partículas virais infecciosas.

Neste trabalho, demonstramos que as RNPs do HDV são continuamente transportadas entre o núcleo e o citoplasma. Uma vez no citoplasma, e na ausência do HBV, as RNPs do HDV são, muito provavelmente, rapidamente reimportadas para o núcleo devido à presença de NLS em ambos os antígenos delta. Se existir uma co-infecção com HBV, então as RNPs do HDV, ao interagirem com os HBsAg no retículo endoplasmático, podem formar partículas virais completas que entrariam nas vias de secreção celular e propagariam, assim, a infecção.

Todas as moléculas em trânsito entre o núcleo e o citoplasma atravessam os poros nucleares. Cada poro nuclear é composto por dezenas de proteínas que formam um canal aquoso que atravessa as membranas nucleares (para uma revisão ver Gorlich e Mattaj, 1996). A exportação do RNA do núcleo para o citoplasma é um processo que envolve o dispêndio de energia e o reconhecimento do substrato de RNA por receptores de transporte específicos. No núcleo, o RNA está intimamente associado a diversas proteínas de ligação a RNA formando partículas ribonucleoproteicas. Hoje em dia, é geralmente aceite que a interacção entre receptores de transporte específicos e sinais de exportação nuclear, presentes nas proteínas de ligação a RNA, seja o acontecimento chave no transporte das RNPs (Ohno et al., 1998; Nakielnny e Dreyfuss, 1999; Gorlich e Kutay, 1999; Michael, 2000). Este modelo é suportado por diversas evidências entre as quais se deve salientar o facto de algumas proteínas de ligação a RNA fazerem um vaivém constante entre o núcleo e o citoplasma. Assim, o transporte núcleo-citoplasmático é considerado um processo activo, dependente de energia, mediado por sinais e receptores específicos (Mattaj e Englemeyer, 1998).

Neste trabalho, demonstramos pela primeira vez que as RNPs do HDV são capazes de ser exportadas para o citoplasma e que esta exportação é independente da presença de HBsAg do HBV. Tendo em conta os conhecimentos actuais sobre transporte atrás referidos e, o facto de os antígenos delta se ligarem ao RNA, então a hipótese atrás referida implicaria que os sinais para exportação nuclear das RNPs do HDV estariam contidas nos antígenos delta e, pelo contrário, a presença do RNA viral seria dispensável ao transporte. O facto de ter sido descrito que a expressão transitória conjunta de ambos os antígenos delta e de HBsAg resultar na formação de partículas virais vazias, sem RNA (Chen et al.,

1992; Ryu et al., 1992), parece ainda mais suportar a hipótese de serem as proteínas e não o ácido nucleico os motores fundamentais do transporte núcleo-citoplasmático do HDV. No entanto, contradizendo estas previsões iniciais, os resultados por nós obtidos mostram que apesar das RNPs do HDV serem exportadas os antígenos delta permanecem no núcleo quando expressos na ausência de genomas virais. Em consequência, os antígenos delta não são responsáveis pela exportação das RNPs do HDV.

Face aos resultados obtidos, a hipótese alternativa para explicar a exportação das RNPs do HDV, seria a existência de sinais de exportação no RNA viral. Diversos dados obtidos recentemente apontam para a existência de sinais de exportação nuclear em RNAs virais (Gorlich e Kutay, 1999; Michael et al., 2000). O sinal melhor caracterizado até ao presente é um domínio denominado "elemento de transporte constitutivo" (CTE) presente no RNA viral do retrovírus tipo D de símios. Este domínio CTE é reconhecido por uma proteína de exportação denominada TAP e, deste modo, os RNAs virais são exportados para o citoplasma (Gruter et al., 1998). Os resultados por nós obtidos em experiências com o plasmídeo pDL542, indicam claramente que os sinais para exportação da RNP do HDV estão presentes no RNA viral.

A eventual contradição entre os nossos resultados e a demonstração por Chen et al. (1992) e Ryu et al. (1992) da formação de partículas virais vazias na ausência de RNA poderá ser, na realidade, apenas aparente. Nós demonstramos que: 1) as RNPs do HDV são exportadas para o citoplasma, 2) nenhum dos antígenos delta é exportado na ausência do genoma viral, 3) a presença do RNA viral é imprescindível à exportação das RNPs do HDV; para além disso, com base nos nossos resultados, propomos que os antígenos delta possuem um sinal de retenção nuclear ainda não identificado. Como poderemos, então, explicar a formação de partículas virais vazias, isto é, sem RNA? Uma das possíveis hipóteses, poderá ser a retenção dos antígenos delta pelos HBsAg do HBV, durante o trânsito dos primeiros do citoplasma para o núcleo após a tradução dos respectivos mRNAs.

Ao demonstrarmos que o HDV é exportado e tendo desvendado alguns dos mecanismos dessa exportação, este trabalho poderá contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens para uma terapêutica anti-viral específica. Tendo em conta que o RNA do HDV possui actividade de ribozima, o aprofundamento do conhecimento sobre a biologia do HDV poderá revelar-se uma contribuição poderosa para o desenvolvimento de futuras aplicações clínicas.

Ribozimas são moléculas de RNA com actividade enzimática que possuem um elevado potencial terapêutico devido à sua capacidade para clivar RNAs prejudiciais ou reparar RNAs celulares mutados (Rossi et al., 1991; Sullenger e Cech, 1994). A descoberta destes RNAs com propriedades catalíticas abriu novos horizontes na terapia génica, nomeadamente de tumores e doenças virais. Recentemente e, a título de exemplo, foi descrita a inibição parcial, *in vitro*, da replicação do HDV por ribozimas que actuam em *trans* (Madejon et al., 1998). Este efeito de inibição revelou-se promissor, especialmente quando potenciado pela utilização conjunta de ribozimas e interferão alfa ou sondas "antisense". Parece consensual que as ribozimas que clivam em *trans* possuem enormes vantagens em relação às proteínas. A título meramente exemplificativo, bastará referir a menor probabilidade de indução de uma resposta imune pelo hospedeiro e, devido às suas reduzidas dimensões, uma muito mais fácil incorporação em vectores de terapia génica (James e Gibson, 1998). Embora as ribozimas não possam concorrer com a maior parte das proteínas no que diz respeito à sofisticação dos processos de catálise, os componentes secundários estruturais do RNA são bastante mais simples e muito mais tolerantes a manipulações e variações de sequência (Bramlage et al., 1998; Phylactou et al., 1998).

No entanto, apesar do elevado número de vantagens que revelam, será ainda necessário ultrapassar vários obstáculos e responder a vários desafios antes de as ribozimas poderem vir a ser consideradas suficientemente seguras e, conseqüentemente, de aplicação generalizada na prática clínica. Será, por exemplo, necessário assegurar que as quantidades de ribozima introduzidas em cada célula são suficientes. Para além disso, a interacção entre as ribozimas e os potenciais alvos deverá ser optimizada. Em particular, a co-localização da ribozima com o alvo e a acessibilidade da ribozima para a ligação ao alvo podem ter uma influência fulcral no efeito terapêutico global (Bramlage et al., 1998; James e Gibson, 1998; Phylactou et al., 1998). Neste contexto, ao descrevermos, pela primeira vez, a localização e a dinâmica do RNA e das RNPs do HDV na célula hospedeira, estamos certamente a contribuir para a optimização de futuras terapias antivirais baseadas em ribozimas.

Os nossos resultados demonstram que os sinais para exportação das RNPs do HDV se encontram no RNA viral. A identificação desses sinais poderá ser conseguida através da construção e subsequente expressão de mutantes. Uma vez identificadas as

sequências necessárias para o transporte, ficarão abertos novos horizontes para o desenvolvimento e construção de ribozimas que interfiram com o transporte do HDV e a formação de partículas virais infecciosas. A própria ribozima do HDV tem vindo a ser crescentemente explorada com fins terapêuticos (Kawakami et al., 1996; Welch et al., 1997). A actividade desta ou de outras potenciais ribozimas já identificadas poderá ser dirigida directamente ao RNA viral. Em alternativa, a identificação das vias de exportação, ou seja, qual ou quais as proteínas celulares que medeiam o transporte do RNA viral, poderá revelar novos alvos potenciais para uma terapia génica da hepatite delta, baseada em ribozimas. Uma possibilidade adicional seria a modificação da actividade de ribozima do RNA viral, de modo a que esta actuasse em *trans*, e competisse com a ribozima de tipo selvagem inibindo a formação de RNAs genómicos prontos a ser exportados.

Em conclusão, ao esclarecermos mecanismos envolvidos na exportação da RNP do HDV podemos contribuir para o desenvolvimento de uma terapia génica dirigida ao RNA e mediada por ribozimas. É esta potencialidade terapêutica que constitui, sem dúvida, um dos desafios futuros mais aliciantes e promissores.

Agradecimentos

Os autores gostariam de manifestar o seu agradecimento às Sr.^{as} Inês Condado e Maria do Carmo Azevedo (Instituto de Histologia e Embriologia da Faculdade de Medicina de Lisboa) pela excelente assistência técnica e às Dr.^{as} Ana Vasconcelos Dias e Ana Rita Peralta (Faculdade de Medicina de Lisboa) pela colaboração na construção do plasmídeo pGFP-C1-Ag-S. Gostaríamos ainda de manifestar o nosso reconhecimento aos seguintes grupos pela cedência de materiais usados neste estudo: Dr. João Monjardino (Department of Medicine, Imperial College of Science, Technology and Medicine at St. Mary's, London) pelas células Huh7, Huh7-D12, pelo anticorpo policlonal B3 e pelo plasmídeo pSVL(D3); Dr. Pei-Jer Chen (Hepatitis Research Center, National Taiwan University Hospital, Taipei) pelos plasmídios pSVLAg-S e pSVLAg-L; Dr. John Taylor (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia) pelo plasmídeo pDL 542; Dr. Ezio David (Department of Gastroenterology, Molinette Hospital, Turin) pelas preparações de biópsias de fígado de pacientes com hepatite delta; Dr. G. Dreyfuss (Howard Hughes Medical Institute e University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia) pelo anticorpo monoclonal

4F4. Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, projecto PRAXIS/P/SAU/14043/98.

Abreviaturas

CTE	- Elemento de transporte constitutivo
DAPI	- 4,6 - diamino - 2 - fenilindol
DMEM	- Meio mínimo essencial modificado por Dulbecco
FBS	- Soro fetal de bovino
FITC	- Isotiocianato de fluoresceína
GFP	- Proteína verde fluorescente
HBsAg	- Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HBV	- Vírus da hepatite B
HDAg	- Antígenos do vírus da hepatite delta
HDV	- Vírus da hepatite delta
Kb	- Quilobase
kD	- Quilodalton
L-HDAg	- Antígeno grande do vírus da hepatite delta
MEM	- Meio mínimo essencial
NES	- Sinal de exportação nuclear
NLS	- Sinal de localização nuclear
NRS	- Sinal de retenção nuclear
nt	- Nucleótido
PAGE	- Electroforese em gel de poliacrilamida
PBS	- Solução salina tamponada por fosfatos
PEG	- Glicol de polietileno
RNP	- Ribonucleoproteína
S-HDAg	- Antígeno pequeno do vírus da hepatite delta
SDS	- Dodecilsulfato de sódio
Tw	- Monolaurato de polioxietileno-sorbitano (Tween 20)

Bibliografia

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., 1995. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc.
- Been, M.D., 1994. *Cis - and trans - acting ribozymes from a human pathogen, hepatitis delta virus*. Trends Biol. Sci., 19: 251.
- Borer, R.A., Lehner, C.F., Eppenberger, H.M., Nigg, E.A., 1989. *Major nucleolar proteins shuttle between the nucleus and the cytoplasm*. Cell, 56 (3): 379-390.
- Bramlage, B., Luzi, E., Eckstein, F., 1998. *Designing ribozymes for the inhibition of gene expression*. Trends Biotech., 16: 434-438.
- Carvalho, C., Telhada, M., Carmo-Fonseca, M., Parreira, L., 1995. *In situ visualization of immunoglobulin genes in normal and malignant lymphoid cells*. J. Clin. Pathol. Mol. Pathol., 48: M158-M164.
- Casey, J.L., Gerin, J.L., 1995. *Hepatitis D virus RNA editing: Specific modification of adenosine in the antigenomic RNA*. J. Virol., 69: 7593-7600.
- Chang, F.L., Chen, P.J., Tu, S.J., Wang, C.J., Chen, D.S., 1991. *The large form of hepatitis delta antigen is crucial for assembly of hepatitis delta virus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 88: 8490-8494.
- Chao, M., Hsieh, S.Y., Taylor, J., 1990. *Role of two forms of hepatitis delta virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication*. J. Virol., 64: 5066-5069.
- Chen, P.J., Chang, F.L., Wang, C.J., Lin, C.J., Sung, S.Y., Chen, D.S., 1992. *Functional study of hepatitis delta virus large antigen in packaging and replication inhibition: role of the amino-terminal leucine zipper*. J. Virol., 66: 2853-2859.
- Cheng, D., Yang, A., Thomas, H., Monjardino, J., 1993. *Characterization of stable hepatitis delta-expressing cell lines: Effect of HDAg on cell growth*. Prog. Clin. Biol. Res., 382: 149-153.
- Choi, Y.D., Dreyfuss, G., 1984. *Monoclonal antibody characterization of the C proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complexes in vertebrate cells*. J. Cell Biol., 99 (6): 1997-2004.
- Chou, H.-C., Hsieh, T.-Y., Sheu, G.T., Lai, M.M.C., 1998. *Hepatitis delta antigen mediates the nuclear import of hepatitis delta virus RNA*. J. Virol., 72: 3684-3690.
- Crosignani, A., Invernizzi, P., Ferrari, R., Manzini, A., Bruno, S., Zuin, M., Bianchi, F.B., Podda, M., 1999. *Exacerbation of chronic hepatitis D during interferon alpha administration*. Ital. J. Gastroenterol. Hepatol., 31 (1): 66-69.
- Cunha, C., Monjardino, J., Chang, D., Krause, S., Carmo-Fonseca, M., 1998. *Localization of hepatitis delta virus RNA in the nucleus of human cells*. RNA, 4: 680-693.
- Dreyfuss, G., Matunis, M.J., Piñol-Roma, S., Burd, C.G., 1993. *HnRNP proteins and the biogenesis of mRNA*. Annu. Rev. Biochem., 62: 289-321.
- Filipovska, J., Konarska, M.M., 2000. *Specific HDV RNA-templated transcription by pol II in vitro*. RNA, 6 (1): 41-54.
- Gorlich, D., Kutay, U., 1999. *Transport between the cell nucleus and the cytoplasm*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 15: 607-660.
- Gorlich, D., Mattaj, J.W., 1996. *Nucleocytoplasmic Transport*. Science 271: 1513-1518.
- Gorinvadarajan, S., Chin, K.P., Redeker, A.G., Peters, R.L., 1984. *Fulminant B viral hepatitis: role of delta agent*. Gastroenterology, 86: 1416-1420.
- Gowans, E.J., Baroudy, B.M., Negro, F., Ponzetto, A., Purcell, R.H., Gerin, J.L., 1988. *Evidence for replication of hepatitis delta virus RNA in hepatocyte nuclei after in vivo infection*. Virology, 167: 274-278.
- Gruter, P., Taberner, C., von Kobbe, C., Schmitt, C., Saavedra, C., Bachi, A., Wilms, M., Felber, B.K., Izaurralde, E., 1998. *TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus*. Mol. Cell, 1 (5): 649-59.
- Hansson, B.G., Moestrup, T., Widell, A., Nordenfelt, E., 1982. *Infection with delta agent in Sweden: introduction of a new hepatitis agent*. J. Infect. Dis., 146: 472-478.
- Harders, J., Lukacs, N., Robert-Nicoud, M., Jovin, T.M., Rioner, D., 1989. *Imaging of viroids in nuclei from tomato leaf tissue by in situ hybridization and confocal scanning laser microscopy*. EMBO J., 8: 3941-3949.
- Haugland, R., 1996. *Nucleic acid stains*; Handbook of fluorescent probes and research chemicals. 6th edition. Molecular Probes.
- Hoofnagle, J., Mullen, K., Peters, M., 1987. *Treatment of chronic delta hepatitis with recombinant alpha interferon*. In: Rizzetto, M., Gerin, J.L., Purcell, R.H., eds. *The hepatitis delta virus and its infection*. New York: Alan R. Liss; 291-298.
- Huo, T.I., Wu, J.C., Lin, R.Y., Sheng, W.Y., Chang, F.Y., Lee, S.D., 1997. *Decreasing hepatitis virus infection in Taiwan: an analysis of contributory factors*. J. Gastroent. Hepatol., 12 (11): 747-751.
- Jacobson, I.M., Dienstag, J.L., Werner, B.C., Brettler, D.B., Levine, P.H., Mushahwar, I.K., 1985. *Epidemiology and clinical impact of hepatitis D virus (delta) infection*. Hepatology, 5: 188-191.
- James, H.A., Gibson, I., 1998. *The therapeutic potential of ribozymes*. Blood, 91 (2): 371-382.
- Johnson, C.V., Singer, R.H., Lawrence, J.B., 1991. *Fluorescent detection of nuclear RNA and DNA: implications for genome organization*. Meth. Cell Biol., 35: 73-98.

30. Kawakami, J., Yuda, K., Suh, Y.-A., Kumar, P.K.R., Nishikawa, F., Maeda, H., Taira, K., Ohtsuka, E., Nishikawa, S., 1996. *Constructing and efficient trans-acting genomic HDV ribozyme*. FEBS Letters, 394: 132.
31. Kuo, M.Y.P., Goldberg, J., Coates, L., Gerin, J., Taylor, J., 1988. *Molecular cloning of hepatitis delta virus RNA from and infected woodchuck liver: sequence, structure and applications*. J. Virol., 62: 1855-1861.
32. Kuo, M.Y., Chao, M., Taylor, J., 1989. *Initiation of replication of the human hepatitis delta virus genome from cloned DNA: role of delta antigen*. J. Virol. 63: 1945-1950.
33. Lau, D.T., Kleiner, D.E., Park, Y., Di Bisceglie, A.M., Hoofnagle, J.H., 1999a. *Resolution of chronic delta hepatitis after 12 years of interferon alfa therapy*. Gastroenterology, 117 (5): 1229-1233.
34. Lau, D.T., Doo, E., Park, Y., Kleiner, D.E., Schmid, P., Kuhns, M.C., Hoofnagle, J.H., 1999b. *Lamivudine for chronic delta hepatitis*. Hepatology, 30 (2): 546-549.
35. Lazinski, D.W., Taylor, J.M., 1993. *Relating structure to function in the hepatitis delta virus antigen*. J. Virol., 67: 2672-2680.
36. Lee, C.Z., Lin, J.H., Chao, M., McKnight, K., Lai, M.M., 1993. *RNA-binding activity of hepatitis delta antigen involves two arginine-rich motifs and is required for hepatitis delta virus RNA replication*. J. Virol., 67: 2221-2227.
37. Lee, C.-Z., Chen, P.-J., Lai, M.M.C., Chen, D.-S., 1994. *Isoprenylation of large hepatitis delta antigen is necessary but not sufficient for hepatitis delta assembly*. Virol., 199: 169-175.
38. Lee, C.Z., Chen, P.J., Chen, D.S., 1995. *Large hepatitis delta antigen in packaging and replication inhibition: role of the carboxyl-terminal 19 amino acids and amino-terminal sequences*. J. Virol., 69 (9): 5332-5336.
39. Lin, J.H., Chang, M.F., Baker, S.C., Govindarajan, S., Lai, M.M.C., 1990. *Characterization of hepatitis delta antigen specific binding to hepatitis delta virus RNA*. J. Virol., 64: 4051-4058.
40. Macnaughton, T.B., Gowans, E.J., McNamara, S.P., Burnell, C.J., 1991. *Hepatitis delta antigen is necessary for access of hepatitis delta virus RNA to the transcriptional machinery but is not part of the transcriptional complex*. Virol., 184: 387-390.
41. Mattaj, I.W., Englmeier, L., 1998. *Nucleocytoplasmic transport: The soluble phase*. Annu. Rev. Biochem., 66: 265-306.
42. Michael, W.M., 2000. *Nucleocytoplasmic shuttling signals: two for the price of one*. Trends Cell Biol., 10: 46-50.
43. Michael, W.M., Choi, M., Dreyfuss, G., 1995. *A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway*. Cell, 83: 415-422.
44. Modahl, L.E., Macnaughton, T.B., Zhu, N., Johnson, D.L., Lai, M.M., 2000. *RNA-dependent replication and transcription of hepatitis delta virus RNA involve distinct cellular RNA polymerases*. Mol. Cell. Biol., 20 (16): 6030-6039.
45. Monjardino, J., Lai, M.M.C., 1993. *Structure and molecular virology*. In: Zuckerman, Thomas, ed. *Viral Hepatitis*. Churchill Livingstone, pp. 329-340.
46. Nakasone, H., Sakugawa, H., Shokita, H., Nakayoshi, T., Kawakami, Y., Kinjo, F., Saito, A., Shinjo, M., Adaniya, H., Mizushima, T., Taira, M., 1998. *Prevalence and clinical features of hepatitis delta virus in the Miyako Islands, Okinawa, Japan*. J. Gastroenterology, 33 (6): 850-854.
47. Nakiely, S., Dreyfuss, G., 1996. *The hnRNP C protein contains a nuclear retention sequence that can override nuclear export signals*. J. Cell Biol., 134: 1365-1373.
48. Nakiely, S., Dreyfuss, G., 1999. *Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus*. Cell, 23: 677-690.
49. Ohno, M., Fornerod, M., and Mattaj, I.W., 1998. *Nucleocytoplasmic Transport: the last 200 nanometers*. Cell 92: 327-336.
50. Oliveira, M.L., Bastos, F.I., Telles, P.R., Yoshida, C.F., Schatzmayr, H.G., Paetzold, U., Pauli, G., Schreier, E., 1999. *Prevalence and risk factors for HBV, HCV and HDV infections among injecting drug users from Rio de Janeiro, Brazil*. Braz. J. Med. Biol. Res., 32 (9): 1107-1114.
51. Phylactou, L.A., Kilpatrick, M.W., Wood, J.J.A., 1998. *Ribozymes as therapeutic tools for genetic disease*. Human Mol. Gen., 7 (10): 1649-1653.
52. Piñol-Roma, S., Dreyfuss, G., 1992. *Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm*. Nature, 355 (6362): 730-732.
53. Ponzetto, A., Forzani, B., Parravicini, P.P., Hele, C., Zanetti, A., Rizzetto, M., 1985. *Epidemiological significance of hepatitis delta virus infection*. Eur. J. Epidemiol., 1: 257-263.
54. Ponzetto, A., Negro, F., Popper, H., Bonino, F., Engle, R., Rizzetto, M., Purcell, R.H., Gerin, J.L., 1988. *Serial passage of hepatitis delta virus in chronic hepatitis B virus carrier chimpanzees*. Hepatology, 8: 1655-1661.
55. Purcell, R.H., Gerin, J.L., 1990. *Hepatitis delta virus*. In: Virology, B.N. Fields et al., eds., Raven press, New York.
56. Ramalho, F., Carvalho, G., Bonino, F., Baptista, A., de Moura, M.C., 1987. *Clinical and epidemiological significance of hepatitis delta virus (HDV) infection in chronic HBV carriers in Portugal*. Prog. Clin. Biol. Res., 234: 409-417.
57. Rizzetto, M., Canese, M.G., Arico, S., Crivelli, O., Trepò, C., Verme, G., 1977. *Immunofluorescence detection of a new antigen-antibody system (δ antigen) associated to hepatitis B virus in liver and serum of HBsAg carriers*. Gut, 18: 997-1003.
58. Rizzetto, M., Hoyer, B., Canese, M.G., Shih, J.W., Purcell, R.H., Gerin, J.L., 1980. *Delta agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 6124-6128.
59. Rizzetto, M., Verme, G., Rechia, S., 1983. *Chronic HBsAg positive hepatitis with intrahepatic expression of delta antigen. An active and progressive disease unresponsive to immunosuppressive treatment*. Ann. Intern. Med., 98: 437-441.
60. Rizzetto, M., Rosina, F., Saraco, G., 1986. *Treatment of chronic delta hepatitis with recombinant alpha-2 interferon*. J. Hepatology, 3: S229-S233.
61. Rizzetto, M., 1999. *Therapy of chronic viral hepatitis: a critical view*. Ital. J. Gastroenterol. Hepatol., 31 (8): 781-793.
62. Rossi, J.J., Cantin, E.M., Sarver, N., Chang, P.F., 1991. *The potential use of catalytic RNAs in therapy of HIV infection and other diseases*. Pharmacol. Ther., 50: 245.
63. Ryu, W.S., Bayer, M., Taylor, J., 1992. *Assembly of hepatitis delta virus particles*. J. Virol., 66: 2310-2315.
64. Saldanha, J., Homer, E., Goldin, P., Thomas, H.C., Monjardino, J., 1990. *Cloning and expression of an immunodominant region of the hepatitis delta antigen*. J. Gen. Virol., 71: 471-475.
65. Smedile, A., Rizzetto, M., Gerin, J., 1994. *Advances in hepatitis D virus biology and disease*. Prog. Liver Dis, 12: 157-175.
66. Sullenger, B.A., Cech, T.R., 1994. *Ribozyme-mediated repair of defective mRNA by targeted trans-splicing*. Nature, 371: 619.
67. Taylor, J.M., 1992. *The structure and replication of hepatitis delta virus*. Annu. Rev. Microbiol., 46: 253-276.
68. Thomas, H.C., Farci, P., Shein, R., 1987. *Inhibition of hepatitis delta virus (HDV) replication by lymphoblastoid human alpha interferon*. In: Rizzetto, M., Gerin, J.L., Purcell, R.H., eds. *The hepatitis delta virus and its infection*. New York: Alan R. Liss, 277-290.
69. Velosa, J., Ramalho, F., Serejo, F., Marinho, R., de Moura, M.C., 1993. *Chronic hepatitis: the etiological spectrum. The implications for treatment*. Acta Médica Portuguesa, 6 (6): 233-238.
70. Welch, P.J., Tritz, R., Yeil, S., Barber, J. Yu, M., 1997. *Intracellular application of hairpin ribozyme genes against hepatitis B virus*. Gene Therapy, 4: 736-743.
71. Xia, Y.-P., Yeh, C.-T., Ou, J.-H., Lai, M.M.C., 1992. *Characterization of nuclear targeting signal of hepatitis delta antigen: nuclear transport as a protein complex*. J. Virol., 66: 914-921.
72. Zirbel, R.M., Mathieu, U.R., Kurz, A., Cremer, T., Lichter, P., 1993. *Evidence for a nuclear compartment of transcription and splicing located at chromosome domain boundaries*. Chrom. Res. 1: 93-106.

Modulação do transporte de insulina em células endoteliais de capilares cerebrais de Rato pela fosfatase alcalina*

C. Calhau^{1,2,3}
 F. Martel^{1,2}
 S. Pinheiro-Silva¹
 P. Soares-da-Silva²
 C. Hipólito-Reis¹
 I. Azevedo²

RESUMO

Foi recentemente demonstrado que a actividade da fosfatase alcalina (ALP), em diferentes tecidos, está correlacionada com a extensão de superfície de membrana por unidade de volume dos mesmos tecidos, o que sugere um relação desta enzima com sistemas de transporte transmembranar. Adicionalmente, foi obtida evidência do envolvimento da ALP na modulação do transporte de cationes orgânicos em hepatócitos de Rato, assim como em células renais de embrião humano (células Hek293) e de carcinoma de cólon humano (células Caco-2). Esta enzima está presente na membrana luminal das células endoteliais que constituem a barreira hemo-encefálica (BHE).

A insulina é uma hormona que atravessa a BHE, por endocitose mediada por receptores, inibindo o centro da fome no sistema nervoso central (SNC). Sabe-se ainda que a insulina inibe a ALP cerebral. Considerámos, então, a hipótese da ALP poder influenciar o transporte de insulina através da BHE. Neste estudo foram usadas células endoteliais de capilares cerebrais de Rato (RBE4). Estudou-se o transporte da insulina-¹²⁵I (100 pM) na presença ou ausência de compostos moduladores da ALP. A radioactividade internalizada foi quantificada em contador gama, ao fim de 60 minutos de incubação a 37°C. A actividade da ALP presente na membrana luminal das células RBE4 (ecto-ALP) foi determinada por método espectrofotométrico em células RBE4 intactas, a pH 7,4. Para este doseamento foi usado o substrato p-nitrofenilfosfato e quantificado o produto p-nitrofenol a 410 nm.

Compostos descritos como activadores da ALP, como a progesterona (100 µM e 200 µM), o beta-estradiol (100 µM) e o canferol (100 µM), aumentaram a actividade da ecto-ALP e a internalização da insulina, nas células RBE4. Por outro lado, a presença de inibidores da ALP, a L-arginina (1 mM) e o vanadato (100 µM), inibiu a ecto-ALP e a internalização da insulina. O tratamento das células RBE4 com compostos capazes de modular de uma forma crónica a actividade da ALP, como o ácido retinóico (10 µM) ou o ferro (FeSO₄, 100 µM), levou a um aumento da actividade da ecto-ALP e da internalização da insulina. No seu conjunto, os resultados mostram existir uma estreita correlação entre a actividade da ecto-ALP e a captação de insulina ($r = 0,85$; $P = 0,0008$; $n = 11$), nas células RBE4.

Em conclusão, os resultados obtidos sugerem uma modulação do transporte da insulina na BHE pela ecto-ALP. O efeito de diferentes tipos de nutrientes sobre a ALP poderá, assim, levar a uma potenciação ou antagonismo da acção da insulina sobre o apetite e, consequentemente sobre o equilíbrio energético.

Palavras chave: fosfatase alcalina (ALP), células RBE4, insulina, endocitose mediada por receptor, barreira hemo-encefálica.

* Prémio Gonçalves Ferreira de Nutrição/Alimentação, 2001.
 Prémio Ricardo Jorge de Saúde Pública (*ex aequo*).
 (Prémios Científicos do I Centenário do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge).

¹ Departamento de Bioquímica (U38-FCT)

² Instituto de Farmacologia e Terapêutica (U38-FCT), Faculdade de Medicina, Universidade do Porto.

³ Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Universidade do Porto.

Introdução

A barreira hemo-encefálica (BHE) separa o sangue do espaço intersticial cerebral, sendo fundamental para a manutenção da homeostasia do SNC. Sabe-se que é o endotélio cerebral o principal elemento responsável pela BHE nos mamíferos [Bradbury, 1979; Cserr e Bundgaard, 1984]. No endotélio cerebral são abundantes duas enzimas membranares: a transpeptidase do gama-glutamilo (GTP) e a fosfatase alcalina (ALP). Estas duas enzimas contribuem para a barreira enzimática existente na BHE [Meyer et al., 1990].

A insulina é uma hormona sintetizada e segregada pelas células beta do pâncreas e é a única hormona capaz de fazer descer a concentração plasmática de glicose. O receptor da insulina é uma glicoproteína transmembranar que, quando activada pelo ligando, estimula reacções de fosforilação em cadeia de proteínas intracelulares e consequente recrutamento de alguns transportadores para a membrana citoplasmática, como são exemplo os transportadores de glicose (GLUTs). A subsequente internalização da insulina ocorre por endocitose mediada por receptor. A transcitose da insulina permite a chegada desta hormona a tecidos onde as células endoteliais possuem junções apertadas. O efeito hipoglicemiante da insulina deve-se: (1) à facilitação da entrada de glicose para as células musculares e adipócitos, (2) à indução da síntese de glicogénio no fígado, (3) à inibição da lipólise e favorecimento da síntese de triacilglicérides no tecido adiposo, (4) ao aumento da síntese proteica, e (5) ao aumento da utilização da glicose pelas células. A falha em algumas destas funções com consequente hiperinsulinismo conduz, entre outras patologias, à obesidade. Mais recentemente, foi descrita a passagem da insulina através da BHE e a presença de receptores para a insulina no SNC [Porte et al., 1998], onde exerce importantes efeitos a nível da regulação do apetite, crescimento e diferenciação neuronal [Schwartz et al., 1992; Baskin et al., 1999; Heidenreich et al., 1993; Robinson et al., 1994]. A insulina influencia de forma positiva as mais preciosas funções cerebrais: conhecimento e memória [Wickelgren 1998]. Para além destes importantes efeitos da insulina no SNC, há ainda a acrescentar o seu papel na prevenção da doença de Alzheimer ao inibir a formação de lesões neurofibrilares características desta patologia [Hoyer 1997]. Em suma, a passagem da insulina através da BHE parece importante para permitir que esta hormona exerça as suas funções no SNC, e consequentemente a regulação da passagem de insulina atra-

vés da BHE contribui para a regulação dos efeitos desta hormona no SNC.

A maioria da investigação sobre mecanismos de regulação por fosforilação/desfosforilação tem focado o seu interesse na compreensão da regulação bioquímica e da importância fisiológica dos mecanismos de fosforilação intracelular. No entanto, durante as últimas décadas, numerosos estudos têm demonstrado a existência de cínases na superfície externa de vários tipos de células (ectocínases). Essas ecto-enzimas são capazes de fosforilar quer substratos extracelulares (solúveis), quer resíduos aminoácídicos extracelulares (tirosina e/ou serina/treonina) de proteínas membranares [Redegeld et al., 1999]. Assim, estas ecto-enzimas desempenham um importante papel na regulação da transdução de sinal ou das interacções célula-célula. A dupla cínases/fosfatases de proteínas é necessária para o controlo reversível de fenómenos de fosforilação e desfosforilação a nível extracelular, de uma forma semelhante ao que fazem ao nível dos sistemas citoplasmáticos de fosforilação/desfosforilação.

A fosfatase alcalina (ALP; EC 3.1.3.1) é uma enzima capaz de hidrolisar monoésteres ortofosfóricos. Trata-se de uma enzima que está ancorada às membranas citoplasmáticas por ligação covalente a um resíduo de glicano e fosfatidilinositol (GPI) sensível à hidrólise pela fosfolípase C ou D, o que veio comprovar a sua ecto-orientação [Low, 1987]. A ALP hidrolisa apropriadamente os substratos no meio extracelular, e, portanto, é uma ecto-enzima.

O papel fisiológico da ALP é ainda controverso. Para isto contribui o facto dos estudos, usando a enzima purificada, serem realizados a valores de pH óptimo não fisiológicos (alcalinos) [McComb et al., 1979]. No entanto, a partir de estudos realizados em fígado humano, foi descrito um pH óptimo de 7-8 para a enzima purificada e para a enzima ligada à membrana plasmática [Chan e Stinson, 1986], bem como para a enzima hepática de Boi e intestinal de Bezerro purificadas [Swarup et al., 1981], usando fosfo-histonas como substrato.

Foi recentemente demonstrado pelo nosso grupo que a actividade da ALP em diferentes tecidos está positivamente correlacionada com a extensão de superfície de troca por unidade de volume de tecido, sugerindo uma associação entre a enzima ALP e sistemas de transporte transmembranar [Calhau et al., 1999]. Adicionalmente, obtivemos evidência do envolvimento da ALP na modulação do transporte de cationes orgânicos em hepatócitos de Rato [Martel et al., 1996, 1998a,b; Calhau et al., 2000], assim como em células renais de embrião humano

(células Hek293; Martel et al., 2001) e de carcinoma de cólon humano (células Caco-2; Calhau et al., 2002).

Neste estudo procedeu-se à investigação da influência da actividade da ALP, presente na membrana luminal das células da BHE, sobre a internalização da insulina. Desta forma, investigámos a influência da ecto-ALP no transporte de insulina para o SNC.

Foi utilizada uma linha imortalizada de células endoteliais de capilares cerebrais de Rato (RBE4). Estas células foram obtidas por transfecção de células endoteliais de capilares cerebrais de Rato com um plasmídeo contendo o gene do adenovírus-E1A [Roux et al., 1994]. A linha celular RBE4 apresenta um fenótipo característico de células da BHE, com expressão das enzimas GTP, ALP e síntese do monóxido de azoto, bem como dos transportadores glicoproteína-P [El Hafny et al., 1997; Naassila et al., 1996; Nobles et al., 1998; Roux et al., 1994] e GLUT-1 (transportador de glicose) [Regina et al., 1997]. Nestas células, a ALP está presente exclusivamente na membrana apical. Assim, as células RBE4 constituem um modelo adequado para a investigação do papel da ecto-fosfatase sobre sistemas de transporte na BHE.

Materiais e métodos

Materiais

Insulina-¹²⁵I (actividade específica de 629 Ci/mmol) (New England Nuclear Chemicals, Dreieich, Germany); adenosina, substrato da fosfatase alcalina (*p*-nitrofenilfosfato), padrão da fosfatase alcalina (*p*-nitrofenol), hidrocloreto da D-arginina, hidrocloreto da L-arginina, corticosterona, dibutíril AMPcíclico, beta-estradiol, sulfato ferroso, HEPES (N-2-ácido etano-sulfónico-N'-2-hidroxiethylpiperazina), insulina pancreática de Boi, canferol, solução de penicilina/estreptomicina, fosfolipase C de *Bacillus cereus*, progesterona, ácido *trans*-retinóico, dulcedil de sódio e sulfato (SDS), ortovanadato de sódio, testosterona, Tris (hidrocloreto de tris-(hidroximetil)-aminometano), solução de tripsina-EDTA, (Sigma, St. Louis, MO, USA); DMSO (dimetilsulfóxido) (Merck, Darmstadt, Germany). A corticosterona, o beta-estradiol, a progesterona e a testosterona foram dissolvidos em etanol (1 %); o canferol e o ácido *trans*-retinóico foram dissolvidos em DMSO (1 %). Os controlos para estes compostos foram realizados na presença do solvente correspondente.

Cultura de Células

A linha celular RBE4 foi gentilmente cedida pela Prof^a. Doutora Françoise Roux (INSERM U. 26, Hôpital Fernand Widal, Paris, França). O clone destas células RBE4 foi mantido em atmosfera com 5% de CO₂-95% ar, à temperatura de 37°C. Estas células (passagens nº 30-60) cresceram em placas de Petri com 21 cm² de área (Costar, Badhoevedorp, The Netherlands), em meio de cultura Minimum Essential Medium / Ham's F10 (1:1) (Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado com 300 ng ml⁻¹ neomicina, 10% soro de feto bovino (Sigma), 1 ng ml⁻¹ de factor de crescimento fibroblástico básico, 100 U ml⁻¹ penicilina G, 0,25 µg ml⁻¹ amfotericina B, 100 µg ml⁻¹ estreptomicina (Sigma) e 25 mM HEPES. O meio de cultura foi mudado de 2 em 2 dias e as células atingiam confluência (formando uma monocamada) ao fim de 3-4 dias de cultura. Para a divisão das células em cultura, as células foram dissociadas com 0,25% de tripsina-EDTA e diluídas de 1:6. Para as experiências, as células RBE4 foram semeadas em placas com 24 poços (2 cm² de área; Ø 16 mm; Corning Costar). 24 h antes de cada experiência, as células foram colocadas em meio de cultura sem soro de feto bovino. Todas as experiências foram realizadas com células RBE4 com 7-10 dias de cultura. Cada cm² continha cerca de 200 µg de proteínas celulares.

Para o tratamento crónico das células RBE4 com FeSO₄ ou ácido retinóico, o composto foi adicionado ao meio de cultura. O ácido retinóico foi dissolvido em DMSO. A concentração final do solvente no meio de cultura foi 0,1%. O controlo para este composto foi realizado na presença do solvente.

Doseamento da actividade fosfo-hidrolítica da ALP em células RBE4 intactas

A actividade fosfo-hidrolítica da ALP foi avaliada doseando a libertação de *p*-nitrofenol a partir do substrato *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP), por espectrofotometria a 410 nm. As experiências foram realizadas a pH fisiológico (pH 7,4) em células RBE4 intactas e com a membrana luminal exposta ao meio.

No dia da experiência, após a remoção do meio de cultura e lavagem das células com meio Hanks a 37°C, as células em monocamada foram pré-incubadas durante 20 minutos em meio Hanks a 37°C. O meio Hanks tinha a seguinte composição (mM): NaCl 137, KCl 5, MgSO₄ 0,8, Na₂HPO₄ 0,33, KH₂PO₄ 0,44, CaCl₂ 0,25, MgCl₂ 1,0, Tris-HCl 0,15 e butirato

de sódio 1,0, pH 7,4. A reacção decorria em 300 μ L de meio Hanks contendo 2,86 mM de *p*NPP. Após 60 minutos de incubação recolheram-se 200 μ L do meio extracelular que foram transferidos para tubos contendo 800 μ L de uma solução de NaOH 0,02 M a 4°C, como forma de finalizar a reacção. O *p*-nitrofenol libertado por hidrólise foi então doseado.

Os resultados são apresentados em miliunidades (mU) de actividade da ecto-*p*NPPase por miligrama de proteína celular. Uma unidade (U) de actividade enzimica está definida como a actividade capaz de hidrolisar 1 μ mol *p*NPP por minuto a 37°C, a pH 7,4.

Internalização da insulina-¹²⁵I pelas células RBE4

Para o doseamento da insulina-¹²⁵I internalizada pelas células RBE4, as células em monocamada foram incubadas com insulina-¹²⁵I (100 pM) em 300 μ L de meio de incubação (KRH) com a seguinte composição (mM): NaCl 119, KCl 4,5, MgSO₄ 1,2, KH₂PO₄ 1,2, NaHCO₃ 25, CaCl₂ 2,5, HEPES 16 e glicose 5, suplementado com 1% de soro de feto bovino, a pH 7,4. Após 60 minutos de incubação a 37°C, as células foram lavadas duas vezes com meio KRH a 4°C, pH 7,4, para remover a insulina-¹²⁵I livre. Em seguida, as células foram incubadas durante 10 minutos com meio a 4°C e pH 2,8 (pH ajustado com HCl). Após este período de incubação, o líquido extracelular foi recolhido, removendo-se desta forma a fracção de insulina-¹²⁵I ligada à membrana celular. As células foram solubilizadas com 0,1% de SDS durante 60 minutos à temperatura ambiente e a radioactividade correspondente à fracção de insulina-¹²⁵I resistente ao ácido, i.e. internalizada, foi determinada em contador gama [Yagil et al., 1988]. Para calcular a ligação não-específica da insulina-¹²⁵I, foram realizados estudos em paralelo na presença de uma elevada concentração de insulina não radioactiva (10 μ M) [Yagil et al., 1988].

Tratamento das células com fosfolipase C (PI-PLC)

A enzima PI-PLC, de origem bacteriana, foi usada com o objectivo de hidrolisar e consequentemente libertar a ecto-ALP para o meio de incubação [Low, 1987]. Para tal, o meio de cultura foi removido e as células em monocamada foram lavadas uma vez em meio Hanks sem NaCl e sem MgCl₂ (solução A), a 37°C. Após 20 minutos de pré-incubação em solução A (pH 7,4, 37°C), as células foram incubadas na presença ou ausência de 0,1 U/ml PI-PLC, cuja ac-

tividade é inibida pelo NaCl [Sundler et al., 1978]. No final de cada incubação, o meio extracelular foi recolhido e suplementado com 137 mM de NaCl e 1 mM de MgCl₂ para o doseamento da actividade de *p*NPPase libertada para o meio (ALP solúvel). Para o doseamento da actividade de ecto-ALP, após a remoção do meio contendo a enzima PI-PLC, as células foram lavadas uma vez com solução A e realizado o doseamento desta actividade nas células intactas de acordo como o protocolo acima descrito.

Quantificação das proteínas celulares

O conteúdo proteico foi determinado de acordo com o procedimento descrito por Bradford [1976], utilizando-se a albumina sérica humana como padrão.

Cálculos e estatística

As médias aritméticas são apresentadas com o erro padrão da média (SEM) e as médias geométricas são apresentadas com os intervalos de 95% de confiança. A diferença entre vários grupos foi avaliada usando o teste de análise de variância (teste ANOVA) seguido do teste Bonferroni. Para a comparação entre dois grupos foi usado o teste *t* de Student. As diferenças foram consideradas significativas quando foi obtido um *P* < 0,05.

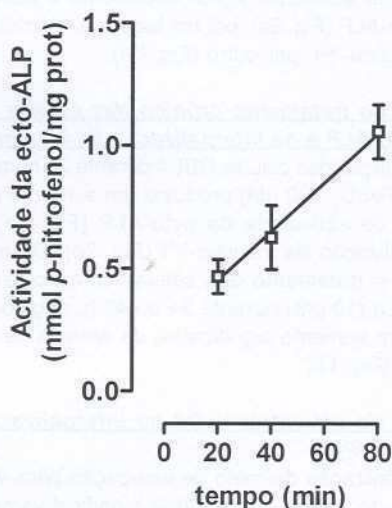
Resultados

Relação entre a actividade da ecto-ALP e a internalização da insulina-¹²⁵I em células RBE4

Actividade da ecto-ALP:

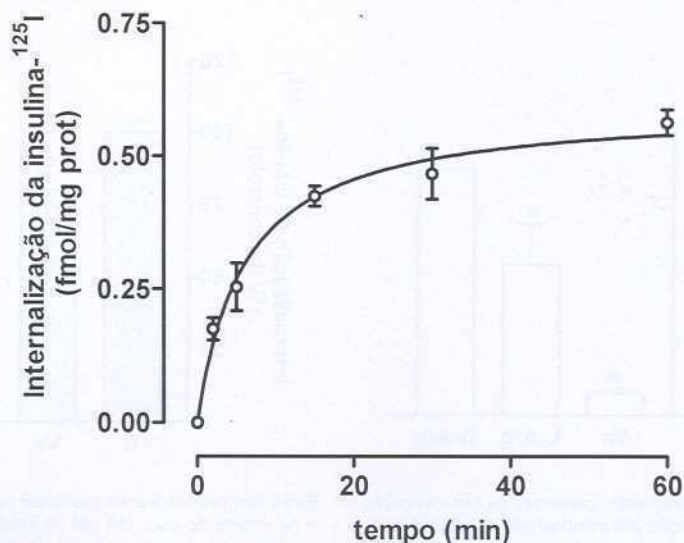
Com o objectivo de estudar a actividade fosfohidrolítica da ALP presente na superfície luminal das células RBE4, a hidrólise do substrato *p*-NPP foi quantificada usando condições fisiológicas (i.e., pH 7,4, 37°C). O substrato *p*-NPP tem uma reconhecida afinidade para a ALP em estudos realizados *in vitro*, com a vantagem adicional de não ser transportado para o interior das células [DePierre and Karnovsky, 1974]. As experiências realizadas na presença de uma concentração saturante (2,86 mM) de *p*-NPP, com diferentes tempos de incubação, demonstraram que a formação do produto *p*-nitrofenol foi linear até aos 80 minutos de incubação (Fig. 1). Nos estudos subsequentes, a actividade da ecto-ALP foi determinada para um tempo de incubação de 60 minutos.

FIGURA 1
VARIACÃO DA ACTIVIDADE DA ECTO-ALP EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO, UTILIZANDO COMO SUBSTRATO O P-NITROFENILFOSFATO (2,86 mM)



A actividade fosfo-hidrolítica está apresentada em NMOL p-nitrofenol por mg de proteína. Cada valor é o resultado da média±SEM de 3 experiências em duplicado

FIGURA 2
VARIACÃO DA INTERNALIZAÇÃO DE INSULINA-¹²⁵I (100 pM) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO, NAS CÉLULAS RBE4. OS RESULTADOS REPRESENTAM A MÉDIA ARITMÉTICA±SEM DE 3 EXPERIÊNCIAS. EM SIMULTÂNEO FOI REALIZADA UMA EXPERIÊNCIA DE INCUBAÇÃO COM INSULINA NÃO RADIOACTIVA (10 μM)



A internalização foi calculada pela diferença entre a insulina-¹²⁵I presente nas células nos dois tipos de experiências. *P<0,05

Internalização da insulina-¹²⁵I:

Para o estudo da possível relação entre a actividade da ecto-ALP e a captação da insulina pela BHE, foram feitas experiências de captação (internalização) de insulina-¹²⁵I em células endoteliais de BHE de Rato (células RBE4).

As células RBE4 com 7-9 dias de cultura apresentavam uma internalização de insulina-¹²⁵I, após 60 minutos de incubação, de $0,563 \pm 0,024$ fmol/mg prot (Fig. 2). Uma incubação prévia das células com insulina não radioactiva (10 μM) produziu uma redução drástica na entrada de insulina-¹²⁵I (resultados não apresentados). Isto prova que a internalização da insulina marcada ocorre graças a um transporte específico.

Efeito agudo de fármacos na actividade da ecto-ALP e na internalização da insulina-¹²⁵I em células RBE4:

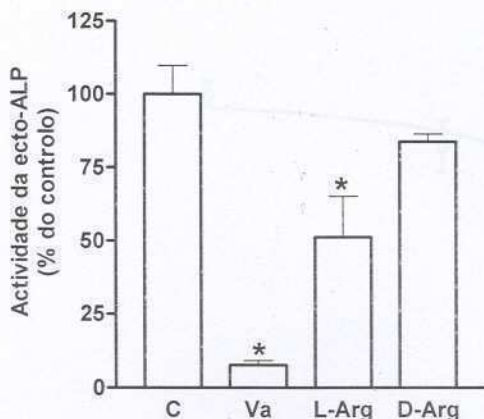
Para estudar o efeito de compostos sobre a actividade da ecto-ALP, as células RBE4 foram incubadas com 2,86 mM do substrato p-NPP durante 60 min e os compostos estavam presentes quer no meio de pré-incubação quer no meio de incubação. Para o estudo da internalização da insulina-¹²⁵I, as células RBE4 foram incubadas com 100 pM de insulina-¹²⁵I durante 60 min (pH 7,4; 37°C) e os compostos

estavam presentes nos meios de pré-incubação e de incubação.

O ortovanadato (100 μM) e o aminoácido L-arginina (1 mM) diminuíram significativamente a actividade da ecto-ALP (Fig. 3a) e a internalização da insulina- ^{125}I (Fig. 3b). No entanto, a forma inactiva do aminoácido (D-arginina, 1 mM) não modificou a actividade enzimática (Fig. 3a) nem a internalização da insulina- ^{125}I (Fig. 3b).

Em seguida, testou-se o efeito de diferentes hormonas esteróides: progesterona (100 μM e 200 μM), beta-estradiol (100 μM), corticosterona (100 μM) e testosterona (100 μM). A actividade da ecto-ALP só foi alterada na presença das duas primeiras hormonas. A actividade enzimática aumentou para 489% e 126% do controlo na presença de progesterona (200 μM) e do beta-estradiol (100 μM), respectivamente (Fig. 4a). Por outro lado, a internalização de insulina- ^{125}I aumentou significativamente na presença de progesterona (100 μM e 200 μM) e beta-estradiol (100 μM). A internalização aumentou para 286% e 160% do controlo, na presença respectivamente de 100 μM dos referidos fármacos (Fig. 4b). A testosterona e a corticosterona não tiveram qualquer efeito sobre a internalização da insulina- ^{125}I (Fig. 4b).

FIGURA 3A
EFEITO DO ORTOVANADATO (Va, 100 μM ; N=4), L-ARGININA (L-ARG, 1 mM, N=4) E D-ARGININA (D-ARG, 1 mM; N=3) SOBRE A ACTIVIDADE DA ECTO-ALP EM CÉLULAS RBE4



Os compostos testados estiveram presentes na pré-incubação (20 minutos) e na incubação (60 minutos; pNPP 2,86 mM). Os resultados representam a percentagem do valor controlo (C). *P<0,05

Por último, o bioflavonóide canferol (100 μM) aumentou significativamente quer a actividade da ecto-ALP (Fig. 5a), quer a internalização da insulina- ^{125}I (Fig. 5b). O ácido *trans*-retinóico (10 μM), uma das formas biologicamente activas da vitamina A, foi capaz de aumentar significativamente a actividade da ecto-ALP (Fig. 6a), por um lado, e a internalização da insulina- ^{125}I , por outro (Fig. 6b).

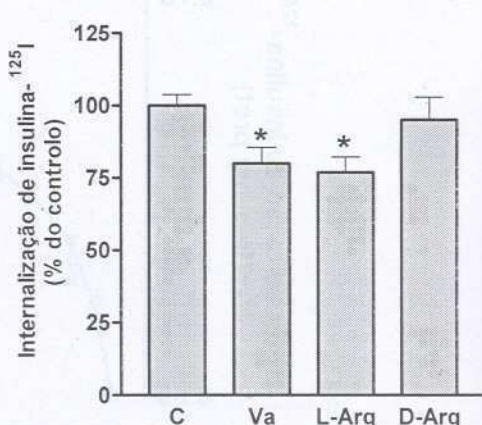
Efeito do tratamento crónico das células RBE4 na ecto-ALP e na internalização da insulina- ^{125}I :

A incubação das células RBE4 durante 24 horas com ferro (FeSO_4 100 μM) produziu um aumento significativo da actividade da ecto-ALP (Fig. 7a) e da internalização da insulina- ^{125}I (Fig. 7b). Do mesmo modo, o tratamento das células com ácido *trans*-retinóico (10 μM) durante 24 ou 48 h, originou também um aumento significativo da entrada de insulina- ^{125}I (Fig. 6b).

Efeito do pH extracelular na internalização de insulina- ^{125}I :

A alcalinização do meio de incubação para valores de pH de 7,8 ou 8,2 facilitou significativamente a internalização da insulina- ^{125}I (Fig. 8).

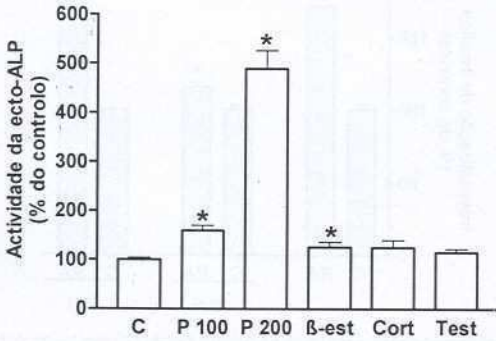
FIGURA 3B
EFEITO DO ORTOVANADATO (Va, 100 μM ; N=11), L-ARGININA (L-ARG, 1 mM, N=13) E D-ARGININA (D-ARG, 1 mM; N=9) SOBRE A INTERNALIZAÇÃO DE INSULINA EM CÉLULAS RBE4



Estes fármacos estiveram presentes na pré-incubação (20 min.) e na incubação com 100 pM de insulina- ^{125}I (60 minutos). Os resultados representam a percentagem do valor controlo (C). *P<0,05

FIGURA 4A

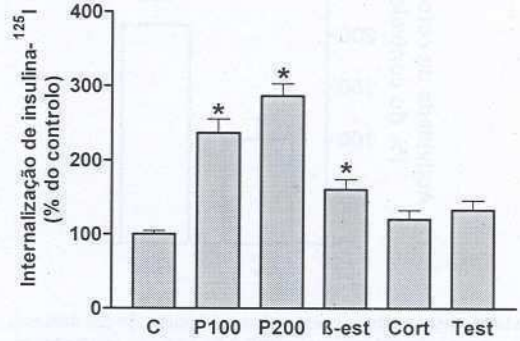
EFEITO DA PROGESTERONA (P100, 100 μ M; P200, 200 μ M, N=16), BETA-ESTRADIOL (β -EST, 100 μ M; N=8), CORTICOSTERONA (CORT, 100 μ M, N=7) E TESTOSTERONA (TEST, 100 μ M; N=8) SOBRE A ACTIVIDADE DA ECTO-ALP EM CÉLULAS RBE4



Estes compostos estiveram presentes na pré-incubação (20 minutos) e na incubação (60 minutos; pNPP 2,86 mM). Os resultados representam a percentagem do valor controlo (C). *P<0,05

FIGURA 4B

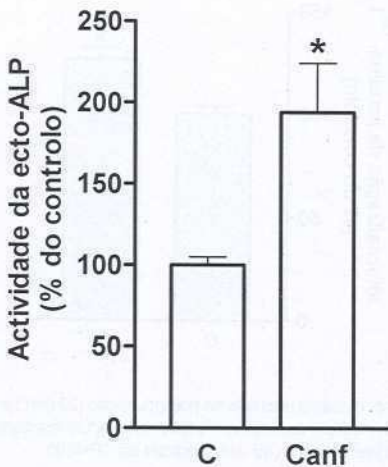
EFEITO DA PROGESTERONA (P100, 100 μ M; P200, 200 μ M, N=14), BETA-ESTRADIOL (β -EST, 100 μ M; N=12), CORTICOSTERONA (CORT, 100 μ M, N=12) E TESTOSTERONA (TEST, 100 μ M; N=12) SOBRE A INTERNALIZAÇÃO DE INSULINA EM CÉLULAS RBE4



Estes fármacos estiveram presentes na pré-incubação (20 min.) e na incubação com 100 pM de insulina-¹²⁵I (60 minutos). Os resultados representam a percentagem do valor controlo (c). *P<0,05

FIGURA 5A

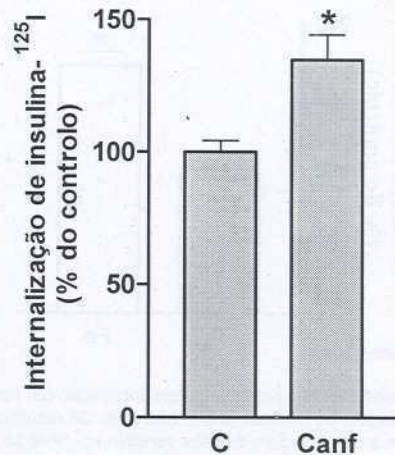
EFEITO DO CANFEROL (K, 100 μ M; N=7) SOBRE A ACTIVIDADE DA ECTO-ALP EM CÉLULAS RBE4



Este composto esteve presente na pré-incubação (20 minutos) e na incubação (60 minutos; pNPP 2,86 mM). Os resultados representam a percentagem do valor controlo (c). *P<0,05

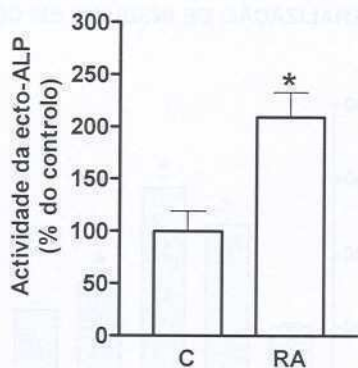
FIGURA 5B

EFEITO DO CANFEROL (K, 100 μ M; N=12) SOBRE A INTERNALIZAÇÃO DE INSULINA EM CÉLULAS RBE4



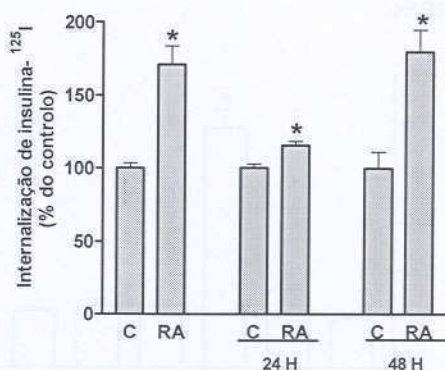
Este fármaco esteve presente na pré-incubação (20 min.) e na incubação com 100 pM de insulina-¹²⁵I (60 minutos). Os resultados representam a percentagem do valor controlo (c). *P<0,05

FIGURA 6A
EFEITO DO ÁCIDO TRANS RETINÓICO (RA, 10 μ M; N=6) SOBRE A ACTIVIDADE DA ECTO-ALP EM CÉLULAS RBE4



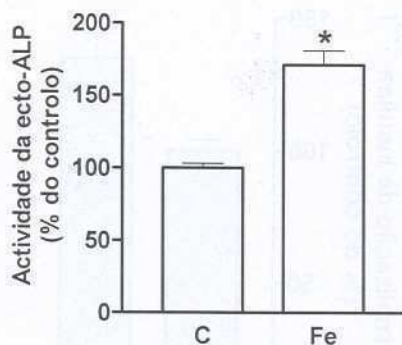
Este composto esteve presente na pré-incubação (20 minutos) e na incubação (60 minutos; pNPP 2,86 mM). Os resultados representam a percentagem do valor controlo (c). *P<0,05

FIGURA 6B
EFEITO DO ÁCIDO TRANS RETINÓICO (RA, 10 μ M) APÓS TRATAMENTO AGUDO (N=16) E CRÔNICO DURANTE 24 HORAS (N=6) E 48 HORAS (N=6), SOBRE A INTERNALIZAÇÃO DE INSULINA EM CÉLULAS RBE4



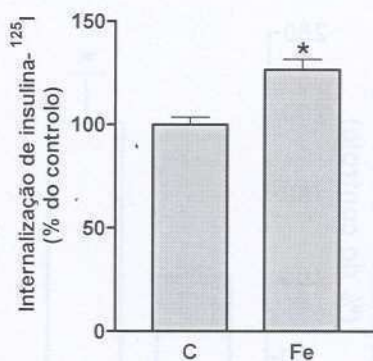
Este fármaco esteve presente na pré-incubação (20 min.) e na incubação com 100 pM de insulina-¹²⁵I (60 minutos). Os resultados representam a percentagem do valor controlo (c). *P<0,05

FIGURA 7A
EFEITO DO TRATAMENTO COM FERRO DURANTE 24 HORAS (FE, 100 μ M; N=7) SOBRE A ACTIVIDADE DA ECTO-ALP EM CÉLULAS RBE4



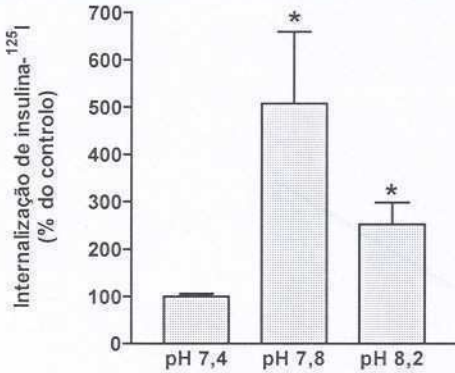
Este composto esteve presente na pré-incubação (20 minutos) e na incubação (60 minutos; pNPP 2,86 mM). Os resultados representam a percentagem do valor controlo (c). *P<0,05

FIGURA 7B
EFEITO DO TRATAMENTO COM FERRO DURANTE 24 HORAS (FE, 100 μ M; N=6) SOBRE A INTERNALIZAÇÃO DE INSULINA EM CÉLULAS RBE4



Este fármaco esteve presente na pré-incubação (20 min.) e na incubação com 100 pM de insulina-¹²⁵I (60 minutos). Os resultados representam a percentagem do valor controlo (c). *P<0,05

FIGURA 8
EFEITO DO PH EXTRACELULAR SOBRE A
INTERNALIZAÇÃO DE INSULINA-¹²⁵I (100 pM, 60
minutos)



Os resultados representam a percentagem do valor controló (pH 7,4). *P<0,05

Actividade da ALP após hidrólise pela PI-PLC

A enzima PI-PLC faz a hidrólise da ligação das proteínas à membrana por resíduos GPI (Low 1987). A ALP é uma enzima ligada à membrana por um resíduo GPI sensível à PI-PLC. A PI-PLC foi usada para estudar a contribuição da ALP ancorada à membrana na actividade fosfo-hidrolítica observada nestas células. Na ausência da enzima PI-PLC, o meio de incubação não apresenta actividade fosfo-hidrolítica, quando na presença do substrato pNPP (resultados não apresentados). Por outro lado, com a adição de PI-PLC (0,1 U/mL) ao meio de incubação pode ser observada actividade fosfo-hidrolítica da ALP solúvel ($0,184 \pm 0,048$ nmol mg⁻¹ prot min⁻¹, n=3). Na presença de ortovanadato (100 μM), a actividade da ALP solúvel foi totalmente inibida (resultados não apresentados). Por outro lado, a progesterona (200 μM) aumentou a actividade fosfo-hidrolítica da ALP solúvel ($0,916 \pm 0,099$ nmol mg prot⁻¹ min⁻¹; n=3), para cerca de 500% do valor controló. Este efeito foi semelhante ao observado sobre a actividade da ecto-ALP (Fig. 3a).

Comparação entre o efeito dos compostos sobre a ecto-ALP e sobre a internalização da insulina-¹²⁵I

Relacionando os resultados obtidos, observou-se que existe uma correlação positiva entre o efeito dos

vários fármacos sobre a ecto-ALP e sobre a internalização da insulina-¹²⁵I ($P= 0,0008$; $r= 0,85$) (Fig. 9).

Discussão

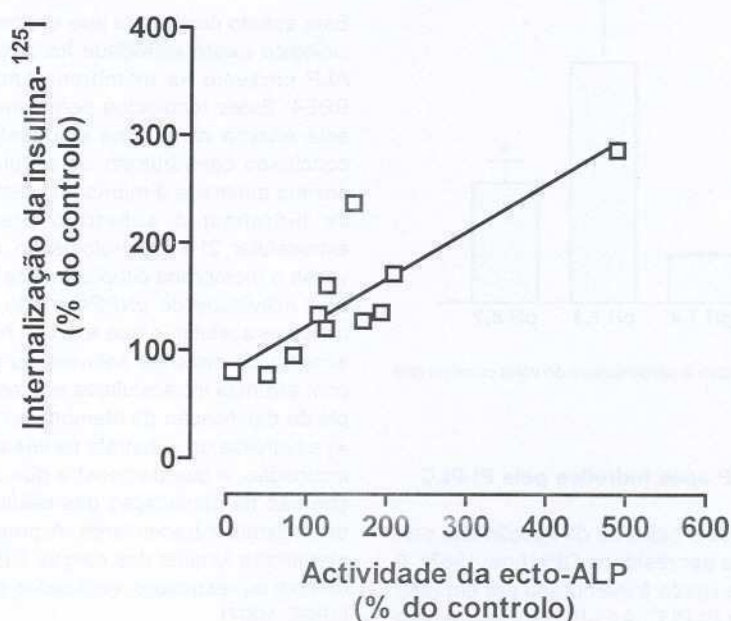
Este estudo demonstra que em condições de pH fisiológico existe actividade fosfo-hidrolítica da ecto-ALP presente na membrana luminal das células RBE4. Estes resultados permitem-nos caracterizar esta enzima como uma ecto-fosfatase. Para esta conclusão contribuíram os seguintes dados: 1) a enzima ancorada à membrana (ecto-ALP) foi capaz de hidrolisar o substrato presente no meio extracelular; 2) o substrato usado, o pNPP, não atravessa a membrana citoplasmática [DePierre, 1974]; 3) a actividade de pNPPase não foi detectada no meio extracelular, o que exclui a hipótese do envolvimento de enzimas solúveis ou de contaminação com enzimas intracelulares em resultado por exemplo da danificação da membrana celular das RBE4; 4) a hidrólise do substrato foi linear com o tempo de incubação, o que demonstra que durante a incubação não há danificação das células com libertação de enzimas intracelulares. A presença de ALP na membrana luminal das células RBE4 está de acordo com os resultados verificados por El Hafny et al. [1996, 1997].

A enzima PI-PLC hidrolisou a ligação GPI da ALP à membrana luminal das células RBE4, o que permitiu a conseqüente solubilização da ALP. Esta alteração não afectou a capacidade da ALP em hidrolisar o pNPP. Estes resultados estão de acordo com os descritos por outros autores noutros modelos celulares [Low e Finean, 1977]. A actividade de ecto-ALP foi sensível à hidrólise pela enzima PI-PLC, o que veio reforçar a descrição feita por Roux et al. [1994] da presença de ALP na membrana citoplasmática das células RBE4. A ausência de actividade de pNPPase no meio de incubação antes da adição de PI-PLC demonstra por um lado que a ALP ancorada à membrana das RBE4 não é libertada espontaneamente, ao contrário do que foi observado por Fukayama e Tashjian [1990] em células de osteosarcoma, e por outro, que não há libertação de ALP intracelular.

O envolvimento da ALP como ecto-enzima na regulação de sistemas de transporte membranares foi pela primeira vez referido por Becq et al. [1993; 1994]. Este grupo observou que inibidores da actividade da ALP, como o vanadato, reduzem a desfosforilação do canal de cloro na fibrose cística, e que por esta razão a fosfatase alcalina ancorada

FIGURA 9

CORRELAÇÃO ENTRE O EFEITO DE ALGUNS COMPOSTOS SOBRE A ACTIVIDADE DA ECTO-ALP E A INTERNALIZAÇÃO DA INSULINA-¹²⁵I. OS COMPOSTOS USADOS FORAM: VANADATO (100 μ M), L- E D-ARGININA (1 MM), FERRO (24 HORAS, 100 μ M), ÁCIDO TRANS-RETINÓICO (10 μ M), PROGESTERONA (100 μ M E 200 μ M), BETA-ESTRADIOL (100 μ M), TESTOSTERONA (100 μ M), CORTICOSTERONA (100 μ M) E CANFEROL (100 μ M)



Cada valor representa a média \pm SEM da % do respectivo controlo. Existe uma correlação positiva e estatisticamente significativa: $r = 0,854$, $P = 0,0008$ ($n=11$).

à membrana celular poderia constituir um potencial alvo terapêutico para o tratamento da fibrose cística. Desta forma, o estado desfosforilado de algumas proteínas membranares está correlacionado com os níveis elevados de actividade da ecto-ALP [Scheibe et al., 2000].

Tem sido difícil identificar todos os sinais envolvidos na regulação do balanço energético. No entanto, sabe-se que a insulina atravessa a BHE, actua a nível do sistema nervoso central, nomeadamente sobre a síntese do neuropeptídeo Y [Woods, 1979]. Mais recentemente, foi descrito por Brüning et al. [2000] um papel importante da insulina como sinal na regulação da adiposidade. Não devemos esquecer que a nível periférico a insulina é uma hormona anabólica, p.e., activando a lipogénese, e que a nível central estimula a saciedade. A falha em algumas destas funções com consequente hiperinsulinismo conduz, entre outras patologias, à obesidade. Para além dos importantes efeitos da insulina no

SNC, como hormona saciadora, sabe-se ainda que inibe a formação de lesões neurofibrilares, exercendo um papel preventivo na doença de Alzheimer [Hoyer 1997]. Em suma, a regulação do transporte da insulina através da BHE é importante não só para permitir que esta hormona exerça as suas funções no SNC, como também para alterar a taxa de insulina periférica/líquido cefalorraquidiano, e consequentemente o balanço dos seus efeitos periféricos/centrais.

Os resultados agora obtidos demonstraram que as substâncias capazes de aumentar a actividade da ecto-ALP nas células RBE4 foram capazes de aumentar significativamente a internalização da insulina-¹²⁵I. Por outro lado, a alcalinização do pH extracelular levou a um aumento da internalização da insulina-¹²⁵I, o que está de acordo com o possível envolvimento da ecto-ALP sobre este transporte, já que se sabe que esta enzima *in vitro* tem um pH óptimo de cerca de 7,8-8,2 [Chan e Stinson, 1986].

O ácido *trans*-retinóico, uma das formas activas da vitamina A, é conhecido pelo seu papel na diferenciação celular e pelo carácter indutor da expressão da enzima ALP em várias células [El Hafny et al. 1996; Scheibe 2000]. O tratamento crónico (24h e 48h) das células RBE4 com ácido *trans*-retinóico levou a um aumento significativo da entrada de insulina para estas células. Tinha sido já descrito por El Hafny et al. [1996] um aumento da actividade da ecto-ALP em células RBE4 tratadas cronicamente com ácido *trans*-retinóico, o que está de acordo com os nossos resultados. Os resultados obtidos no presente estudo, referentes ao efeito do tratamento crónico das células RBE4 com ácido *trans*-retinóico sobre a internalização da insulina, estão de acordo com o seu reconhecido papel de agente diferenciador celular, i.e., a ALP e a endocitose mediada por receptores surgem em estádios mais diferenciados da célula endotelial.

O ortovanadato, um potente inibidor de fosfatases de proteínas em resíduos de tirosina, incluindo a ALP [Seargeant e Stinson, 1979], foi capaz, nestas células, de inibir a ecto-ALP e a internalização da insulina-¹²⁵I. Da mesma forma, o aminoácido L-arginina inibiu a actividade da ecto-ALP e a internalização da insulina-¹²⁵I. Recentemente, foi observado que a repetição de resíduos de arginina na cauda de péptidos facilitava a captação celular [Service 2000]. O mecanismo pelo qual a arginina facilita o transporte dos péptidos é desconhecido. No entanto, tendo em conta o carácter inibitório deste aminoácido sobre a actividade da ecto-ALP e os efeitos inibitórios verificados na captação de insulina (presente estudo) e sobre a captação de taurocolato em hepatócitos de Rato (Martins et al. resultados não publicados), sugere-se que o efeito da arginina sobre sistemas de transporte seja mediado, directa ou indirectamente, pela ALP.

A actividade da ALP encontra-se diminuída na presença de substâncias quelantes de ferro [Naves Diaz et al., 1998]. De acordo com estes autores, nós observámos que o tratamento durante 24 horas com ferro levou a um aumento quer da actividade da ecto-ALP quer da internalização da insulina-¹²⁵I. Ao contrário dos nossos resultados, Ben-Shachar et al. [1988] verificaram que a passagem de insulina para o cérebro estava aumentada em ratos com deficiência em ferro.

Neste estudo, a progesterona e o beta-estradiol, bem como o canferol, um fitoestrogénio, aumentaram a captação de insulina-¹²⁵I e a actividade da ecto-ALP. Foi recentemente descrita para o estrogénio a capacidade de preservar e mesmo melhorar algumas das funções cerebrais, tais como o conhecimento e

a memória [Wickelgren 1997]. Assim, julga-se que esta hormona atenua o declínio intelectual. Os efeitos centrais da insulina não se resumem apenas ao papel no controlo da ingestão alimentar mas também ao seu efeito positivo sobre a memória e o conhecimento [Wickelgren 1998]. Com base nos nossos resultados o papel do estrogénio a nível do SNC, descrito por alguns autores [Wickelgren 1997], poderá, em parte, ser mediado pela facilitação da passagem de insulina para o SNC. Os flavonóides presentes na dieta, principalmente nos frutos, vinho tinto e chá, são reconhecidos como importantes factores anti-oxidantes, desempenhando um papel protector relativamente a doenças cardiovasculares e a carcinomas. Com estes nossos resultados, i. e., a observação de uma facilitação da passagem de insulina para o SNC pelos flavonóides, podemos sugerir um papel benéfico adicional para estes compostos, facilitando a saciedade e diminuindo a taxa de efeitos periféricos da insulina.

Em suma, os nossos resultados mostram que substâncias que aumentam ou diminuem a actividade da ecto-fosfatase presente na membrana luminal das células RBE4 tiveram o mesmo efeito sobre a internalização da insulina. Estes resultados não nos permitem concluir que a alteração da internalização de insulina se deve directamente a uma alteração do estado de fosforilação do receptor. No entanto, permitem-nos concluir inequivocamente que a internalização da insulina é facilitada pelo aumento da actividade da ecto-ALP.

Assim, a fosforilação/desfosforilação de domínios extracelulares de importantes proteínas membranares poderá constituir um atractivo e novo alvo terapêutico. Desta forma, a ALP presente na membrana luminal de células da BHE poderá constituir um potencial alvo terapêutico para algumas patologias cerebrais relacionadas com os níveis de insulina no SNC, como a doença de Alzheimer [Wickelgren 1998] ou alguns tipos de obesidade.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela FCT e Programa Ciência, Tecnologia e Inovação do Quadro Comunitário de Apoio (Projecto POCTI/32550/99). Agradecemos a excelente e dedicada colaboração do Dr. Hélder Pinheiro e Dr. Alejandro Santos, bem como a excelente assistência técnica das Sr.^{as} D.^{as} Luísa Vasques e Manuela Moura.

Referências bibliográficas

- Baskin DG, Figlewicz Lattemann D, Seeley RJ, Woods SC, Porte D Jr, Schwartz MW (1999): Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Res* 848: 114-123.
- Becq F, Fanjul M, Merten M, Figarella C, Hollande E, Gola M (1993): Possible regulation of CFTR-chloride channels by membrane-bound phosphatases in pancreatic duct cells. *FEBS Lett* 327(3):337-342.
- Becq F, Jensen TJ, Chang XB, Savoia A, Rommens JM, Tsui LC, Buchwald M, Riordan JR, Hanrahan JW (1994): Phosphatase inhibitors activate normal and defective CFTR chloride channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(19):9160-9164.
- Ben-Shachar D, Yehuda S, Finberg JP, Spanier I, Youdim MB (1988): Selective alteration in blood-brain barrier and insulin transport in iron-deficient rats. *J Neurochem* 50:1434-1437.
- Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Markus S, Orban PC, Klein R, Krone W, Müller-Wieland D, Kahn CR (2000): Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289:2122-2125.
- Bradbury MWB (1979): The concept of the blood-brain barrier. John Wiley, New York.
- Bradford MM (1976): A rapid method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Calhau C, Hipólito-Reis C, Azevedo I (1999): Alkaline phosphatase and exchange surfaces. *Clin Biochem* 32:153-154.
- Calhau C, Martel F, Hipólito-Reis C, Azevedo I (2000): Effect of P-glycoprotein modulators on alkaline phosphatase activity in cultured rat hepatocytes. *Cell Physiol Biochem* 10: 177-186.
- Calhau C, Martel F, Hipólito-Reis C, Azevedo I (2002): Regulation of intestinal absorption of organic cationic drugs in Caco-2 cells by an ecto-alkaline phosphatase activity. *J Cell Biochem* 87: 408-416.
- Catalan RE, Martínez AM, Aragonés MD, Miguel BG, Robles A (1988): Insulin action on brain microvessels; effect on alkaline phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* 150(2): 583-590.
- Chan JRA, Stinson RA (1986): Dephosphorylation of phosphoproteins of human liver plasma membranes by endogenous and purified liver alkaline phosphatases. *J Biol Chem* 261:7635-7639.
- Cserr HF, Bundgaard M (1984): Blood-brain interfaces in vertebrates: a comparative approach. *Am J Physiol* 246:R277-R288.
- DePierre JW and Karnovsky ML (1974): Ecto-enzymes of the guinea pig polymorphonuclear leucocyte. I. Evidence for an ecto-adenosine monophosphatase-adenosine triphosphatase, and a *p*-nitrophenyl phosphatase. *J Biol Chem* 249:7111-7120.
- Ei Hafny B, Bourre JM, Roux F (1996): Synergistic of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities by retinoic acid and astroglial factors in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *J Cell Physiol* 167:451-460.
- Ei Hafny B, Chappey O, Piciotti M, Debray M, Boval B, Roux F (1997): Modulation of P-glycoprotein activity by glial factors and retinoic acid in an immortalized rat brain microvessel endothelial cell line. *Neurosci Lett* 236: 107-111.
- Fukayama S, Tashjian AHJ (1990): Stimulation by parathyroid hormone of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in osteoblast-like cells: possible involvement of alkaline phosphatase. *Endocrinol* 126:1941-1949.
- Heidenreich KA (1993): Insulin and IGF-I receptor signaling in cultured neurons. *Ann N Y Acad Sci* 692:72-88.
- Hoyer S (1997): Models of Alzheimer disease: cellular and molecular aspects. *J Neural Transm (Suppl)* 49:11-21.
- Huang K-P, Robinson JC, Chou JY (1976): Phosphoprotein phosphatase activity associated with human placental alkaline phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* 70:186-192.
- Jonas EA, Knox RJ, Smith TC, Wayne NL, Connor JA, Kaczmarek LK (1997): Regulation by insulin of a unique neuronal Ca^{2+} pool and of neuropeptide secretion. *Nature* 385(6614):343-346.
- Low MG (1987): Biochemistry of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchors. *Biochem J* 244:1-13.
- Low MG, Finean JB (1977): Release of alkaline phosphatase from membranes by a phosphatidyl inositol-specific phospholipase C. *Biochem J* 167:281-284.
- Maggi D, Andraghetti G, Cordera R (1995): A ser for cys mutation in the extracellular portion of insulin receptor beta subunit impairs the insulin-insulin receptor complex internalization in CHO cells. *Biochem Biophys Res Commun* 210(3):931-937.
- Martel F, Martins MJ, Hipólito-Reis C, Azevedo I: Inward transport of [^3H]-1-phenylpyridinium in rat isolated hepatocytes: putative involvement of a P-glycoprotein transporter. *Br J Pharmacol* 1996;119:1519-1524.
- Martel F, Calhau C, Martins MJ, Azevedo I (1998a): Uptake of ^3H -adrenaline by freshly isolated rat hepatocytes: putative involvement of P-glycoprotein. *J Auton Pharmacol* 18:57-64.
- Martel F, Calhau C, Hipólito-Reis C (1998b): Effect of bile duct obstruction on hepatic uptake of 1-methyl-4-phenylpyridinium in the rat. *Pharmacol Res* 37:497-500.
- Martel F, Keating E, Calhau C, Gründemann D, Schömig E, Azevedo I (2001): Regulation of human extraneuronal monoamine transporter (hEMT) expressed in HEK293 cells by intracellular second messenger systems. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 364:487-495.
- McComb RB, Bowers GN, Posen S (1979): Alkaline phosphatase. New York: Plenum.
- Meyer J, Mischek U, Veyhl M, Henzel K, Galla HJ (1990): Blood-brain barrier characteristic enzymatic properties in cultured brain capillary endothelial cells. *Brain Res* 514(2):305-309.
- Motulsky HJ, Spannard P, Neubig R (1994): Graphpad Prism (version 1.0). San Diego, CA: Graphpad Prism Software.
- Naassila M, Roux F, Beauge F, Daoust M (1996): Ethanol potentiates lipopolysaccharide- or interleukin-1 β -induced nitric oxide generation in RBE 4 cells. *Eur J Pharmacol* 313:273-277.
- Naves Diaz ML, Elorriaga R, Canteros A, Cannata Andia JB (1998): Effect of desferrioxamine and deferiprone (L1) on the proliferation of MG-63 bone cells and on phosphatase alkaline activity. *Nephrol Dial Transplant* 13 Suppl 3:23-28.
- Nobles M, Abbott NJ (1998): Modulation of the effects of extracellular ATP on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in rat brain microvascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 361:119-127.
- Porte D Jr, Seeley RJ, Woods SC, Baskin DG, Figlewicz DP, Schwartz MW (1998): Obesity, diabetes and the central nervous system. *Diabetologia* 41:863-881.
- Redegeld FA, Caldwell CC, Sitkovsky MV (1999): Ecto-protein kinases: ecto-domain phosphorylation as a novel target for pharmacological manipulation? *Trends Pharmacol Sci* 20(11):453-459.
- Regina A, Roux F, Revest PA (1997): Glucose transport in immortalized rat brain capillary endothelial cells in vitro: transport activity and GLUT1 expression. *Biochim Biophys Acta* 1335:135-143.
- Robinson LJ, Leitner W, Draznin B, Heidenreich KA (1994): Evidence that p21ras mediates the neurotrophic effects of insulin and insulin-like growth factor I in chick forebrain neurons. *Endocrinology* 135(6):2568-2573.
- Roux F, Durieu-Trautmann O, Chaverot N, Claire M, Mailly P, Bourre JM, Strosberg AD, Couraud PO (1994): Regulation of γ -glutamyl-transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *J Cell Physiol* 159:101-113.
- Scheibe RJ, Kuehl H, Krautwald S, Meissner JD, Mueller WH (2000): Ecto-alkaline phosphatase activity identified at physiological pH range on intact P19 and HL-60 cells is induced by retinoic acid. *J Cell Physiol* 176:420-436.
- Schwartz MW, Sipols AJ, Marks JL, Sanacora G, White JD, Scheurink A, Kahn SE, Baskin DG, Woods SC, Figlewicz DP, et al. (1992): Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology*, 130(6):3608-3616.
- Seargeant LE, Stinson RA (1979): Inhibition of human alkaline phosphatase by vanadate. *Biochem J* 181:247-250.
- Service R F (2000): Chemical tags speed delivery into cells. *Science* 288:28-29.
- Sundler R, Alberts AW, Vagelos PR (1978): Enzymatic properties of phosphatidylinositol inositolphosphohydrolase from *Bacillus*

- ceruus*. Substrate dilution in detergent-phospholipid micelles and bilayer vesicles. *J Biol Chem* 253:4175-4179.
- Swarup G, Cohen S, Garbers DL (1981): Selective dephosphorylation of proteins containing phosphotyrosine by alkaline phosphatase. *J Biol Chem* 256:8197-8201.
- Yagil C, Ehmann UK, Frank BH, Rabkin R (1988): Insulin binding, internalization, and degradation by a cultured kidney cell line. *Am J Physiol* 254:E601-E608.
- Yoon HK, Baylink DJ, Lau KH (2000): Protein tyrosine kinase inhibitors block the stimulatory actions of phosphotyrosine phosphatase inhibitors to increase cell proliferation, alkaline phosphatase activity, and collagen synthesis in normal human bone cells. *Am J Nephrol* 20(2):153-162.
- Wickelgren I (1998): Tracking insulin to the mind. *Science* 280:517-519.
- Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D Jr (1979): Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 282:503-505.

Efeito genotóxico da exposição prolongada a ruído de baixa frequência e vibração de corpo inteiro*

Maria João Silva¹

Anabela Dias¹

Ana Barreta¹

Paulo Nogueira²

Nuno Castelo Branco³

Maria Guida Boavida¹

RESUMO

Sabe-se, desde há algum tempo, que a exposição crónica a ruído de baixa frequência (RBF) e a vibração de corpo inteiro (VCI) determina alterações de índole fisiológica e psicológica no homem. Contudo, desconheciam-se os seus potenciais efeitos ao nível genético. Em estudos recentes, que se descrevem detalhadamente, demonstrámos, pela primeira vez, que indivíduos de várias profissões ligadas a actividades de aeronáutica com exposição prolongada a RBF e VCI apresentavam níveis de trocas de cromátides irmãos (SCE) nos linfócitos significativamente aumentados em relação aos respectivos controlos.

O objectivo deste trabalho consistiu, por um lado, na avaliação de danos citogenéticos (SCE e anomalias cromossómicas) num grupo profissional ainda não analisado, pilotos de aviação civil, tendo em comum com os anteriores a exposição crónica a RBF e VCI. Por outro lado, investigou-se se ratinhos expostos de forma crónica a estes agentes físicos apresentariam também elevação dos níveis de SCE, tal como observado no homem. Tentou-se ainda discriminar entre os efeitos produzidos apenas pelo RBF isolado e os produzidos por este em combinação com VCI, na indução de SCE.

No que se refere ao estudo dos pilotos, a análise estatística da frequência média de SCE por célula revelou a existência de uma diferença significativa ($p = 0.001$) entre pilotos ($n = 31$) e controlos ($n = 28$), quer para a totalidade dos casos, quer após estratificação em fumadores e não fumadores. Contudo, a comparação da proporção de células com alta frequência de SCE (HFCs) não resultou em diferenças significativas entre o grupo de pilotos e o de controlo, embora se tenha encontrado uma correlação deste parâmetro com os hábitos de tabagismo. Por sua vez, a comparação do total de anomalias de tipo cromatídico e cromossómico entre pilotos e controlos não atingiu significado estatístico. No entanto, observou-se uma tendência ($p = 0.067$) para uma elevação do total de anomalias de tipo cromossómico no grupo dos pilotos não fumadores. Encontrou-se também, no grupo dos pilotos, um aumento não significativo na frequência média de cromossomas dicêntricos, seis vezes superior ao dos controlos, sugerindo um efeito da radiação ionizante. De facto, sabe-se que o nível de anomalias cromossómicas e, em particular de dicêntricos, é um indicador biológico preciso dos níveis de radiação ionizante. Por outro lado, as SCE parecem ser preferencialmente induzidas por outros estímulos físicos como ruído e vibração, sendo as radiações fracas indutoras de SCE. Assim, os resultados sugerem que o aumento dos níveis de SCE observado nos pilotos possa reflectir o efeito da sua exposição prolongada a RBF e VCI, enquanto que a exposição a radiação ionizante possa não ter sido suficiente para induzir efeitos significativos ao nível de anomalias cromossómicas.

No que diz respeito aos resultados da exposição de ratinhos a RBF e VCI, a análise estatística revelou um aumento significativo da frequência de SCE por célula e da proporção de células com alta frequência de SCE em linfócitos de ratinhos submetidos aos dois agentes combinados, comparativamente aos controlos. Por outro lado, não se encontraram diferenças significativas nos níveis de SCE ou de HFCs entre os grupos de animais expostos apenas a RBF isolado e os controlos. Do mesmo modo, observou-se um atraso da cinética do ciclo celular no grupo de exposição a RBF e VCI, mas não no de RBF isolado. Em conclusão, demonstrou-se que a influência da exposição a RBF e VCI, traduzida por uma indução significativa de SCE observada em vários grupos de trabalhadores expostos, é extensiva a roedores expostos em condições experimentais controladas. Para além disso, os resultados indicaram que o agente mais efectivo na indução de SCE nestes animais, não é o estímulo sonoro mas antes a vibração ou a acção conjunta de ambos os agentes.

* Prémio de Investigação sobre Ambiente e Saúde Aloísio Coelho, 2001.

Prémio Ricardo Jorge de Saúde Pública, 2001 (*ex aequo*).

(Prémios Científicos do I Centenário do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge).

¹ Centro de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

² Observatório Nacional de Saúde, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

³ Centro da Performance Humana, Alverca.

ABSTRACT

Chronic exposure to low frequency noise (RBF) and whole-body vibration (VCI) is known to determine physiological and psychological alterations in man. However, their potential effects at the genetic level remained unknown. Recently, we have demonstrated for the first time, that long-term exposure to combined RBF and VCI determines an increase in sister chromatid exchange (SCE) level and in high frequency cells (HFCs) in groups of workers of various professions linked to aeronautical activities.

The objective of the present study was two-fold: to extend our previous study of workers exposed to RBF and VCI to another professional group, civil aviation pilots, and to evaluate whether the cytogenetic damage detected in workers could be observed in mice exposed under controlled experimental conditions. In addition, we aimed to discriminate between the effect of noise alone or combined with VCI on SCE induction.

In the first part of the study, SCEs and chromosomal aberrations were analysed in the lymphocytes of 34 male airline pilots and 28 control individuals. Statistical analysis of the mean SCE count per cell revealed a significant difference between pilots and controls after considering the effect of smoking ($p = 0.001$). However, the proportion of HFCs was not significantly different between pilots and controls in spite of the correlation between this parameter and smoking habits. Comparison of the total chromatid- and chromosome-type aberrations did not show a significant difference between groups. However, a marginally significant increase in chromosome-type aberrations was found in non-smoker pilots relatively to controls ($p = 0.067$). Also, a nonsignificant six-fold increase in the mean frequency of dicentric may suggest an ionizing radiation effect. It is also known that chromosomal aberrations are efficiently induced by ionizing radiation. On the other hand, SCEs are preferentially induced by other stimuli such as RBF and VCI while radiations are generally known as weak inducers. Therefore, it can be hypothesised that the observed SCEs increase in pilots may have resulted from their prolonged exposure to RBF and VCI while exposure to cosmic radiation may not be sufficient to induce detectable levels of chromosomal aberrations.

Regarding experimental exposure of mice to noise and vibration, statistical analysis revealed significant increases in the mean SCE number per cell and in the proportion of cells with a high frequency of SCEs (HFCs) in lymphocytes of mice submitted to RBF and VCI over controls. No significant differences were found between isolated noise-exposed and control mice groups. Likewise, a cell cycle delay was observed exclusively in the RBF and VCI exposure groups. In conclusion, it is demonstrated that the influence of RBF and VCI upon SCE level, previously found in various groups of exposed workers, is extensive to rodents under controlled lifestyle factors and exposure conditions. Besides, the results indicated that the most effective SCE inducer is not RBF alone but VCI *per se* or the cumulative action of both agents.

Prefácio

Desde 1980 que uma equipa portuguesa de médicos de saúde ocupacional tem sido pioneira na investigação de sinais clínicos difusos desenvolvidos em trabalhadores com exposição prolongada a ruído e vibração. Os profissionais em estudo são, na sua maioria, pertencentes a uma indústria de fabricação, manutenção e reparação de aviões da Força Aérea Portuguesa (OGMA, Oficinas Gerais de Material Aeronáutico). Estes indivíduos - operadores de bancos de ensaio e técnicos de "pontos fixos" - encontravam-se expostos desde há pelo menos 10 anos, a ruído de elevada pressão sonora [\geq a 90 dB (A)] e de baixas frequências e a vibração de corpo inteiro de baixa frequência. Incluía ainda um grupo de mandriladores de uma empresa externa às OGMA, expostos a ruído de elevada pressão sonora, mas de elevada frequência, e a vibração segmentar limitada ao eixo mão-braço. O conjunto de alterações observadas ao nível dos sistemas respiratório, cardiovascular, nervoso e gastrointestinal e ainda ao nível psicológico levaram à definição de um síndrome, que posteriormente foi designado por síndrome vibroacústico (VAD, *vibroacoustic syndrome*), (Castelo Branco e Rodriguez, 1999). Aos estudos deste grupo e suas conclusões a revista *Aviation Space and Environmental Medicine* dedicou

recentemente um dos seus números (vol. 70, nº 3, section II, Supplement, 1999).

Na sequência dos resultados dos primeiros trabalhos iniciou-se um projecto que visava, numa primeira fase, a análise de potenciais efeitos genotóxicos da exposição prolongada a ruído de baixa frequência (RBF) e vibração de corpo inteiro (VCI) nos grupos profissionais acima referidos e, bem assim, em pilotos de helicóptero. O estudo consistiu na avaliação dos níveis de trocas de cromatídeos irmãos (SCE) em linfócitos de indivíduos expostos e de controlos. É sabido que a avaliação dos níveis de SCE constitui um bom indicador dos efeitos genotóxicos de agentes químicos e físicos (Tucker e col., 1993). Os resultados indicaram que os grupos de indivíduos expostos apresentavam níveis significativamente aumentados de SCE relativamente aos dos grupos de controlos. Exceptuava-se apenas o grupo de mandriladores mecânicos, cujos níveis não diferiam dos do controlo. Tal como referido, estes apresentavam características de exposição diferentes, isto é, a ruído de elevada amplitude e frequência e a vibração localizada (Silva e col., 1996, 1999). Assim, pela primeira vez ficou demonstrado que a exposição prolongada a RBF e VCI determina efeitos genotóxicos no homem.

Estes resultados levaram ao alargamento do projecto no sentido de ser efectuado um estudo se-

melhante em pilotos de aviões militares *alphajet* que se encontravam igualmente expostos a RBF e VCI e ainda a forças gravitacionais. Os resultados indicaram a existência de uma elevação significativa de SCE no grupo dos pilotos comparativamente ao grupo controlo, corroborando a evidência anteriormente obtida do efeito genotóxico da exposição prolongada aos agentes físicos em causa (Silva e col., 1999).

O projecto que teve por base o estudo que ora se apresenta visou um duplo objectivo primordial que incluiu, por um lado, a verificação da consistência dos resultados obtidos num outro grupo profissional com exposição semelhante em termos de ruído e vibração e, por outro, a utilização de um modelo animal para a pesquisa dos mesmos efeitos. Assim, analisaram-se:

- (i) os níveis de SCE e de anomalias cromossómicas em linfócitos de pilotos de aviação comercial expostos a RBF e VCI e também a radiação ionizante;
- (ii) os níveis de SCE e a cinética do ciclo celular em linfócitos esplénicos de ratinhos submetidos a RBF e VCI, em condições experimentais controladas.

Os resultados indicam que a elevação de SCE, previamente observada noutros grupos de trabalhadores, é aplicável também a este grupo profissional, sugerindo tratar-se de um efeito inerente a toda a exposição prolongada a RBF e VCI. Além disso, a verificação do mesmo fenómeno em linfócitos de animais expostos revela que o efeito observado é extensivo a outras espécies, correspondendo provavelmente a uma resposta celular generalizada a tais estímulos.

Apesar dos mecanismos subjacentes à formação de SCE não serem totalmente compreendidos, os seus níveis correlacionam-se com exposição genotóxica, isto é, um aumento é indicativo de dano genético (Tucker e Preston, 1996). Assim, os resultados aqui apresentados, associados ao facto de a VAD ser uma entidade nosológica com carácter sistémico que poderá afectar uma proporção significativa de trabalhadores, imprimem maior pertinência à observação de Jaron e Lewin de que "a VAD deverá ser considerada uma das doenças ocupacionais que provavelmente permanecerá conosco durante o próximo milénio" (Jaron e Lewin, 1999).

1. Estado actual dos conhecimentos

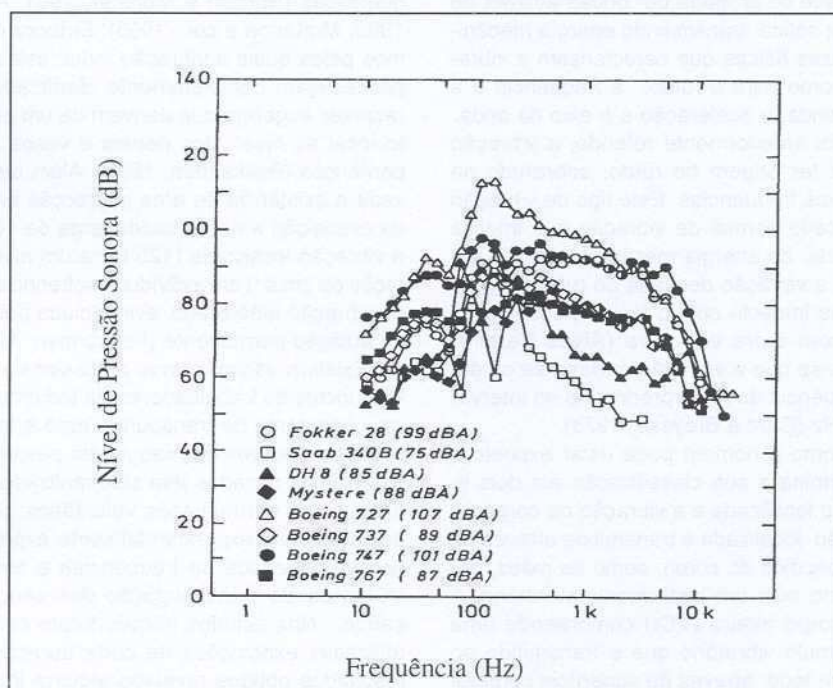
1.1. Caracterização do som e ruído

O som é um fenómeno físico que consiste na compressão e distensão alternada do ar que, a partir de uma fonte, se propaga em todas as direcções. Estas compressões e distensões podem ser descritas como pequenas flutuações da pressão em torno do limite audível (20 μ Pa). O som é caracterizado pela sua amplitude e frequência que, por sua vez, determinam a percepção pelo ouvido humano.

O número de variações de pressão por segundo é denominado frequência do som e é medido em Hertz (Hz). Considera-se que o intervalo de sons audíveis para o homem se situa entre 20-20000 Hz para indivíduos jovens, decrescendo com a idade. Os sons com frequência superior a 20 KHz, não audíveis pelo ouvido humano, são designados por ultrasons, enquanto que aqueles que possuem frequência inferior a 20 Hz são genericamente denominados infrasons. Os limites mínimo e máximo do som de baixa frequência foram arbitrariamente estabelecidos, podendo ser, respectivamente, 20 Hz e 250 Hz ou 500 Hz (Berglund e col., 1996). No entanto a maioria dos sons, incluindo o ruído industrial, consiste num vasto espectro de frequências, denominados ruídos de banda larga. Se o ruído apresenta frequências igualmente distribuídas no intervalo audível é designado por ruído branco. A segunda grandeza física que caracteriza o som é a amplitude das flutuações de pressão e é expressa em decibel (dB). Em termos de nível de pressão sonora, os sons audíveis variam entre o limite do audível, isto é, 0 dB e o limiar da dor que corresponde a 130 dB.

O termo "ruído" representa sons produzidos por fontes ambientais cuja percepção é apreciada como negativa, isto é, representa sons desagradáveis (Passchier-Vermeer e Passchier, 2000). O ruído de baixa frequência (RBF) pode definir-se como o som cujas componentes principais se situam dentro do intervalo de baixas frequências (inferior a 250 ou 500 Hz). Grande parte, embora não toda a energia deste tipo de ruído fica situada abaixo do limite do audível. O RBF (incluindo infrasons) faz parte do ruído residencial comum e, ainda com maior relevância, do ruído ocupacional em muitos locais de trabalho. A maquinaria utilizada em muita da chamada Indústria pesada, utilizando turbinas de ar comprimido, produz uma quantidade apreciável de RBF (figura 1). O ruído do motor de aviões, uma das principais fontes de ruído comunitário e de ruído ocupacional na indústria aeronáutica, contém quantidades signi-

FIGURA 2
EXPOSIÇÃO A RUÍDO EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA PARA VÁRIOS TIPOS DE AVIÕES (REGISTADOS NO EXTERIOR DO APARELHO; ADAPTADO DE BERGLUND E HASSMÉN, 1996)



entanto, apesar da influência do RBF na capacidade auditiva ter sido pouco estudada, sabe-se que este pode também afectar a audição e/ou agravar os efeitos do ruído de alta frequência (Berglund e col., 1996).

Segundo o Manual técnico da OSHA (Occupational Safety and Health Administration, 1996), "para além dos efeitos na audição, o ruído interfere com o discurso, causa uma reacção de stress, interfere com o sono, baixa a moral, reduz a eficiência, causa contrariedade, interfere com a concentração e causa fadiga".

Na realidade, o ruído actua também como um agente de stress psicogénico, capaz de causar sensações de contrariedade, alterações do sono e diminuição da capacidade de concentração e de desempenho quer no homem quer em animais (Passchier-Vermeer e Passchier, 2000; Berglund e col., 1996; Akerlund e col., 1990; Fidell e col., 1995; Gomes e col., 1999). Entre os efeitos nocivos do ruído associados ao stress induzido, têm sido descritas em diversos estudos, de carácter epidemiológico ou experimental, perturbações várias dos sis-

temas neuroendócrino, cardiovascular e imunitário (Passchier-Vermeer e Passchier, 2000; Berglund e col., 1996; Nakamura e col., 1992; Soldani e col., 1997; Sobrian e col., 1997; de Wazière e col., 1998), bem como alterações do metabolismo, dos mecanismos de defesa anti-oxidativa, do estado de peroxidação lipídica e do estado nutricional (Van Raaij e Oortinsen, 1995). Em particular, ao nível cardiovascular, a análise dos resultados de vários estudos epidemiológicos revelou que a exposição a ruído com valor superior a 70 dB (A) aumenta o risco de doença isquémica cardíaca. Foi também encontrada uma correlação entre a exposição ocupacional a ruído, com valor de $L_{Aeq,8h}$ igual ou superior a 85 dB (A) e um risco acrescido de hipertensão (Passchier-Vermeer e Passchier, 2000; Zhao e col., 1991). Do mesmo modo, em indivíduos residentes numa zona de elevada exposição a ruído de aviões foi detectada uma maior frequência de hipertensão, de utilização de medicação anti-hipertensiva e de aparecimento de doença cardiovascular do que em residentes de outra zona sem este tipo de exposição (Knipschild, 1980).

1.3. Caracterização da vibração

A vibração é um factor físico com origem numa fonte oscilatória que se propaga por ondas através de uma superfície sólida, transmitindo energia mecânica. As grandezas físicas que caracterizam a vibração são, tal como para o ruído, a frequência e a amplitude e, ainda, a aceleração e o eixo da onda.

Como já foi anteriormente referido, a vibração pode também ter origem no ruído, sobretudo na gama das baixas frequências. Este tipo de vibração difere do conceito normal de vibração que implica uma transmissão de energia mecânica sólida a sólido. De facto, a vibração derivada do ruído origina-se no ar até ao impacto com o tecido viscoelástico humano ou com outra estrutura (Alves Pereira, 1999). Verifica-se que a vibração máxima se obtém quando a frequência do ruído predomina no intervalo de 63-125 Hz (Cant e Breyse, 1973).

A forma como o homem pode estar exposto a vibração determina a sua classificação em dois tipos, a vibração localizada e a vibração de corpo inteiro. A vibração localizada é transmitida através de uma parte específica do corpo, como as mãos, em contacto directo com um instrumento vibratório. A vibração de corpo inteiro (VCI) compreende uma forma de estímulo vibratório que é transmitido ao corpo como um todo, através da superfície corporal de sustentação, quer se trate da posição sentada ou erecta.

1.4. Exposição a vibração e efeitos na saúde humana

O "stresse vibratório" é definido como o ambiente vibratório de natureza física que exteriormente afecta o homem. Por sua vez, o termo "esforço vibratório" tem sido utilizado para descrever todas as reacções do homem de natureza fisiológica, psicológica e patológica em resposta ao stresse vibratório.

O ser humano é sensível a vibração com frequências entre 0,5 Hz e, pelo menos, 100 KHz, embora a exposição no intervalo de 0,5 a 200 Hz cause os problemas de saúde mais graves. Para além disso, a estimulação física vibratória incrementa também a percepção do ruído, tornando-o mais incomodativo (Berglund e col., 1996).

Reconhece-se que a exposição ocupacional a vibração localizada, em trabalhadores que operam ferramentas manuais vibratórias como, por exemplo, martelos pneumáticos e serras eléctricas, determina o desenvolvimento de uma patologia complexa, denominada "dedo branco" ou, síndrome de vibra-

ção mão-braço (*hand-arm vibration syndrome*). Este caracteriza-se pelo envolvimento de componentes vasculares, sensoriais, neurológicas e musculoesqueléticas (Burdorf e Monster, 1991; Araki e col., 1993; McKenna e col., 1993). Embora os mecanismos pelos quais a vibração induz estas alterações não estejam completamente clarificados, estudos recentes sugerem que derivam de um primeiro efeito local ao nível dos nervos e vasos sanguíneos periféricos (Pekkarinen, 1995). Além disso, foi provada a existência de uma interacção entre o efeito da exposição a ruído [banda larga de 100 dB (A)] e a vibração localizada (125 Hz a um nível de aceleração de 2m.s^{-2}) em indivíduos sofrendo de síndrome de vibração mão-braço, evidenciada por uma perda de audição permanente (Pekkarinen, 1995).

Existem vários grupos profissionais expostos a VCI, incluindo trabalhadores da indústria aeronáutica, condutores de transportes rodó e ferroviários e ainda operadores de maquinaria pesada. Ao longo das últimas décadas têm sido realizados vários estudos, quer em humanos voluntários quer em modelos animais experimentalmente expostos a uma grande variedade de frequências e amplitudes de VCI, visando a investigação dos seus efeitos na saúde. Nos estudos iniciais foram correntemente utilizadas exposições de curta duração, tendo os resultados obtidos revelado alguma inconsistência (revisto em Helmkamp e col., 1984). Contudo, foi posteriormente confirmado que a exposição profissional de longa duração a VCI se encontra associada a um risco acrescido de dor lombar e ciática, assim como de alterações degenerativas no sistema vertebral (Bovenzi e Hulshof, 1999; Hoogendoorn e col., 1999).

Para além desses efeitos, sabe-se que a VCI, tal como o ruído, é também um factor de stresse generalizado, activando várias vias de resposta com consequências a níveis mais sistémicos (Nakamura e col., 1990). Assim, a exposição a VCI tem sido associada ao desenvolvimento de patologias dos sistemas neuroendócrino e imunitário e ainda a alterações das funções digestiva e circulatória (Pekkarinen, 1995; Nakamura e col., 1991; Lundström e col., 1990; Seidel, 1988, 1993). O seu efeito ao nível auditivo assemelha-se ao produzido pelo RBF, presumindo-se que cause alterações do fluxo sanguíneo do ouvido interno, que resultam numa perda de audição (Pekkarinen, 1995). Em trabalhadores expostos a VCI são frequentemente diagnosticadas lesões da mucosa gástrica que poderão ter origem num estímulo vibratório directo ou serem mediadas por factores ligados ao stresse. Com vista ao esclarecimento da patogénese destas lesões,

Nakamura e col. (1992) determinaram os níveis de diversos parâmetros bioquímicos e hormonais em roedores expostos a VCI (frequência = 10 Hz). Os resultados sugeriram que a ulceração observada nos ratinhos é causada, primariamente, por uma acção mecânica directa e específica no estômago e não por efeitos ligados ao stresse.

No ambiente laboral, os trabalhadores encontram-se em geral expostos a uma combinação de VCI e ruído, predominantemente de baixa frequência, cujos efeitos parecem ser mais pronunciados aos níveis sensorial, neuroendócrino e cardiovascular do que os efeitos da exposição única a RBF ou a VCI (Pekkarinen, 1995; Nakamura, 1991, Lundstrom, 1990; Seidel, 1988). Mais recentemente, e em particular devido à contribuição de investigadores portugueses, caracterizou-se um síndrome de índole sistémica denominado doença vibroacústica (VAD, *vibroacoustic disease*). Esta foi definida como uma doença ocupacional ocorrendo em trabalhadores com exposição prolongada (≥ 10 anos) a ruído de elevada amplitude (≥ 90 dB SPL) e de baixa frequência (≤ 500 Hz) (Castelo Branco e Rodriguez, 1999). Caracteriza-se pelo desenvolvimento de alterações morfológicas e funcionais envolvendo vários órgãos e sistemas, nomeadamente, cardiovascular, neurológico, respiratório e gastrointestinal e ainda pela alteração de aspectos psicocomportamentais (Castelo Branco, 1999). Ao nível neurológico, demonstrou-se a existência de alterações cognitivas - através de exames psicológicos e neurofisiológicos (potenciais evocados, ERP P300) - vertigo, alterações auditivas, epilepsia e doenças cerebrovasculares (Martinho Pimenta e Castelo Branco, 1999). Ao nível celular, observou-se uma proliferação anormal da matriz extracelular do tecido conectivo, sobretudo ao nível cardíaco, causando espessamento do pericárdio, das estruturas valvulares e do endocárdio (Marciniak e col., 1999). A mesma equipa conseguiu ainda reproduzir e confirmar alguns dos efeitos observados em humanos, nomeadamente ao nível do tracto respiratório, num modelo animal (Grandé e col., 1999).

1.5. Agentes físicos e seus efeitos genotóxicos

Tem sido amplamente demonstrado que alguns agentes físicos, para além de muitos compostos químicos, apresentam actividade genotóxica.

A radiação ionizante é reconhecidamente um agente lesivo do DNA, por via directa e indirecta, através da formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS), e é também indutora de anomalias

cromossómicas (Lloyd e col., 1986), de micronúcleos (Silva e col., 1994) e, embora em menor extensão, de SCEs (Littlefield e col., 1979). A radiação ultravioleta manifesta actividade mutagénica (Witkin, 1989) induzindo a formação de aductos de DNA, nomeadamente ciclobutadipirimidinas e fotoaductos de pirimidina (6-4) pirimidona (Mitchel e Nairn, 1989; Cadet, 1994) e "cross-links" DNA-proteína (Shetlar, 1980). Induz ainda, de uma forma eficiente, aberrações cromossómicas e SCEs (Kato, 1973; Wolff e col., 1974).

No que diz respeito a outros agentes físicos já estudados, os resultados da avaliação dos efeitos genotóxicos têm sido frequentemente discordantes. Assim, por exemplo, em relação aos efeitos genéticos causados por exposição ocupacional a campos eléctricos e magnéticos, existem dados positivos de indução de aberrações cromossómicas em linfócitos de trabalhadores que operam em centrais eléctricas (Nordenson e col., 1984, 1988) e com cabos de alta tensão (Skyberg e col., 1993). No entanto, noutro estudo em que se analisaram aberrações cromossómicas em linfócitos de indivíduos trabalhando num ambiente semelhante, estes resultados não foram confirmados (Bauchinger e col., 1981). Por sua vez, estudos dos potenciais efeitos mutagénicos de campos electromagnéticos em ratinhos (Benz e Carsten, 1986) e ratos (Zwingleberg e col., 1993) evidenciaram resultados negativos. Na maioria dos estudos experimentais *in vitro* utilizando vários sistemas celulares, foram reportados também resultados negativos quer para a análise de aberrações cromossómicas quer para a de SCE (Cohen e col., 1986a,b; Livingston e col., 1991). Porém, demonstrou-se a existência de uma indução significativa de SCE em células de ratinhos expostas a campos magnéticos de elevada densidade e frequência extremamente baixa (Yaguchi, 1999). Em linfócitos humanos expostos a campos electromagnéticos alternados foi detectado um aumento de aberrações cromossómicas e de SCEs (Khalil e Qassem, 1991).

No que se refere aos ultrasons, foi observado um aumento de SCE em linfócitos humanos após tratamentos *in vitro* e *in vivo* com doses terapêuticas. (Stella e col., 1984). Contudo, vários estudos têm apresentado resultados contraditórios. Em estudos de exposição de humanos e de ratinhos às mesmas doses de ultrasons, não foi encontrada qualquer indução de SCE (Au e col., 1982; Lundberg e col., 1982; Stella e col., 1984) enquanto que em trabalhos *in vitro* foram obtidos quer resultados negativos (Miller e col., 1983) quer positivos (Haupt e col., 1981). Em relação às microondas, tem-se atribuído actividade clastogénica em células humanas (Maes

e col., 1993) e em outros sistemas celulares *in vitro* (Garaj-Vhrovac e col., 1991) bem como actividade mutagénica em células de ratinhos expostos (Sarkar e col., 1994).

Outro agente físico cujos efeitos aos níveis celular e genético têm suscitado, recentemente, grande interesse é a gravidade. Tem sido descrito que variações da força gravitacional produzem alterações específicas na expressão, avaliada ao nível do mRNA, de protooncogenes relacionados com a proliferação celular. De facto, em condições de hipergravidade observou-se uma sobreexpressão dos genes *c-fos*, *egr-1* (Nose e col., 1994) e *c-myc* (Kumei, 1989) em culturas celulares. Foram também reportadas alterações semelhantes associadas a microgravidade, quer em linhas celulares, quer em animais expostos (Backup, 1994). Noutra estudo, foi demonstrado que alterações prolongadas de gravidade, quer hipo quer hipergravidade, potenciam a instabilidade de microsátélites existente numa linha celular deficiente num sistema de reparação de erros de emparelhamento do DNA, HCT-116 (Han e col., 1999).

Em contraste com a variedade de dados existentes relativamente aos agentes físicos acima descritos, os potenciais efeitos genéticos do ruído, vibração ou da associação de ambos, têm sido alvo de escassa investigação.

No entanto, foi descrito que a exposição prolongada a ruído branco, compreendendo frequências igualmente distribuídas ao longo do intervalo audível, causa um aumento de SCE e de aberrações cromossómicas estruturais em ratinhos (Fischman e Kelly, 1999). No que se refere a estudos sobre efeitos genotóxicos da vibração, Khalil e Qassem (1996) utilizando a análise de SCE e a estimativa dos índices proliferativo e mitótico, não conseguiram demonstrar qualquer efeito, quer genotóxico quer citotóxico, da exposição de linfócitos humanos a vibração de baixa frequência, durante um curto intervalo de tempo (10 Hz, 20 minutos).

Se bem que existam alguns estudos sobre efeitos genotóxicos do ruído e da vibração *per se* que se saiba, nunca foram avaliados os efeitos combinados destes dois agentes. Este grupo tem-se dedicado ao longo dos últimos anos à investigação desta problemática. Numa primeira fase, avaliaram-se as SCE em vários grupos profissionais expostos a ruído e vibração. No presente trabalho, pesquisou-se a existência dos mesmos efeitos quer em pilotos de aviação comercial, quer em animais em condições experimentais controladas.

2. Estudos prévios

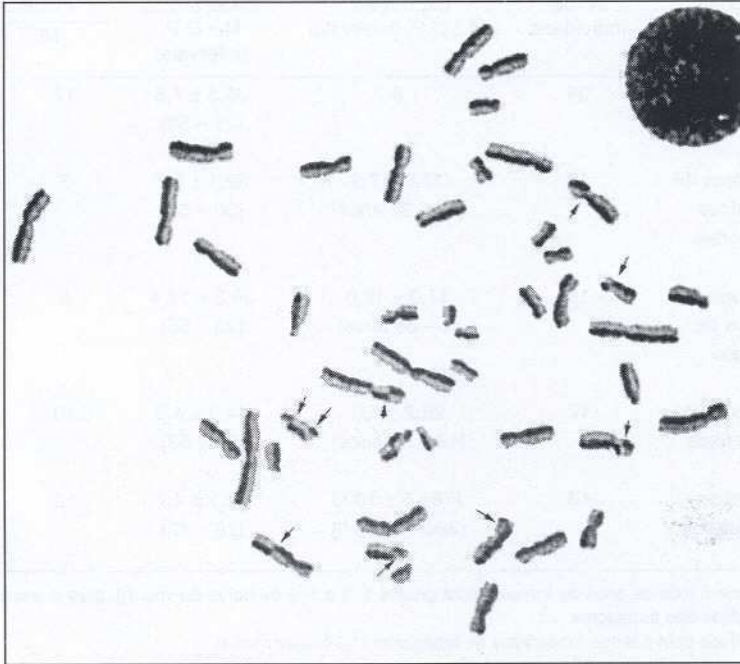
2.1. Análise de trocas de cromátídeos irmãos em vários grupos profissionais expostos a ruído e vibração

Este estudo teve como objectivo a avaliação de potenciais efeitos genotóxicos da exposição ocupacional prolongada a ruído e vibração de corpo inteiro. Assim, analisaram-se as trocas de cromátídeos irmãos em linfócitos do sangue periférico de indivíduos pertencentes a três grupos profissionais com exposição crónica a RBF, em combinação com VCI (figura 3). Foi ainda incluído um outro grupo exposto a ruído de amplitude comparável, mas predominantemente de alta frequência, e a vibração localizada transmitida através do eixo mão-braço. Como controlo seleccionaram-se indivíduos sem exposição conhecida a estes estímulos físicos.

O grupo de indivíduos estudados, incluiu 50 trabalhadores do sexo masculino, na sua maioria pertencentes a uma base da Força Aérea Portuguesa, ocupacionalmente expostos a ruído e vibração (quadro 1). O grupo 1 consistiu em trabalhadores que operam ferramentas vibratórias – máquinas de rebitagem e martelos pneumáticos. Estes indivíduos encontravam-se predominantemente expostos a vibração localizada no eixo mão-braço e a ruído com prevalência de altos níveis de pressão sonora e de frequência. Os grupos 2, 3 e 4 incluíram, respectivamente, operadores de bancos de ensaio que efectuavam testes aos motores dos aviões militares em reparação (grupo 2), indivíduos que faziam "pontos fixos", ou seja trabalhavam dentro da cabine do avião com os motores em funcionamento (grupo 3) e pilotos de helicóptero (grupo 4). Os profissionais destes grupos encontravam-se expostos a ruído de banda larga com predominância de elevados níveis de pressão e de baixas frequências. Para o grupo de controlo seleccionaram-se 34 indivíduos do sexo masculino, incluindo pessoal administrativo e militares da mesma base aérea, sem exposição conhecida a ruído e vibração. O quadro 1 resume as características dos grupos expostos a ruído e vibração e do grupo de controlo, no que diz respeito a idade, hábitos de tabagismo e duração da exposição, expressa como o número total de anos de trabalho para os grupos 1, 2 e 3 e como o número total de horas de voo para o grupo 4. Todos os trabalhadores estavam ao activo no momento da colheita de sangue para realização deste estudo.

Após cultura de uma amostra de sangue periférico para obtenção de preparações de metafases e coloração diferencial com vista à diferenciação dos

FIGURA 3
 METAFASE DE LINFÓCITOS HUMANOS CORADOS PELO MÉTODO DE FPG PARA VISUALIZAÇÃO DE SCE (→)



dois cromatídeos irmãos (Perry e Wolf, 1974), foram analisadas, microscopicamente, 50 metafases por cada indivíduo. Os dados foram também analisados em termos da proporção de células com um número de SCE igual ou superior ao 95º percentil do controlo (Bender e col., 1992), ou seja, de células com alta frequência de SCEs (HFCs). Com base nos dados dos controlos analisados, neste estudo as HFCs foram definidas como aquelas que apresentavam um número de SCE igual ou superior a 15.

Os resultados da frequência média de SCE por célula (figura 3), bem como da proporção de HFCs, obtidos para os vários grupos analisados de acordo com os hábitos de tabagismo, encontram-se resumidos no quadro 2. A relação entre a variável dependente (valor médio de SCE por célula) e as variáveis independentes (grupo de exposição, duração da exposição, idade e tabagismo) foi explorada por uma análise de regressão múltipla. Desta análise, resultou que apenas o consumo de tabaco e a exposição originaram um resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Verificou-se ainda que a inclusão de todos os casos na análise determinou que a(s) diferença(s) entre: (1) grupo 1 e grupo 0 não

era significativa; (2) grupo 2 e grupo 0, grupo 3 e grupo 0 e grupo 4 e grupo 0 eram altamente significativas ($p < 0,001$); (3) grupo 2 e grupo 3 não era significativa; ($p > 0,05$); (4) grupos 2 e 3 combinados e grupo 0 era altamente significativa ($p < 0,0001$); (5) grupos 2 e 3 combinados e grupo 4 não era significativa ($p > 0,05$); (6) grupos 2, 3 e 4 combinados e grupo 0 era altamente significativa ($p < 0,0001$). Verificou-se também que quando se confinava a análise apenas a não fumadores, a todos os fumadores ou a fumadores moderados (1-20 cigarros por dia), as magnitudes destas diferenças eram consistentes embora o facto de se efectuar a análise estatística com números mais reduzidos de indivíduos transformasse, por vezes, algumas das comparações previamente significativas em não significativas.

As rectas de regressão obtidas para os vários grupos estudados foram expressas do seguinte modo:

Controlo: Média SCE/célula = $6,87 + 0,082 \times n^\circ$ cigarros/dia

Grupo 1: Média SCE/célula = $7,25 + 0,082 \times n^\circ$ cigarros/dia

QUADRO 1
DESCRIÇÃO DOS GRUPOS PROFISSIONAIS ESTUDADOS

Grupo	Categoria profissional	Nº de indivíduos	Exposição ^a M ± D.P. (intervalo)	Idade (anos) M ± D.P. (intervalo)	Hábitos de tabagismo		
					NF ^b	FM ^c	F ^d
0	Administrativos/ militares	34	0	36,3 ± 7,8 (21 - 56)	17	11	6
1	Operadores de máquinas vibratórias	10	17,0 ± 7,9 (10 - 31 anos)	39,1 ± 5,7 (30 - 51)	7	3	0
2	Operadores de bancos de ensaio	15	17,0 ± 12,0 (1 - 36 anos)	38,3 ± 12,4 (20 - 55)	6	8	1
3	Operadores de pontos fixos	12	25,2 ± 6,9 (10 - 33 anos)	44,3 ± 4,9 (37 - 53)	10	2	0
4	Pilotos de helicóptero	13	1765,5 ± 1003 (294 - 3985 h)	32,1 ± 4,7 (28 - 42)	12	1	0

^a Expresso como o número total de anos de trabalho para grupos 1, 2 e 3 e de horas de voo (h), para o grupo 4

^b NF, número de indivíduos não fumadores

^c FM, número de indivíduos com hábitos moderados de tabagismo (1-20 cigarros/dia)

^d F, número de indivíduos fumadores (> 20 cigarros/dia)

Grupos 2 + 3 + 4: Média SCE/célula = 8,74 + 0,082 x nº cigarros/dia

Dado que o tabagismo revelou ser uma variável independente de grande influência na frequência de SCE, as diferenças entre os vários grupos de exposição foram postas em evidência pelo ajuste dos resultados ao efeito do tabagismo. No entanto, as conclusões relativas às diferenças entre os grupos foram essencialmente semelhantes quando estes se subdividiram em fumadores e não fumadores. Estimou-se que, no conjunto de todos os fumadores analisados, o consumo do tabaco aumenta o valor médio de SCE por célula em 0,082 por cigarro por dia. Este factor tem um valor superior ao encontrado por outros autores, nomeadamente 0,054 (Carrano, 1982), 0,076 (Husum e col., 1982) e 0,045 (Yager e col., 1993). No entanto, considerando apenas os fumadores do grupo de controlo, o valor obtido foi de 0,075 ± 0,016 por cigarro por dia. Por outro lado, o facto de no grupo de controlo se ter observado uma diferença altamente significativa entre fumadores e não fumadores ($p < 0,001$) constituiu um bom controlo da qualidade do estudo e da sensibili-

dade do método para detecção de efeitos genotóxicos.

Em condições de exposição crónica a um dado agente, tem sido observado que o aumento da frequência de SCE resulta da presença de subpopulações linfocitárias apresentando níveis de SCE muito elevados (HFCs). A análise dos resultados deste estudo, em termos de proporção de HFCs, produziu resultados consistentes com os anteriores (quadro 2). Assim, por exemplo, observou-se um aumento significativo da proporção de HFCs nos grupos 2, 3 e 4 combinados, comparativamente ao grupo 0 (8,6 % vs. 5,1 %; $\chi^2 = 16,6$; 1 grau de liberdade, $p < 0,0001$). A diferença tornou-se ainda mais significativa após subdivisão dos grupos em não fumadores, fumadores moderados e fumadores de mais de 20 cigarros por dia (estatística de Mantel-Haenszel = 6,42, $p \approx 10^{-9}$).

Em síntese, a análise estatística dos resultados mostrou a existência de um aumento significativo da frequência média de SCE por célula nos grupos de trabalhadores com exposição crónica a ruído de baixa frequência e vibração de corpo inteiro - operadores de bancos de ensaio, "pontos fixos" e pilotos

QUADRO 2

VALORES MÉDIOS DOS NÍVEIS DE SCE^a (MÉDIA ± DP) E DA PROPORÇÃO DE HFCs^b NOS VÁRIOS GRUPOS PROFISSIONAIS EXPOSTOS A RUÍDO E VIBRAÇÃO E NO GRUPO DE CONTROLO, CONSIDERANDO OS HÁBITOS DE TABAGISMO

Grupos de exposição	Número de indivíduos	SCEs/célula (Média ± D.P.)	HFCs (%)
<i>Grupo 0</i>			
Total de indivíduos	34	7,92 ± 1,76	85 / 1667 (5,1 %)
Não Fumadores	17	6,90 ± 1,25	14 / 827 (1,7 %)
Fumadores	17	8,94 ± 1,61	71 / 840 (8,0 %)
<i>Grupo 1</i>			
Total de indivíduos	10	7,66 ± 1,22	14 / 500 (2,8 %)
Não Fumadores	7	7,00 ± 0,45	4 / 350 (1,1 %)
Fumadores	3	9,21 ± 0,98	10 / 150 (6,7 %)
<i>Grupo 2</i>			
Total de indivíduos	15	9,33 ± 1,77	70 / 750 (9,3 %)
Não Fumadores	6	7,83 ± 1,51	9 / 300 (3,0 %)
Fumadores	9	10,32 ± 1,11	61 / 450 (14,0 %)
<i>Grupo 3</i>			
Total de indivíduos	12	8,62 ± 1,18	36 / 600 (6,0 %)
Não Fumadores	10	8,34 ± 0,78	21 / 500 (4,2 %)
Fumadores	2	10,01 ± 2,31	15 / 100 (15 %)
<i>Grupo 4</i>			
Total de indivíduos	13	9,38 ± 1,31	66 / 650 (10,2 %)
Não Fumadores	12	9,29 ± 1,33	6 / 600 (10,0 %)
Fumadores	1	10,46	6 / 50 (12,0 %)
<i>Grupos 2 + 3 + 4</i>			
Total de indivíduos	40	9,13 ± 1,45	172 / 2000 (8,6 %)
Não Fumadores	28	8,64 ± 1,31	90 / 1400 (6,4 %)
Fumadores	12	10,28 ± 1,18	82 / 600 (14,0 %)

^a 50 metafases analisadas por indivíduo

^b Definidas como células com 15 ou mais SCEs

de helicóptero - relativamente ao grupo de controlo. A comparação estatística entre estes três grupos de exposição revelou não existirem diferenças entre eles ou existirem apenas diferenças marginalmente significativas. Por outro lado, não foi encontrada uma diferença significativa entre o grupo de operadores de máquinas vibratórias e o grupo de controlo. Uma possível explicação para este resultado discrepante

pode basear-se nas diferenças de frequência do ruído e vibração a que estes indivíduos se encontram expostos, bem como numa diferente percepção da vibração localizada. Assim, os resultados deste trabalho revelaram, pela primeira vez, que a exposição crónica a ruído de baixa frequência e a vibração de corpo inteiro pode causar efeitos genotóxicos no Homem.

2.2. Análise de trocas de cromátídeos irmãos em pilotos de aviões militares *alphajet*

No estudo anterior, de entre os grupos profissionais expostos a RBF e VCI, os pilotos de helicóptero apresentavam o valor médio de SCE e de HFCs mais elevado. Estes resultados determinaram o estudo de um outro grupo de pilotos, mas de aviões militares *alphajet*, que se encontram igualmente expostos a ruído, vibração de corpo inteiro e, além disso, a forças gravitacionais.

O grupo estudado consistiu em 9 pilotos de aviões militares *alphajet*, todos do sexo masculino, com uma idade média de 32,7 anos (D.P. = 3,0), sendo 5 fumadores e os restantes não fumadores. Estes indivíduos encontravam-se expostos a ruído de banda larga com predomínio de frequências inferiores a 500 Hz e de elevado nível de pressão sonora (Bento-Coelho e col., 1999). A exposição incluía ainda vibração de corpo inteiro e forças gravitacionais (forças g) geradas pelas variações bruscas de direcção durante as manobras aéreas. A duração da exposição por piloto variava entre 1100 e 3000 horas de voo (média \pm DP = 2050 \pm 621 h). Para grupo de controlo seleccionaram-se 10 trabalhadores administrativos da mesma Base Aérea, todos do sexo masculino, com uma idade média de 30,6 anos (D.P. = 9,2), incluindo 3 fumadores e 7 não fumadores.

Após obtenção de preparações de metafases a partir de sangue periférico de acordo com o método

anteriormente referido, analisaram-se 50 metafases no 2º ciclo de divisão celular por indivíduo, calculando-se o valor médio de SCE por célula. Os dados foram igualmente analisados em termos de HFCs, que neste estudo se definiram como as células com frequência de SCE igual ou superior a 12 SCE, com base no 95º percentil dos valores do controlo (Bender, 1992). Utilizou-se, para a análise estatística de HFCs, o teste do qui-quadrado e a estatística de Mantel-Haenszel (MH).

Os resultados da frequência média de SCE por célula e de HFCs para os grupos em estudo, considerando os hábitos de tabagismo, estão sintetizados no quadro 3. A análise estatística dos resultados (análise de variâncias) mostrou que a frequência média de SCE por célula se encontrava significativamente aumentada no grupo dos pilotos em comparação ao de controlo, após ajustamento para os efeitos do tabagismo ($p = 0,04$). De facto, o valor médio de SCE/célula dos pilotos excedia o dos controlos em 1,04 (DP = 0,45; $t_{16} = 2,29$; $p = 0,04$), sendo que a diferença não ajustada para os efeitos do tabagismo era ligeiramente superior (1,25; DP = 0,47), possivelmente devido à maior proporção de fumadores entre os pilotos. A análise estatística da proporção de HFCs, usando quer o teste convencional do qui-quadrado (não ajustado para o tabagismo) quer o teste de MH (após estratificação em fumadores e não fumadores) mostrou uma diferença altamente significativa entre o grupo dos pilotos e o

QUADRO 3

VALOR MÉDIO DOS NÍVEIS DE SCE^a (MÉDIA \pm DP) E PROPORÇÃO DE HFCS^b NO GRUPO DOS PILOTOS E NO DE CONTROLO, CONSIDERANDO OS HÁBITOS DE TABAGISMO

Grupos de exposição	Número de indivíduos	SCEs/célula (Média \pm D.P.)	HFCs (%)
<i>Controlo</i>			
Total de indivíduos	10	6,64 \pm 1,16	35 / 500 (6,6 %)
Não Fumadores	7	6,37 \pm 0,98	13 / 350 (3,7 %)
Fumadores	3	7,29 \pm 1,52	20 / 150 (13,3 %)
<i>Pilotos</i>			
Total de indivíduos	9	7,89 \pm 0,84	59 / 450 (13,1 %)
Não Fumadores	4	7,48 \pm 0,74	21 / 200 (10,5 %)
Fumadores	5	8,22 \pm 0,84	38 / 250 (15,2 %)

^a 50 metafases analisadas por indivíduo

^b Definidas como células com 12 ou mais SCEs

de controlo ($\chi^2 = 10,75$, 1 g.l.; $p = 0,001$; estatística de MH = 2,27, $p = 0,012$).

Embora se tenha analisado um pequeno número de indivíduos, os resultados da análise estatística, revelando a existência de uma elevação significativa da frequência média de SCE por célula e de HFCs no grupo dos pilotos corroboraram os resultados anteriormente obtidos. Contudo, os pilotos de *alphajet*, além da exposição a RBF e a VCI, encontram-se também submetidos a forças g. Vários estudos têm descrito alterações nos níveis de mRNA de protooncogenes, como *c-fos*, *egr-1* (Nose e col., 1994) e *c-myc* (Kumei e col., 1989) em células em cultura após exposição a condições de hipergravidade. Resultados semelhantes foram também obtidos em culturas celulares e em animais submetidos a microgravidade (Backup e col., 1994). Contudo, é de salientar que a exposição de osteoblastos a uma condição de vibração vigorosa, simulando a que ocorre durante o lançamento de um veículo espacial, induz uma sobreexpressão de *c-fos* e *c-myc* muito superior à obtida em condições de alteração da força gravitacional (Trandjwinata e col., 1997). De facto, também no trabalho anterior se verificou um aumento de SCE em trabalhadores com exposição a RBF e VCI, mas sem exposição a forças g, o que parece sugerir que estas não estarão implicadas na indução de SCEs observada nos pilotos presentemente em análise. Assim, e em conclusão, a exposição a RBF e a VCI parece ser a causa comum para a elevação de SCE nos diversos grupos profissionais estudados.

3. Efeito genotóxico da exposição prolongada a ruído de baixa frequência e vibração de corpo inteiro

3.1 Análise de trocas de cromátides irmãos e de aberrações cromossómicas em pilotos de aviação civil

3.1.1. Introdução e objectivos

A tripulação de aviões comerciais encontra-se exposta a uma diversidade de agentes potencialmente genotóxicos, entre os quais se tem dado particular atenção à radiação ionizante de origem cósmica (Heimers, 1999; Bagshaw e col., 1996; Friedberg e col., 1993). Esta radiação compreende, em proporções aproximadamente iguais, radiação de baixa transferência linear de energia (LET), nomeadamente radiação gama e ainda radiação de alta LET correspondendo a neutrões rápidos e prótons

(Heimers, 1999; Romano, e col., 1997). A intensidade da radiação, e do mesmo modo a exposição do pessoal de bordo, varia geograficamente de acordo com a actividade solar, latitude e altitude do voo (Bagshaw, 1996; Friedberg e col., 1993; Lantos, 1993; Bramlitt e col., 1985). Para altitudes normais de voo (9000 a 12000 m, em voos intercontinentais) estimou-se que o equivalente de dose recebida é de cerca de 6 $\mu\text{Sv/h}$ (NCRP, 1995). Naturalmente, dada a diversidade de rotas e tempos de voo, o equivalente de dose anual de radiação ionizante absorvida pelo pessoal de voo na aviação civil é também muito variável (1-10 mSv/ano) sendo, em média, de cerca de 5 mSv/ano (Romano e col., 1997). Este valor é significativamente superior ao absorvido por indivíduos de outras categorias profissionais expostos a radiação ionizante, como por exemplo, os trabalhadores de centrais nucleares ou os técnicos de radiologia (2 mSv/ano), embora seja inferior ao nível estabelecido pelo ICRP (International Commission on Radiological Protection) para exposição ocupacional - 20 mSv/ano, valor médio durante 5 anos (ICRP, 1991). No entanto, excede o nível de segurança de 1 mSv/ano, fixado para exposição da população comum a radiação ionizante.

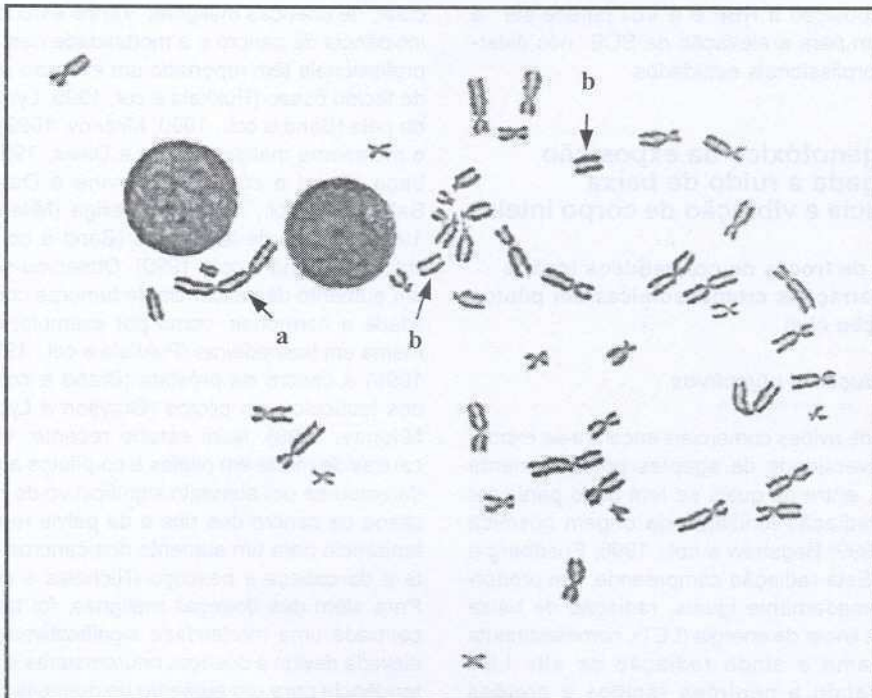
Resultados de diversos estudos epidemiológicos têm evidenciado que a tripulação de aviões comerciais se encontra sujeita a um risco acrescido de desenvolvimento de algumas patologias e, em particular, de doenças malignas. Vários estudos sobre a incidência de cancro e a mortalidade nestes grupos profissionais têm reportado um excesso de cancros do tecido ósseo (Pukkala e col., 1995; Lyng, 1996), da pele (Band e col., 1990; Milanov, 1999) incluindo o melanoma maligno (Irvine e Davis, 1992), da cabeça (Band e col., 1990; Irvine e Davis, 1992; Salisbury e col., 1991), da bexiga (Milanov e col., 1999) e ainda de leucemias (Band e col., 1996) e linfomas (Band e col., 1990). Observou-se também um aumento da incidência de tumores com sensibilidade a hormonas, como por exemplo, cancro da mama em hospedeiras (Pukkala e col., 1995; Lyng, 1996) e cancro da próstata (Brand e col., 1996) e dos testículos em pilotos (Grayson e Lyons, 1996; Milanov, 1999). Num estudo recente, visando as causas de morte em pilotos e co-pilotos americanos, detectou-se um aumento significativo do número de casos de cancro dos rins e da pélvis renal e uma tendência para um aumento dos cancros da próstata e da cabeça e pescoço (Nicholas e col., 1998). Para além das doenças malignas, foi também encontrada uma mortalidade significativamente mais elevada devido a doenças neuromotoras e ainda uma tendência para um aumento de doenças do sistema

nervoso central e dos órgãos sensoriais (Nicholas e col., 1998).

Ao nível biológico, para a avaliação da exposição ocupacional a doses baixas de radiação ionizante têm sido utilizados, maioritariamente, marcadores citogenéticos (Evans e col., 1979; Lloyd e col., 1980; Braselman e col., 1994). De entre estes, a análise de aberrações cromossômicas estruturais em linfócitos do sangue periférico, constitui o método de escolha em dosimetria radiobiológica (Lloyd, 1980). Aquando da irradiação a maioria dos linfócitos em circulação encontra-se na fase G_0 do ciclo celular, ou seja, na fase que precede a síntese de DNA. A irradiação poderá produzir, directa ou indirectamente (mediada pela formação de ROS), quebras da cadeia dupla do DNA que, por sua vez, darão origem a anomalias cromossômicas na primeira mitose após cultura dos linfócitos (Natarajan, 1984; Bender e col., 1988). Em casos de exposição ocupacional a radiação ionizante identificam-se, sobretudo, aberrações estruturais de tipo cromossômico, incluindo quebras e trocas (figura 4). De entre estas, está demonstrado que a frequência de

cromossomas dicêntricos constitui o indicador mais preciso para a determinação da dose de radiação absorvida (Bender, 1988; Scheid, 1990). De facto, estes constituem as anomalias radioinduzidas mais frequentes, em contraste com um nível espontâneo extremamente reduzido, permitindo uma dosimetria biológica de grande exactidão, se analisados num curto intervalo de tempo após a ocorrência de uma irradiação aguda (Straume e Bender, 1997). No entanto, a tripulação de aviões comerciais encontra-se exposta de forma prolongada a doses muito reduzidas de radiação cósmica. Nestas condições, as anomalias cromossômicas instáveis, incluindo os dicêntricos, vão sendo eliminadas o que, em termos de dosimetria biológica, diminui o seu valor. Contudo, mais recentemente, a análise da frequência de translocações recíprocas por FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) veio permitir a aplicação da biodosimetria a exposições crónicas ou algum após a ocorrência da exposição (Lucas, 1997) embora, segundo alguns autores, com um decréscimo da sensibilidade (Edwards, 1997). Esta limitação parece ter sido obviada pela recente aplicação da técnica

FIGURA 4
METAFASE DE LINFÓCITOS HUMANOS CORADA POR GIEMSA PARA VISUALIZAÇÃO DE ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS: (a) DICÊNTRICO E (b) FRAGMENTO ACÊNTRICO



ca de mFISH (*multicolour FISH*) à identificação das anomalias cromossômicas radioinduzidas (Greulich e col., 2000). Espera-se que este método, ao permitir a detecção de translocações envolvendo quaisquer cromossomas não homólogos resulte numa maior e melhor informatividade acerca do efeito da radiação. Por outro lado, dada a complexidade e morosidade da análise de anomalias cromossômicas, tem sido proposto como um possível método alternativo, a análise de micronúcleos (MN) em linfócitos com bloqueio da citocinese (Fenech e Morley, 1986; Silva e col., 1994).

São ainda poucos os trabalhos que avaliaram os danos citogenéticos em linfócitos de tripulações de aviões comerciais, sendo que os resultados obtidos foram algo contraditórios. Apesar de em alguns estudos se observarem elevações estatisticamente significativas de anomalias cromossômicas comparativamente a populações de controlo (Scheid e col., 1993; Heimers e col., 1995; Romano e col., 1997) noutros estudos, os resultados foram negativos (Zwingmann e col., 1998; Wolf, 1999). Do mesmo modo, a análise de MN em linfócitos com citocinese bloqueada produziu resultados conflituosos, tendo sido reportado um aumento significativo do seu valor médio em pilotos de aviões supersónicos (Heimers e col., 2000) mas não em pilotos de aviões subsónicos (Zwingmann e col., 1998). A frequência de SCE, embora não seja um marcador sensível de exposição a radiação ionizante, foi também avaliada em dois dos estudos referidos, originando resultados negativos (Wolff e col., 1999; Heimers, 2000). Além destes estudos, a exposição de culturas de linfócitos humanos a baixas doses de uma mistura de neutrões e de radiação gama aplicada a uma taxa de dose muito reduzida - simulando a exposição a radiação cósmica - produziu um aumento significativo de cromossomas dicêntricos embora não tenha induzido significativamente MN ou SCEs (Heimers, 1999).

Apesar dos trabalhos acima referidos terem sido realizados numa perspectiva de avaliação da exposição de grupos profissionais a radiação ionizante, em termos de risco para a saúde existem outros factores de exposição relevantes, nomeadamente os campos electromagnéticos produzidos pelos sistemas eléctricos (Nicholas e col., 1998) e ainda o RBF e VCI gerados pelo motor do avião (Silva e col., 1996, 1998). Estes factores poderão actuar isoladamente ou sinergisticamente com a radiação cósmica pelo que deverão ser também considerados. De facto, foi previamente demonstrado que a exposição ocupacional a RBF e a VCI determina um incremento da frequência média de SCEs e da proporção

de HFCs em trabalhadores da indústria aeronáutica (Silva e col., 1996) e em pilotos de aviões militares *alphajet* (Silva e col., 1999).

No presente trabalho, pretendeu-se contribuir para o esclarecimento dos riscos genéticos da exposição de pilotos de uma companhia aérea portuguesa, através da análise de anomalias cromossômicas estruturais e de SCE em linfócitos circulantes, em comparação com um grupo de controlo. Estes, contrariamente aos pilotos anteriormente estudados estão submetidos a radiação cósmica e não sofrem efeitos de forças gravitacionais.

3.1.2. Materiais e Métodos

População estudada

O grupo profissional seleccionado para estudo consistiu em 34 pilotos de aviões comerciais, do sexo masculino, com uma idade média de 43,6 anos (DP = 10,2) sendo, na sua maioria, não fumadores (quadro 4). A caracterização da exposição em termos de antiguidade (anos de trabalho como piloto), número total de horas de voo e número de horas de voo realizadas no ano precedente ao estudo encontra-se resumida no quadro 4. O número de horas de voo compreende o período de tempo, em horas, entre o início do movimento do avião na pista antes da decolagem até à imobilização do aparelho após a aterragem. Para o grupo de controlo seleccionaram-se 28 indivíduos, incluindo trabalhadores da área administrativa e da saúde, todos do sexo masculino, com idade média de 38,4 anos (DP = 10,0 anos) e hábitos de tabagismo comparáveis aos do grupo de pilotos (quadro 4). Para cada indivíduo foi colhida informação detalhada sobre os hábitos de vida, história clínica e profissional, por preenchimento de um questionário e foi obtido consentimento informado para colheita de sangue e realização do estudo. Deste foram excluídos todos os indivíduos sob medicação, com exposição recente a radiação (inferior a 6 meses), com doença activa ou crónica e com exposição extra-profissional susceptível de influenciar a análise dos resultados. Em relação aos hábitos de consumo de café e álcool apenas se detectaram pequenas variações entre os indivíduos seleccionados.

A dose cumulativa de radiação recebida por este grupo de pilotos ao longo dos anos foi calculada com base nos registos individuais. Para o cálculo da dose anual de radiação absorvida, multiplicou-se o número médio de horas de voo do último ano por um valor de 6 μ SV/h, assumido como a taxa de exposição dos

QUADRO 4
DESCRIÇÃO DOS GRUPOS ESTUDADOS, DE ACORDO COM A IDADE, HÁBITOS DE TABAGISMO E, EM RELAÇÃO AOS PILOTOS, ANTIGUIDADE E HORAS DE VOO

	Pilotos	Controlos
Número total de indivíduos	34	28
Idade (anos) ^a	43,6 ± 10,2 (28 - 59)	38,4 ± 10,0 (24 - 60)
Hábitos de tabagismo		
Não Fumadores	29	23
Fumadores	5	5
Antiguidade profissional (anos) ^a	22,6 ± 9,9 (7 - 40)	--
Total de horas de voo ^{a,b}	9415 ± 4534 (1700 - 18000)	--
Total de horas de voo no ano precedente ^{a,b}	675,5 ± 102,6 (330 - 825)	--
Total de horas de voo de longa distância no ano precedente	470,1 ± 214,9 (132 - 770)	--

^a Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (valores mínimo e máximo)

^b Tempo que medeia entre a saída do avião para a pista antes da decolagem e a imobilização do aparelho após a aterragem.

pilotos a radiação ionizante (NCRP, 1995) e considerando o número médio anual de horas de voo.

Cultura de linfócitos e análise citogenética

De cada indivíduo foi colhida por punção venosa uma amostra de 5 ml de sangue periférico para tubo heparinizado. Iniciaram-se culturas com 0,5 ml de sangue total em 5 ml de meio RPMI-1640 (Gibco-BRL) suplementado com 20 % de soro fetal de vitelo (Gibco-BRL), 2 % de fitohemaglutinina (Gibco-BRL), penicilina (125 U/ml) e estreptomina (100 µg/ml). Para análise de anomalias cromossômicas as culturas foram incubadas a 37°C durante 42 horas, tendo-se adicionado colcemida (0,2 µg/ml) durante a última hora. Em paralelo, realizou-se uma cultura nas mesmas condições mas adicionada de 10 µM de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), para controlo da proporção de metafases em primeira e segunda divisão. Às culturas para análise de SCEs adicionou-se também 10 µM de BrdU, tendo-se processado de forma idêntica às anteriores, à excepção do período de incubação que se prolongou até às 56 horas.

A colheita dos linfócitos foi realizada segundo o método estandardizado de tratamento hipotónico

com KCl 0,075 M a 37°C, seguido de fixação com metanol-ácido acético (3:1). As preparações fixadas em lâmina foram coradas com Giemsa a 4 % (v/v) em tampão fosfatos (pH = 6,8) com vista à análise de anomalias cromossômicas. Para a análise de SCE utilizou-se um método de coloração com um fluorocromo (bisbenzimidazida) e Giemsa (método FPG, fluorescence plus Giemsa), que permitiu a obtenção de uma coloração diferencial dos cromatídeos de cada cromossoma (Perry e Wolf, 1974).

A observação microscópica das preparações foi efectuada em lâminas codificadas, provenientes de, pelo menos, duas culturas independentes. As anomalias cromossômicas foram examinadas, para cada indivíduo, em 100 metafases na primeira divisão do ciclo celular. A cultura de controlo (efectuada nas mesmas condições e corada pelo método FPG) permitiu confirmar que mais de 98% das metafases obtidas se encontravam na primeira divisão. Identificaram-se em cada metafase todos as anomalias de tipo cromatídico e cromossômico, incluindo quebras e trocas, segundo os critérios definidos por Savage (1975). Os *gaps* cromatídicos e cromossômicos embora quantificados, não foram incluídos nos re-

sultados. Os dados obtidos foram agrupados em anomalias de tipo cromatídico, incluindo quebras e radiais, e de tipo cromossômico, incluindo quebras terminais e *double minutes*, cromossomas dicêntricos e em anel. A análise de SCEs foi realizada em 50 metafases na segunda divisão do ciclo celular.

Análise estatística

Para testar a existência de potenciais interações entre anomalias cromossômicas e grupo profissional, horas de voo (inferior ou superior a um total de 10 000 horas de voo) e tabagismo utilizou-se uma análise de variâncias. A análise estatística dos resultados de anomalias cromossômicas foi efectuada aplicando o teste não paramétrico de Mann-Whitney, tendo em consideração a heterogeneidade interindividual dentro de cada grupo e evitando assim fazer suposições acerca da distribuição intercelular e interindividual das anomalias cromossômicas.

No que se refere à análise dos resultados de SCE, para cada indivíduo foi calculada a média e o desvio padrão do número de SCE por célula, com

base nas 50 metafases analisadas. A relação entre o número de SCE por célula e os factores: grupo profissional (pilotos ou controlo), tabagismo e número de horas de voo (inferior ou superior a um total de 10 000 horas de voo), foi explorada por uma análise de variâncias. Para comparação estatística do valor médio de SCE por célula entre o grupo de pilotos e o grupo de controlo foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

A proporção de HFCs, definidas por um valor de SCE igual ao superior ao 95º percentil do controlo (Bender e col., 1992), foi também estimada, correspondendo neste estudo, a células com um valor igual ou superior a 14 SCE.

3.1.3. Resultados

O quadro 5 apresenta os resultados da análise de anomalias cromossômicas nos grupos de pilotos e de controlos estratificados segundo os hábitos de tabagismo. Da aplicação de uma análise de variâncias para detecção de potenciais interações

QUADRO 5
VALORES MÉDIOS (\pm DP) DAS FREQUÊNCIAS DE ANOMALIAS DE TIPO CROMATÍDICO, DE TIPO CROMOSSÔMICO, DE CROMOSSOMAS DICÊNTRICOS E DO TOTAL DE ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS ESTRUTURAIS NOS GRUPOS DE PILOTOS E CONTROLOS, CONSIDERANDO OS HÁBITOS DE TABAGISMO

Grupos de exposição	Número de células analisadas	Anomalias cromatídicas (Média \pm DP)	Anomalias cromossômicas (Média \pm DP) ^a	Dicêntricos (Média \pm DP)	Total de anomalias (%)
<i>Controlo</i>					
Total de indivíduos (n = 28)	2800	2,20 \pm 1,94	0,92 \pm 1,19	0,04 \pm 0,20	3,12
Não Fumadores (n = 23)	2300	2,05 \pm 1,64	0,70 \pm 1,08	0,05 \pm 0,22	2,75
Fumadores (n = 5)	500	2,80 \pm 3,03	1,80 \pm 1,30	0	4,6
<i>Pilotos</i>					
Total de indivíduos (n = 34)	3400	2,24 \pm 1,81	1,15 \pm 0,99	0,24 \pm 0,50	3,39
Não Fumadores (n = 29)	2900	2,18 \pm 1,72	1,17 \pm 1,07	0,24 \pm 0,50	3,35
Fumadores (n = 5)	500	2,40 \pm 2,50	1,00 \pm 0,00	0,20 \pm 0,50	3,4

^a Incluindo os cromossomas dicêntricos

entre a variável dependente (anomalia cromatídica, anomalia cromossômica ou dicêntrico) e as variáveis independentes (exposição, tabagismo e horas de voo) apenas resultou uma correlação significativa, a um nível de significância de 90 %, entre profissão e tabagismo no que se refere a anomalias de tipo cromossômico. A comparação estatística dos resultados de anomalias de tipo cromatídico, cromossômico e de cromossomas dicêntricos entre o total de pilotos e controles não revelou a existência de diferenças significativas a um nível de significância de 95 %. Após estratificação dos grupos em fumadores e não fumadores obtiveram-se resultados consistentes com os anteriores. No entanto, observou-se um aumento, apenas marginalmente significativo, no valor médio das aberrações de tipo cromossômico entre pilotos e controles não fumadores ($p = 0,067$). Foi igualmente detectada uma elevação do nível médio de aberrações de tipo cromossômico em controles fumadores relativamente aos não fumadores, embora apenas ao nível de significância de 90 % ($p = 0,069$). É de notar ainda, que a frequência média de cromossomas dicêntricos no grupo de pilotos ($0,24 \pm 0,50$) é seis vezes superior à observada no grupo de controlo ($0,04 \pm 0,20$), apesar de não ter atingido significado estatístico.

No quadro 6 são apresentados os resultados da frequência média de SCE por célula bem como da

proporção de HFCs. Na figura 5, encontra-se representado o valor médio individual de SCE por célula bem como a média de SCE nos grupos controlo e de pilotos. Em três pilotos não se obtiveram metafases bem diferenciadas pelo que foram excluídos da análise de SCE. A análise de uma eventual correlação entre frequência de SCE e as variáveis profissão, tabagismo e horas de voo mostrou uma interação significativa com a profissão e o tabagismo ($p < 0,0001$). Assim, os grupos de exposição foram estratificados segundo o consumo de tabaco, em fumadores e não fumadores.

A análise estatística da frequência média de SCE por célula mostra a existência de uma diferença significativa entre o grupo de pilotos e o grupo de controlo ($p = 0,001$). Após estratificação de ambos os grupos em não fumadores e fumadores, as diferenças entre os grupos exposto e controlo permanecem significativas ($p = 0,001$ e $p = 0,05$). Verificou-se igualmente um acréscimo significativo do nível médio de SCE por célula no conjunto dos indivíduos fumadores face aos não fumadores, quer no grupo de pilotos quer no de controlo ($p < 0,0001$). Contudo, os resultados da comparação da proporção de HFCs entre pilotos e controlos não atingiram significância estatística, para a totalidade dos casos ou após subdivisão dos grupos em fumadores e não fumadores ($p > 0,05$). No entanto, verificou-se a

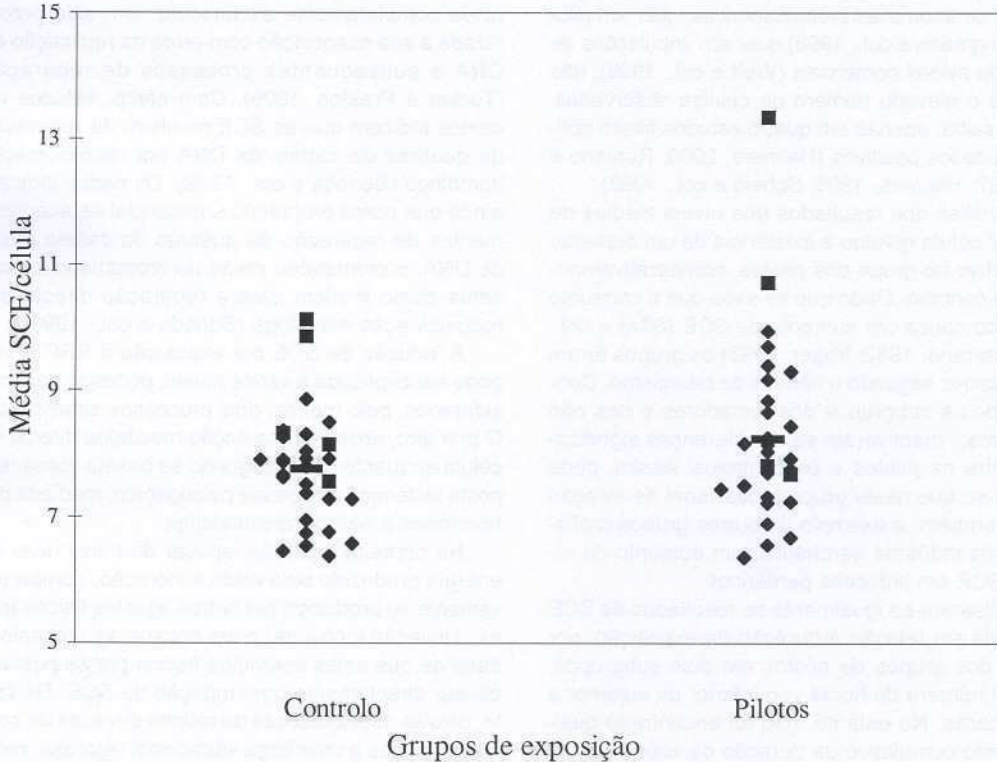
QUADRO 6
VALORES MÉDIOS DOS NÍVEIS DE SCE^a (\pm DP) E DA PROPORÇÃO DE HFCs^b NOS GRUPOS DE PILOTOS E DE CONTROLO, CONSIDERANDO OS HÁBITOS DE TABAGISMO

Grupos de exposição	Número de indivíduos	SCEs/célula (Média \pm DP)	HFCs (%)
<i>Controlo</i>			
Total de indivíduos	28	7,76 \pm 3,17	(5,71 %)
Não Fumadores	23	7,53 \pm 3,03	(4,26%)
Fumadores	5	8,80 \pm 3,55	(12,40 %)
<i>Pilotos</i>			
Total de indivíduos	31	8,24 \pm 3,69	(8,39 %)
Não Fumadores	27	7,99 \pm 3,41	(6,30 %)
Fumadores	4	9,89 \pm 4,94	(22,50 %)

^a 50 metafases analisadas por indivíduo

^b definidas como células com 14 ou mais SCEs

FIGURA 5
 FREQUÊNCIA MÉDIA DE SCE PARA CADA INDIVÍDUO DOS GRUPOS CONTROLOS E PILOTOS DE ACORDO COM HÁBITOS DE TABAGISMO: (■) FUMADOR; (◆) NÃO FUMADOR; (—) FREQUÊNCIA MÉDIA DE SCE POR GRUPO DE EXPOSIÇÃO



existência de uma diferença significativa entre fumadores e não fumadores quer no grupo de controlo ($p = 0,045$), quer no de pilotos ($p = 0,026$).

No que se refere à dose média anual de radiação recebida pelos pilotos, considerando um número médio de horas de voo no ano precedente ao estudo de 675,5 horas (DP = 102,6), estimou-se que a dose média recebida nesse ano foi de $4,05 \pm 0,62$ mSv.

3.1.4. Discussão

Os resultados da presente análise de anomalias cromossômicas em pilotos de uma companhia aérea portuguesa não revelaram um aumento significativo do nível de anomalias cromossômicas no grupo dos pilotos, comparativamente ao dos controlos (quadro 5). Contudo, foi observado no grupo exposto, uma frequência média de dicêntricos 6 vezes superior à do controlo, apesar de não revelar significância estatística ($p > 0,05$). Sabendo-se que os

cromossomas dicêntricos constituem o tipo de aberração mais directamente relacionada com o efeito da radiação de alta energia, este dado sugere um possível efeito da mesma. Além disso, considerando unicamente o subgrupo de indivíduos não fumadores, observou-se um aumento da frequência de aberrações de tipo cromossômico nos pilotos, mas apenas ao nível de significância de 90 %, sugerindo também uma influência da radiação. É possível que a inexistência de diferença estatística seja devida à análise de um número de células insuficiente para detectar os efeitos dos baixos níveis de radiação a que estes trabalhadores estão expostos. Assim, o presente estudo, sugerindo uma tendência para um aumento de anomalias cromossômicas no grupo dos pilotos, deverá ser alargado a um maior número de indivíduos ou à análise de um número mais elevado de células por indivíduo.

Os efeitos biológicos da exposição dos pilotos da aviação civil foram já investigados em alguns estudos

(Romano e col., 1997; Scheid e col., 1993; Heimers, 2000; Wolf, 1999; Zwingmann e col., 1998) na perspectiva de avaliação dos potenciais danos citogenéticos induzidos pela radiação cósmica. Alguns autores não conseguiram também demonstrar aumentos significativos de anomalias cromossômicas, quer em pilotos (Zwingmann e col., 1998) quer em tripulações de cabine de aviões comerciais (Wolf e col., 1999), não obstante o elevado número de células observadas. Que se saiba, apenas em quatro estudos foram obtidos resultados positivos (Heimers, 2000; Romano e col., 1997; Heimers, 1995; Scheid e col., 1993).

A análise dos resultados dos níveis médios de SCE por célula revelou a existência de um aumento significativo no grupo dos pilotos, comparativamente ao de controlo. Dado que se sabe que o consumo de tabaco causa um aumento de SCE (Silva e col., 1996; Carrano, 1982; Yager, 1993) os grupos foram estratificados segundo o hábitos de tabagismo. Considerando os subgrupos dos fumadores e dos não fumadores, mantiveram-se as diferenças significativas entre os pilotos e os controlos. Assim, pode concluir-se que neste grupo profissional da aviação ocorre também, a exemplo de outros grupos profissionais da indústria aeronáutica, um aumento do nível de SCE em linfócitos periféricos.

Analysaram-se igualmente os resultados de SCE por célula em relação à duração da exposição, por divisão dos grupos de pilotos em dois subgrupos: com um número de horas voo inferior ou superior a 10000 horas. No entanto, não foi encontrado qualquer efeito cumulativo da duração da exposição ao nível de SCE. Resultados semelhantes foram já encontrados no trabalho anterior do grupo, envolvendo trabalhadores com outro tipo de ocupação, mas também expostos a RBF e VCI (Silva e col., 1996). Estes resultados podem ser explicados considerando que existe uma cinética complexa e contínua de remoção das lesões do DNA por mecanismos de reparação efectivos, e ainda pelo normal *turnover* dos linfócitos em circulação. Aceita-se em geral que ambos os mecanismos possam estar envolvidos neste processo, resultando num acréscimo moderado do nível de SCE que, contudo, permanece estável por longos períodos de tempo (Tates e col., 1994; Yager e col., 1993; Carrano e col., 1992).

Uma vez que, como foi referido, a radiação ionizante a que estes pilotos estão submetidos não só é fraca indutora de SCE como é extremamente baixa, parece poder concluir-se que o RBF e VCI são, pelo menos em larga escala, os factores determinantes na indução de SCE. Contudo, os mecanismos subjacentes a esta indução, em trabalhadores expostos, estão ainda por esclarecer.

As SCE representam trocas recíprocas de fragmentos cromatídicos de um mesmo cromossoma, em *loci* aparentemente homólogos, não resultando numa alteração estrutural do cromossoma. Embora o mecanismo de formação de SCE não se encontre ainda completamente esclarecido, tem sido preconizada a sua associação com erros da replicação do DNA e subsequentes processos de reparação (Tucker e Preston, 1999). Com efeito, estudos recentes indicam que as SCE resultam da reparação de quebras de cadeia de DNA por recombinação homóloga (Sonoda e col., 1999). Os dados indicam ainda que numa proporção substancial de acontecimentos de reparação de quebras da cadeia dupla de DNA, o cromátide irmão do cromátide lesado actua como modelo para a reparação directa por recombinação homóloga (Sonoda e col., 1999).

A indução de SCE por exposição a RBF e VCI pode ser explicada a vários níveis, podendo ser considerados, pelo menos, dois processos alternativos. O primeiro, envolve uma acção mecânica directa na célula enquanto que o segundo se baseia numa resposta sistémica ao stress psicogénico, mediada por hormonas e neuro transmissores.

Na primeira hipótese, apesar do baixo nível de energia produzido pelo ruído e vibração, comparativamente ao produzido por outros agentes físicos (por ex., radiação ionizante) pode encarar-se a possibilidade de que estes estímulos físicos *per se* possam causar directamente uma indução de SCE. De facto, células osteoblásticas de ratinho privadas de soro e submetidas a uma força vibracional vigorosa, mostraram uma regulação positiva transitória dos protooncogenes relacionados com o crescimento celular, *c-fos* e *c-myc* e, por outro lado, uma regulação negativa de genes associados com a diferenciação, como osteocalcina e factor transformante do crescimento- β 1 (Trandjwinata e col., 1997). Encontra-se também descrito que a exposição da mesma linha celular a condições alteradas de gravidade, outra forma de força mecânica, gera um padrão semelhante de eventos genéticos, ao nível molecular (Fitzgerald e col., 1996; Nose e col., 1994). É de salientar o facto de que as modificações induzidas pela vibração ao nível da expressão de certos genes são superiores, quer em magnitude quer em número de genes activados, às determinadas pelas forças gravitacionais anteriormente descritas (Trandjwinata e col., 1997). Noutro trabalho, em que foram usados cardiomiócitos cultivados sob a acção de forças mecânicas cíclicas de 1 Hz, foi observado que a expressão da proteína da matriz extracelular, tenascina C, se encontrava induzida através da activação do factor kB nuclear (NF-kB) presumi-

velmente por ROS (Yamamoto, 1999). Por outro lado, vários estudos têm demonstrado que a perda de audição induzida pelo ruído se encontra associada com uma elevação persistente das ROS na cóclea, sugerindo que o ruído é capaz de determinar directamente um processo localizado de stresse oxidativo intracelular. (Ohlemiller e col., 1999; Yamasoba e col., 1999). Numa análise conjunta, os dados dos referidos estudo indicaram que estímulos mecânicos têm a capacidade de desencadear acontecimentos celulares, incluindo a produção de ROS. Sabe-se que, entre outras acções, as ROS podem induzir a formação de quebras de cadeia de DNA (Vallyathan e col., 1998), a activação de genes de resposta ao stresse (Amstad e col., 1992; Nose e col., 1991) e causar um atraso do ciclo celular (Goldstone e col., 1997). Nesse sentido, é possível que o nível aumentado de SCE observado nos linfócitos de indivíduos expostos a ruído e vibração possa ter resultado da reparação por recominação das quebras de cadeia de DNA, induzidas pelas ROS.

Em alternativa, a elevada frequência de SCE observada pode ter sido indirectamente derivada da acção celular de hormonas adrenocorticóides libertadas em resposta ao stresse experimentado num ambiente de ruído e vibração (Soldani e col., 1999; Nakamura e col., 1990, 1991). Sabe-se que os glucocorticóides são capazes de interferir com o metabolismo celular (Kasperk e col., 1995), com a expressão génica (Reichardt e col., 2000) e com a progressão do ciclo celular (Baghdassarian e col., 1999). Por outro lado, alguns trabalhos publicados sobre danos citogenéticos induzidos por hormonas, indicam também que as hormonas esteróides, nomeadamente hidrocortisona e estrogéneo, induzem SCE em linfócitos humanos em cultura, em roedores (Dhilon e Dhilon, 1996; Hundal e col., 1997; Bali e col., 1990) e em humanos (Murthy e Prema, 1983; Joseph-Lerner e col., 1993).

Numa análise global, parece razoável assumir que ambos os tipos de mecanismos, directos e indirectos, possam estar na base da indução de SCE decorrente da exposição a RBF e VCI. Independentemente dos processos envolvidos, encontra-se amplamente demonstrado que um aumento do valor médio de SCE é indicativo de um efeito genotóxico, embora não se tenha definido uma correlação directa com subseqüentes efeitos adversos para a saúde, nomeadamente desenvolvimento de cancro (Tuker e Preston, 1996). Assim, os presentes resultados sugerem que a exposição deste grupo profissional a radiação ionizante não é suficiente para induzir danos citogenéticos detectáveis, enquanto que a exposição prolongada a RBF e VCI

determina um efeito genotóxico, consistente com o anteriormente observado noutros grupos profissionais.

3.2. Análise de trocas de cromátides irmãos em esplenócitos de ratinhos expostos a ruído de baixa frequência e a vibração de corpo inteiro

3.2.1. Objectivos

Pretendeu-se investigar até que ponto o aumento de SCE, préviamente observado no homem em consequência da exposição prolongada a RBF e VCI, seria reprodutível num modelo murino, em condições experimentais controladas. Por outro lado, tentou-se discriminar entre o efeito do RBF isolado e combinado com VCI, na indução de SCE. Procurou-se ainda avaliar a possibilidade da existência de um efeito do RBF e VCI ao nível da cinética do ciclo celular. Para tal, analisaram-se as SCE em linfócitos esplénicos de ratinhos (figura 6) expostos a várias condições de RBF e deste em combinação com VCI.

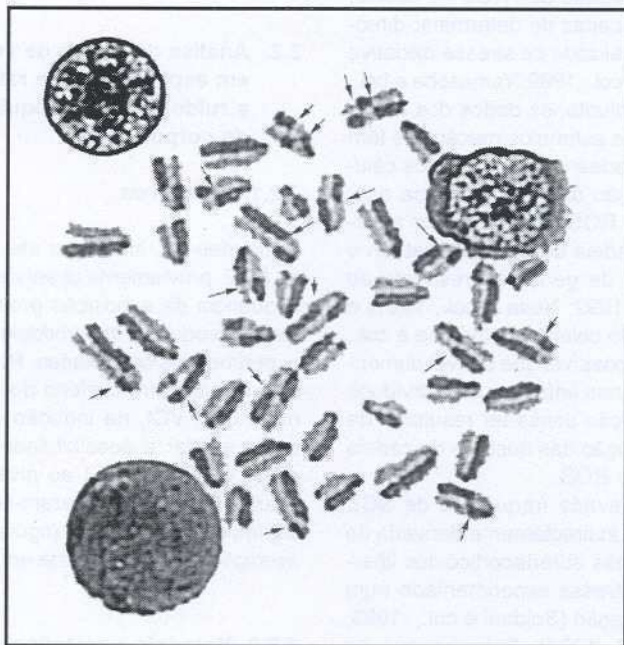
3.2.2. Materiais e métodos

Animais e condições de exposição

Nas experiências foram utilizados 54 ratinhos BALB/c, do sexo masculino, de 7 a 8 semanas de idade. Os animais foram mantidos numa sala de temperatura (22°C) e humidade (50%) controladas em ciclos de 12 horas alternados dia-noite e com acesso a água e alimento *ad libitum*. Todos os animais foram tratados de acordo com as Directivas da União Europeia (86/609/CEE).

Os ratinhos foram expostos a períodos de 8 horas de ruído contínuo de nível de pressão elevado e baixa frequência ou do mesmo ruído em combinação com VCI, durante vários intervalos de tempo. A exposição ocorreu numa câmara audiogénica na qual o sinal sonoro foi produzido por um gerador analógico de som, amplificado e a sua frequência filtrada. O conteúdo da energia espectral do som concentrou-se, sobretudo, nas bandas de baixa frequência, inferiores a 500 hertz (Hz). Os valores do nível sonoro oscilaram entre 90 e 109 decibéis (dB) com o nível de pressão sonora ponderado A de 98 dB (A). Para a exposição a vibração, foi colocado no interior da câmara audiogénica um vibrador mecânico produzindo vibração vertical sinusoidal com uma frequência fundamental de 12.06 Hz, uma amplitude de 2 mm e uma aceleração de 11.4 m.s⁻² (1,16 g) de valor eficaz.

FIGURA 6
METAFASE DE LINFÓCITOS DE RATINHO BALB/c CORADA PELO MÉTODO DE FPG PARA VISUALIZAÇÃO DE SCE (→)



Procedeu-se à exposição de grupos de 6 a 10 animais em gaiolas individuais só a RBF durante 300 e 600 h, num esquema de 8 h por dia e 5 dias por semana (grupos R1 e R2, respectivamente). Grupos do mesmo número de animais foram expostos simultaneamente à combinação de RBF e VCI durante cumulativamente 300 e 600 h, nas mesmas condições experimentais (grupos RV1 e RV2). Grupos de ratinhos de controlo emparelhados para a idade foram mantidos num ambiente sem ruído nem vibração mas de resto em condições em tudo idênticas às dos ratinhos expostos (grupos C0, C1 e C2, correspondendo, respectivamente a 0, 300 e 600 horas).

Protocolo experimental

Nos vários tempos protocolados sacrificaram-se grupos de animais expostos e de controlo. Após remoção do baço, isolamento e lavagem das células esplênicas, iniciaram-se as culturas em meio RPMI 1640 (Gibco-BRL) suplementado com 20% de soro fetal de vitelo e estimularam-se as células à divisão por adição de 2 µg/ml de concanavalina A (Sigma). Após 24 h de incubação a 37°C, adicionou-se à cultura 5-bromo 2'-deoxiuridina (5 µM) e, 28 h depois, colcemida (0.2 µg/ml) durante 2 h. As preparações

cromossómicas foram efectuadas segundo protocolos standardizados e coradas pelo método de coloração diferencial de FPG (Perry e Wolf 1975).

Para cada animal analisaram-se 30 metafases na segunda divisão do ciclo celular em lâminas codificadas aleatoriamente, provenientes de pelo menos duas culturas diferentes. Para caracterização da cinética do ciclo celular, analisaram-se pelo menos 200 metafases por animal que foram classificadas em 1ª, 2ª e 3ª divisão do ciclo celular, com base no padrão de coloração diferencial dos cromossomas.

Análise estatística

Para cada animal foram calculados a média e o desvio padrão do número de SCE por célula. Uma vez verificado que a frequência de SCE não segue uma distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnov) aplicaram-se, para a comparação dos valores médios de SCEs entre os diversos grupos, os teste não paramétricos de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney. Estimou-se ainda a proporção de HFCs, cujos resultados se analisaram pelo teste do qui-quadrado. A cinética do ciclo celular foi avaliada através do índice replicativo (IR) calculado pela seguinte fórmula: $IR = [M1 + 2(M2) + 3(M3)/n]$, em que

n representa o número de células analisadas. A análise estatística dos resultados do IR foi efectuada por uma análise de variâncias (ANOVA).

3.2.3. Resultados

O valor médio de SCE por célula para cada animal e para os vários grupos de exposição (ruído, vibração e controlo) encontram-se graficamente representados na figura 7. A frequência média de SCE por célula, a proporção de HFCs bem como o valor do IR obtido para os vários grupos de animais expostos e de controlo, considerando os vários tempos de exposição, são apresentados no quadro 7.

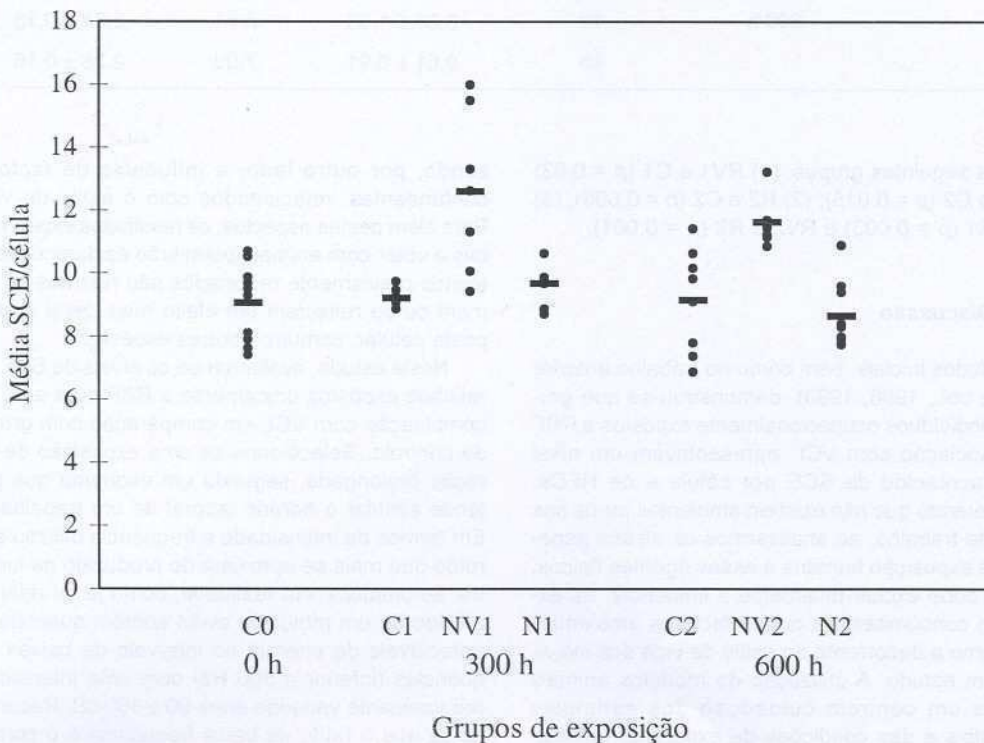
A análise estatística da frequência média de SCE por célula, revelou que a(s) diferença(s) entre: (1) os vários grupos de controlo, C0, C1 e C2 não têm significado estatístico ($p > 0,05$); (2) os grupos RV1 e RV2 não é significativa ($p > 0,05$); (3) os grupos R1 e R2 é significativa ($p = 0,007$); (4) os grupos RV1

e C1 e os grupos RV2 e C2 são altamente significativas ($p < 0,0001$); (5) os grupos R1 e C1 e os grupos R2 e C2 não são significativas ($p > 0,05$); (6) os grupos RV1 e R1 e os grupos RV2 e R2 são altamente significativas ($p < 0,0001$).

Os resultados da análise estatística da proporção de HFCs correspondendo, no presente estudo, a células com um valor igual ou superior a 15 SCE, estão de acordo com os acima referidos para a frequência média de SCE. Assim, a proporção de HFCs encontra-se significativamente aumentada nos grupos RV1 e RV2 em comparação, respectivamente, com os grupos C1 e C2 ($p < 0,0001$). Pelo contrário, não existe diferença significativa entre cada um dos grupos expostos a RBF e os correspondentes controlos ($p > 0,05$). Por outro lado, as diferenças entre os grupos expostos unicamente a RBF não é significativa, enquanto que a comparação entre os grupos RV1 e RV2 adquiriu significado estatístico ($p = 0,025$).

A análise dos dados da cinética do ciclo celular revelaram a existência de diferença(s) significativa(s)

FIGURA 7
FREQUÊNCIA MÉDIA DE SCE POR CÉLULA PARA (•) CADA ANIMAL E PARA CADA UM DOS GRUPOS DE EXPOSIÇÃO (—)



QUADRO 7

NÍVEL MÉDIO (\pm DP) DE TROCAS DE CROMATÍDEOS IRMÃOS (SCE), PROPORÇÃO DE CÉLULAS COM ELEVADA FREQUÊNCIA DE SCE (HFCs) POR CÉLULA E ÍNDICE REPLICATIVO (IR) NOS VÁRIOS GRUPOS DE EXPOSIÇÃO E DE CONTROLO

Grupos de exposição	Duração da exposição (h)	Número de animais	SCEs/célula (Média \pm D.P.)	HFCs (%)	IR (Média \pm D.P.)
<i>Controlo</i>					
C0	0	10	9,06 \pm 1,21	7,09	1,98 \pm 0,15
C1	300	6	9,21 \pm 0,34	7,65	2,24 \pm 0,18
C2	600	8	9,15 \pm 1,65	7,69	1,97 \pm 0,31
Total		24	9,13 \pm 1,20	7,43	2,04 \pm 0,24
<i>Ruído e vibração</i>					
RV1	300 h	7	12,61 \pm 2,54	31,90	1,66 \pm 0,17
RV2	600 h	7	11,59 \pm 0,77	21,54	1,53 \pm 0,12
Total		14	12,10 \pm 1,88	26,91	1,59 \pm 0,15
<i>Ruído isolado</i>					
R1	300 h	6	9,59 \pm 0,71	9,64	2,19 \pm 0,13
R2	600 h	10	8,66 \pm 1,00	5,61	2,34 \pm 0,13
Total		16	9,01 \pm 0,91	7,09	2,28 \pm 0,15

entre os seguintes grupos: (1) RV1 e C1 ($p = 0,03$) e RV2 e C2 ($p = 0,015$); (2) R2 e C2 ($p = 0,006$); (3) RV1 e R1 ($p = 0,003$) e RV2 e R2 ($p = 0,001$).

3.2.4. Discussão

Nos estudos iniciais, bem como no trabalho anterior (Silva e col., 1996, 1999), demonstrou-se que grupos de indivíduos ocupacionalmente expostos a RBF em associação com VCI apresentavam um nível médio acrescido de SCE por célula e de HFCs. Considerando que não existem ambientes puros nos locais de trabalho, ao analisarmos os efeitos genéticos da exposição humana a esses agentes físicos, não se pode excluir totalmente a influência da exposição concomitante a outros factores ambientais bem como a decorrente do estilo de vida dos indivíduos em estudo. A utilização de modelos animais permite um controlo cuidadoso dos estímulos ambientais e das condições de exposição, minimi-

zando, por outro lado, a influência de factores confundentes, relacionados com o estilo de vida. Para além destes aspectos, os resultados experimentais a obter com animais permitirão esclarecer se os efeitos previamente reportados são restritos ao homem ou se reflectem um efeito mais geral de resposta celular, comum a outras espécies.

Neste estudo, avaliaram-se os níveis de SCE em ratinhos expostos unicamente a RBF ou a este em combinação com VCI, em comparação com grupos de controlo. Seleccionou-se uma exposição de duração prolongada, segundo um esquema que pretende simular o horário laboral de um trabalhador. Em termos de intensidade e frequência utilizou-se o ruído que mais se aproxima do produzido na indústria aeronáutica. Na realidade, como já foi referido, o ruído de um motor de avião contém quantidades apreciáveis de energia no intervalo de baixas frequências (inferior a 500 Hz) com uma intensidade predominante variando entre 90 e 100 dB. Reconhece-se que o ruído de baixa frequência é o compo-

nente do ruído de banda larga mais lesivo para a saúde (Berglund e col., 1996). Por outro lado, sabe-se que também a vibração de baixa frequência, equivalente à aplicada nesta experiência (12 Hz) corresponde à frequência média de ressonância do corpo humano, sendo particularmente prejudicial para o organismo porque produz o deslocamento máximo entre os órgãos e a estrutura do esqueleto (Randall e col., 1997). Deste modo, e salvaguardando a possível existência de diferenças importantes entre espécies no que diz respeito à biodinâmica e, conseqüentemente, à frequência de ressonância, estudos experimentais no rato revelaram que a vibração com uma frequência aproximada de 10 Hz é altamente eficaz na determinação de um desequilíbrio da homeostase do organismo (Nakamura, 1991).

Os resultados revelaram que os grupos de animais expostos a 300 e a 600 h de ruído isolado não apresentam diferenças estatisticamente significativas dos níveis de SCE nas células esplênicas, comparativamente aos respectivos grupos de controlo, independentemente da duração da exposição. Em contraste com estes resultados, verificou-se que os grupos de animais expostos a 300 e 600 horas de RBF e VCI apresentam um aumento significativo da frequência de SCE e, bem assim, da proporção de HFCs em relação aos respectivos grupos de controlo. A elevação da proporção de HFCs corrobora assim o incremento verificado no valor médio da frequência de SCE por célula. Vários estudos têm indicado que as HFCs representam subpopulações linfocitárias com um tempo de vida prolongado o que promove a acumulação de lesões no seu DNA. Assim, em casos de exposição crónica, a sua estimativa confere maior sensibilidade à análise de SCE (Pozanelli, 1997; Bonassi, 1999). Contudo, apesar do aumento significativo dos níveis de SCE obtido em resposta à exposição combinada a RBF e VCI, observou-se um decréscimo do valor médio de SCE assim como um decréscimo significativo do nível de HFCs das 300 h para as 600 h de exposição. Uma hipótese explicativa poderá ser a de que a exposição dos ratinhos a estes estímulos físicos de uma forma prolongada e repetitiva poderia induzir uma resposta de tolerância, expressa por uma indução decrescente de SCE ao longo do tempo. O fenómeno de tolerância genética encontra-se bem documentado, ao nível celular e de organismo em, por exemplo, casos de exposição a níveis reduzidos de agentes físicos ou químicos potencialmente agressivos para o material genético, tais como radiação ionizante (Lehnert, 1995), radiação ultravioleta (Alvarez e Boveris, 1997), campos electromagnéti-

cos (DiCarlo, 1999) elevação térmica (Sonneberg, 1992) e agentes oxidantes (Trosko, 1998). No que diz respeito à cinética do ciclo celular, observou-se um atraso significativo na progressão da divisão celular, mas exclusivamente nos grupos expostos a RBF e VCI, em comparação com os controlos respectivos.

Os resultados obtidos - revelando que apenas os ratinhos expostos a RBF e VCI apresentam níveis significativamente aumentados de SCE - são indicativos de que é a VCI, por si só ou em combinação com o RBF, o factor determinante na indução de SCE e no atraso do ciclo celular. No entanto, em contraste com os nossos resultados, outros autores reportaram que a exposição prolongada a ruído causa uma indução de SCE em células de medula óssea de rato (Fischman e Kelly, 1996, 1999). Esta discrepância pode, contudo, ser atribuída à diferença das componentes do ruído aplicado por aqueles autores e no presente trabalho ou a diferenças de sensibilidade das diferentes espécies utilizadas, face ao estímulo auditivo (Davis e col., 1999; Windle e col., 1998). Por outro lado, num ensaio *in vitro* em que se submeteram linfócitos humanos a vibração de baixa frequência (5-10 Hz) durante 20 minutos, não foi observado qualquer aumento significativo da frequência de SCE (Khailil e Qassem, 1996). No entanto, a duração da exposição pode ter sido demasiado curta para produzir um efeito genético detectável pelo teste utilizado.

Em conclusão, verificou-se que o incremento dos níveis de SCE e de HFCs previamente observado em grupos de trabalhadores expostos a RBF e VCI (Silva e col., 1996, 1999) é extensivo a outra espécie, em condições experimentais controladas de exposição e de factores ligados ao estilo de vida. Os resultados permitem ainda concluir que o componente mais importante, em termos de indução de SCE, não é o ruído de baixa frequência isoladamente, mas sim ou a vibração de corpo inteiro *per se* ou a acção conjunta de ambos os agentes. Provou-se igualmente que o ratinho constitui um modelo experimental útil e fidedigno, permitindo assim estudos futuros mais detalhados sobre os efeitos genéticos destes agentes físicos.

4. Conclusões

Os resultados do presente estudo vieram confirmar os de trabalhos anteriores do grupo, em que se verificou que a exposição prolongada a RBF e VCI determina um aumento dos níveis de SCE nos linfócitos de indivíduos ocupacionalmente expostos.

Provaram também que o efeito é extensivo a ratinhos expostos aos mesmos estímulos em condições controladas, sugerindo tratar-se de uma resposta celular generalizada a áqueles agentes.

Apesar de os mecanismos da sua formação não serem ainda bem compreendidos, as SCE são consideradas um bom marcador de exposição, isto é, o seu aumento é uma indicação de dano genético. Contudo, não existe uma associação directa entre a indução de SCE e um efeito celular adverso ou na saúde, incluindo o desenlace de cancro.

Considerando que os agentes físicos estudados podem afectar uma proporção significativa de trabalhadores, torna-se importante aprofundar os estudos de genotoxicidade, quer alargando-os a outras populações expostas quer à análise de outros parâmetros genéticos.

5. Agradecimentos

Os autores desejam expressar o seu agradecimento aos Professores Nuno Nunes e Bento Coelho pelo planeamento e calibração dos aparelhos de produção de vibração e de ruído, ao Sr. Carlos Lopes pela manutenção dos animais, à A.P.P.L.A. (Associação de Pilotos Portugueses de Linhas Aéreas) pela concessão de uma bolsa de estudo a um dos autores e ainda a todos quantos participaram nos trabalhos aqui apresentados.

Abreviaturas

dB	- decibel
DP	- desvio padrão
ERP	- potenciais evocados
FISH	- hibridação <i>in situ</i> por fluorescência
HFCs	- células com alta frequência de SCE
Hz	- Hertz
ICRP	- International Commission on Radiological Protection
IR	- índice replicativo
LET	- transferência linear de energia
mFISH	- FISH multicor
MN	- micronúcleo(s)
OGMA	- Oficinas Gerais de Material Aeronáutico
OSHA	- Occupational Safety and Health Administration
RBF	- ruído de baixa frequência
ROS	- espécies reactivas de oxigénio
SCE	- trocas de cromátidos irmãos
VAD	- síndrome vibroacústico
VCI	- vibração de corpo inteiro

6. Referências bibliográficas

- Akerlund E, Löfstedt P, Landström U, Kjelberg A. Low frequency noise and annoyance in working environments. *J. Low Frequency Noise Vib.*, 9 (1990) 61-65.
- Alvarez S, Boveris A. Antioxidant adaptive response in human blood mononuclear cells exposed to UVB. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 38 (1997) 152-157.
- Alves-Pereira M. Noise-induced extra-aural pathology: a review and commentary. *Aviat. Space Environ. Med.*, 70, Section II, Suppl. (1999) A7-A21.
- Amstad PA, Krupitza G, Cerruti PA. Mechanisms of c-fos induction by active oxygen. *Cancer Res.*, 52 (1992) 3952-3956.
- Araki S, Murata K, Yokoyama K Assessment of central, peripheral, and autonomic nervous system functions in vibrating tool operators: neuroelectrophysiology studies. *Environ. Res.*, 62 (1993) 272-282.
- Au W., Obergonner N., Goldenthal K., Corry P., Willingham V. Sister chromatid exchanges in mouse embryos after exposure to ultrasound in utero. *Mutation Res.*, 103, (1982) 315-320.
- Backup P., Westerlind K., Harris S., Spelsberg T., Kline B., Turner, R. Spaceflight results in reduced mRNA levels for tissue specific proteins in the musculoskeletal system. *Am. J. Physiol.*, 266 (1994) E567-E573.
- Baghdassarian N, Peiretti A, Devaux E, Bryon PA, M. French M. Involvement of p27Kip1 in the G1- and S/G2-phase lengthening mediated by glucocorticoids in normal human lymphocytes. *Cell Growth Differ.*, 10 (1999) 405-412.
- Bagshaw M, Irvine D, Davies DM. Exposure to cosmic radiation of British Airways flying crew on ultralonghaul routes. *Occup. Environ. Med.*, 53 (1996) 495-498.
- Bali D, Singh JR, Singh H, Sandhu D. In vitro and in vivo genotoxicity evaluation of hormonal drugs. I. Hydrocortisone. *Environ. Mol. Mutagen.*, 16 (1990) 250-254.
- Band PR, Nhu DL, Frang R, Deschamps M, Coldman AJ, Gallagher RP, Moody J. Cohort study of Air Canada pilots: mortality, cancer incidence, and leukemia risk. *Am. J. Epidemiol.*, 143 (1996) 137-143.
- Bauchinger, M., R., Hauf, E. Schmid and J. Dresch. Analysis of structural chromosome changes and SCE after occupational long-term exposure to electric and magnetic fields from 380 KV- systems. *Radiat Environ. Biophys.*, (1981) 235-238.
- Bender MA, Awa AA, Brooks AL, Evans HE, Groer PG, Littlefield JG, Pereira C, Preston RJ, Wachholz BW. Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation. *Mutation Res.*, 196 (1988) 103-159.
- Bender MA, Preston RJ, Leonard RC, Pyatt BE, Gooch PC. On the distribution of spontaneous SCE in human peripheral blood lymphocytes. *Mutation Res.*, 281 (1992) 227-232.
- Bento Coelho JL, Ferreira A, Serrano J, Castelo Branco NAA. Noise assessment during aircraft run-up procedures. *Aviat. Space Environ. Med.*, 70, Section II, Suppl. (1999) A22-A26.
- Benz, RD, Carsten AL. Effects on dominant lethal mutation, multigeneration prosperity and bone marrow sister chromatid exchanges and cell cycle time by 60 Hz, 50 KV/m: 10 Gauss electric/magnetic fields in two strains of mice. *Environ. Mutagen.*, (1986) 10-11.
- Berglund B, Hassemén P, Soames RF. Sources and effects of low-frequency noise. *J. Acoust. Soc. Am.*, 99 (1996) 2985-3002.
- Bonassi S, Fontana V, Ceppi M, Barale R, Biggeri A. Analysis of correlated data in human biomonitoring studies. The case of sister chromatid exchange frequency cells. *Mutation Res.*, 438 (1999) 13-21.
- Bovenzi M, Hulshof CT. An updated review of epidemiologic studies on the relationship between exposure to whole-body vibration and low back pain (1986-1997). *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 72 (1999) 351-358.
- Bramlitt ET. Commercial aviation crewmember radiation doses. *Health Phys.*, 49 (1985) 945-948.
- Braselman H, Schmid E, Bauchiger M. Chromosome aberrations in nuclear power plant workers: the influence of dose accumulation and lymphocyte life-time. *Mutation Res.*, 306 (1994) 197-202.

- Burdorf A, Monster A. Exposure to vibration and self-reported health complaints of riveters in the aircraft industry. *Ann. Occup. Hyg.*, 35 (1991) 287-298.
- Cadet J. DNA damage caused by oxidation, deamination, ultraviolet radiation and photo excised psoralens, in: K. Hemminki, A. Dipple, D. Shuker, F.F. Kadublar; D. Segerback, H. Bartsch (eds), DNA adducts: identification and biological significance. IARC Scientific Publications N° 125, Lyon, 245-276.
- Cant S.M., Breyesse P.A. Aircraft noise induced vibration in fifteen residences near Seattle-Tacoma International Airport, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 34 (1973) 463-468.
- Carrano A.V. (1982) Sister chromatid exchange as an indicator of human exposure, in: B.A. Bridges, B.E. Butterworth, I.B. Weinstein (eds) Banbury Report 13: Indicators of genotoxic exposure, Cold Spring Harbour, NY, 307-318.
- Castelo-Branco NAA (1999) The clinical stages of vibroacoustic disease. *Aviat. Space Environ. Med.*, 70, Section II, suppl.: A32-A39.
- Castelo Branco NAA, Rodriguez E. The vibroacoustic disease – an emerging pathology. *Aviat. Space Environ. Med.*, 70, Section II, Suppl. (1999) A1-A6.
- Cohen M.M., Kunska J.A., Astemborski J.A., McCulloch. The effect of low-level 60 Hz electromagnetic fields on human lymphoid cells. II sister chromatid exchanges in lymphocytes and lymphoblastoid cell lines, *Mutation Res.*, 172 (1986a) 177-184.
- Cohen. M.M., Kunska J.A., Astemborski D., McCulloch A., Paskewitz D.A. Effect of low-level 60-Hz electromagnetic breakage in human peripheral lymphocytes, *Bioelectromagnetics*, 7 (1986 b) 415-423.
- Davis RR, Cheever ML, Krieg EF, Erway CLC. Quantitative measure of genetic differences in susceptibility to noise-induced hearing loss in two strains of mice, *Hear. Res.*, 134 (1999) 9-15
- Dhilon VS, Dhilon IK. Genotoxicity evaluation of norethisterone acetate, *Mutation Res.*, 367 (1996) 1-10.
- Dicarlo AL, Hargis MT, Penafiel LM, Litovitz TA. Short-term magnetic field exposures (60 Hz) induce protection against ultraviolet radiation damage, *Int. J. Radiat. Biol.*, 75 (1999) 1541-1549.
- Edwards AA. The use of chromosomal aberrations in human lymphocytes for biological dosimetry, *Radiat. Res.*, 148 (1997) S39-S44.
- Evans HJ, Buckton KE, Hamilton GE, Carothers A. Radiation-induced chromosome aberrations in nuclear dockyard workers, *Nature* 277 (1979) 531-534.
- Fenech M, Morley AA Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Res.*, 161 (1986) 193-198.
- Fidell S, Pearsons K, Tabachnick B, Howe R, Silvati L, Barber D. S. Field study of noise-induced sleep disturbance, *J. Acoust. Soc. Am.*, 98 (1995) 1025-1033.
- Fischman HK, Kelly DD. Chromosomes and stress, *Int. J. Neurosci.*, 99 (1999) 201-219.
- Fischman HK, Pero RW, Kelly DD. Psychogenic stress induces chromosomal and DNA damage, *Int. J. Neurosci.*, 84 (1996) 219-227.
- Fitzgerald J, Hughes-Fulford M. Gravitational loading of a simulated launch alters mRNA expression in osteoblasts, *Exp. Cell Res.*, 228 (1996) 168-171.
- Friedberg W, Duke FE, Snyder L, Faultner DN, O'Brien K, Darden Jr. EB, Parker DE. The cosmic radiation environment at air carrier flights altitude and possible associated health risks, *Radiat. Prot. Dosim.*, 48 (1993) 21-25.
- Garaj-Vrhovac, V., D. Horvat and Z. Koren. The relationship between colony-forming ability, chromosome aberrations and incidence of micronuclei in V79 chinese hamster cells exposed to microwave radiation, *Mutation Res.*, 263 (1991) 143-149.
- Goldstone SD, Hunt NH. Redox regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway during lymphocyte activation, *Biochim. Biophys. Acta*, 1355 (1997) 353-360
- Gomes JMP, Martinho Pimenta AJF, Castelo Branco NAA. Effects of occupational exposure to low frequency noise on cognition, *Aviat. Space Environ. Med.*, 70, Section II, Suppl. (1999) A115- A118.
- Grande NR, Águas A, de Sousa Pereira A, Monteiro E, Castelo Branco NAA Morphologic changes in rat lung parenchyma exposed to low frequency noise, *Aviat. Space Environ. Med.*, 70, Section II, Suppl. (1999) A70-A77.
- Grayson JK, Lyon TJS. Cancer incidence in United States Air Force Aircrew, 1975-89, *Aviat. Space Environ. Med.*, 67 (1996) 101-104.
- Greulich KM, Kreja L, Heinze B, Rhein AP, Weier HUG, Brückner M, Fuchs P, Molls M. Rapid detection of radiation-induced chromosomal aberrations in lymphocytes and hematopoietic progenitor cells by mFISH, *Mutation Res.*, 452 (2000) 73-81.
- Han ZB, Ishizaki K, Nishizawa K, Kato T, Todo T, Ikenaga M. A genetic effect of altered gravity: mutations induced by simulated hypogravity and hypergravity in microsatellite sequences of human tumour cells, *Mutation Res.*, 426 (1999) 1-10.
- Haupt M, Martin N, Simpson JL, Iqbal S, Dyer A. Ultrasonic induction of sister chromatid exchanges in human lymphocytes, *Hum. Genet.*, 59 (1981) 221-226.
- Heimers A, Schröder H, Lengfelder E, Schmitz-Feuerhake I. Chromosome aberration analysis in aircrew members. *Radiat. Protect. Dosim.*, 60 (1995) 171-175.
- Heimers A. Chromosome aberration analysis in Concorde pilots, *Mutation Res.*, 467 (2000) 169-176.
- Heimers A. Cytogenetic analysis in human lymphocytes after exposure to simulated cosmic radiation which reflects the inflight radiation environment, *Int. J. Radiat. Biol.*, 75 (1999) 691-698.
- Helmkamp JC, Talbott EO, Marsh GM. Whole-body vibration – a critical review, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 45 (1984) 162-167.
- Hoogendoorn WE, Van Poppel MN, Bongers PM, Koes BW, Bouter LM. Physical load during work and leisure time as risk factors for back pain, *Scand. J. Work Environ. Health*, 25 (1999) 387-403.
- Hundal BS, Dhilon VS, Sidhu IS. Genotoxic potential of estrogens, *Mutation Res.*, 389 (1997) 173-181.
- Husum B., Wulf H.C., Niebuhr E. Increased sister chromatid exchange frequency in lymphocytes of healthy cigarette smokers, *Hereditas*, 96 (1982) 85-88.
- International Commission on Radiological Protection (1991) Recommendation of the International Commission on Radiological Protection, ICRP publication 60, Pergamon press, Oxford.
- Irvine D, Davies M. The mortality of British Airways pilots, 1966-1989: a proportional mortality study, *Aviat. Space Environ. Med.*, 63 (1992) 276-279.
- Jaron D., Lewin P.A. Preface, *Aviat. Space Environ. Med.*, 70, Section II, Suppl. (1999) v.
- Joseph-Lerner N, Fejgin M, Ben-Nun I, Legum C, Amiel A. The correlation between the frequency of sister-chromatid exchange and human reproductive hormones, *Mutation Res.*, 300 (1993) 247-252.
- Kasperk C, Schneider U, Sommer U, Niethard F, Ziegler R. Differential effects of glucocorticoids on human osteoblastic cell metabolism in vitro, *Calcif. Tissue Int.*, 57 (1995) 120-126.
- Kato H. Induction of sister chromatid exchanges by UV light and its inhibition by caffeine. *Exp. Cell Res.*, 82 (1973) 383-390.
- Khalil AM, Qassem W. Cytogenetic effects of pulsing electromagnetic field on human lymphocytes in vitro: chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and cell kinetics, *Mutation Res.*, 247 (1991) 141-146.
- Khalil AM, Qassem W. A search for possible cytogenetic effects of low frequency vibrations in cultured human lymphocytes, *Hum. Exp. Toxicol.*, 15 (1996) 504-507.
- Knipschild P. (1980) Aircraft noise and hypertension, in: Noise as a public health problem, ed. Tobias J.V., Jansen G., Ward W.D. (ASHA reports, Rockville, MD), no. 10, 8-88.
- Kumei Y., Nakajima T., Sato A, Kamata N., Enomoto S.. Reduction of G1 phase duration and enhancement of c-myc gene expression in HeLa cells at hypergravity, *J. Cell Sci.*, 93 (1989) 221-226.
- Lantos P. The sun and its effect on the terrestrial environment, *Radiat. Prot. Dosim.*, 48 (1993) 27-32.
- Lehert S. Gene induction and adaptive responses in irradiated cells: mechanisms and clinical implications, *Radiat. Res.*, 141 (1995) 108-123.

- Littlefield LG, Colyer SP, Joiner EE, DuFrain RJ. Sister chromatid exchanges in human lymphocytes exposed to ionizing radiation during Go. *Radiat. Res.*, 78 (1979) 514-521.
- Livingston GK, Witt KL, Gandhi OP, Chatterjee I, Roti Roti JL. Reproductive integrity of mammalian cells exposed to power electromagnetic fields. *Environ. Mol. Mutagen.*, 12 (1991) 209-217.
- Lloyd DC, Edwards AA, Prosser JS. Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by in vitro acute X and gamma radiation. *Radiat. Prot. Dosim.*, 15 (1986) 83-88.
- Lloyd DC, Purrot RJ, Reeder EJ. The incidence of unstable chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes from unirradiated and occupationally exposed people. *Mutation Res.*, 72 (1980) 523-532.
- Lucas JN. Chromosome translocations: a biomarker for retrospective biodosimetry. *Environ. Health Perspect.*, 105 (1997) S1433-S1436.
- Lundberg M, Jerominski L, Lee T, Fineman R. Failure to demonstrate an effect of in vivo diagnostic ultrasound on sister chromatid exchange frequency in amniotic fluid cells. *Am. J. Med. Genet.*, 11 (1982) 31-37.
- Lundström RU, Landström U, Kjelberg A. Combined effects of low-frequency noise and whole body vibration on wakefulness, annoyance and performance. *A. C. E. S.*, 2 (1990) 1-7.
- Lynge E. Risk of breast cancer is also increased among Danish female airline cabin attendants. *B.M.J.*, 312 (1996) 253.
- Maes A, Vershaeve L, Arroyo A, de Wagter C, Verduyssen L. In vitro cytogenetic effects of 2450 Hz waves on human peripheral blood lymphocytes. *Bioelectromagnetics*, 14 (1993) 495-501.
- Marcianik W, Rodríguez E, Olszowska K, Atkov O, Botvin I, Araujo A, Pais F, Soares Ribeiro C., Bordalo A., Loureiro J., Prazeres de Sá E., Ferreira D., Castelo Branco MSN, Castelo Branco NA. Echocardiographic evaluation in 485 aeronautical workers exposed to different noise environments. *Aviat. Space Environ. Med.*, 70, Section II, Suppl. (1999) A46-A51.
- Martinho Pimenta AJF, Castelo Branco NA. Neurological aspects of vibracoustic disease. *Aviat. Space Environ. Med.*, 70, Section II, Suppl. (1999) A91-A95.
- May J. Occupational hearing loss. *Am. J. Ind. Med.*, 37 (2000) 112-120.
- McKenna K.M., Mc Grann S., Allen J.A. An investigation into the acute vascular effects of riveting. *Br.J. Ind. Med.*, 50 (1993) 160-166.
- Milanov L, Dimitrov D, Danon S. Cancer incidence in Republic of Bulgaria aircrew, 1964-1994. *Aviat. Space Environ. Med.*, 70 (1999) 681-685.
- Miller MW, Wolff S, Filly R, Cox C, Carstensen FL. Absence of an effect of diagnostic ultrasound on sister chromatid exchange induction in human lymphocytes. *Mutation Res.*, 120 (1983) 261-268.
- Mitchell DL, Nairn RS. The biology of the (6-4) photoproduct. *Photoch. Photobiol.*, 49 (1989) 805-819.
- Murthy PBK, Prema K. Further studies on sister chromatid exchange frequency in users of hormonal contraceptives. *Mutation Res.*, 119 (1983) 351-354.
- Nakamura H, Katoh A, Nohara S, Nakamura H, Okada A. Experimental studies on the pathogenesis of the gastric mucosal lesions induced by whole-body vibration. *Environ. Res.*, 58 (1992) 220-229.
- Nakamura H, Moroji T, Nohara S, Nakamura H, Okada A. Effects of whole-body vibration stress on substance-P and neurotensin-like immunoreactivity in the rat brain. *Environ. Res.*, 52 (1990) 155-163.
- Nakamura H, Moroji T, Nohara S, Nakamura H, Okada A. Activation of cerebral dopaminergic systems by noise and whole-body vibration. *Environ. Res.*, 57 (1992) 10-18.
- Nakamura H, Nagase H, Miura K, Hunma T, Nohara S, Nakamura H, Okada A. Behavioral and neuroendocrine changes under chronic exposures to noise and whole-body vibration. *A. C. E. S.*, 3 (1991) 37-47.
- Natarajan AT (1984) Origin and significance of chromosomal alterations. in: G. Obe (ed.), *Mutation in Man*, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York/Tokyo.
- NCRP, National Council on Radiation Protection and Measurements (1995) Commentary 12. Radiation exposure and high-altitude flight. NCRP, Bethesda, MD.
- Nicholas JS, lackland DT, Butler GC, Mohr LC, Dunbar JB, Kaune WT, Grosche B, Hoel DG. Cosmic radiation and magnetic field exposure to airline flight crews. *Am. J. Indust. Med.*, 34 (1998) 574-580.
- Nordenson, I, Mild KH, Nordstrom S, Sweins A, Birke E. Clastogenic in human lymphocytes of power frequency electric fields; in vivo and in vitro studies. *Radiat. Environ. Biophys.*, 23, (1984) 191-201.
- Nordenson, I., K.H. Mild, U. Ostman and H. Ljungherg. Chromosomal effects in lymphocytes of 400KV - substation worker. *Radiat Environ. Biophys.*, 27 (1988) , 39-47.
- Nose K, Shibanuma M. Induction of early response genes by hypergravity in cultured mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1). *Exp. Cell. Res.*, 211 (1994) 168-170.
- Occupational Safety and Health Administration. Noise measurement. Technical Manual, Section II, Chapter 5. Washington DC: US Department of labor, 1996.
- Ohlemiller KK, Wright JS, Dugan LL. Early elevation of cochlear reactive oxygen species following noise exposure. *Audiol. Neurootol.*, 4 (1999) 229-236.
- Passchier-Vermeer W, Passchier WF. Noise exposure and public health. *Environ. Health Persp.*, 108, suppl. 1 (2000) 123-131.
- Pekkarinen J. Noise, impulse noise, and other physical factors: combined effects on hearing. *Occup. Med.*, 10 (1995) 545-559.
- Perry P, Wolff S. New Giemsa method for differential staining of sister chromatids. *Nature*, 261 (1974) 156-158.
- Ponzanelli I, Landi S, Bernacchi F, Barale R. The nature of high frequency sister chromatid exchange cells (HFCs). *Mutagenesis*, 12 (1997) 329-333.
- Pukkaia E, Auvinen A, Wahlberg G. Incidence of cancer among Finnish airline cabin attendants, 1967-92. *B.M.J.*, 311 (1995) 649-652.
- Randall JM, Matthews RT, Stiles MA. Resonant frequencies of standing humans, 40 (1997) 879-886.
- Reichardt HM, Tronche F, Bauer A, Schutz G. Molecular genetic analysis of glucocorticoid signaling using the Cre/loxP system. *Biol. Chem.*, 381 (2000) 961-964.
- Romano E, Ferrucci L, Nicolai F, Derme V, De Stefano GF. Increase of chromosomal aberrations induced by ionising radiation in peripheral blood lymphocytes of civil aviation pilots and crew members. *Mutation Res.*, 377 (1997) 89-93.
- Salisbury DA, Band PR, Threlfall WJ, Gallagher RP. Mortality among British Columbia pilots. *Aviat. Space Environ. Med.*, 62 (1991) 351-352.
- Sarkar, S., S. Ali and J. Behari. Effect of low power microwave on the mouse genome: a direct DNA analysis. *Mutation Res.*, 320 (1994) 141-147.
- Savage JR. Classification and relationship of induced chromosomal structural changes. *J. Med. Genet.*, 12 (1975) 103-122.
- Scheid W, Weber J, Traut H, Gabriel HG. Biological and physical dosimetry after chronic occupational exposure to ionizing radiation: a comparative study. *Studia Biophys.*, 138 (1990) 205-212.
- Scheid W, Weber J, Traut H, Gabriel HW. Chromosome aberrations induced in the lymphocytes of pilots and stewardesses. *Naturwissenschaften*, 80 (1993) 528-530.
- Seidel H, Harazin B, Pavlas K, Sroka C, Richter J, Bluthner R, Erdmann U, Grzesik J, Hinz B, Rother R. Isolated and combined effects of prolonged exposures to noise and whole-body vibration on hearing, vision and strain. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 61 (1988) 95-106.
- Seidel H. Selected health risks caused by long-term whole-body vibration. *Am. J. Ind. Med.*, 23 (1993) 589-604.
- Shetlar M.D. Cross-linking of protein to nucleic acids by ultraviolet light. *Photochem. Photobiol. Rev.*, 5 (1980) 107-197.
- Silva MJ, Carothers A, Castelo Branco N, Dias A, Boavida MG. Increased levels of sister chromatid exchanges in military aircraft pilots. *Mutation Res.*, 441 (1999) 129-134.
- Silva MJ, Carothers A, Castelo Branco N, Dias A, Boavida MG. Sister chromatid exchange analysis in workers exposed to noise and vibration. *Mutation Res.*, 369 (1996) 113-121.

- Silva MJ, Carothers A, Dias A, Luis JH, Piper J, Boavida MG. Dose dependence of radiation-induced micronuclei in cytokinesis-blocked human lymphocytes, *Mutation Res.*, 322 (1994) 117-128.
- Skyberg K, Hansteen IL, Vistnes AI. Chromosome aberrations in lymphocytes of high-voltage-laboratory cable splicers exposed to electromagnetic fields, *Scand. J. Work Environ. Health*, 19 (1993) 29-34.
- Sobrian SK, Vaughn VT, Ashe WK, Markovic B, Djuric V, Jankovic BD. Gestational exposure to loud noise alters the development and postnatal responsiveness of humoral and cellular components of the immune system in offspring, *Environ. Res.*, 73 (1997) 227-241.
- Soldani P, Gesi M, Lenzi P, Natale G, Fornai F, Pellegrini A, Ricciardi MP, Papparelli A. Long-term exposure to noise modifies rat adrenal cortex ultrastructure and corticosterone plasma levels, *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 31 (1999) 441-448.
- Soldani P, Pellegrini A, Gesi M, Lenzi P, Cristofani R, Papparelli A. SEM/TEM investigation of rat cardiac subcellular alterations induced by changing duration of noise stress, *Anat. Rec.*, 248 (1997) 521-532.
- Sonneborn JS. Stress protein response in hormesis, in: EJ Calabrese (ed.) *Biological Effects of Low Level Exposures to Chemicals and Radiation*, Lewis Publishers, Chelsea (1992) 41-52.
- Sonneborn JS, Barbee SA. Exercise-induced stress response as an adaptive tolerance strategy, *Environ. Health Perspect.*, 106, Suppl. 1 (1998) 325-330.
- Sonoda E, Sasaki MS, Morrison C, Yamaguchi-Iwai Y, Takata M, Takeda S. Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells, *Mol. Cell Biol.*, 19 (1999) 5166-5169.
- Stella M, Trevisan L, Montaldi A, Zaccaria G, Rossi G, Bianchi V and Levis AG. Induction of sister chromatid exchanges in human lymphocytes exposed in vitro and in vivo to therapeutic ultrasound, *Mutation Res.*, 138 (1984) 75-85.
- Straume T, Bender MA. Issues in Cytogenetic Biological Dosimetry: emphasis on radiation environments in space, *Radiat. Res.*, 148 (1997) S60-S70.
- Tates AD, Grummt T, van Dam FJ. Measurement of frequencies of HPRT mutants, chromosomal aberrations, micronuclei, sister chromatid exchanges and cells with high frequencies of SCE in styrene/dichloromethane-exposed workers, *Mutation Res.*, 313 (1994) 249-262.
- Tjandrawinata RR, Vincent VL, Hughes-Fulford M. Vibrational forces alters mRNA expression in osteoblasts, *FASEB J.*, 11 (1997) 493-497.
- Trosko JE. Hierarchical and cybernetic nature of biological systems and their relevance to homeostatic adaptation to low-level exposures to oxidative stress-inducing agents, *Environ. Health Perspect.*, 106, Suppl. 1 (1998) 331-337.
- Tucker JD, Auletta A, Cimino MC, Dearfield KL, Jacobson-Kram D, Tice RR, Carrano AV. Sister-chromatid exchange: second report of the Geno-Tox Program, *Mutation Res.*, 297 (1993) 101-180.
- Tucker JD, Preston RJ. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment, *Mutation Res.*, 365 (1996) 147-159.
- Vallyathan V, Shi X, Castranova V. Reactive oxygen species: their relation to pneumoconiosis and carcinogenesis, *Environ. Health Perspect.*, 106, Suppl. 5 (1998) 1151-1155.
- Van Raaij MTM, Oortgiesen M. Noise stress and airway toxicity: a prospect for experimental analysis, *Food Chem. Toxicol.*, 34 (1996) 1159-1161.
- Wazieres B, Spehner V, Harraga S, Laplante F, Corallo F, Bloch Ch, Dupond JL, Vuitton DA, Seillès E. Alteration in the production of free oxygen radicals and proinflammatory cytokines by peritoneal and alveolar macrophages in old mice and immunomodulatory effect of RU 41740 administration. Part I: Effect of short and repetitive noise stress, *Immunopharmacology*, 39 (1998) 51-59.
- Windle RJ, Wood S, Shanks N, Perks P, Cone GL, Costa AP, Ingram CD, Lightman SL. Endocrine and behavioural responses to noise stress: comparison of virgin and lactating female rats during non-disrupted maternal activity, *J. Neuroendocrinol.*, 9 (1997) 407-414.
- Windle RJ, Wood SA, Lightman SL, Ingram CD. The pulsatile characteristics of hypothalamo-pituitary-adrenal activity in female Lewis and Fischer 344 rats and its relationship to differential stress responses, *Endocrinology*, 139 (1998) 4044-4052.
- Witkin E.M. Ultraviolet mutagenesis and the SOS response in *Escherichia coli*: a personal perspective, *Environ. Mol. Mutag.*, 14, Suppl. 16 (1989) 30-34.
- Wolf G, Piper R, G. Obe. Chromosomal alterations in peripheral lymphocytes of female cabin attendants, *Int. J. Radiat. Biol.*, 75 (1999) 829-836.
- Wolf S, Bodycote J, Painter RB. Sister chromatid exchanges induced in chinese hamster cells by UV irradiation of different stages of the cell cycle: the necessity for cells to pass through S, *Mutation Res.*, 25 (1974) 73-81.
- Yager JW, Paradisin WM, Rappaport SM. Sister chromatid exchanges in lymphocytes are increased in relation to longitudinally measured occupational exposure to low concentrations of styrene, *Mutation Res.*, 319 (1993) 155-165.
- Yaguchi H, Yoshida M, Ejima Y, Miyakoshi J. Effect of high-density extremely low frequency magnetic field on sister chromatid exchanges in mouse m5S cells, *Mutation Res.*, 440 (1999) 189-194.
- Yamamoto K, Dang QN, Kennedy SP, Osathanondh R, Kelly RA, Lee RT. Induction of tenascin-c in cardiac myocytes by mechanical deformation, role of reactive oxygen species, *J. Biol. Chem.*, 274 (1999) 21840-21846.
- Yamasoba T, Schacht J, Shoji F, Miller JM. Attenuation of cochlear damage from noise trauma by an iron chelator, a free radical scavenger and glial cell line-derived neurotrophic factor in vivo, *Brain Res.*, 815 (1999) 317-325.
- Zhao Y, Zhang S, Selin S, Spear RCA. A dose-response relation for noise induced hypertension, *Br. J. Ind. Med.*, 48 (1991) 179-184.
- Zwengelberg R, Obe G, Rosenthal M, Mevissen M, Buntenkotter S, Loscher W. Exposure of rats to a 50 Hz, 30-mT magnetic field influences neither the frequencies of sister chromatid exchanges nor proliferation characteristics of cultured peripheral lymphocytes, *Mutation Res.*, 302, (1993) 39-44.
- Zwingmann IH, Welle IJ, Van Herwijnen M, Engelen JJM, Schilderman PAEL, Smid TJ, Kleinjans JCS. Oxidative DNA damage and cytogenetic effects in flight engineers exposed to cosmic radiation, *Environ. Mol. Mutagen.*, 32 (1998) 121-129.

Bibliografia publicada noutros periódicos, por investigadores e técnicos do INSA

Papers published by INSA staff in other scientific journals

2001

Artigos publicados em revistas internacionais

Doenças infecciosas:

BORREGO, M.J.; FERREIRA, M.A.; LAMARÃO P.; CATRY, M.A. – Serology for *Chlamydia trachomatis* in a reinfected population. *Sex. Transm. Infect.* 2001; (suppl 2): 87-91

CORDEIRO, M. – The impact of the National Programme of Immunization in Portugal. *New Developments in Vaccine Res. Dis. Surveill.* 2001; 1: 9-15

FÉRIA, C.; MACHADO, J.; CORREIA, J.D.; GONCALVES, J.; GAASTRA, W. – Virulence genes and P fimbriae PapA subunit diversity in canine and feline uropathogenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol.* 2001; 82: 81-9

FÉRIA, C.; MACHADO, J.; DUARTE CORREIA, J.; GONCALVES, J.; GAASTRA W. – Distribution of *papG* alleles among uropathogenic *Escherichia coli* isolated from different species. *FEMS Microbiol Lett.* 2001; 202: 205-8

FERREIRA, F.M.; BEZERRA, L.; SANTOS, M.B.; BERNARDES, R.M.; AVELINO, I.; SILVA, M.L. – Intestinal microsporidiosis: a current infection in HIV-seropositive patients in Portugal. *Microbes Infect.* 2001; 3: 1015-9

GOMES, J.P.; CATRY, M.A.; SANTO, I.; AZEVEDO, J.; CARDOSO, J. – Comparison of the Gen-Probe Amplified CT Assay and PCR for the detection of *Chlamydia trachomatis* in urine samples. *Sex. Transm. Infect.* 2001; (suppl 2): 39-42

GOMES, J.P.; FERREIRA, M.A.; BRITO DE SÁ, A.; CATRY, M.A. – Pooling urine samples for PCR screening of *Chlamydia trachomatis* urogenital infection in women. *Sex. Transm. Infect.* 2001; 77: 76-7

GOMES, J.P.; TAVIRA, L.; EXPOSTO, F.; PRIETO, E.; CATRY, M.A. – *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infections in patients attending STD and family planning clinics in Bissau, Guinea-Bissau. *Acta Trópica.* 2001; 80: 261-4

GONÇALVES, G.; SANTOS, M.A.; AFONSO, S.; CORREIA, A.M.; DANIEL PINHEIRO, C. – Portuguese study provides serological evidence to support vaccination of sex workers. *Eurosurveillance Weekly.* 2001; 16 December: 51

MELO-CRISTINO, J.; FERNANDES, M.L.; SERRANO, N. – The Portuguese Surveillance Group for the Study of Respiratory Pathogens. A multicenter study of the antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Moraxella catarrhalis* isolated from patients with community-acquired lower respiratory tract infections in 1999 in Portugal. *Microb Drug Resist.* 2001; 7: 33-8

MONTEIRO, L.; DE MASCAREL, A.; SARRASQUETA, A.-M.; BERGEY, B.; BARBERIS, C.; TAILBY, P.; ROUX, D.; SHOULER, L.; GOLDFAIN, D.; LAMOULIATTE, H.; MÉGRAUD, F. – Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: non-invasive methods compared to invasive methods and evaluation of the antigen stool test. *Am J Gastroenterol.* 2001; 96: 353-8

MONTEIRO, L.; GRAS, N.; VIDAL, R.; CABRITA, J.; MÉGRAUD, F. – Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human feces by PCR: DNA stability and removal of inhibitors. *J Microbiol Methods.* 2001; 45: 89-94

SALLES-MONTAUDON, N.; DERTHEIL, S.; BROUET, N.; MONTEIRO, L.; GRAS, N.; PEREIRA, E.; DE MASCAREL, A.; MÉGRAUD, F.; RAINFRAY, M.; EMERIAU, J.P. – Comment déterminer le diagnostic de l'infection à *Helicobacter pylori* chez la personne âgée? *Rev Méd Interne.* 2001; 22: 339-47

ZEIDNER, N.S.; NÚNCIO, M.S.; SCHNEIDER, B.S.; GERN, L.; PIESMAN, J.; BRANDÃO, O.; FILIPE, A.R. – A Portuguese isolate of *Borrelia lusitaniae* induces disease in C3H/HeN mice. *J Med Microbiol.* 2001; 50: 1055-60

Doenças crónico-degenerativas e genéticas:

ALBUQUERQUE-SILVA, J.; VASSART, G.; LAVINHA, J.; ABRAMOWICZ, M.J. – Chimeraplasty validation. *Nature Biotechnol.* 2001; 19: 1011

AMARAL, M.D.; PACHECO, P.; BECK, S.; FARINHA, C.M.; PENQUE, D.; NOGUEIRA, P.; BARRETO, C.; LOPES, B.; CASALS, T.; DAPENA, J.; GARTNER, S.; VÁSQUEZ, C.; PÉREZ-FRÍAS, J.; OLIVEIRA, C.; CABANAS, R.; ESTIVILL, X.; TZETIS, M.; KANAVAKIS, E.E.; DOUDOUNAKIS, S.; DÖRK, T.; TÜMMLER, B.; GIRODON-BOULANDET, E.; CAZENEUVE, C.; GOOSSENS, M.; BLAYAU, M.; VERLINGUE, C.; VIEIRA, I.; FÉRÉC, C.; CLAUSTRES, M.; DES GEORGES, M.; CLAVEL, C.; BIREMBAUT, P.; HUBERT, D.; BIENVENU, T.; ADOUN, M.; CHOMEL, J.-C.; DE BOECK, K.; CUPPENS, H.; LAVINHA, J. – Cystic fibrosis patients with the 3272-26A>G splicing mutation have milder disease than F508del-homozygotes: a large European study. *J Med Genet.* 2001; 38: 777-782

CLARKE, L.A.; REBELO, C.S.; GONÇALVES, J.; BOAVIDA, M.G.; JORDAN, P. – PCR amplification introduces errors into mononucleotide and dinucleotide repeat sequences. *Mol Pathol.* 2001; 54: 351-3

DAVID, D.; SAENKO, E.; SANTOS, A.I.M.; JOHNSON, D.; TUDDENHAM, E.G.D.; McVEY, J.H.; KEMBALL-COOK, G. – Stable recombinant expression and characterisation of the two haemophilic FVIII variants C329S (CRM) and G1948D (CRM). *Br. J. Haematol.* 2001; 113: 604-15

MATOS, P.; ISIDRO, G.; VIEIRA, E.; LACERDA, A.F.; MARTINS, A.G.; BOAVIDA, M.G. – P73 expression in neuroblastoma: A role in the biology of advanced tumours? *Pediatr Hematol Oncol.* 2001; 18: 37-40

SIEST, G.; BERTRAND, P.; QIM, B.; HERBETH, B.; SEROT, J. MARIE.; MASANA, L.; RIBALTA, J.; PERPASSMONE, A.; EVANS, A.; FERRARI, M.; FRANCESCHI, M.; SHEPHERD, J.; CUCHEL, M.; BEISIEGEL, U.; ZUCHOWSKY, K.; STAVLGENIC RUKAVINA, A.; SER-

TIC, J.; STOJANOV, M.; KOSTIC, V.; MITREVSKI, A.; PETROVA, V.; SASS, C.; MERCHED, A.; SALOMEN, J.; TIREL, L.; VISVIKIS, S. and THE APOEUROPE GROUP – Apolipoprotein E polymorphism and serum concentration in Alzheimer's disease in nine European centres, The ApoEurope Study. *Clin Chem Lab Med.* 2000; 38: 721-30

VERÍSSIMO, F.; JORDAN, P. – WNK kinases, a novel protein kinase subfamily in multi-cellular organisms. *Oncogene.* 2001; 20: 5562-9

VIEIRA, L.; OLIVEIRA, V.; AMBRÓSIO, A.P.; MARQUES, B.; PEREIRA, A.M.; HAGEMEIJER, A.; BOAVIDA, M.G. – Translocation t(8;17;15;21)(q22;q23;q15;q22) in acute myeloid leukemia (M2): a four-way variant of t(8;21). *Cancer Genet Cytogenet.* 2001; 28: 104-7

Problemas de saúde relacionados com o ambiente:

ALVERCA, E.; FRANCA, S.; DÍAZ DE LA ESPINA, S.M. – Organisation of spliceosomal RNP_s in dinoflagellate nuclei. *Biol Cell.* 2001; 93: 388-398.

FERREIRA, F.; SOLER, J.; FIDALGO, L.; FERNANDEZ P. – Toxins from *Aphanizomenon flos-aquae* (cyanobacteria) collected in the Crestuma-Lever reservoir (Douro river, northern Portugal). *Toxicol.* 2001; 39:747-61

LEWIS, J.; KENNAWAY, G.; FRANCA, S.; ALVERCA, E. – Bacterium-dinoflagellate interactions: investigative microscopy of *Alexandrium spp.* (Gonyaulacales, Dinophyceae). *Phycologia.* 2001; 40: 280-5

MAYAN, O.; HENRIQUES, A.; CALHEIROS, J. – Childhood lead exposure in Oporto, Portugal. *Int. J. Occup Environ Health.* 2001;7:128-35

MAYAN, O.; TEIXEIRA, J.; PIRES, A. – Biological monitoring of n-hexane exposure in Portuguese shoe manufacturing workers. *Appl Occup Environ Hyg.* 2001;16:1-6

Segurança alimentar e nutrição:

AMORIM CRUZ, J.A. – Nutrition and osteoporosis: facts and uncertainties about calcium and vitamin D recommendations. *Ann Nutr Metab.* 2001; 45 (suppl 1): 604

NORMAS PARA A PREPARAÇÃO DE MANUSCRITOS

Os «Arquivos do INSA» publicam artigos, onde se relatam e discutem os resultados de actividades de I&D, na área das Ciências da Saúde.

Os trabalhos deverão ser originais (isto é, nunca terem sido publicados, total ou parcialmente, e não terem sido simultaneamente submetidos a apreciação noutra revista nacional ou estrangeira).

Os manuscritos devem ser enviados à Direcção do INSA, que os remeterá ao Conselho Redactorial dos Arquivos, o qual, com base no parecer de, pelo menos, dois peritos, procederá ao respectivo encaminhamento.

Requisitos a que os manuscritos devem obedecer:

Texto em português ou inglês, dactilografado só de um lado, em papel branco, formato A4, a dois espaços, e com uma margem de ambos os lados da página (c. 2,5 cm).

Fazer acompanhar o original de duas cópias do mesmo.

Recomenda-se que o texto não exceda as 25 páginas, incluindo quadros e figuras.

As folhas serão numeradas, por ordem sequencial, no canto superior direito.

O texto deverá ter a seguinte estrutura: Autor, Título, Resumo, Introdução, Materiais e Métodos (incluindo, se aplicável, a caracterização da amostra populacional), Resultados, Discussão e Bibliografia.

1. APRESENTAR, EM FOLHAS SEPARADAS, OS SEGUINTE ELEMENTOS:

1.1 Identificação

- Título do artigo, que deverá ser curto
- Subtítulo, se se justificar
- Nome do(s) Autor(es), que deu(deram) contribuição material
- Organismo(s) em que o(s) Autor(es) exerce(m) a sua actividade

1.2 Resumo

- Em português e em inglês (Summary)
- Deve ser sucinto (máximo 200 palavras) e conter os seguintes elementos essenciais:
 - Objectivo do estudo em causa
 - Referência aos métodos nele utilizados
 - As principais conclusões
- O resumo em inglês deverá ser encabeçado pelo título do artigo, na mesma língua

1.3 Palavras-chave

- Fazer acompanhar os resumos de 3 a 5 palavras-chave (em português e inglês), as quais definam bem o conteúdo do artigo. Não esquecer que uma palavra-chave pode ser constituída por dois segmentos. Ex.: Rubéola-Epidemiologia.

1.4 Quadros

- Apresentação em folhas autónomas, com título e legenda próprias.
- Numeração individual, em números romanos.
- Recomenda-se que os quadros não sejam em número exagerado, e que cada um se baste a si próprio, sem recurso a quadros suplementares.
- Os quadros devem ser citados no texto.
- No verso de cada quadro, indicar a respectiva localização no texto.

1.5 Figuras

- De boa qualidade, que permita reprodução fotográfica.
- Numeração em algarismos árabes.
- Legendas em folhas A4, à parte.

Gráficos

A tinta da China preta, sobre papel vegetal ou produzidos em impressora de boa qualidade. Títulos e legendas, inscritos no verso de fotocópia dos mesmos.

Fotografias

A preto e branco, em papel brilhante, e com bom contraste. Não deixar impressões digitais.

N.B.: No verso de cada Quadro ou Figura deve ser colado um autocolante, com o nome do(s) Autor(es), o início do Título, número de ordem e localização, dentro do trabalho.

1.6 Agradecimentos

- Em poucas linhas, e apresentados também em folha à parte.

1.7 Bibliografia

- Referências bibliográficas, precedidas de um número de ordem sequencial.
- Este número será usado no texto, quando se fizer, a respectiva citação, de modo a remeter o leitor para a Bibliografia apresentada no final do artigo. Nunca repetir a referência em nota de rodapé.
- O título do periódico pode ser abreviado, de acordo com a norma internacional de abreviaturas, utilizada pelo Index Medicus.
- Utilizar a Norma Portuguesa NP-405-1 (IPQ).

2. NP-405-1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: DOCUMENTOS IMPRESSOS

EXEMPLIFICAÇÃO DE CASOS-TIPO MAIS FREQUENTES

2.1 Monografia (=Livro)

Com um Autor

LEVY, JAY A. — HIV and the pathogenesis of AIDS. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1994

Até três Autores

DHILLON, H.S.; PHILIP, L. — Health promotion and community action for health in developing countries. Geneva: WHO, 1994.

Mais de três Autores

MODELL, B.; et al.* — Les services génétiques au sein de la collectivité en Europe: rapport sur une enquête. Copenhague: OMS, Bureau Régional de l'Europe, 1993. (Série Européenne; 38).

Contribuições em monografias (Capítulos)

Faz-se a entrada pelo **Autor e Título do Capítulo** a referir, seguido de **In** e o **Autor principal da obra e respectivo Título da mesma, bem como as páginas-limite do Capítulo em questão.**

SCHEFLEN, A.E. — Systèmes de la communication humaine. In WINKIN, Yves — La nouvelle communication. Paris: Seuil, 1981, p. 145-57.

Colectividade — Autor

Quando é subordinada a outra colectividade, o nome dessa constará em primeiro lugar. Ministérios, órgãos legislativos, judiciais, administrativos, civis ou religiosos ficam subordinados à circunscrição territorial a que dizem respeito.

UNIVERSIDADE DE COIMBRA. Faculdade de Ciências. Departamento de Química — [... seguem-se os elementos duma referência bibliográfica (V. ex. 1.1)]

PORTUGAL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Saúde — [... seguem-se os elementos duma referência bibliográfica (V. ex. 1.1)]

* et al. = abreviatura da expressão latina «et alii», que significa «e outros».

2.2. Artigos de publicações em série (Periódicos)

Cumpra-se o estabelecido para as entradas de Autor (V. ex. 1.1 a 1.4), e usa-se a seguinte descrição bibliográfica, para todos os restantes elementos:

BOSHOFF, C.; et al. — Kaposi's sarcoma: associated herpesvirus infects endothelial and spindle cells. Nature Medicine. New York, N.Y.*. 1: 12 (1995), 1274-78.

2.3. Comunicações em congressos, jornadas, etc.

LECHNER, M.C. — Regulação da expressão de genes de citocromo P450 no fígado. In JORNADAS LUSO-ESPAÑOLAS DE GENÉTICA, 30.^{as}, Lisboa, 1995, p. C71.

[Caso idêntico ao das contribuições em monografias — (V. 1.4)]

Se se referir a publicação na totalidade, e não apenas parte:

JORNADAS LUSO-ESPAÑOLAS DE GENÉTICA, 30.^{as}, Lisboa, 1995 — Livro de Comunicações. Lisboa: Sociedade Portuguesa de Genética, 1995.

2.4. Abreviaturas¹

Definir as abreviaturas na sua primeira ocorrência no texto. Exemplo: «vírus da imunodeficiência humana (VIH)»

Podem utilizar-se, nos seguintes casos:

→ AUTORES, EDITORES LITERÁRIOS, etc.
Ex.: PIAGET, J.

→ ESTADOS, PROVÍNCIAS, PAÍSES, etc.²
Ex.: E.U.A., GB

→ TÍTULOS DE PERIÓDICOS³
Ex.: Clinical Chemistry
Clin. Chem.

Journal of Medical Genetics
J. Med. Genet.

→ PALAVRAS E TERMOS CORRENTES
Ex.: edição = ed.
página = p.
volume = vol.

3. SEPARATAS

Cada autor receberá 20 separatas grátis e 1 exemplar dos Arquivos.

4. ENDEREÇO EDITORIAL

Os manuscritos deverão ser enviados para:

Director do
Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
Av. Padre Cruz
1649-016 LISBOA

Telefone: 21 751 92 00
Telefax: 21 752 64 00
Conselho Redactorial: 21 751 93 18/81 (directo)

1. Consulte-se a NP-3680, 1989: Descrição e referências bibliográficas: abreviatura de palavras típicas.
2. O local de publicação é um elemento facultativo. Recomenda-se, no entanto, o seu uso, quando possa ocasionar dúvidas. Ex.: Cambridge (Inglaterra) — Cambridge, Massachusetts (Estados Unidos da América).
3. Aconselha-se consulta da lista de títulos do Index Medicus, contida na base de dados MEDLINE

