

## Biomonitorização humana e genotoxicidade ambiental: quatro décadas de investigação translacional sobre interação gene-ambiente e seu impacto em saúde pública

*Human biomonitoring and environmental genotoxicity: four decades of translational research on gene-environment interplay and its public health impact*

Henriqueta Louro, Célia Ventura, Nádia Vital, Ana Tavares, Maria João Silva

[m.joao.silva@insa.min-saude.pt](mailto:m.joao.silva@insa.min-saude.pt)

Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

### \_Resumo

A exposição a agentes químicos, físicos e biológicos é ubiqüitária e pode ter impacto na saúde humana. A biomonitorização humana (BMH) tem assumido um crescente papel de relevo na avaliação da exposição humana a esses xenobióticos, na medida em que permite quantificar a exposição interna aos agentes em estudo, bem como avaliar precocemente os seus efeitos. Desde a sua formação no Departamento de Genética Humana que o grupo de investigação em Toxicologia Genética tem conduzido estudos de BMH, maioritariamente em ambiente ocupacional. Os diversos estudos, revisitados neste trabalho, têm fornecido suporte para a recomendação de medidas de mitigação, dado que têm permitido identificar precocemente efeitos genotóxicos associados à exposição, efeitos esses que se poderão traduzir em doença, a longo prazo. Contudo, considerando a sua logística complexa, morosidade e custos, a investigação paralela recorrendo a modelos experimentais *in vitro* ou *in vivo* tem sido crucial para a caracterização da genotoxicidade de químicos e para elucidar os mecanismos associados, para além de alicerçar o desenvolvimento de novos biomarcadores de efeito, baseados em abordagens mecanísticas e com recurso a tecnologias mais avançadas. Globalmente, a investigação nesta área tem progredido no sentido de uma crescente capacidade preventiva e preditiva, indissociável das prioridades da Genética Humana, encontrando tradução em regulamentação e no apoio a novas políticas de saúde e ambiente, com ganhos em saúde pública.

### \_Abstract

*Exposure to chemical, physical, and biological agents is ubiquitous and can impact human health. Human biomonitoring (HBM) has assumed an increasingly important role in assessing human exposure to those xenobiotics, as it allows for the quantification of internal exposure to the agents under study and the assessment of their early effects. Since its formation in the Department of Human Genetics, the Genetic Toxicology research group has conducted HBM studies, primarily in occupational settings. The various studies, reviewed in this work, have supported the recommendation of mitigation measures, as they have allowed for the early identification of genotoxic effects associated with exposure, which may translate into long-term disease. However, given its complex logistics, time-consuming nature, and cost, parallel research using *in vitro* or *in vivo* experimental models has been crucial for characterizing the genotoxicity of chemicals and elucidating the associated mechanisms, in addition to supporting the development of new biomarkers of effect, based on mechanistic approaches and utilizing more advanced technologies. Globally, research in this area has progressed towards a growing preventive and*

*predictive capacity, inseparable from the priorities of Human Genetics, finding translation into regulation and support for new health and environmental policies, with gains in public health.*

### \_Introdução

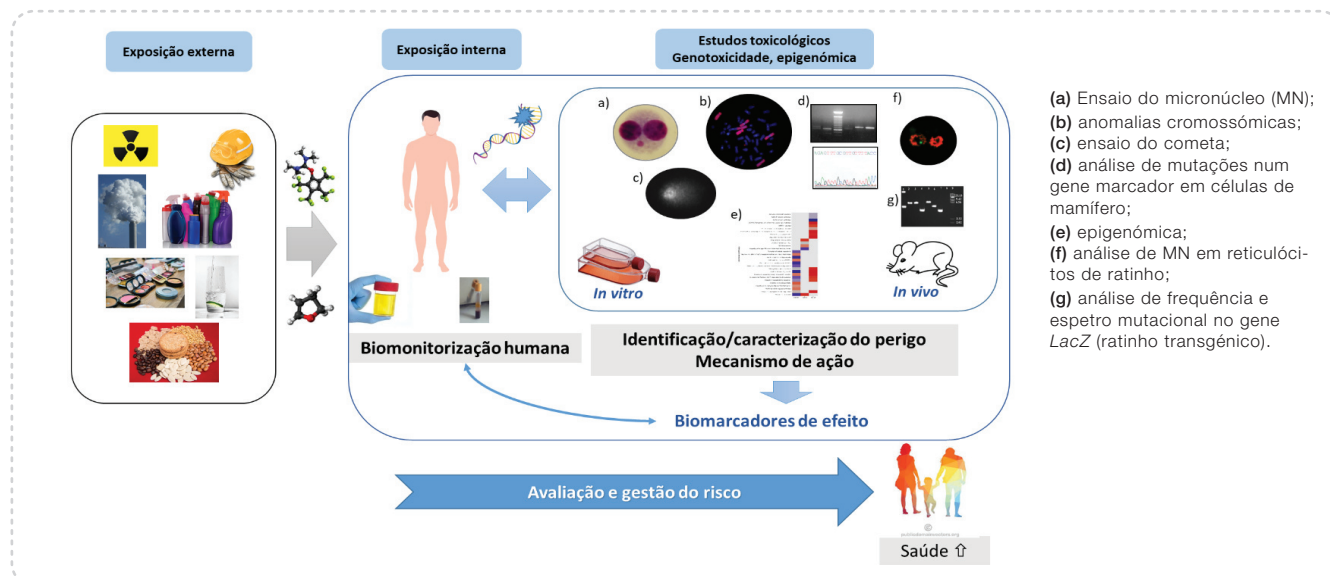
Em Portugal, tal como em toda a Europa, a saúde da população é influenciada por determinantes ambientais, de entre os quais se destacam a poluição atmosférica, os produtos químicos, o ruído e as mudanças climáticas (1). A exposição a produtos químicos provenientes do ambiente, ou veiculados pelos alimentos e pelos variados produtos de consumo que utilizamos (por ex. medicamentos, têxteis, artigos de higiene ou limpeza) poderá ter um impacto negativo na saúde, desde efeitos agudos, tais como intoxicações e problemas respiratórios agudos, até efeitos a longo prazo, contribuindo para o desenvolvimento de diversas doenças crónicas. Convém ainda salientar o impacto crescente de alguns poluentes emergentes, tais como os materiais à escala nano, ou nanomateriais (NMs), e os micro/nanoplásticos que, pelo seu tamanho diminuto aliado a uma geral insolubilidade e persistência no ambiente e no organismo dos seres vivos, constituem uma preocupação para a saúde humana (2). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, as doenças do foro cardiovascular, respiratório e oncológico (especialmente cancro do pulmão, fígado e bexiga) são as principais doenças com causas predominantemente relacionadas com o ambiente; 23% do total de mortes, a nível mundial, são atribuíveis a causas ambientais (3). Essa morbidade e mortalidade afeta mais fortemente as pessoas ou grupos vulneráveis, incluindo crianças, idosos, doentes crónicos e grupos socialmente mais desfavorecidos.

Visando controlar e minimizar o impacto da exposição a substâncias químicas na saúde humana, importa seguir dois tipos de abordagem complementares: a monitorização da exposição humana às substâncias químicas e a monitorização dessas substâncias em matrizes ambientais e nos alimentos. É inegável que a abordagem mais direta e fidedigna para identificar e quantificar a exposição humana a químicos, quaisquer que sejam as fontes e vias de exposição, é através da utilização da biomonitorização humana (BMH). Trata-se de uma abordagem que permite a caracterização da exposição de cada indivíduo a um ou vários compostos químicos através da medição desse(s) composto(s) ou dos seus metabolitos em amostras biológicas, bem como a deteção de efeitos biológicos precoces que precedem o aparecimento de doença (biomarcadores de exposição e de efeito) (4). A estimativa da exposição a um químico, conjuntamente com a caracterização e quantificação da sua perigosidade com recurso a estudos de toxicidade, contribui para a avaliação de risco dessa substância. Essa avaliação tem por objetivo a compreensão e estimativa da natureza, magnitude e probabilidade de ocorrer um potencial efeito adverso, para a saúde ou para o ambiente, decorrente da exposição ao químico e é realizada, essencialmente, pelas entidades regulamentares, ao nível Nacional e Internacional.

Os efeitos lesivos do genoma, ou efeitos genotóxicos, estão entre os mais relevantes para a caracterização da perigosidade dos químicos, pois são considerados como determinantes de

processos cancerígenos. Para a identificação da genotoxicidade utilizam-se, desejavelmente, ensaios em sistemas experimentais *in vitro*, complementados com estudos *in vivo*, apenas quando essenciais para esclarecer os achados *in vitro*. Não existe um único ensaio de genotoxicidade ou mutagénese que dê resposta aos eventos-chave de iniciação do processo cancerígeno, isto é, a indução de mutações no DNA e/ou de anomalias no número ou estrutura dos cromossomas que constituem o genoma das células somáticas. Como tal, a estratégia em geral utilizada para esse fim consiste no uso de uma bateria de ensaios complementares (5,6). Para além da caracterização da genotoxicidade, os modelos experimentais permitem a elucidação dos mecanismos subjacentes e permitem a medição de outros parâmetros complementares, tais como citotoxicidade e stress oxidativo. O reconhecimento de que outros efeitos, que não apenas os efeitos genotóxicos, contribuem para o efeito cancerígeno de certas substâncias, conjuntamente com a inovação tecnológica no campo da sequenciação de nova geração, tem conduzido ao desenvolvimento de estudos baseados em abordagens mais abrangentes e de alto rendimento, as chamadas “ómicas”, entre as quais se salientam a transcritómica e a epigenómica. Por sua vez, estas novas abordagens metodológicas (NAMs, do inglês *New Approach Methodologies*) desenvolvidas em sistemas experimentais *in vitro* poderão vir a ser usadas como futuros biomarcadores de efeito em estudos de BMH (figura 1).

Figura 1: Integração dos estudos de Biomonitorização Humana com os estudos de genotoxicidade e epigenómica *in vitro* e *in vivo*.



## \_Objetivo

Neste artigo pretende dar-se uma visão global sobre a investigação levada a cabo no Departamento de Genética Humana (DGH) sobre a interação gene-ambiente e seus potenciais efeitos na saúde humana, incluindo os estudos de biomonitorização humana e a investigação realizada em modelos celulares e em modelos animais. Com esta revisão pretende-se ainda fazer uma reflexão sobre a relevância desta área da Genética relativamente à tradução dos dados e conhecimento produzidos para a proteção da saúde humana e, conseqüentemente, em ganhos em saúde pública.

## \_Quatro décadas de investigação em Toxicologia Genética no DGH

O DGH foi pioneiro na investigação em Toxicologia Genética no INSA. Os primeiros passos foram dados com a implementação de um biomarcador de efeito, a análise de trocas de cromátídeos irmãos (SCE) em linfócitos sanguíneos humanos (7), com vista à sua integração em estudos de saúde ocupacional. Em paralelo, iniciaram-se os estudos de mutagenese e de genotoxicidade recorrendo a modelos experimentais, de que é exemplo o ensaio do micronúcleo (MN) em células de mamífero (8) e, posteriormente, os modelos de ratinhos transgênicos para estudos *in vivo* de mutagenese e de reparação do DNA (9,10). Desde então a investigação realizada pelo Grupo de Toxicologia Genética tem contribuído para a caracterização do potencial genotóxico e carcinogénico de vários xenobióticos, entre eles, a radiação ionizante, os nanomateriais, as toxinas naturais e os bisfenóis, para a identificação de efeitos biológicos precoces em indivíduos a eles expostos e também para o desenvolvimento de biomarcadores baseados em tecnologias mais avançadas.

## \_Estudos de biomonitorização humana

Sintetizam-se, na **tabela 1**, os principais estudos de BMH realizados ao longo das quatro décadas de existência da Toxicologia Genética, bem como o seu impacto, em termos de proteção da saúde humana. O denominador comum da intervenção do Grupo nesses estudos tem sido a caracterização de biomarcadores precoces de efeito

genotóxico. Os resultados da análise desses biomarcadores, ao refletirem instabilidade genética observável precocemente em células somáticas, contribui para o estabelecimento de uma relação entre exposição e o potencial risco de desenvolvimento de malignidades, a longo prazo. Ao serem integrados nos estudos de BMH, a informação que fornecem contribui para a implementação de intervenções mais eficazes, preventivas ou mitigadoras do risco. Em alguns dos estudos realizados analisaram-se também biomarcadores de suscetibilidade genética, recorrendo-se à identificação de polimorfismos em genes críticos para a metabolização de xenobióticos ou para a reparação do DNA, com o intuito de identificar genótipos mais suscetíveis aos químicos em estudo e, por conseguinte, proteger grupos em maior risco de vir a desenvolver doença.

O estudo pioneiro de BMH focou-se em trabalhadores expostos a um solvente orgânico utilizado na indústria de plástico reforçado, o estireno, substância essa que, curiosamente, foi recentemente reavaliada pela Agência Internacional para a Investigação do Cancro como provavelmente carcinogénica para o homem (grupo 2A; 11). De entre outros estudos de BMH salienta-se, pela sua relevância e impacto na comunidade visada e no ambiente, a participação no Projeto MinUrar – Minas de Urânio e seus Resíduos: efeitos na saúde da população, coordenado pelo Departamento de Epidemiologia do INSA. Na sua globalidade, os resultados da análise de anomalias cromossómicas estáveis em linfócitos foram sugestivos de uma associação entre alguma instabilidade genética observada nas células dos indivíduos do grupo exposto (residentes da área de influência da exploração do urânio) e a exposição prolongada a baixas doses de radiação e metais pesados (**tabela 1**). Os resultados foram também sugestivos da existência de uma resposta adaptativa à radiação ionizante nesse mesmo grupo da população. Com base na globalidade dos resultados do estudo foram emanadas recomendações para seguimento clínico e epidemiológico da população afetada, bem como para a realização de uma requalificação ambiental (12), recomendações essas que foram posteriormente concretizadas.

Tabela 1: Síntese dos estudos de biomonitorização humana mais relevantes.

Designação do estudo Período	População estudada n (grupo exposto) n (grupo controlo)	Agente(s)	Biomarcadores		Principais conclusões	Impacto em saúde pública [Publicações]
			Biomarcadores de exposição	Biomarcadores de efeito ou suscetibilidade		
Estudo dos efeitos citogenotóxicos da exposição ocupacional ao estireno 1985-1989	35 (trabalhadores de indústrias de fibra de vidro/plástico reforçado)  34 (administrativos)	Estireno e outros solventes orgânicos	Sem dados	Análise de SCE em células sanguíneas	Apenas o subgrupo de não fumadores expostos apresentou um aumento significativo da frequência média de SCE em comparação com os controlos não fumadores sugerindo que estes trabalhadores poderão ter um risco acrescido de doença.	Recomendações aos trabalhadores e empregadores para utilização adequada de equipamentos de proteção individual; Recomendação de melhorias no sistema de ventilação. [1]
Exposição de profissionais de saúde a fármacos anti-tumorais: avaliação de efeitos genotóxicos e da mutagenese urinária 1991-1993	11 (pessoal de saúde envolvido na preparação de citostáticos numa unidade hospitalar)  11 (pessoal administrativo)	Mistura de fármacos citostáticos	Mutagenese urinária (teste de reversão de mutação em bacteriais como indicador de exposição a agentes mutagénicos)	Análise de SCE, HFC e de aberrações cromossómicas em células sanguíneas Mutagenese urinária	Mutagenese urinária - positiva no grupo de trabalhadores expostos a citostáticos; negativa no grupo de controlo; SCE e aberrações cromossómicas - frequência média significativamente mais elevada no grupo exposto comparativamente ao de controlo. Os resultados indicam exposição ocupacional a químicos mutagénicos e instabilidade cromossómica detectável nas células sanguíneas dos trabalhadores.	Recomendações aos trabalhadores e empregadores para utilização adequada de equipamentos de proteção individual; Recomendação para instalação de um equipamento de ventilação forçada (hotte) para preparação dos fármacos citostáticos - seguida pela Unidade hospitalar. [2]
Efeitos genotóxicos decorrentes da exposição ocupacional ao ruído e vibração de corpo inteiro 1991-1999	59 (técnicos de aeronáutica, pilotos de helicóptero, pilotos de aviões militares e mandriladores mecânicos)  44 (administrativos, militares, profissionais de saúde)	Ruído de baixa frequência e vibração de corpo inteiro, exceto no caso de mandriladores mecânicos (efeito localizado com frequências mais elevadas); pilotos militares - efeito adicional de forças gravitacionais.	Características do ruído e da vibração nas superfícies de contacto com o corpo humano	Análise de SCE e HFC em células sanguíneas	Aumento significativo de SCE e HFC em técnicos de aeronáutica, pilotos de helicóptero e pilotos de aviões militares com exposição crónica a ruído de baixa frequência e vibração de corpo inteiro relativamente ao grupo de controlo. Efeito também verificado em ratinhos expostos a ruído e vibração em condições controladas. Não se verificaram diferenças na frequência média de SCE entre o grupo de mandriladores mecânicos e o controlo.	Contribuição para o conhecimento e reconhecimento da doença vibroacústica (DVA) como uma doença profissional. Como resultado dos esforços de uma equipa multidisciplinar com sede em Portugal, essa doença foi definida como uma patologia induzida pelo ruído e caracterizada pelo crescimento anormal de colagénio na ausência de processos inflamatórios. [2; (7)]
Efeitos genotóxicos decorrentes da exposição ao ruído e vibração de corpo inteiro em pilotos de aviação comercial 2000-2001	34 (pilotos de aviação comercial)  28 (administrativos, profissionais de saúde)	Ruído, vibração, radiação cósmica e gases de emissão	Características do ruído, da vibração e da radiação	Análise de SCE, HFC e de aberrações cromossómicas em células sanguíneas	Aumento significativo da frequência média de SCE no grupo de pilotos comparativamente ao de controlo; Sem diferenças significativas na frequência média de aberrações cromossómicas entre grupos exposto e controlo.	Contribuição para a proteção dos pilotos e pessoal de cabine; recomendação de acompanhamento médico. [2; (16)]*
Efeitos genotóxicos da exposição humana a gases de emissão de veículos automóveis em portageiros 1998-2000	18 (portageiros)  18 (administrativos da mesma empresa)	Gases de emissão de veículos automóveis	Ácido trans, trans-mucónico (AM) na urina (metabolito do benzeno); mutagenese urinária	Análise de SCE, HFC e de aberrações cromossómicas em células sanguíneas	Concentração de AM superior no grupo de portageiros relativamente ao controlo. Mutagenese urinária - negativa; SCE, HFC, aberrações cromossómicas - sem diferenças significativas entre grupos exposto e controlo. O estudo sugeriu que os portageiros estudados, embora expostos, não apresentavam efeitos biológicos precoces de molde a requerer proteção adicional.	Recomendou-se o encerramento das janelas das cabines sempre que possível para evitar a poluição do ar interior com os gases de emissão. [2; (17)]
MinUrar - Minas de Urânio e seus Resíduos — Efeitos na saúde da população: efeitos genotóxicos e suscetibilidade genética 2002-2008	32 (residentes na área de influência das minas de exploração de urânio, e suas escombrelas) 62 (33 residentes em freguesias da mesma área geográfica sem minas e 29 residentes numa área geográfica com baixo fundo radioativo)	Metais pesados e radiação alfa e gama	Pb, Cu e Zn no no sangue; rádio-núclidos (Polónio-210) no cabelo	Análise de aberrações cromossómicas estáveis (translocações); ensaio challenge (translocações induzidas pela irradiação <i>in vitro</i> ); Análise de polimorfismos em genes de reparação do DNA (susceptibilidade)	Aumento da frequência de translocações nos indivíduos do grupo exposto comparativamente aos 2 grupos de controlo, embora sem significado estatístico. Diferença significativa entre o grupo exposto e os grupos de controlo na frequência de translocações induzidas pela irradiação do sangue <i>in vitro</i> , sugerindo a existência de uma resposta adaptativa no grupo exposto. Alguns polimorfismos em genes de reparação de quebras no DNA afetam os níveis de aberrações cromossómicas radioinduzidas.	Implementação de um Programa de vigilância para os mineiros e seus familiares. Requalificação ambiental das minas e escombrelas abandonadas da Urgeira. [(12,18)]
Exposição ocupacional ao fumo de tabaco ambiental: um estudo em restaurantes na cidade de Lisboa 2010-2016	29 (trabalhadores de restauração expostos ao fumo de tabaco ambiental/fumo passivo)  33 (trabalhadores não expostos ao fumo de tabaco ambiental)	fumo do tabaco	Cotínina urinária	Análise de SCE, ensaio do cometa, análise de micronúcleos em linfócitos e em células bucais, e ensaio challenge (baseado no ensaio do cometa após tratamento do sangue <i>ex vivo</i> com agente alquilante); Análise de polimorfismos em genes de metabolização	Não se detetou uma associação clara entre a exposição ocupacional ao fumo ambiental do tabaco e a indução de efeitos genotóxicos. Os resultados do ensaio challenge sugeriram uma resposta adaptativa no grupo exposto ao fumo passivo (apresentam menor frequência de lesões do DNA após o estímulo <i>ex vivo</i> com um agente alquilante do que o grupo exposto). Não se identificaram efeitos moduladores dos polimorfismos genéticos estudados.	Apoio da decisão da proibição total de fumar em espaços públicos, particularmente, em espaços de restauração. [1; (19)]
Estudo de biomonitorização ocupacional relativo ao crómio e a outras substâncias químicas nocivas no quadro do Projeto Europeu HBM4EU 2019-2021	191 (trabalhadores da indústria metalúrgica e aeronáutica)  93 (administrativos das mesmas empresas; voluntários externos às empresas)	crómio hexavalente, níquel e outros metais pesados	crómio hexavalente, Ni, etc. em urina, sangue e condensado do ar exalado	Análise de micronúcleos em linfócitos de sangue periférico; ensaio do cometa em leucócitos	Aumento significativo do nível de lesões no DNA (ensaio cometa) e de micronúcleos (alterações cromossómicas) no grupo exposto comparativamente ao grupo de controlo (voluntários fora das empresas estudadas). Grupo de controlo formado por pessoal administrativo dentro das empresas também apresentou níveis significativos de instabilidade genética.	Apoio à necessidade de reavaliar o limite de exposição ocupacional a crómio hexavalente em prática. Recomendação para aplicação de medidas de proteção, particularmente aos trabalhadores em maior risco (envolvidos na soldadura e de galvanoplastia) e de mitigação. [2; (20)]
Exposição ocupacional a compostos químicos durante a reciclagem de resíduos elétricos e eletrónicos no quadro dos projetos HBM4EU e PARC 2021-presente	95 (trabalhadores da indústria de reciclagem e gestão de resíduos)  50 (Voluntários externos às empresas)	mistura complexa de metais pesados (Pb, Li, etc.) e compostos orgânicos (bisfenóis, substâncias perfluoroalquiladas (PFAS), bifenis policlorados (PCBs), etc.	Metais, PFAS, bisfenóis, PCBs, etc. em amostras de sangue, urina e cabelo.	Análise de micronúcleos em linfócitos de sangue periférico e em células da mucosa bucal	Aumento da frequência média de micronúcleos em linfócitos do grupo exposto comparativamente ao grupo de controlo. Estudo alargado a um maior número de trabalhadores (ainda em curso).	Recomendação para aplicação de medidas de proteção aos trabalhadores e de mitigação. [(21)]

(1) Relatório apresentado às indústrias participantes; (2) Relatório apresentado ao serviço de medicina ocupacional com pedido de informação aos participantes.

\*Trabalho vencedor do Prémio Ricardo Jorge de Saúde Pública (*ex-aequo*) e do Prémio de Investigação sobre Ambiente e Saúde Aloísio Coelho no âmbito dos Prémios Científicos do I Centenário do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, 2001.

HBM4EU - Iniciativa Europeia em Biomonitorização Humana; HFC - células com alta frequência de SCE; PARC - Parceria para Avaliação dos Riscos de Químicos; SCE - trocas entre cromátídeos irmãos.

A participação recente na Iniciativa Europeia em Biomonitorização Humana (HBM4EU, <https://www.hbm4eu.eu/>) e na Parceria Europeia para a Avaliação dos Riscos de Químicos (PARC, <https://www.eu-parc.eu/>) abriu a oportunidade de participação em estudos de BMH ocupacional multicêntricos, visando a exposição ao crómio hexavalente em várias atividades industriais e a exposição a misturas de substâncias químicas perigosas, incluindo metais pesados e compostos orgânicos, em indústrias de gestão de resíduos de aparelhos elétricos e eletrónicos, nos quais o Grupo tem tido um papel de relevo na análise de biomarcadores de efeito.

### **\_Investigação em genotoxicidade e reparação do DNA em modelos *in vitro* ou *in vivo***

Os estudos de mutagénese e de genotoxicidade em modelos experimentais usando estirpes bacterianas e, principalmente, células de mamífero, tais como o teste de mutação no gene *hprt* (hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase) em células V79 e o ensaio do MN em variadas linhas celulares humanas (8,13), têm constituído ferramentas importantes para investigar as propriedades genotóxicas e mutagénicas de agentes físicos, químicos e suas misturas, bem como para elucidar os seus mecanismos de ação. Os estudos de mutagénese *in vivo*, com recurso a modelos murinos transgénicos e, principalmente, a criação no INSA de um modelo único de ratinho transgénico com inativação de um gene de reparação do DNA, permitiram avançar a investigação em mecanismos de reparação do DNA e o seu papel na formação de mutações somáticas e germinais após exposição a agentes químicos (9,10).

Na **tabela 2**, são indicados os principais projetos nestas áreas bem como os ensaios utilizados, incluindo NAMs. O trabalho mais recentemente desenvolvido pelo Grupo tem-se focado nos ensaios considerados mais relevantes para decisões em saúde pública, por revelarem efeitos em dois acontecimentos fundamentais na carcinogénese: mutações génicas e perda total/parcial de cromossomas. Nesse sentido, existem linhas orientadoras para utilizar estes ensaios anteriormente à colocação no mercado de novas substâncias químicas, tais como as orientações da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE). Relativamente às

abordagens inovadoras, como a análise epigenética, apesar de não existirem ainda linhas de orientação, muitos destes dados são considerados na avaliação global da evidência, conforme o mecanismo subjacente.

De entre as temáticas investigadas, salientam-se os estudos na área da nanotoxicologia, iniciados em 2010, na medida em que surgiram em resposta a uma preocupação emergente sobre a segurança dos NMs - cuja produção e aplicação tem sofrido um crescimento exponencial - para a saúde humana (**tabela 2**). Esta linha de investigação tem prosseguido até ao presente, com a utilização de abordagens experimentais integradas para testagem e avaliação, tendo em vista a garantia de que os NM usados, por exemplo, na tecnologia alimentar - Projeto INGESTnano - são seguros e de que a potencial exposição ocupacional a esses NMs não constitui um risco para a saúde dos trabalhadores - Projeto ToxApp4nanoCELFI (**tabela 2**). Qualquer destes estudos tem uma forte componente translacional, tendo em vista a integração da informação gerada para a avaliação do risco associado à exposição a esses materiais, como apoio à sua regulamentação, por forma a assegurar o progresso seguro e sustentável das nanotecnologias e da nanomedicina.

### **\_Abordagens inovadoras na investigação em genotoxicidade e no desenvolvimento de novos biomarcadores**

Considerando a evolução da ciência nestas últimas décadas, são atualmente privilegiadas abordagens alternativas *in vitro* com maior aproximação aos sistemas vivos, tais como o uso de modelos celulares complexos, ou a inclusão de processos fisiológicos, como seja a digestão (simulada *in vitro*), na testagem da genotoxicidade de substâncias ingeridas (14,15). Também os estudos toxicogenómicos têm adquirido cada vez maior protagonismo, seguindo os recentes avanços tecnológicos. Tem-se ainda assistido a um progressivo interesse no papel da epigenética - modificações no genoma que causam alterações na expressão dos genes - na resposta biológica à exposição a agentes ambientais. Entre essas alterações estão, por exemplo, as modificações nas histonas, na metilação do DNA e na expressão de microRNAs (miRNAs).

Tabela 2: Síntese dos principais estudos realizados com recurso a ensaios de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo*.

Projetos / agente(s) em estudo (publicações/representativa(s))	Teste do cometa (lesão DNA)		Teste do micronúcleo (alterações cromossómicas)		Testes de mutagenese (mutações génicas)		Testes de mutagenese para avaliação da reparação do DNA	Teste de Carcinogénese <i>in vitro</i> (iniciação/ promoção)	Avaliação de efeitos epigenéticos
	Em linhas celulares de mamífero	<i>In vivo</i>	Em linfócitos humanos ou em linhas celulares de mamífero	Em medula óssea ou em reticulócitos sanguíneos <i>in vivo</i>	Mutações no gene <i>Hprt</i> ou no gene <i>Tk</i> de células de mamífero	Mutações no gene <i>lacZ</i> num modelo transgénico <i>in vivo</i>			
Estabelecimento de uma curva de dosimetria biológica com base na frequência de micronúcleos em células binucleadas / radiação ionizante [16]			Linfócitos humanos				Mutações no gene <i>lacZ</i> num knock-out ( <i>Parp</i> ) <i>in vivo</i> ou ensaio do cometa <i>in vitro</i>	Transformação celular em células Bias-42	Metilação do DNA ou expressão diferencial de miRNA
Atividade citotóxica, mutagénica e clastogénica de fármacos anti-tumorais derivados da platina / cisplatina e oxaliplatina [22, 43]				Em eritrócitos imaturos de medula óssea	Análise da frequência e espectro de mutações em <i>Hprt</i>	Análise da frequência e espectro de mutações			
Caracterização dos efeitos mutagénicos da deficiência em <i>PARP</i> * em ratinhos transgénicos / agentes alquilantes [10]				Em eritrócitos sanguíneos		Análise da frequência de mutações			
Avaliação do potencial cancerígeno de micotoxinas / toxinas naturais (cianotoxinas) [23]	Células hepáticas e renais	Leucócitos de ratinho	Células hepáticas e renais	Em eritrócitos imaturos de medula óssea					
Avaliação do risco de um ambiente estuarino contaminado: análise do potencial genotóxico e alterações na reparação do DNA / mistura complexa (metais e compostos orgânicos) [24, 25]	Células hepáticas	Leucócitos de ratinho	Células hepáticas	Em eritrócitos sanguíneos		Análise da frequência de mutações	Ensaio cometa em células hepáticas <i>in vitro</i>		
Investigação dos efeitos tóxicos de micotoxinas e suas misturas: potencial efeito cito e genotóxico / toxinas naturais [26, 27]	Células hepáticas, renais e intestinais								
Avaliação da segurança de nanomateriais (NMs) através da caracterização dos seus efeitos genotóxicos / NMs de sílica, dióxido de titânio e nanotubos de carbono [28]		Fígado e baco de ratinho	Linfócitos humanos	Em eritrócitos sanguíneos		Análise da frequência de mutações			
Uma abordagem europeia concertada para a testagem regulatória de nanomateriais / NMs de prata e magnésio [29, 30]	Células brônquicas e pulmonares		Células brônquicas e pulmonares		Análise da frequência de mutações em <i>Tk</i>				
Exposição ocupacional a nanomateriais fibrosos: uma abordagem <i>in vitro</i> dos seus efeitos genéticos e epigenéticos / nanotubos de carbono e nanocelulose [16]	Co-cultura de células pulmonares com macrófagos		Co-cultura de células pulmonares com macrófagos						micrornas em células pulmonares
Mecanismos celulares e moleculares de toxicidade de nanomateriais ingeridos / NMs dióxido de titânio (Projeto INGESTmano) [31]	Células intestinais		Células intestinais						Metilação do DNA em células intestinais
Uma abordagem de toxicologia preditiva para caracterização dos efeitos respiratórios de fibras de nanocelulose (Projeto ToxAppNanocELFI) [14]	Células pulmonares e co-cultura com macrófagos		Células pulmonares e co-cultura com macrófagos						microRNAs e metilação do DNA em células pulmonares
Perfil toxicológico de nanomateriais de celulose ingeridos em células gastrointestinais / nanoceluloses [15]	Células intestinais		Células intestinais		Análise da frequência de mutações em <i>Hprt</i>				Metilação do DNA em células intestinais
Avaliação da toxicidade de bisfenóis: impacto na saúde humana/compostos alternativos ao bisfenol A [32]	Células hepáticas, 2D e 3D		Linfócitos e células hepáticas, 2D e 3D						
Avaliação da toxicidade de micotoxinas: impacto na saúde humana / toxinas da <i>Alternaria</i> e eniatinas [22]			Células hepáticas						Fígado, <i>in vivo</i>

\**PARP* – gene poli-ADP ribose polimerase ; *Tk* - gene timidina cinase; NMs – nanomateriais

Nota – Todos os estudos referidos incluíram ensaios de citotoxicidade para definir a gama de concentrações ou doses a testar; a maioria dos estudos incluiu a análise de parâmetros adicionais, tais como a indução de stress oxidativo ou, no caso dos nanomateriais, estudos de internalização celular.

Com o desenvolvimento das tecnologias de sequenciação de nova geração, a epigenética evoluiu para a epigenómica que compreende o estudo das modificações epigenéticas em todo o genoma. O Grupo tem investigado os efeitos epigenómicos de vários NMs através da análise de miRNAs e da metilação de todo o genoma (33), sendo esta investigação de extrema importância para explorar os genes alvo desses NMs e, assim, avançar na compreensão do seu modo de ação molecular que poderá explicar os seus efeitos nocivos na saúde. É expectável que estas novas abordagens experimentais constituam também a base para o desenvolvimento de novos biomarcadores de efeito biológico precoce mais sensíveis e específicos, na medida em que são suportados por conhecimento de índole mecânica.

## Conclusões

Enquanto a Genética Humana se dedica, de uma forma geral, a compreender e analisar alterações patológicas ou variações nos genes ou cromossomas, a Toxicologia Genética foca-se na investigação sobre a forma como fatores ambientais podem induzir ou contribuir para essas alterações genéticas ou epigenéticas e, por consequência, gerar instabilidade genómica. Essa instabilidade pode ser determinante para o desenvolvimento de cancro, doenças hereditárias ou envelhecimento prematuro, condições com forte impacto na saúde e qualidade de vida da população e que, portanto, importa prevenir. Os resultados dos estudos revisitados neste artigo têm fornecido conhecimento relevante para a avaliação da perigosidade e do risco de químicos que, por sua vez, são utilizados em quadros regulamentares respeitantes à garantia da segurança dos químicos. Recorrendo a abordagens integradoras e inovadoras, os achados da investigação nesta área da genética têm progredido no sentido de uma crescente capacidade preventiva e preditiva, indissociáveis das prioridades da Genética Humana, visando a proteção da saúde humana.

## Agradecimentos:

À Doutora Guida Boavida, pelo lançamento desta linha de investigação no DGH e pela visão da sua importância no contexto da Genética Humana. A todos os colegas que, enquanto estudantes ou colaboradores, contribuíram para o desenvolvimento da investigação em Toxicologia Genética no DGH, bem como aos colegas de outros Departamentos do INSA e de outras instituições que colaboraram (ou coordenaram) nos trabalhos aqui descritos e contribuíram para o seu sucesso.

## Referências bibliográficas:

- (1) Agência Portuguesa do Ambiente. Estratégia Nacional para o Ar (ENAR) 2020 - Emissões Atmosféricas e Qualidade do Ar Ambiente: Enquadramento e Diagnóstico. Lisboa: APA, 2015. [https://apambiente.pt/sites/default/files/\\_Ar\\_Ruido/Ar/PoluicaoAr/ENAR\\_02\\_Diagnostico\\_20150528\\_VF\\_Portal.pdf](https://apambiente.pt/sites/default/files/_Ar_Ruido/Ar/PoluicaoAr/ENAR_02_Diagnostico_20150528_VF_Portal.pdf)
- (2) World Health Organization. Addressing the impact of nanotechnology on health [online]. [consult. 2025/10/5] [https://www.who.int/europe/health-topics/health-impact-assessment/addressing-the-impact-of-nanotechnology-on-health#tab=tab\\_1](https://www.who.int/europe/health-topics/health-impact-assessment/addressing-the-impact-of-nanotechnology-on-health#tab=tab_1)
- (3) World Health Organization. WHO global strategy on health, environment and climate change: the transformation needed to improve lives and wellbeing sustainably through healthy environments. Geneva: WHO, 2020. <https://iris.who.int/handle/10665/331959>
- (4) Louro H, Heinälä M, Bessems J, et al. Human biomonitoring in health risk assessment in Europe: Current practices and recommendations for the future. *Int J Hyg Environ Health*. 2019 Jun;222(5):727-37. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.05.009>
- (5) Groff K, Evans SJ, Doak SH, et al. In vitro and integrated in vivo strategies to reduce animal use in genotoxicity testing. *Mutagenesis*. 2021 Nov 29;36(6):389-400. <https://doi.org/10.1093/mutage/geab035>
- (6) Andreoli C, Dusinska M, Bossa C, et al. Regulatory practices on the genotoxicity testing of nanomaterials and outlook for the future. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2025 Nov;162:105881. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2025.105881>
- (7) Silva MJ, Carothers A, Branco NC, et al. Sister chromatid exchange analysis in workers exposed to noise and vibration. *Mutat Res*. 1996 Jul 10;369(1-2):113-21. [https://doi.org/10.1016/s0165-1218\(96\)90055-5](https://doi.org/10.1016/s0165-1218(96)90055-5)
- (8) Silva MJ, Carothers A, Dias A, et al. Dose dependence of radiation-induced micronuclei in cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutat Res*. 1994 Aug;322(2):117-28. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(94\)00019-0](https://doi.org/10.1016/0165-1218(94)00019-0)
- (9) Louro H, Silva MJ, Boavida MG. Mutagenic activity of cisplatin in the lacZ plasmid-based transgenic mouse model. *Environ Mol Mutagen*. 2002;40(4):283-91. <https://doi.org/10.1002/em.10118>
- (10) Louro H, Pinheiro I, Costa P, et al. Mutagenic effects of poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficiency in transgenic mice. *Mutat Res*. 2008 Apr 2;640(1-2):82-8. Epub 2007 Dec 23. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.12.003>
- (11) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Styrene, Styrene-7,8-oxide, and Quinoline. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551039>
- (12) Silva MJ, Monteiro-Gil O, Sousa AC, et al. Minas de urânio e seus resíduos: efeitos na saúde da população – Estudo dos efeitos genotóxicos. In: Projeto MinUrar. Relatório Científico II. Lisboa: INSA, 2007. p. 27-60. <http://hdl.handle.net/10400.18/6994>
- (13) Silva MJ, Costa P, Dias A, et al. Comparative analysis of the mutagenic activity of oxaliplatin and cisplatin in the Hprt gene of CHO cells. *Environ Mol Mutagen*. 2005 Aug;46(2):104-15. <https://doi.org/10.1002/em.20138>

- (14) Ventura C, Pinto F, Lourenço AF, et al. Assessing the Genotoxicity of Cellulose Nanomaterials in a Co-Culture of Human Lung Epithelial Cells and Monocyte-Derived Macrophages. *Bioengineering (Basel)*. 2023 Aug 21;10(8):986. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10080986>
- (15) Vital N, Cardoso M, Kranendonk M, et al. Evaluation of the cyto- and genotoxicity of two types of cellulose nanomaterials using human intestinal cells and in vitro digestion simulation. *Arch Toxicol*. 2025 Feb;99(2):575-96. Epub 2024 Dec 24. <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03911-2>
- (16) Silva MJ, Dias A, Barreta A, et al. Efeito genotóxico da exposição prolongada a ruído de baixa frequência e vibração de corpo inteiro. *Arquivos do Instituto Nacional de Saúde*. 2001;24:36-67. <http://hdl.handle.net/10400.18/1016>
- (17) Boavida MG, Proença MJ, Barreta A, et al. Analysis of genotoxic effects of vehicle exhaust emissions in toll collectors. *Annales de Génétique*. 2001;44(suppl 1):S138. [https://doi.org/10.1016/S0003-3995\(01\)01067-X](https://doi.org/10.1016/S0003-3995(01)01067-X)
- (18) Gil F, Louro H, Dias A, et al. Influence of hOGG1 genotype on the frequencies of stable and unstable chromosome aberrations in radiation-exposed individuals. *Eur J Cancer*. 2008;6(9):199. [https://doi.org/10.1016/S1359-6349\(08\)71882-2](https://doi.org/10.1016/S1359-6349(08)71882-2)
- (19) Vital N, Antunes S, Louro H, et al. Environmental Tobacco Smoke in Occupational Settings: Effect and Susceptibility Biomarkers in Workers From Lisbon Restaurants and Bars. *Front Public Health*. 2021 Jun 4;9:674142. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.674142>
- (20) Tavares A, Aimonen K, Ndaw S, et al. On Behalf Of The Hbm Eu Chromates Study Team. HBM4EU Chromates Study-Genotoxicity and Oxidative Stress Biomarkers in Workers Exposed to Hexavalent Chromium. *Toxics*. 2022 Aug 18;10(8):483. <https://doi.org/10.3390/toxics10080483>
- (21) Aimonen K, Silva MJ, Tavares A, et al. Genotoxicity in peripheral blood leukocytes and reticulocytes of e-waste management workers. *Toxicology Letters* 2023 Sep;384(Suppl 1):S64. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(23\)00425-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(23)00425-3)
- (22) Louro H, Vettorazzi A, López de Cerain A, et al. Hazard characterization of Alternaria toxins to identify data gaps and improve risk assessment for human health. *Arch Toxicol*. 2024 Feb;98(2):425-69. Epub 2023 Dec 26. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03636-8>
- (23) Dias E, Louro H, Pinto M, et al. Genotoxicity of microcystin-LR in in vitro and in vivo experimental models. *Biomed Res Int*. 2014;2014:949521. <https://doi.org/10.1155/2014/949521>
- (24) Pinto M, Costa PM, Louro H, et al. Human hepatoma cells exposed to estuarine sediment contaminant extracts permitted the differentiation between cytotoxic and pro-mutagenic fractions. *Environ Pollut*. 2014 Feb;185:141-8. Epub 2013 Nov 24. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.034>
- (25) Pinto MF, Louro H, Costa PM, et al. Exploring the potential interference of estuarine sediment contaminants with the DNA repair capacity of human hepatoma cells. *J Toxicol Environ Health A*. 2015;78(9):559-70. <https://doi.org/10.1080/15287394.2015.1006712>
- (26) Costa JG, Saraiva N, Guerreiro PS, et al. Ochratoxin A-induced cytotoxicity, genotoxicity and reactive oxygen species in kidney cells: An integrative approach of complementary endpoints. *Food Chem Toxicol*. 2016 Jan;87:65-76. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.11.018>
- (27) Pinhão M, Tavares AM, Loureiro S, et al. Combined cytotoxic and genotoxic effects of ochratoxin A and fumonisin B1 in human kidney and liver cell models. *Toxicol In Vitro*. 2020 Oct;68:104949. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104949>
- (28) Tavares AM, Louro H, Antunes S, et al. Genotoxicity evaluation of nanosized titanium dioxide, synthetic amorphous silica and multi-walled carbon nanotubes in human lymphocytes. *Toxicol In Vitro*. 2014 Feb;28(1):60-9. Epub 2013 Jun 27. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.06.009>
- (29) Louro H, Pinhão M, Santos J, et al. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of benchmark multi-walled carbon nanotubes in relation to their physico-chemical properties. *Toxicol Lett*. 2016 Nov 16;262:123-34. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.09.016>
- (30) Gábelová A, El Yamani N, Alonso TI, et al. Fibrous shape underlies the mutagenic and carcinogenic potential of nanosilver while surface chemistry affects the biosafety of iron oxide nanoparticles. *Mutagenesis*. 2017 Jan;32(1):193-202. Epub 2016 Sep 22. <https://doi.org/10.1093/mutage/gew045>
- (31) Vieira A, Vital N, Rolo D, et al. Investigation of the genotoxicity of digested titanium dioxide nanomaterials in human intestinal cells. *Food Chem Toxicol*. 2022 Mar;161:112841. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.112841>
- (32) Mhaouty-Kodja S, Zalko D, Tait S, et al. A critical review to identify data gaps and improve risk assessment of bisphenol A alternatives for human health. *Crit Rev Toxicol*. 2024 Nov;54(10):696-753. <https://doi.org/10.1080/10408444.2024.2388712>
- (33) Ventura C, Vieira L, Silva C, et al. Functional effects of differentially expressed microRNAs in A549 cells exposed to MWCNT-7 or crocidolite. *Toxicol Lett*. 2020 Aug 1;328:7-18. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.04.002>