

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação de potenciais biomarcadores de efeito precoces na exposição ocupacional
à sílica cristalina

JESSICA NARDI

Porto Alegre, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação de potenciais biomarcadores de efeito precoces na exposição ocupacional
à sílica cristalina

Dissertação apresentada por **Jessica Nardi**
para obtenção do GRAU DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Solange Cristina Garcia
Co-orientadora: Dr^a. Ana Maria Tibiriçá Bon

Porto Alegre, 2018

Esta Dissertação de Mestrado foi desenvolvida sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Solange Cristina Garcia e co-orientação da Prof^a. Dr^a. Ana Maria Tibiriçá Bon, no laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Jessica Nardi recebeu bolsa de mestrado CAPES.

Este trabalho foi avaliado pela Banca Examinadora composta por:

Prof^a. Dr^a. Flávia Valladão Thiesen

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

Prof^a. Dr^a. Marli Maria Knorst

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Dr^a. Sabrina Nunes do Nascimento

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

CIP - Catalogação na Publicação

Nardi, Jessica

Avaliação de potenciais biomarcadores de efeito precoces na exposição ocupacional à sílica cristalina / Jessica Nardi. -- 2018.

128 f.

Orientadora: Solange Cristina Garcia.

Coorientadora: Ana Maria Tibiriçá Bon.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. sílica cristalina. 2. silicose. 3. fibrose pulmonar. 4. garimpos. 5. biomarcadores de efeito precoces. I. Garcia, Solange Cristina, orient. II. Bon, Ana Maria Tibiriçá, coorient. III. Título.

À Cecília, que, mesmo ainda sem conhecê-la, é minha maior motivação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por todas as oportunidades que me concedeu, as quais me permitiram crescer e fazem parte da construção de um presente e futuro que sempre sonhei.

Agradeço à minha família, minha mãe Clair, meu pai Norberto e meu irmão Darlan, pelo apoio incondicional em todas as situações e por sempre me apoiarem. Sem vocês, nada teria sentido. Amo vocês!

Agradeço a meu namorado Robson, por estar sempre ao meu lado e, pelo amor e carinho de sempre, me dar forças para passar por todas as dificuldades. Te amo!

Agradeço aos amigos, pois sem a companhia deles, o caminho seria muito mais difícil. Obrigada por entenderem minhas ausências e por me ouvirem e me fazerem rir, mesmo quando a situação não estava a favor da alegria.

Agradeço à professora Solange por ter me concedido a oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, mesmo sem me conhecer. Obrigada por todos os ensinamentos, toda a compreensão e por acreditar em mim.

Agradeço à Dra. Ana Maria, por quem tenho uma grande afeição. Obrigada pelas palavras carinhosas de sempre e por todo apoio e esforço pela realização deste trabalho.

Agradeço à toda equipe da Fundacentro de São Paulo e de Porto Alegre por não terem medido esforços para que este trabalho acontecesse. Um agradecimento especial à Cristiane, Leila, Gláucia, ao Cassiano da Fundacentro e ao Paulo do Cerest de Palmeira das Missões, por terem encarado o desafio de passar uma semana literalmente de baixo da terra! Muito obrigada, admiro vocês por todo o comprometimento e dedicação.

Agradeço à toda a equipe do LATOX, aos pós e aos “gafanhotos”, sem vocês nada disso seria possível! Obrigada especialmente às PhD Students do meu coração, que tanto me ajudaram e me acolheram com tanta amizade. Vocês são maravilhosas!

Agradeço às minhas professoras da Universidade de Passo Fundo, em especial a Luciana, Mariza, Siomara, Charise, Miriam e Andréa, que sempre me incentivaram e acreditaram em mim. Obrigada pelos conselhos, pelas amigas e por todos os ensinamentos.

À equipe da Urest e Prefeitura Municipal de Ametista do Sul pela acolhida, pelo espaço físico e pelo auxílio no recrutamento dos participantes. Parabéns pelo grande

trabalho que desempenham na comunidade, vocês fazem a diferença e são exemplos de dedicação!

À Amparo, por todo auxílio no convite aos participantes da pesquisa. Parabéns pela dedicação na assistência às pessoas que tanto necessitam desse apoio.

Aos garimpeiros que participaram do trabalho e aos responsáveis pelos garimpos, que colaboraram para que este trabalho acontecesse. Sem vocês, nada aconteceria.

Ao Banrisul, especialmente ao Sérgio, agradeço à disponibilidade em participar desta pesquisa através de seus funcionários e pelo fornecimento do espaço físico.

A todos os amigos e demais pessoas que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço às professoras Marli Knorst, Flavia Thiesen e Sabrina Nascimento por aceitarem o convite para participar da banca examinadora deste trabalho.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por disponibilizar a estrutura necessária para realização de tantos experimentos.

À UFRGS e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela estrutura para realizar o Mestrado.

À CAPES pelo fomento através da concessão da bolsa.

“A inexplicável quantidade e diversidade de metais existentes no interior da terra (como também de minerais e fósseis cuja natureza e qualidade a indústria química nos tem dado a conhecer) quase nos impossibilitam de estabelecer quais e quantos perigos específicos são destas ou daquelas minas, e se afetam alguma parte do organismo mais do que outra; cabe simplesmente afirmar que o ar confinado absorvido na respiração é saturado de exalações e partículas, sumamente funestas para os pulmões e o cérebro, que passam à massa sanguínea e aos humores, donde derivam logo coortes de males.”

(Bernardino Ramazzini – As doenças dos trabalhadores)

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está estruturada na forma de encarte de publicações a serem submetidas e dividida em seções, da seguinte maneira: Introdução, Objetivos, Revisão da Literatura, Artigo presente no Capítulo I, Discussão, Conclusões, Referências Bibliográficas e Anexos.

A Introdução apresenta de uma forma geral o embasamento teórico no qual a proposta deste trabalho foi construída. Os Materiais e Métodos, Resultados e as Referências Bibliográficas pertinentes à publicação específica encontram-se dentro do Capítulo I.

A seção Discussão contém uma interpretação geral dos resultados obtidos. A seção Conclusões aborda as conclusões gerais da dissertação.

A seção Referências Bibliográficas lista a bibliografia utilizada nas seções Introdução e Discussão.

A seção “Anexos” contém a descrição do processo de trabalho nos garimpos de Ametista do Sul, o parecer do Comitê de Ética da UFRGS, o modelo do termo de consentimento livre esclarecido e o questionário aplicado aos voluntários da pesquisa.

RESUMO

Garimpeiros de ametistas estão ocupacionalmente expostos à sílica cristalina, um agente químico que, ao ser inalado, provoca dano oxidativo e reação inflamatória nos pulmões, resultando em silicose. Neste sentido, este estudo objetivou avaliar componentes periféricos envolvidos na resposta inflamatória e no estresse oxidativo como potenciais biomarcadores de efeito precoces na toxicidade da sílica cristalina nestes trabalhadores. Para esta avaliação foram recrutados 30 indivíduos não expostos ocupacionalmente à sílica cristalina, 38 trabalhadores sem silicose expostos em garimpos e 24 indivíduos aposentados por silicose. O grupo de expostos foi dividido conforme o tempo de exposição, sendo 19 indivíduos com 1 a 15 anos de exposição e 19 trabalhadores com mais de 16 anos de exposição. Os biomarcadores inflamatórios avaliados foram a expressão proteica de L-selectina, β -2 integrina e molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) na superfície de monócitos e linfócitos, níveis séricos de C3, C4, proteína C reativa ultrasensível (PCRus) e atividade sérica da enzima adenosina deaminase (ADA). Os biomarcadores de estresse oxidativo avaliados foram malondialdeído (MDA) plasmático e vitamina C sérica. Também foram avaliados parâmetros bioquímicos e hematológicos. A expressão de L-selectina na superfície de linfócitos foi significativamente menor nos indivíduos com mais de 16 anos de exposição comparados aos não-expostos ($p < 0.05$), indicando que este é um potencial biomarcador precoce para silicose. Os níveis de MDA foram significativamente aumentados nos expostos e nos silicóticos comparados aos não expostos ($p < 0.05$), enquanto os níveis de vitamina C estavam diminuídos nos silicóticos comparados aos não expostos ($p < 0.05$). C3, PCRus, ADA e AST tiveram níveis significativamente elevados nos silicóticos comparados aos não expostos ($p < 0.05$). Glicose e ureia estavam aumentadas em todos os grupos em comparação aos não expostos ($p < 0.05$). Correlações parciais significativas foram observadas entre os parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo, e a L-selectina correlacionou-se negativamente com o tempo de exposição ($p < 0.001$), reforçando a importância deste componente como potencial biomarcador precoce para ocorrência de silicose.

Palavras-chave: sílica cristalina, silicose, fibrose pulmonar, garimpos, biomarcadores de efeito precoces.

ABSTRACT

Evaluation of potential early biomarkers of effect on crystalline silica occupational exposure

Workers of mining activities are exposed to crystalline silica, an agent that leads to pulmonary inflammatory reaction and oxidative damage, resulting in silicosis. Therefore, this work aimed to evaluate inflammatory and oxidative stress parameters as potential early biomarkers of effect to assess crystalline silica toxicity in these workers. For this, 38 crystalline silica exposed workers without silicosis, 24 silicotic individuals and 30 non-occupationally exposed workers were enrolled. Exposed workers were according to the time of exposure: 19 workers with 1-15 years of occupational exposure and 19 workers above 16 years of occupational exposure. The inflammatory parameters assessed were L-selectin, β -2 integrin and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) surface protein expression in lymphocytes and monocytes, C3, C4, high sensitivity-C reactive protein (hs-CRP) and adenosine deaminase (ADA) in serum. As biomarkers of oxidative stress, plasma levels of malondyaldehyde (MDA) and serum levels of vitamin C were determined. Biochemical and hematological parameters were also evaluated. L-selectin surface protein expression was significantly decreased in workers above 16 years of exposure compared to non-exposed individuals ($p < 0.05$). MDA levels were significantly increased in both exposed workers and silicotic groups compared to non-exposed ($p < 0.05$), while vitamin C levels were decreased in silicotic individuals compared to non-exposed ($p < 0.05$). C3, hs-CRP, ADA and aspartate aminotransferase (AST) levels were increased in silicotic individuals compared to non-exposed group ($p < 0.05$). Glucose and urea levels were significantly higher in exposed and silicotic groups compared to NEW group ($p < 0.05$). Significant partial correlations were observed among inflammatory and oxidative stress parameters, and L-selectin was negatively correlated with time of exposure, supporting the relevance of this potential biomarker evaluation in long time exposure to crystalline silica in miners chronically exposed.

Keywords: crystalline silica, silicosis, lung fibrosis, mining, early biomarkers of effect.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACGIH	- American Conference of Governmental Industrial Hygienists/ Conferência Americana de Higienistas Industriais Governamentais
C3	- Componente 3 do Sistema Complemento
C4	- Componente 4 do Sistema Complemento
CAM	- Cellular Adhesion Molecule/ Molécula de adesão celular
CAPES	- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAT	- Catalase
CD62E	- E-selectina
CD62L	- L-selectina
CD62P	- P-selectina
CDC	- Centers for Disease Control and Prevention
COOGAMAI	- Cooperativa de Garimpeiros do Médio Alto Uruguai
Cu	- Cobre
DATASUS	- Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DNA	- Deoxyribonucleic acid/ Ácido desoxirribonucleico
DPOC	- Doença pulmonar obstrutiva crônica
EDTA	- Ethylene diamine tetracetic acid/ Ácido etilendiamino tetra- acético
EPI	- Equipamento de proteção individual
ERNs	- Espécies reativas de nitrogênio
EROs	- Espécies reativas de oxigênio
Fe	- Ferro
GR	- Glutathione reductase
GSH	- Glutathione reduced
GSH-Px	- Glutathione peroxidase
H ₂ O ₂	- Peróxido de hidrogênio
IARC	- International Agency for Research on Cancer/ Agência Internacional para Pesquisa em Câncer

ICAM-1	- Intercellular adhesion molecule 1/ Molécula de adesão intercelular 1
IL-1 β	- Interleucina 1 β
IL-6	- Interleucina 6
INCA	- Instituto Nacional de Câncer
LT	- Limite de tolerância
MAC	- Membrane attack complex/ Complexo de ataque à membrana
MASP-1	- Manose binding lectin associated serine protease 1/ Serina protease associada a lectina ligadora de manose 1
MASP-2	- Manose binding lectin associated serine protease 2/ Serina protease associada a lectina ligadora de manose 2
MDA	- Malondialdeído
Mn	- Manganês
mppdc	- Milhões de partículas por decímetro cúbico
NIOSH	- National Institute for Occupational Safety and Health/ Instituto Nacional para Saúde e Segurança Ocupacional
NR	- Norma Regulamentadora
OIT	- Organização Internacional do Trabalho
OSHA	- Occupational Safety and Health Administration/ Administração de Segurança e Saúde Ocupacional
PCMSO	- Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional
PCR	- Proteína C reativa
PCR-us	- Proteína C reativa ultrasensível
PNES	- Programa Nacional de Eliminação da Silicose
SC	- Sistema complemento
SiO ₂	- Dióxido de silício
SOD	- Superóxido dismutase
TNF- α	- Fator de necrose tumoral α
UFRGS	- Universidade Federal do Rio Grande do Sul
WHO	- World Health Organization/ Organização Mundial da Saúde
Zn	- Zinco

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	21
OBJETIVOS	27
1. Objetivo geral.....	29
2. Objetivos específicos	29
REVISÃO DE LITERATURA	31
1. Toxicologia Ocupacional	33
2. Sílica cristalina	34
3. Exposição ocupacional à sílica cristalina	35
4. Silicose	36
4.1. Formas de diagnóstico disponíveis	38
4.2. Biomarcadores de efeito precoces na exposição à sílica cristalina.....	39
4.2.1. Biomarcadores relacionados à resposta inflamatória	40
4.2.2. Biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo.....	43
CAPÍTULO I (ARTIGO):	47
Inflammatory and oxidative stress parameters as potential early biomarkers for silicosis.....	47
DISCUSSÃO	79
CONCLUSÕES	87
PERSPECTIVAS.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
ANEXOS	107
ANEXO I	109
Descrição do processo de trabalho nos garimpos de Ametista do Sul	109
ANEXO II	112
Carta de confirmação da submissão do artigo.....	112
ANEXO III	113
Documento de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS	113
ANEXO IV.....	114
Documento de aprovação na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa	114
ANEXO V.....	115
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – grupo de não expostos ocupacionalmente.....	115
ANEXO VI.....	120
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – grupo expostos à sílica e silicóticos	120
ANEXO VII.....	125

Questionário de avaliação..... 125

Existe um grupo importante de doenças de âmbito ocupacional decorrentes da inalação de poeira contendo partículas minerais, as chamadas pneumoconioses (WHO, 2007; BRASIL, 2010; LANEY & WEISSMAN, 2012). A principal pneumoconiose que ocorre a nível ocupacional é a silicose, problema decorrente da inalação de sílica na sua forma cristalina (SiO_2), da qual o quartzo é a forma predominante (JIANG *et al.*, 2015; MUZEMBO *et al.*, 2015). A silicose é uma doença nodular, decorrente da deposição de colágeno no tecido pulmonar e é incurável. Desenvolve-se de acordo com a quantidade de sílica cristalina inalada e o tempo de exposição em que essa inalação ocorre, e a cessação da exposição não impede a progressão da doença. A forma crônica, que é a mais comum, apresenta um tempo de latência bastante elevado, necessitando de em torno de 10 a 20 anos de exposição para o desenvolvimento da doença. Essa pneumoconiose incapacita o indivíduo afetado, o torna mais suscetível a outras doenças pulmonares, como a tuberculose, e está altamente relacionada ao óbito dos indivíduos acometidos (NIOSH, 2002; FUBINI & HUBBARD, 2003; GREENBERG *et al.*, 2007; BRASIL, 2010). Além disso, a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classifica a sílica cristalina como um agente carcinogênico pertencente ao Grupo 1 para humanos (IARC, 2009).

De acordo com dados do Programa Nacional para Eliminação da Silicose (PNES), programa desenvolvido em parceria com a Organização Internacional do Trabalho (OIT) em 2000 com o objetivo de reduzir a ocorrência de silicose no país até o ano de 2010 e eliminar o problema até 2030; no período de 1999 a 2000 aproximadamente 2 milhões de trabalhadores formais estavam expostos à sílica cristalina no Brasil. Os setores mais atingidos são de construção civil, transformação de minerais não-metálicos, metalurgia, mineração e agricultura. Porém, infelizmente as estatísticas da doença não são exatas, e o número real de trabalhadores acometidos não é conhecido (PNES, 2001; BRASIL, 2006b).

Neste panorama, a cidade de Ametista do Sul, com pouco mais de 7 mil habitantes, localizada no norte do Estado do Rio Grande do Sul, é conhecida como a capital mundial da pedra ametista devido à grande ocorrência do mineral, composto de sílica cristalina, no subsolo da região. A principal atividade econômica do município é a extração de pedras preciosas e semi-preciosas, dentre elas a ametista, a ágata e o topázio. O setor corresponde a 75% de toda atividade econômica do município, e emprega aproximadamente 20% da população local (SOUZA *et al.*, 2017; AMETISTA DO SUL, 2018; IBGE, 2018; COOGAMAI, 2018). De acordo com dados apresentados

no Anuário Mineral Estadual do Rio Grande do Sul, no ano de 2015, o município foi responsável pela comercialização de 4.174.750 toneladas de geodos de ametista (BRASIL, 2017). Dados obtidos através do Datasus demonstram que no período compreendido entre os anos de 2010 a 2015, as principais causas de morte no município foram neoplasias (22,6%), doenças do aparelho respiratório (20,3%) e doenças do aparelho circulatório (19,3%). Diferentemente do que ocorre em Ametista do Sul, as doenças do aparelho respiratório aparecem somente em 4º lugar dentre as principais causas de morte no Brasil, correspondendo a 11,1% do total de óbitos registrados por residência no país, e a 12,4% das mortes registradas no Estado do Rio Grande do Sul (BRASIL, 2018).

Devido ao seu caráter progressivo e ao grande período de latência, em muitos casos a silicose é diagnosticada em estados mais avançados, onde há severa perda de função pulmonar decorrente da constante reação inflamatória local gerada pelo contato das partículas de sílica cristalina, seguida de deposição de colágeno nos pulmões, o que leva os indivíduos acometidos a apresentarem sintomas mais intensos (BRASIL, 2006b; GREENBERG *et al.*, 2007; LEUNG *et al.*, 2012; JIANG *et al.*, 2015).

O diagnóstico acontece através de exame de imagem, normalmente radiografia de tórax, aliado à avaliação clínica do paciente e ao histórico de exposição à sílica cristalina (ILO, 2011). Como forma de monitorização da exposição ocupacional, a Norma Regulamentadora 7 (NR 7) do Ministério do Trabalho que normatiza os procedimentos do Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO) recomenda que trabalhadores expostos a substâncias aerodispersóides fibrogênicas devem realizar espirometria no momento da admissão na empresa e a cada dois anos, e ainda, determina que os trabalhadores sejam submetidos a raio-X de tórax no momento da admissão e com periodicidade anual (Brasil, 1978a), pois ainda não existem biomarcadores periféricos validados capazes de avaliar a toxicidade induzida pela sílica cristalina no organismo dos indivíduos expostos. Dessa forma, os trabalhadores acabam tendo uma considerável exposição também à radiação ao longo de sua trajetória ocupacional, considerando que eles já estão potencialmente expostos à sílica cristalina, um agente que por si só já está relacionado ao desenvolvimento de fibrose pulmonar e câncer (NIOSH, 2002; IARC, 2009).

Diante desse quadro, este estudo objetivou avaliar potenciais biomarcadores periféricos precoces que sejam capazes de indicar que a exposição à sílica cristalina esteja promovendo alterações que podem culminar em silicose no organismo de

trabalhadores expostos ocupacionalmente à sílica cristalina, de forma a permitir uma considerável redução na ocorrência de efeitos adversos relacionados a esta exposição na saúde destes trabalhadores.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Avaliar potenciais biomarcadores precoces em indivíduos expostos ocupacionalmente à sílica cristalina

2. Objetivos específicos

- Avaliação de biomarcadores de ativação do sistema imunológico envolvidos na iniciação do processo inflamatório desencadeado pela exposição à sílica cristalina;
- Avaliação de biomarcadores envolvidos no processo de estresse oxidativo gerado pela exposição à sílica cristalina;
- Avaliações bioquímicas, da função renal e hepática e avaliações hematológicas;
- Avaliar possíveis associações entre os parâmetros analisados e sua importância no diagnóstico precoce da toxicidade provocada pela exposição ocupacional à poeira contendo sílica cristalina.

1. Toxicologia Ocupacional

A Toxicologia Ocupacional é a subárea da Toxicologia voltada ao estudo dos efeitos nocivos de xenobióticos e agentes presentes nos ambientes de trabalho na saúde do trabalhador, com o intuito principal de prevenir o desenvolvimento de patologias decorrentes dessa exposição a longo prazo (THORNE, 2012; DELLA ROSA *et al.*, 2014).

Na exposição ocupacional, o trabalhador tem contato com xenobióticos através de suas atividades profissionais de forma que ocorre a possibilidade de estas substâncias produzirem efeitos adversos sobre o organismo deste indivíduo. Esta ação tóxica pode ser local, por exemplo, e levar à lesão de pele e mucosas, ou pode ser sistêmica, quando o agente é capaz de penetrar as barreiras do organismo e produzir efeitos nos diferentes órgãos e/ou sistemas orgânicos. Ainda, a forma como as substâncias são manuseadas e as condições de trabalho e do ambiente de trabalho são fatores importantes a serem levados em conta na avaliação da exposição ocupacional (DELLA ROSA *et al.*, 2014). As principais vias de exposição dos trabalhadores a agentes no ambiente de trabalho são: inalação, ingestão e absorção dérmica. Visando a segurança do trabalhador, existem limites de exposição estabelecidos por agências regulamentadoras e/ou pela legislação para diversos agentes químicos, biológicos e físicos existentes nos mais diversos ambientes de trabalho (THORNE, 2012). Porém, infelizmente, em muitos casos, os valores de limites de exposição determinados não são suficientes para prevenir que o trabalhador desenvolva um problema de saúde decorrente das atividades ocupacionais (BRASIL, 2006a).

Nem sempre estabelecer a relação causal entre a doença ocupacional a atividade laboral é tarefa simples pois, muitas vezes, as manifestações clínicas de doenças que não derivam de exposição ocupacional apresentam as mesmas características daquelas derivadas da exposição a um xenobiótico no ambiente de trabalho. Além disso, na grande maioria dos casos existe um longo intervalo de tempo entre a exposição à substância e o desenvolvimento da patologia, além de ser influenciada por fatores pessoais que podem interferir no processo da doença (THORNE, 2012), como pode ser observado na Figura 1.

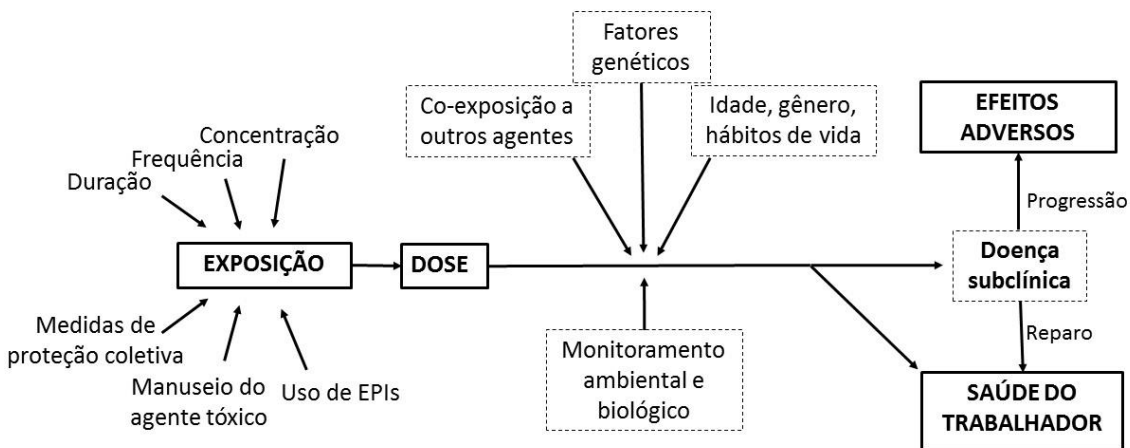


Figura 1. Processo de exposição ao agente e possíveis desfechos até o desenvolvimento da doença (Adaptado de THORNE, 2012).

2. Sílica cristalina

A sílica (ou dióxido de silício, SiO_2) é composta pelos elementos oxigênio e silício, o que a torna um dos compostos mais abundantes da crosta terrestre (GREENBERG *et al.*, 2007; BRASIL, 2010; OSHA, 2010). Apresenta-se nas formas cristalina e amorfa, sendo que a forma cristalina é considerada a de maior toxicidade. A sílica cristalina está presente na natureza em forma de quartzo, o qual existe em oito diferentes formas polimórficas, sendo algumas delas a cristobalita e a tridimita (BRASIL, 2010; NIOSH, 2002).

O quartzo é um mineral rochoso de origem magmática, comum no solo e nas rochas, ocorrendo em quantidades variáveis em diversos tipos de minerais, como no granito, no arenito e em pedras preciosas e semipreciosas (LEUNG *et al.*, 2012; GREENBERG *et al.*, 2007). Uma das variedades existentes de quartzo é a ametista, que nada mais é do que quartzo transparente de coloração arroxeada devido à presença de resíduos férricos. O maior produtor mundial de ametistas é o Brasil, seguido por Rússia, Sri Lanka, Índia, Madagascar, Uruguai, Estados Unidos da América e México. No Brasil, o principal Estado produtor é o Rio Grande do Sul, onde se localiza a cidade de Ametista do Sul, seguido pelo Estado da Bahia (BRANCO, 2008).

A cidade de Ametista do Sul é mundialmente considerada a maior produtora do mineral. Devido a isso, a economia do pequeno município de 7 mil habitantes gira em

torno da extração, beneficiamento e comercialização da pedra, e estas atividades empregam grande parte da população local (Ametista do Sul, 2018).

3. Exposição ocupacional à sílica cristalina

Devido ao seu grande número de aplicações, milhões de trabalhadores estão expostos à sílica a nível ocupacional em todo o mundo. Segundo dados do *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH), órgão responsável pelo estudo da saúde e segurança do trabalhador ligado ao *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), estima-se que pelo menos 1,7 milhões de trabalhadores americanos estejam expostos à sílica na sua forma cristalina. Existem inúmeras fontes de exposição ocupacional à sílica cristalina, principalmente nas áreas em que ocorrem perfuração, extração e beneficiamento de minerais (minas, pedreiras, construções, agricultura, entre outros) e na área industrial, onde ocorre a produção e manuseamento de materiais contendo dióxido de silício (BRASIL, 2010; LEUNG *et al.*, 2012; OSHA-NIOSH, 2012, OSHA-NIOSH, 2015).

A exposição à sílica ocorre através da inalação de poeira contendo sílica cristalina, e sua toxicidade é influenciada pelo tamanho da partícula. As partículas com tamanhos inferiores a 10 µm configuram a fração respirável, com capacidade de penetração além dos brônquios e capazes de se depositar nos alvéolos. Essa deposição de partículas de sílica cristalina no parênquima pulmonar ao longo dos anos leva a um quadro inflamatório que dá origem à silicose, além de outros quadros associados, como bronquite, tuberculose e doenças autoimunes (BRASIL, 2010; LEUNG *et al.*, 2012; SELLAMUTHU *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2015; MUZEMBO *et al.*, 2015).

O limite de tolerância (LT) estabelecido pela legislação brasileira na NR 15 para a exposição à sílica cristalina livre é dado pela fórmula a seguir:

$$LT = \frac{8}{\% \text{ quartzo} + 2} \text{ mppdc (milhões de partículas por decímetro cúbico)}$$

Esse valor é calculado com base na porcentagem de sílica (% quartzo) presente na poeira respirável no ambiente ocupacional, avaliada através do monitoramento ambiental e individual, para uma jornada de trabalho de até 48 horas semanais (BRASIL, 1978b). O valor preconizado pelo NIOSH e pela *American*

Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) é de 0,025 mg/m³, levando em conta uma jornada de trabalho de 40 horas semanais (BRASIL, 2010).

Estima-se que em 2007 havia uma prevalência média de 5,6% dos trabalhadores expostos à sílica cristalina no Brasil, um número bastante elevado quando comparado a resultados de países como Finlândia (3,8%), Áustria (3,1%), Alemanha, Grécia e Irlanda (em torno de 3%). No estado do Rio Grande do Sul estima-se que nesse mesmo ano cerca de 180 mil trabalhadores estavam expostos à sílica cristalina, com 18 mil potenciais casos de silicose no período (BRASIL, 2010). Aliado a esses dados, estudos demonstram que a prevenção através da utilização de equipamentos de proteção individual (EPI) pelos trabalhadores é insuficiente, especialmente devido à resistência ao uso de máscaras ou da utilização de protetores faciais não adequados à atividade (SANTOS *et al.*, 2007; BELTRAME *et al.*, 2010).

4. Silicose

A silicose é a principal e mais grave pneumoconiose, doença caracterizada pela ocorrência de fibrose pulmonar nodular, potencialmente fatal e irreversível (GREENBERG *et al.*, 2007; BRASIL, 2010; LEUNG *et al.*, 2012; FANG *et al.*, 2014). Pode ser desenvolvida de três formas diferentes, dependendo da concentração de sílica cristalina inalada e do tempo em que essa exposição ocorre. São elas: a forma crônica, a acelerada e a aguda (NIOSH, 2002).

A forma crônica é a mais comum e geralmente ocorre após a exposição à sílica cristalina em baixas concentrações por períodos longos, acima de 10 a 20 anos. Os trabalhadores afetados geralmente apresentam tosse seca, falta de ar, produção de escarro e considerável diminuição da função pulmonar, sintomas decorrentes da obstrução das vias aéreas devido ao processo de fibrose gerado nos alvéolos pulmonares. De acordo com revisão de Greenberg *et al.* (2007), o mecanismo pelo qual as partículas de sílica geram o processo de fibrose ainda não está totalmente elucidado, porém acredita-se que tenha início quando os macrófagos alveolares fagocitam as partículas numa tentativa de eliminá-las do organismo. Esses macrófagos podem sofrer danos se partículas de sílica não forem completamente removidas do pulmão, e acredita-se que eles liberem espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) quando danificados. Fatores transcricionais também podem ser liberados e induzir a produção de citocinas inflamatórias (IL- 6, IL- 1 β , TNF-

α), proteases, leucotrienos e prostaglandinas. Ao morrer, os macrófagos liberam as partículas de sílica de volta para o tecido, e elas são fagocitadas novamente por outros macrófagos, gerando um ciclo inflamatório danoso e contínuo. Além dos macrófagos, células epiteliais alveolares, linfócitos e neutrófilos também participam deste ciclo, aumentando o seu potencial inflamatório. Fatores fibrogênicos liberados por macrófagos recrutam fibroblastos para produzirem fibronectina e colágeno, culminando em fibrose pulmonar (FUBINI & HUBBARD, 2003; GREENBERG *et al.*, 2007; KAWASAKI, 2015). Um resumo destes mecanismos pode ser observado na Figura 2.

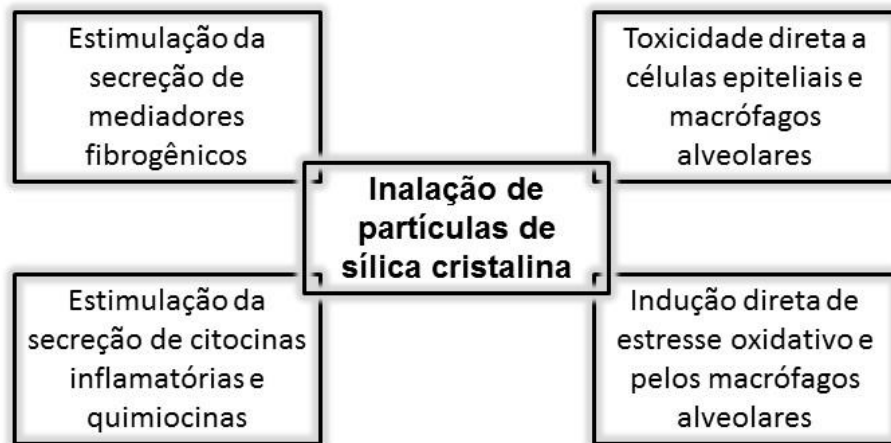


Figura 2. Mecanismos envolvidos na toxicidade das partículas de sílica cristalina inaladas.

A forma acelerada acontece de 5 a 10 anos após iniciar a exposição, dependendo da concentração de sílica inalada no ambiente de exposição. Os sintomas são semelhantes à forma crônica, porém sua evolução é mais rápida, com fibrose mais irregular e difusa (FUBINI & HUBBARD, 2003; GREENBERG *et al.*, 2007).

Já a forma aguda da silicose (também referida como silicoproteinose) se desenvolve após um período curto de exposição, de algumas semanas a 5 anos, a concentrações elevadas de sílica cristalina. Essa é a forma menos comum, porém é a mais fatal e de rápida progressão, tipicamente evoluindo para falência respiratória em menos de dois anos após o início da exposição (NIOSH, 2002; OSHA, 2010). Os mecanismos da silicose aguda diferem da silicose crônica. Foi verificado que na forma aguda os pneumócitos tipo II hipertrofiam, sugerindo que estejam produzindo

surfactante e material proteico em excesso, o que deixa os alvéolos repletos de fluidos. Além disso, o excesso de radicais livres gerados contribui para a agudização do problema (HOFFMAN, 1973; GREENBERG *et al.*, 2007).

Conforme a gravidade da silicose avança, infecções por fungos ou micobactérias podem se instalar no pulmão doente, agravando ainda mais o quadro do indivíduo acometido. A mais comum dessas infecções é a tuberculose, pois os macrófagos repletos de partículas de sílica são incapazes de fagocitar o agente *Mycobacterium tuberculosis*, causador da doença. Também ocorrem infecções por outras micobactérias e por fungos, como os do gênero *Cryptococcus* (NIOSH, 2002). Também podem ocorrer alterações genéticas devido à persistência da inflamação e constantes danos às células epiteliais e parenquimais pulmonares por compostos oxidantes, podendo culminar em neoplasias (IARC, 2009).

Estudos demonstram que a ocorrência de câncer em pacientes silicóticos é maior do que em pacientes não silicóticos. Steenland *et al.* (2001), em estudo de coorte agrupado onde avaliaram 65.980 trabalhadores e 1.072 casos de óbito em decorrência de câncer de pulmão, observaram um risco 1,7 vezes maior de desenvolvimento de câncer em silicóticos quando comparados a não silicóticos. Além disso, verificaram que o tempo de exposição à sílica cristalina é um fator importante para o desenvolvimento de câncer de pulmão. Ainda, um fator relevante para o aumento no risco de desenvolvimento de câncer, especialmente de pulmão, é o ato de fumar ou a co-exposição à fumaça do cigarro. Diversos estudos demonstram que o hábito de fumar aumenta o risco de desenvolvimento de câncer de pulmão em indivíduos expostos à sílica cristalina, e quanto maior a exposição ao cigarro maior é o risco de desenvolver câncer (KURIHARA & WADA, 2004; IARC, 2009; FROST *et al.*, 2011).

Outros problemas apontados como secundários à silicose são bronquite, enfisema, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), doenças autoimunes como artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico, e insuficiência renal crônica (GREENBERG *et al.*, 2007).

4.1. Formas de diagnóstico disponíveis

Não existem marcadores biológicos de exposição e de efeito específicos e validados para a silicose, assim, o diagnóstico acontece através do exame clínico,

com avaliação do histórico do paciente, e através de exames de imagem para detectar as anormalidades decorrentes da doença. O histórico de exposição a poeiras contendo sílica cristalina deve ser bem avaliado, e outros problemas respiratórios devem ser excluídos para correlacionar com os sintomas clínicos do paciente. Aliada a esses dois aspectos, a radiografia de tórax é importante na confirmação do diagnóstico. As alterações observadas na radiografia de tórax devem ser avaliadas conforme preconizado pela OIT (ILO, 2011), a qual recomenda a avaliação de anormalidades no parênquima pulmonar, como pequenas e grandes opacidades, sua profusão nas áreas afetadas e sua forma e tamanho. Em casos de dúvida e quando não há informações sobre o histórico de exposição de um paciente, a tomografia computadorizada é recomendada e também pode ser realizada uma biópsia pulmonar para que se possa avaliar a origem das lesões (BRASIL, 2006b; GREENBERG *et al.*, 2007; ILO, 2011; LEUNG *et al.*, 2012; JIANG *et al.*, 2015).

Como já mencionado, na grande maioria dos casos o diagnóstico é tardio, e cessar a exposição ao agente causador não garante que a doença pare de se desenvolver, e nem faz com que os danos causados se estabilizem (NIOSH, 2002; IARC, 2009). Além disso, não existe um tratamento eficaz e específico para a silicose. O mais recomendado é o afastamento do trabalhador e o uso de corticosteroides pode ser uma opção farmacológica, porém, sua eficácia é limitada (GREENBERG *et al.*, 2007; BRASIL, 2010). O transplante de pulmão também pode ser realizado em pacientes em estágios avançados (MAO *et al.*, 2011).

4.2. Biomarcadores de efeito precoces na exposição à sílica cristalina

Biomarcadores são indicadores biológicos utilizados na avaliação da exposição a um agente ou dos riscos à saúde provocados por ele, e podem ser divididos em três categorias: exposição, efeito e susceptibilidade. Os biomarcadores de exposição são avaliados quando se determina a concentração do xenobiótico ou de seu metabólito em uma amostra biológica. Os biomarcadores de efeito avaliam a interação entre um xenobiótico e o organismo, através da determinação de alterações fisiológicas, bioquímicas ou comportamentais que podem ser mensurados em amostras biológicas. Já os biomarcadores de susceptibilidade são indicadores de sensibilidade elevada aos efeitos de um determinado xenobiótico, que podem ser avaliados em amostras biológicas, como sangue e urina (NIOSH, 2002; AMORIM, 2003; DELLA

ROSA *et al.*, 2014; LEUNG *et al.*, 2012). O desenvolvimento de biomarcadores precoces é dificultado devido às inúmeras e complexas alterações celulares que acontecem na silicose (NIOSH, 2002). Apesar de vários biomarcadores de efeito precoces terem sido estudados até hoje, nenhum ainda foi completamente validado para utilização clínica (LEUNG *et al.*, 2012).

Na busca de um diagnóstico precoce da silicose, inúmeros estudos tem desenvolvido técnicas para identificar biomarcadores relacionados com a exposição à sílica, de forma a potencializar os cuidados com prevenção e diagnóstico clínico (BERNARD *et al.*, 1994; GULUMIAN *et al.*, 2006; SELLAMUTHU *et al.*, 2011; FANG *et al.*, 2014; JIANG *et al.*, 2015). Como já mencionado anteriormente, o contato das partículas de sílica cristalina no parênquima pulmonar leva a uma constante reação inflamatória local e dano oxidativo, culminando em fibrose pulmonar, o que caracteriza a silicose (GULUMIAN *et al.*, 2006). Dessa forma, biomarcadores de efeito que sejam capazes de detectar alterações na fase inflamatória, ou ainda, relacionados ao dano oxidativo provocado pelas partículas de sílica cristalina, anteriormente à ocorrência da fibrose, demonstram ser importantes alternativas na busca por formas precoces de diagnóstico a fim de evitar que o trabalhador exposto desenvolva a doença.

4.2.1. Biomarcadores relacionados à resposta inflamatória

Alguns estudos vêm tentando identificar biomarcadores precoces para o desenvolvimento de silicose. Braz *et al.* (2014) avaliaram diversos marcadores inflamatórios em indivíduos expostos à sílica e um grupo controle, e verificaram um aumento nos receptores do tipo 2 de TNF- α , um importante componente da resposta inflamatória. Além disso, verificaram uma correlação entre os níveis do receptor e o tempo de exposição com a severidade radiológica. Sauni *et al.* (2012) verificaram um aumento nos níveis de IL-6 em trabalhadores altamente expostos à sílica, com uma exposição mínima de 20 anos à poeira, quando comparados ao grupo controle. Porém, falta especificidade para que estes biomarcadores possam ser utilizados clinicamente, e seus resultados devem ser correlacionados com a análise de outros indicadores biológicos.

Neste cenário, existem alguns componentes celulares que exercem papel de extrema importância durante a reação inflamatória, as moléculas de adesão celular (CAMs, do inglês *cellular adhesion molecules*). As CAMs são proteínas localizadas na

superfície celular responsáveis pelas ligações entre os próprios leucócitos, dos leucócitos com as células endoteliais ou dos leucócitos com a matriz extracelular. Dessa forma, a ligação das CAMs com seus receptores e/ou ligantes gera respostas que são importantes na circulação dos linfócitos através dos órgãos linfoides e no recrutamento e migração de leucócitos para o sítio inflamatório, e têm papel central no desenvolvimento de problemas como câncer e doenças inflamatórias (APLIN *et al.*, 1999; DRIVALOS *et al.*, 2011; LODISH *et al.*, 2000; BLANCO *et al.*, 2004). As CAMs podem ser divididas em duas classes principais: 1) moléculas de adesão dependentes de cálcio, composta por caderinas e selectinas; e 2) moléculas de adesão não dependentes de cálcio, composta pelas integrinas e as proteínas da superfamília das imunoglobulinas. A família das caderinas desempenham papel importante durante a diferenciação tecidual e são as principais moléculas de adesão entre células, enquanto as selectinas são importantes durante a adesão celular entre leucócitos e células do endotélio vascular (LODISH *et al.*, 2000). Com relação à família das integrinas, são responsáveis pela adesão e migração leucocitária para a matriz extracelular circundante (JIN e VARNER, 2004), e a superfamília das imunoglobulinas exerce papel fundamental na imunidade humoral (ABBAS *et al.*, 2012). É possível observar a atuação de alguns destes componentes conforme retratado na Figura 3.

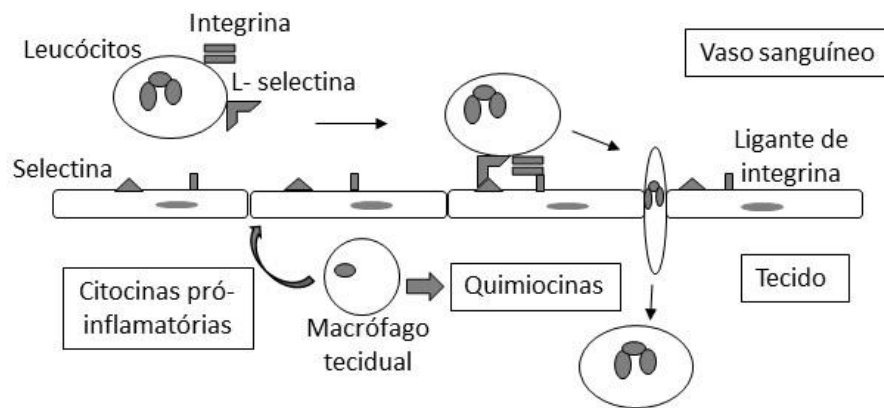


Figura 3. Envolvimento das selectinas e integrinas no processo de migração leucocitária para o sítio inflamatório (Adaptado de ABBAS *et al.*, 2012).

Quanto às selectinas, são CAMs que se ligam a carboidratos presentes na membrana plasmática, sendo responsáveis pela etapa inicial de adesão dos leucócitos circulantes às células endoteliais. As células endoteliais expressam a P-selectina (CD62P) e a E-selectina (CD62E), em resposta a citocinas, produtos

microbianos, histamina e também à trombina, no caso da P-selectina. Os leucócitos apresentam ligantes em sua superfície, especialmente grupos de carboidratos que contém grupamentos sialil, os quais são responsáveis pela ligação com as selectinas do endotélio (ABBAS *et al.*, 2012)

Ainda, os leucócitos expressam uma terceira selectina, a L-selectina (CD62L), que se liga a ligantes presentes nas células endoteliais (CD34, especialmente) e tecidos linfoides (GlyCAM-1, expresso por células endoteliais periféricas em linfonodos; e MAdCAM-1, expresso por células endoteliais das placas de Peyer) (MIYASAKA, 1998; ABBAS *et al.*, 2012). A L-selectina é responsável pelo direcionamento de linfócitos aos linfonodos durante processos inflamatórios e por direcionar linfócitos e neutrófilos aos locais de inflamação, o que pode culminar em destruição e fibrose tecidual (HAWASAKI, 2015; ABBAS *et al.*, 2012), como ocorre na silicose. Esta molécula desempenha um papel importante na inflamação crônica, e estudos demonstraram que neutralizando a L-selectina é possível levar à atenuação da infiltração leucocitária para os sítios de inflamação (KAWASAKI, 2015; STEEBER *et al.*, 1996). Em modelos animais de avaliação de fibrose pulmonar induzida por bleomicina, uma forma amplamente utilizada para avaliar a doença, foi possível observar que em camundongos com ausência de L-selectina e/ou molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1, do inglês *intercellular adhesion molecule-1*) a fibrose pulmonar foi altamente inibida, o que demonstra o importante papel da L-selectina na reação inflamatória seguida de fibrose pulmonar (HAMAGUCHI *et al.*, 2002).

Outro componente crucial da resposta inflamatória é o sistema complemento (SC), que é composto por diversas proteínas presentes no plasma, as quais trabalham de forma conjunta para eliminar o agente agressor através da sua opsonização, promoção do recrutamento de fagócitos e morte direta do patógeno (ABBAS *et al.*, 2012). O SC pode ser ativado através de três diferentes formas: 1) via clássica, que é ativada através da detecção de anticorpos de microrganismos ou estruturas estranhas ao organismo pela proteína C1q, que por sua vez ativa as proteases C1r e C1s, e estas iniciam a cascata proteolítica do SC; 2) via alternativa, ativada pelo reconhecimento de estruturas microbianas através da proteína C3; e 3) via das lectinas, que é ativada quando a proteína lectina ligante de manose (MBL) detecta resíduos de manose derivados de microrganismos, ativando duas serina proteases (MASP-1 e MASP-2) responsáveis pela ativação da cascata proteolítica do SC. O evento central da ativação do SC é a proteólise do componente C3, o que leva à

formação de compostos biologicamente ativos e culmina no complexo de ataque à membrana (MAC), que é o responsável pela lise e morte do patógeno em questão (ABBAS *et al.*, 2012).

A ativação do SC desempenha papel importante em praticamente todas as etapas da reação inflamatória, desde as alterações vasculares à quimiotaxia e migração de leucócitos para o tecido lesado. Mais especificamente, os componentes gerados após a clivagem do C3 demonstraram exercer função importante na estimulação de duas citocinas pró-inflamatórias, o TNF- α e a IL-1 β . Estas citocinas têm, dentre outras funções, a capacidade de ativar o endotélio vascular e de promover o recrutamento de leucócitos e de fibroblastos para a área de inflamação (TAKABAYASHI *et al.*, 1996; MARKIEWSKI & LAMBRIS, 2007).

Outro ponto relevante na resposta inflamatória é a liberação de proteína C reativa (PCR) para a circulação. A PCR é uma proteína de fase aguda produzida pelos hepatócitos em resposta à presença de TNF- α , IL-1 β e interleucina 6 (IL-6), e sua ação facilita a ativação do SC. Níveis aumentados de PCR são observados durante estados inflamatórios, devido a isso, ela é considerada um indicador inespecífico para a ocorrência de inflamação (KALLINY & BASSYOUNI, 2011; MEHERE *et al.*, 2016). Neste trabalho, optamos por utilizar kits capazes de quantificar níveis muito baixos de PCR (PCR ultrasensível – PCR-us), de forma a verificar se esta seria uma forma de avaliar a toxicidade induzida pela sílica cristalina precocemente.

Como todos estes componentes estão envolvidos na resposta inflamatória, a etapa inicial para o desenvolvimento de silicose, seu estudo como formas precoces de avaliar a toxicidade da sílica cristalina é de grande importância por se tratarem de formas simples e não invasivas de avaliação.

4.2.2. Biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo

Além da reação inflamatória, as partículas de sílica cristalina que são capazes de se depositar no parênquima pulmonar ainda podem ser danosas devido à geração de espécies reativas. Caso a geração destas espécies ocorra em quantidades que superem as defesas antioxidantes do organismo, podem ocorrer danos à macromoléculas (lipídios, proteínas e DNA) como resultado do processo de estresse oxidativo (SHI *et al.*, 2001).

A sílica cristalina gera radicais livres através de duas maneiras: 1) espécies reativas que estão intrinsecamente presentes na superfície das partículas, especialmente nos casos em que a sílica foi recentemente fraturada; e 2) geração de espécies reativas pelas células ativadas na presença das partículas de sílica no tecido pulmonar, especialmente macrófagos alveolares (SHI *et al.*, 2001). A produção de espécies reativas, especialmente as derivadas do oxigênio, é um dos mecanismos regulatórios chave na iniciação e manutenção da inflamação induzida por sílica cristalina (KAWASAKI, 2015). Através da indução de estresse oxidativo, a sílica cristalina é capaz de gerar danos a macromoléculas, especialmente lipídios, proteínas e ao DNA. Neste último, a capacidade de gerar danos está altamente relacionada à carcinogênese atribuída à sílica cristalina, pela sua capacidade de formar adutos ou gerar quebras nas fitas de DNA e provocar danos a cromossomos (SHI *et al.*, 1994; PELUSO *et al.*, 2015; BONASSI *et al.*, 2016; SHOEB *et al.*, 2017).

Uma das consequências da exposição aos radicais livres gerados pela sílica cristalina é o ataque a membranas biológicas, desencadeando o processo de peroxidação lipídica, também conhecido como lipoperoxidação. Inúmeros estudos já demonstraram a capacidade da sílica cristalina de promover lipoperoxidação, tanto *in vitro* como *in vivo* (KAMAL *et al.*, 1989; SHI *et al.*, 1994; AZARI *et al.*, 2011; SAKHVIDI *et al.*, 2015; FUKUI *et al.*, 2016). Neste contexto, a quantificação de malondialdeído (MDA), um dos mais conhecidos subprodutos do dano lipídico produzido pelo estresse oxidativo nas membranas biológicas do organismo, é uma importante ferramenta para avaliar a toxicidade decorrente do dano oxidativo da sílica cristalina em trabalhadores ocupacionalmente expostos (GROTTO *et al.*, 2007).

Uma das maneiras de proteção que o organismo possui contra os danos provocados pelo estresse oxidativo é através do sistema antioxidante. Esse importante sistema é composto por antioxidantes enzimáticos, como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GSH-Px) e antioxidantes não enzimáticos, como a glutathione reduzida (GSH). Além destes componentes endógenos, substâncias exógenas como as vitaminas C, A e E também agem nesse sistema, de modo a diminuir o dano provocado pelo estresse oxidativo, e são adquiridas através da dieta (BIRBEN *et al.*, 2012). Esses antioxidantes atuam através de diversos mecanismos e, conforme seu modo de ação, podem ser classificados como *scavengers*, que agem transformando um radical livre em outro radical com

menor reatividade; ou *quenchers*, capazes de neutralizar completamente o radical livre (ABDALLA & FAINE, 2008).

Com relação aos antioxidantes exógenos, a vitamina C (ácido ascórbico) é considerada um dos nutrientes hidrossolúveis mais importantes obtidos através da ingestão alimentar. Por ter baixa capacidade de redução, é capaz de converter a maioria das espécies reativas em substâncias inofensivas (ABDALLA & FAINE, 2008). Devido a esta importante característica, a vitamina C atua como um antioxidante *in vivo* e sua quantificação é considerada um biomarcador de estresse oxidativo nos seres humanos (BAIERLE *et al.*, 2012).

A vitamina A, também conhecida como retinol, é uma vitamina lipossolúvel obtida através da ingestão de alimentos que contenham carotenoides, que são pigmentos de tecidos fotossintéticos de vegetais, e o carotenoide com maior potencial para ser convertido a vitamina A é o β -caroteno. Não só a vitamina A, mas outros carotenoides também têm ação antioxidante, atuando como supressoras de oxigênio singlete e também como sequestradoras de radicais livres, sendo que esta atividade antioxidante é relevante principalmente em situações de baixas tensões de oxigênio observadas em condições fisiológicas (ABDALLA & FAINE, 2008). Também lipossolúvel, a vitamina E (α -tocoferol) se acumula no interior das membranas biológicas, protegendo-as contra o processo de lipoperoxidação. Atua suprimindo o oxigênio singlete e sequestrando os radicais superóxido e hidroxila, dessa forma, bloqueia o início do processo de peroxidação lipídica e também sua propagação (ABDALLA & FAINE, 2008).

Dessa forma, a quantificação destes compostos pode auxiliar na avaliação da toxicidade induzida pela sílica cristalina e no seu potencial como biomarcadores de efeito precoce em trabalhadores expostos.

CAPÍTULO I (ARTIGO):
Inflammatory and oxidative stress parameters as potential early biomarkers for
silicosis

Submetido para publicação na revista *Clinica Chimica Acta*

Inflammatory and oxidative stress parameters as potential early biomarkers for silicosis

Jessica Nardi^{a,b}; Sabrina Nascimento^{a,b}; Gabriela Göethel^{a,b}; Bruna Gauer^{a,b}; Elisa Sauer^{a,b}; Nuryan Fão^{a,b}; Larissa Cestonaro^{a,b}; Caroline Peruzzi^{a,b}; Jorge Souza^c; Solange Cristina Garcia^{a,b,*}

^a Laboratório de Toxicologia (LATOX), Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

^c Unidade Regional de Saúde do Trabalhador, Ametista do Sul, RS, Brasil.

*Corresponding author at: Avenida Ipiranga 2752, Santa Cecília, Porto Alegre, RS, CEP: 90610-000, Brazil. Tel.: +55 3308 5297; fax: +55 51 3308 5437.
E-mail address: solange.garcia@ufrgs.br (S.C. Garcia)

Highlights

- L-selectin appears to be an useful biomarker for crystalline silica exposure.
- Non-silicotic miners exposed to crystalline silica presented decreased L-selectin.
- L-selectin was significantly associated with time of exposure to crystalline silica.
- Oxidative damage was observed in non-silicotic miners exposed to crystalline silica.
- Inflammatory and oxidative stress biomarkers were significantly associated.

Abstract

Workers involved in mining activities are exposed to crystalline silica, which leads to constant pulmonary inflammatory reaction and severe oxidative damage, resulting in silicosis. In this line, this work aimed to evaluate inflammatory and oxidative stress parameters as potential early biomarkers of effect to assess crystalline silica toxicity in workers occupationally exposed in mining activities. For this, 38 crystalline silica exposed workers (CSEW), 24 silicotic individuals (SI) and 30 non-occupationally exposed workers (NEW) were enrolled, totalizing 92 participants. CSEW were divided into two groups, according to the time of exposure: 19 workers with 1-15 years of occupational exposure (CSEW I) and 19 workers above 16 years of occupational exposure (CSEW II). The inflammatory parameters assessed were L-selectin, β -2 integrin and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) surface protein expression in lymphocytes and monocytes, complement C3 and C4, high sensitivity-C reactive protein (hs-CRP) and adenosine deaminase (ADA) in serum. Plasma levels of malondialdehyde (MDA) and serum levels of vitamin C were determined as biomarkers of oxidative stress. Biochemical and hematological parameters were also investigated. L-selectin surface protein expression was significantly decreased in CSEW II group ($p < 0.05$), evidencing the importance of this immune system component as a potential marker of crystalline silica-induced toxicity. MDA levels were significantly increased in CSEW I, CSEW II and SI groups compared to NEW group ($p < 0.05$). Vitamin C levels were decreased, while C3, hs-CRP, ADA and aspartate aminotransferase (AST) levels were increased in SI group compared to NEW group ($p < 0.05$). Glucose and urea levels were significantly higher in CSEW I and II and SI groups compared to NEW group ($p < 0.05$). Negative partial association was found between L-selectin and time of exposure ($p < 0.001$), supporting the relevance of this biomarker evaluation in long time exposure to crystalline silica. Significant associations were also observed among inflammatory and oxidative stress biomarkers. Therefore, our results demonstrated the relevance of L-selectin as a potential peripheral biomarker for monitoring crystalline silica-induced toxicity in miners chronically exposed, before silicosis is developed. However, more studies are necessary for better understanding its use as an early biomarker in exposed workers.

Keywords: biomarker of effect, L-selectin, crystalline silica, silicosis, lung fibrosis, mining.

1. Introduction

Brazil is one of the most important gemstones exporter countries in the world. Among the most extracted gems is amethyst, a violet variety of quartz, which is mostly found in the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil [1]. The amethyst mining is responsible for nearly 75% of all the economic activity in the 7 thousand-resident town of Ametista do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil, the greatest producer of the gem worldwide [2,3]. The town is located in a region that is part of the Serra Geral Formation, where amethyst-bearing basaltic lava flows have been identified [4].

Quartz is composed of crystalline silica (SiO_2), a compound that when fractured is harmful for the health of those who inhale the dust, especially the workers of mining activities. When respirable crystalline silica particles are inhaled, they are able to reach the alveoli, inducing to oxidative stress by the formation of reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RNS) due to the generation of siloxil radicals after crystalline silica fracturing [5]. Malondialdehyde (MDA), one of the better-known secondary products of lipid peroxidation, is a useful biomarker to evaluate oxidative stress [6]. Concomitantly, the particles unleash an inflammatory response that involves alveolar epithelial cells and elements of the immune system as macrophages, neutrophils, lymphocytes, cellular adhesion molecules (CAMs), cytokines, chemokines and complement system activation [5, 7, 8]. Important components of this reaction are L-selectin, a CAM (also known as CD62L) responsible for lymphocytes and neutrophils trafficking to inflammatory sites; component C3 of the complement system, which is a potent inflammatory mediator after activated; and adenosine deaminase (ADA), an ubiquitous enzyme present in inflammatory conditions [9, 10, 11, 12]. Since they are present during early stages of the disease, they can be helpful during early diagnosis of silicosis.

Once the inflammatory response is not able to eliminate the silica particles from the alveoli, the reaction perpetrates in the lung tissue culminating in the generation of fibrotic nodules, characterizing silicosis [5, 8, 9, 13, 14, 15, 16]. Silicosis consist in the most important occupational pneumoconiosis. Despite being known for so long, this

disease is still responsible for the death of thousands of workers worldwide nowadays [5, 17, 18, 19].

This fibrotic process usually takes more than 15 to 20 years to be developed and depends on the amount of crystalline silica inhaled [15, 20]. Its main symptoms are cough, breathlessness and weakness. Therefore, the disease is generally diagnosed by chest X-ray in late stages, when the lungs present considerable fibrotic nodules and, consequently, important loss of respiratory function. Since it is progressive, removing the worker of the workplace does not guarantee the disease stagnation. In addition, effective treatments for the problem are not available yet, and lung transplant is sometimes an option. Thus, silicotic individuals turn out to be incapable to work and, as the disease progresses; they become unable to realize simple daily tasks [5, 15, 20, 21, 22].

In addition, crystalline silica is considered a carcinogenic compound belonging to Group 1 by the International Agency for Research on Cancer (IARC). Many *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that crystalline silica exposure is linked to cancer development [23, 24, 25, 26, 27, 28], especially due to its capacity to promote oxidative stress and chronic inflammation.

Therefore, considering the actual context of workers exposed to crystalline silica and the lack of an early form to diagnose silicosis, this study aimed to investigate inflammatory and oxidative stress parameters as potential early peripheral biomarkers of effect for monitoring workers occupationally exposed to crystalline silica in a mining town of Southern Brazil.

2. Material and Methods

2.1. Subjects

Four groups composed this study, with ninety-two male participants, as demonstrated in Figure 1. The non-occupationally exposed workers (NEW) group consisted of 30 men who work in administrative functions in the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, who have never had history of crystalline silica occupational exposure. The crystalline silica exposed workers (CSEW) group consisted of 38 men who work in mining activities in the town of Ametista do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil (Figure 1), with no diagnosis of silicosis.

Since there were workers with different time of exposure, we divided the CSEW in two groups: CSEW I, composed of 19 workers with 1 to 15 years of occupational exposure; and CSEW II, composed of 19 workers with 16 or more years of occupational exposure. All miners work on underground mines. The last group consisted of 24 silicotic individuals (SI), who had been diagnosed with silicosis and are retired from mining activities.

Recruitment of exposed workers and SI was achieved by contact with a public facility especially focused on miner's occupational health in the town. Nurses and the doctor of the facility contacted the mining companies, the workers and the SI and invited them to participate of the study.

Individuals with chronic diseases (diabetes, hepatitis, tuberculosis and previous cancer history) and with less than one year of occupational exposure to crystalline silica were excluded of the study.

All the subjects answered a questionnaire regarding health status, lifestyle, drinking, smoking and exercising habits, diet, medicines use and occupational activities. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Registry CAAE n° 60976516.7.0000.5347). All participants were informed about the study and signed an informed consent.

2.2. Sample collection

Blood of all participants was collected in the morning, after an 8-hour fasting period, by venipuncture using vacutainer tubes. An EDTA tube (4 mL) was collected for blood count and L-selectin, β -2 integrin and ICAM-1 surface protein expression. The EDTA-blood was centrifuged at 1500 xg for 10 min at room temperature to quantify malondialdehyde (MDA) in plasma. An anticoagulant free tube (5 mL) was also centrifuged at 1500 xg for 10 min at room temperature, and serum was used to perform ADA activity determination and the following biochemical analysis: glucose, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyl transferase (GGT), urea, creatinine and serum total protein determinations. The remaining serum was stored at -20°C for posterior analysis of the components 3 and 4 of the complement system (C3 and C4, respectively) and high sensitivity C reactive protein (hs-CRP) and at -80°C for vitamin C analysis. An amount of 50 mL of urine was collected from each participant to determine creatinine and

microalbuminuria levels, and the remaining urine was frozen at -80°C for further analysis.

2.3. Anthropometric measurements

In the same day of blood and urine collection, subjects were evaluated for weight and height to obtain the body mass index (BMI). Weight was measured with an upright scale (Plenna Sport MEA 07420), with a capacity to weigh 150 kg in 100-g increments. Height was measured using a standing stadiometer. BMI was obtained by division of the person's weight in kilograms (kg) by the person's square height in meters (m) (kg m²).

2.4. Inflammatory biomarkers determination

2.4.1. L-selectin, β -2 integrin and ICAM-1 surface protein expression

Determination of L-selectin, β -2 integrin and ICAM-1 surface protein expression (%) in lymphocytes and monocytes was performed through flow cytometry, using EDTA-collected blood. To analyze L-selectin surface expression, blood samples were incubated exclusively with fluorescein-5-isothiocyanate (FITC)-conjugated L-selectin antibody (BD Biosciences™, San Jose, CA, USA). Additionally, to evaluate β -2 integrin and ICAM-1 surface expression, samples were incubated with FITC-conjugated integrin β -2 antibody and phycoerythrin (PE)-conjugated ICAM-1 antibody (BD Biosciences™, San Jose, CA, USA). BD® FACS Lysing solution was used following the manufacturer's instructions. Cells were immediately analyzed at Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using Attune® Cytometric Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Lymphocytes and monocytes were identified according to manual gating, considering the parameters of side scatter and size. Results are expressed as the percentage of L-selectin surface, β -2 integrin or ICAM-1 protein expression in lymphocytes or monocytes.

2.4.2. Complement C3 and C4 and high sensitivity- C Reactive Protein (hs-CRP) determinations

After samples thawing, serum C3 and C4 levels and hs-CRP were quantified using a Mindray® BS-120 Chemistry Analyzer (Shenzhen Mindray Bio-Medical

Electronics Co Ltd, Shenzhen, China) by immunoturbidimetric method with commercial kits (BioClin[®], Belo Horizonte, MG, Brasil).

2.4.3. Adenoside deaminase (ADA) activity determination in serum

ADA activity was determined in serum using a colorimetric method described by Giusti and Galanti [29], with ammonia formation after the enzyme in serum reacts with the substrate adenosine. Results are expressed as U L⁻¹.

2.5. Oxidative stress biomarkers

2.5.1. Malondialdehyde (MDA) plasma levels

Lipid peroxidation was evaluated through quantification of MDA levels in plasma, by high performance liquid chromatography with visible detector (HPLC-VIS), as previously described by Grotto et al. [5]. Results are expressed as $\mu\text{mol L}^{-1}$.

2.5.2. Vitamin C serum levels

The exogenous antioxidant, vitamin C, was quantified in serum by HPLC with ultraviolet detection (HPLC-UV) as previously developed in our laboratory and described by Baierle et al. [30]. Results are expressed as mg L⁻¹.

2.6. Biochemical and hematological analyses

Biochemical parameters were quantified in fasting serum using a Mindray[®] BS-120 Chemistry Analyzer (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co Ltd, Shenzhen, China), with commercial kits (Bioclin[®], Belo Horizonte, MG, Brazil). Glucose, AST, ALT, ALP, GGT, creatinine, serum total protein and urea were determined by enzymatic colorimetric tests. Microalbuminuria was analyzed by immunoturbidimetric commercial kits (Bioclin[®], Belo Horizonte, MG, Brazil). Controls were analyzed with samples and only two standard deviations of the reference interval were accepted.

The hematological analyses of hemoglobin (Hb), hematocrit (Ht), red blood cells (RBC), white blood cells (WBC) and platelet counts were performed in whole blood collected with EDTA in an hematology analyzer (ABX Pentra XL 80 Horiba[®], France).

2.7. Statistical analysis

Data were analyzed using IBM SPSS Statistics software (version 22). A normality test was employed to check data distribution, and the variables were evaluated using Shapiro-Wilk test. Comparisons between the groups were carried out using Kruskal-Wallis test according to the distribution of the variables. Univariate analysis (UNIANOVA) was used to evaluate significant differences between the groups and examine the influence of confounding factors (age, BMI, smoking habits, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and multivitamin supplement intake), followed by Bonferroni's *post hoc* test. To evaluate associations between pairs of variables controlling by the confounding factors smoking habits, NSAIDs and multivitamin supplement intake, partial correlations were performed considering only the exposed (CSEW I and II) and silicotic (SI) groups, since the variable of time of exposure does not apply to the non-occupationally exposed group. Variables with a non-normal distribution were log transformed to be included in UNIANOVA and partial correlations. Results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) or median (interquartile range) according to distribution of variables, and number of participants and percentage (n [%]). Significance was accepted at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Characteristics of the study population

Data obtained from the questionnaires answered by the subjects are summarized on Table 1. Significant differences were observed among the studied groups for age and smoking habits (in relation to former smokers and non-smokers). Regarding BMI, anti-inflammatory and multivitamin supplement use no significant differences were found among groups. The most used NSAIDs according the participants reported on the questionnaires are diclofenac and ibuprofen. Among the SI group, 6 individuals (25%) reported the use of Foraseq® (formoterol fumarate dihydrate + budesonide). In relation to weekly workload, no significant differences were found between the NEW, CSEW I and CSEW II groups. Regarding time of exposure, significant differences were observed for CSEW I and CSEW II groups and CSEW I and SI groups.

3.2. Inflammatory biomarkers

3.2.1. Percentage of L-selectin surface expression

According to demonstrated in Figure 2A, a significant down-regulation of L-selectin surface protein expression in lymphocytes was observed for CSEW II group (38.91 ± 2.11 %) compared to NEW group (47.30 ± 1.82 %) ($p < 0.05$), and for SI group (24.21 ± 1.73 %) compared to all other groups ($p < 0.001$). Regarding the percentage of L-selectin surface protein expression in monocytes, no significant differences were found among the studied groups (Figure 2B).

3.2.2. Percentage of β -2 Integrin and ICAM-1 surface expression

The results for integrin β -2 and ICAM-1 surface expression are presented on Table 2. No significant difference was observed among the groups for both parameters, neither for lymphocytes nor for monocytes surface.

3.2.3. Complement C3 and C4

As showed in Figure 3A, significant differences in C3 serum levels were found between SI and NEW (188.24 ± 9.95 and 138.89 ± 4.43 mg dL⁻¹, respectively), SI and CSEW I (188.24 ± 9.95 and 143.92 ± 5.20 mg dL⁻¹, respectively) and between SI and CSEW II (188.24 ± 9.95 and 140.51 ± 4.83 mg dL⁻¹, respectively) ($p < 0.05$). Nevertheless, means are within the reference range (75 – 200 mg dL⁻¹).

In relation to C4 serum levels, no significant differences were found among the studied groups, and all means were within the reference range (9 – 45 mg dL⁻¹) (Figure 3B). Despite that, it was possible to observe that C4 serum levels tended to increase according to the exposure time. Hence, an increase of 12.53% was observed for CSEW I group, 13.93% for CSEW II group and 23.73% for SI group compared to NEW group.

3.2.4. hs-CRP levels

Hs-CRP serum levels were significantly increased in SI group compared to NEW group (5.92 [2.33 - 14.93] and 0.95 [0.38 - 2.91] mg L⁻¹, respectively) ($p < 0.01$); in SI group compared to CSEW I group (5.92 [2.33 - 14.93] and 0.98 [0.69 - 2.01] mg L⁻¹, respectively) ($p < 0.05$); and in SI group compared to CSEW II (5.92 [2.33 - 14.93] and 1.25 [0.55 - 1.71] mg L⁻¹, respectively) ($p < 0.001$).

3.2.5. ADA activity in serum

ADA activity was significantly increased in SI group compared to NEW group (26.99 ± 2.65 and 19.24 ± 1.38 U L⁻¹, respectively) ($p < 0.01$); in SI group compared to CSEW I group (26.99 ± 2.65 and 20.32 ± 2.50 U L⁻¹, respectively) ($p < 0.05$); and in SI group compared to CSEW II (26.99 ± 2.65 and 20.86 ± 2.37 U L⁻¹, respectively) ($p < 0.05$).

3.3. Oxidative stress biomarkers

3.3.1. MDA plasma levels

As showed in Figure 4A, the lipid peroxidation marker MDA in plasma was significantly different in CSEW I group (7.80 ± 0.36 μmol L⁻¹) compared to both NEW and SI groups (6.51 ± 0.28 and 9.35 ± 0.23 μmol L⁻¹, respectively) ($p < 0.05$). A significant increase was also observed in CSEW II group (7.62 ± 0.31 μmol L⁻¹) and SI group (9.35 ± 0.23 μmol L⁻¹) compared to NEW group (6.51 ± 0.28 μmol L⁻¹) ($p < 0.05$).

3.3.2. Vitamin C serum levels

Figure 4B shows that a significant decrease was observed in the exogenous antioxidant vitamin C for SI compared to NEW (4.44 ± 0.41 and 7.62 ± 0.58 mg L⁻¹, respectively) ($p < 0.05$).

3.4. Partial correlations among inflammatory and oxidative stress biomarkers

Results obtained from partial correlations analyses controlling by the confounding factors smoking habits, NSAIDs and multivitamin supplement intake demonstrated that L-selectin surface protein expression was negatively correlated with time of exposure, as demonstrated in Figure 5 ($r = -0.487$; $p < 0.001$). Data regarding correlations among the inflammatory and oxidative stress biomarkers are demonstrated on Table 3.

3.5. Biochemical and hematological analyses

Results of biochemical and hematological parameters are demonstrated in Table 4. Glucose levels were significantly increased in all exposed groups compared

to NEW group ($p < 0.05$); however, the means for all groups were within the reference ranges. A significant increase in AST activity was observed in SI group compared to NEW group ($p < 0.01$); however, no significant difference was found among the groups regarding the other hepatic enzymes and serum total protein levels. Significant increase was found for urea in all exposed groups compared to NEW group ($p < 0.05$), but the means were within the reference ranges. Despite these differences in urea, serum creatinine and microalbuminuria demonstrated no significant differences among the four groups.

No significant differences were observed for RBC, hemoglobin, hematocrit, platelets and WBC parameters.

4. Discussion

The present study evidenced, for the first time, that L-selectin surface protein expression in lymphocytes is a potential peripheral biomarker of effect for monitoring crystalline silica toxicity in miners occupationally exposed, allied to a clinical history of at least 16 years of occupational exposure in individuals without silicosis. The decrease in L-selectin surface protein expression in lymphocytes observed in individuals with more than 16 years of exposure was accompanied by an even greater decrease of this biomarker for silicotic individuals, demonstrating its importance as an early biomarker of effect. Moreover, MDA, a biomarker widely used as an indicator of cellular injury, can help in early diagnosis of silicosis by demonstrating the occurrence of lipid peroxidation, even in occupational exposure periods of less than 15 years.

Furthermore, our results demonstrated that L-selectin surface protein expression was inversely correlated with time of occupational exposure to crystalline silica, reinforcing the relevance of L-selectin in lymphocytes as a potential biomarker for monitoring crystalline silica toxicity in occupationally exposed workers.

As mentioned before, crystalline silica exposure leads to constant pulmonary inflammatory reaction and severe oxidative damage, resulting in silicosis. In the absence of an early diagnosis, patients are generally diagnosed in late stages of the disease and the prognosis is poor, leading to incapacity to work [31, 32]. In addition, workers are also exposed to radiation due to the necessity to perform a chest radiograph for the disease diagnose [33] and there are no validated biomarkers of exposure for crystalline silica, which could help in the disease early detection [34]. Considering that, the study and development of new diagnostic methods that allow

non-invasive assessment of crystalline silica-induced toxicity is crucial to provide better forms of silicosis surveillance and, consequently, better prognosis in individuals occupationally exposed to crystalline silica.

In the present study, we demonstrated that blood lymphocyte L-selectin surface protein expression could be a simple and effective tool on the evaluation of crystalline silica toxicity, in miners occupationally exposed in order to help for an early diagnosis of silicosis. L-selectin is a CAM, responsible for directing lymphocytes to lymph nodes and leading lymphocytes and neutrophils to inflammatory sites. Its expression on leukocyte surface allows the cells to leave the bloodstream, activate endothelial cells and start leukocyte rolling and adherence, playing an important role in acute and chronic inflammation [10, 35, 36].

Only leukocytes express L-selectin on their surface, and naïve T cells express it in high levels. After T cells activation, L-selectin is shed from leukocyte surface and its expression is decreased [10], as observed in our study. Moreover, significantly reduced L-selectin expression in lymphocytes had already been described in diabetic patients who develop diabetic retinopathy as a consequence of all the metabolic alterations involved in diabetes. Besides L-selectin expression in lymphocytes, the authors also observed elevated serum levels of soluble L-selectin, corroborating that it is shed from lymphocytes surface after the cells activation [37]. Klinger et al. [38] studied L-selectin expression on circulating T cells in blood, lymph nodes and thoracic duct of rats by confocal laser scanning microscopy, and observed that L-selectin expression is reduced in active T cells bound to the endothelium, and its expression decreases even more after T cell transmigration to the tissue. They suggest that reduced levels of L-selectin expression might be necessary for the induction of primary immune responses for secondary lymphoid organs, what might explain that in our study we only observed decreased levels of L-selectin expression in lymphocytes, and not in monocytes.

In another study, Hamaguchi and colleagues [39] evaluated the role of L-selectin and ICAM-1 in bleomycin-induced lung fibrosis in mice. They observed that collagen deposition was inhibited in L-selectin or ICAM-1 lacking mice, and pulmonary fibrosis was practically eliminated in mice lacking both CAMs, indicating that they play a crucial role in bleomycin-induced lung fibrosis by mediating leukocyte accumulation in inflammatory site and regulating the production of proinflammatory cytokines and the profibrotic cytokine transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). Different from the

conclusions of this study described by Hamaguchi et al. [39], our results demonstrated that only L-selectin plays a role in early alterations induced by crystalline silica in exposed workers. According to our results, ICAM-1 and β 2-integrin surface expression was not significantly different among the groups in lymphocytes and monocytes, although they are members of the integrin family also involved in the mechanisms of host defense that elicit inflammatory response [40, 41].

Additionally, our study also evaluated the components of the complement system C3 and C4 in serum, once they are immunologic elements involved in the induction of acute inflammatory response [42]. C4 remained in similar levels for all the studied groups, as already observed in other studies [9, 43], while C3 levels were only significantly increased in silicotic individuals, differently from the results obtained in a study conducted by Kalliny and Bassyouni [44]. They evaluated C3 levels in mining workers exposed to crystalline silica with and without silicosis and in a group of non-exposed individuals. Their results demonstrated increased C3 levels for both exposed groups compared to the non-exposed group. According to our results, neither C3 nor C4 are suitable as early biomarkers for crystalline silica toxicity, since the only significant difference observed was for SI in C3 levels. However, assessment of C3 levels may be suitable on the monitoring of patients with silicosis to evaluate the disease progression.

Another inflammatory parameter evaluated in this study was hs-CRP, a classical acute-phase serum protein considered an unspecific indicator of inflammatory reaction, extensively used as a predictor for cardiovascular events due to the capacity of detection of very low levels of CRP in serum [45]. In our study, hs-CRP was significantly increased only in the SI group, compared to all other groups, similarly to the findings of Kalliny and Bassyouni [44]. They evaluated C-Reactive Protein (CRP) instead of hs-CRP, and observed significant increase in a group of silicotic workers, compared to non-exposed and non-silicotic workers. These findings suggest that, as for C3 levels, hs-CRP is not a suitable early biomarker either. Nevertheless, the values of hs-CRP were negatively correlated with L-selectin expression in lymphocytes, and positively with C3 levels, corroborating that inflammation is a mechanism of crystalline silica toxicity in the development of silicosis.

We also evaluated ADA activity in serum, an ubiquitous enzyme of purine metabolism that catalyzes the deamination of adenosine and deoxyadenosine to inosine and deoxyinosine, respectively, and is found in most mammalian cells [11, 46].

It is considered a marker of cell mediated immunity and is involved in inflammatory process in some diseases, as tuberculosis and rheumatoid arthritis [11]. ADA is important in the proliferation and differentiation of T cells, and in the maturation of monocytes to macrophages. It's determination in different body fluids is also used in the auxiliary diagnosis of tuberculosis, due to its low specificity [47, 48]. In our study, ADA activity was significantly increased only in SI group, thus it is not useful as an early biomarker of crystalline silica toxicity. However, it was negatively correlated with L-selectin expression and positively correlated with C3, demonstrating that ADA is also involved in silicosis pathophysiology.

Moreover, oxidative stress biomarkers were also evaluated in the current study, due to the known capacity of crystalline silica to induce the formation of ROS and RNS in lungs. Innumerable studies demonstrate the involvement of lipid peroxidation, evaluated through quantification of MDA in plasma, in crystalline silica exposure [16, 49, 50, 51]. Corroborating our results, Anlar et al. [16] observed a significant increase in MDA plasma levels of ceramic workers exposed to crystalline silica, compared to a non-exposed group of individuals. Increased MDA levels were also observed in a study conducted in healthy glass sandblasters exposed to crystalline silica aerosols [50]. In our work, we observed significant increase in MDA levels for all exposed groups compared to the non-exposed group, demonstrating that the increase was observed independently of the time of exposure. Therefore, MDA proved to be an important ally on obtaining an early diagnosis of the crystalline silica toxicity in exposed subjects. Moreover, MDA plasma levels were correlated, with C3 serum levels, demonstrating an involvement of oxidative stress on inflammation process.

Following the results observed for MDA, vitamin C levels were significantly decreased in SI group compared to non-exposed individuals in this study, endorsing the occurrence of oxidative stress induced by crystalline silica toxicity. Vitamin C is a well-established water-soluble exogenous antioxidant, essential for life. It is an electron donor, capable to reduce unpaired electrons substances, such as oxygen, sulphur and nitrogen radicals. It also reduces compounds that are reactive but not radicals, as nitrosamines, nitrous acid substances and ozone, as well as the compounds formed by their reaction with vitamin C [52]. Most of these reactive substances are formed during crystalline silica exposure, as demonstrated by Zhang et al. [23], who observed that superoxide anion and hydrogen peroxide formation were enhanced in silica-induced cytotoxicity in cultured rat alveolar macrophages. Shi and colleagues [49] also

detected hydroxyl radical and singlet oxygen formation after crystalline silica exposure. Vitamin C reacts with these compounds, thus, its serum levels decrease, as observed in the present study.

Although it is an exogenous antioxidant and can be modulated by food intake, partial correlation analysis demonstrated that vitamin C levels were inversely associated with MDA levels in the present study. Unfortunately, it was not possible to evaluate endogenous antioxidants in this work. Nonetheless, other authors have already demonstrated that crystalline silica alters these parameters in *in vivo* and *in vitro* studies. Anlar et al. [16] evaluated these compounds and observed significant decrease in levels of total glutathione (GSH) and in the activities of the enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px). They also observed a significant increase in glutathione reductase (GR) and, similarly to the present study, in MDA levels as well, in workers exposed to crystalline silica in ceramic production. Fenoglio et al. [53] evaluated commercial quartz toxicity on GSH and cysteine. They observed that both substances react with quartz, especially when it is freshly fractured, demonstrating that oxidative stress is an outcome of crystalline silica exposure. Furthermore, vitamin C was inversely correlated with hs-CRP in our study, reinforcing the involvement of oxidative stress on the inflammatory process unleashed by crystalline silica.

In relation to the biochemical parameters investigated in our study, we observed significant increase in blood glucose levels for all exposed subjects (CSEW I and CSEW II) and SI compared to non-exposed workers, however, the means for all groups lied within the reference range. Another study evaluating crystalline silica exposure and blood glucose levels did not observe significant difference among dust-exposed workers in a casting factory and silicotic individuals compared to non-exposed individuals [54]. On the other hand, Sade and colleagues [55] demonstrated that exposure to air pollution, especially particulate matter (PM) inferior to 10 and 2.5 μm , which are also present in dust derived from mining activities, have a negative impact on serum glucose levels, increasing it in intermediate-term exposures. Miners are exposed to the dust generated during their activities [55], however, the increase in serum glucose levels observed in our study did not correlate with any of the other biomarkers evaluated, especially L-selectin, MDA, C3 and hs-CRP (*data not shown*). Hence, we believe that increased glucose levels are likely due to the eating habits of the exposed workers, SI and non-exposed workers.

Similar results were observed for urea levels, also significantly increased in the exposed workers and SI compared to non-exposed workers. Urea is the main product from amino acids catabolism and is mainly excreted in urine, thus, it is considered a nonspecific marker of renal function, since dietary habits can influence its levels in blood. Greater intake of protein or low hydration produce an increase in urea blood levels [57]. Urea also increases with age [58]. In our study, the increase observed for urea levels was not accompanied by increased levels of creatinine and microalbuminuria, which are considered more specific markers of renal function. Moreover, urea levels did not correlate with age or time of exposure (*data not shown*), leading to believe that the increase observed is possibly due to dietary habits of the participants of the study, since they live in different areas of the state of Rio Grande do Sul, Brazil.

Another biochemical parameter that demonstrated significant difference among the studied groups was AST, increased in SI compared to non-exposed workers. Zawilla et al. [59] evaluated liver function of silica-exposed workers in Egypt and observed that AST and GGT levels were significantly increased in exposed workers with or without silicosis compared to non-exposed individuals. According to their results, they suggest that crystalline silica exposure can be involved in the development of liver disease due to matrix remodeling. Since we did not evaluate any parameter involved in this outcome, we cannot confirm that the increase in AST activity is related to matrix remodeling. Furthermore, 25% of the SI in our study reported the use of NSAIDs, what can also explain the elevation in AST levels, as already reported by previous investigations regarding liver damage caused by NSAIDs [60, 61].

Our study has some limitations, and the most important are the small number of participants and the lack of chest x-ray to confirm the pulmonary health status of the exposed workers and SI. However, since they are assisted in the public health facility that performed the recruitment, the information regarding their pulmonary assessment, but not the exams, was available in the establishment. Another point is the lack of lipid profile evaluation of the study participants, since these parameters are strongly related to inflammatory conditions. The lack of endogenous antioxidants measurement and soluble L-selectin in plasma assessment are other important limitations of our study. Finally, we did not perform the evaluation of dust-generated crystalline silica content in the mines of the town. Nevertheless, the existence of many silicotic retired miners and the knowledge that the most extracted stone is amethyst, a quartz composed gem,

evidences that crystalline silica exposure is a reality for these workers. Despite all the limitations, this study was able to suggest important findings that can contribute to an early monitoring of crystalline silica toxicity in workers occupationally exposed.

5. Conclusions

This study suggested, for the first time, that L-selectin surface protein expression in lymphocytes might be a potential peripheral biomarker of effect for monitoring crystalline silica toxicity in non-silicotic individuals occupationally exposed, with at least 16 years of occupational history. Moreover, the periodic clinical use of this potential biomarker could be helpful on the early diagnosis of crystalline silica induced alterations and, after more studies, could be used as an additional alternative allied to the chest X-rays that workers are exposed to during silicosis evaluation and diagnosis. However, further investigations are required to provide better understanding of L-selectin role in crystalline silica-induced toxicity and possible ways to prevent silicosis development through blocking L-selectin activity in exposed individuals.

Acknowledgments

The authors would like to thank the volunteers who participated in this study, the healthcare professionals from Ametista do Sul, who were essential for the development of this study and F.A. Freitas and O.A. Lovison for their substantial help during sample collection.

Funding

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, protocol number 27671.414.17115.26062017, PqG 2017). J. Nardi had a CAPES MSc. research fellowship and S.C. Garcia is a recipient of CNPq research fellowship.

Conflict of interest

Declarations of interest: none.

REFERENCES

- [1] P.M. Branco, *Dicionário de Mineralogia e Gemologia*, second ed., Oficina de Textos, São Paulo, 2008.
- [2] T.P. Souza, G. Watte, L.M. Gusso, R. Souza, J.S. Moreira, M.M. Knorst, Silicosis prevalence and risk factors in semi-precious stone mining in Brazil, *Am. J. Ind. Med.*, 60 (2017) 529-536.
- [3] Ametista do Sul, Official site. <https://www.ametistadosul-rs.com/dado-gerais>. (accessed 23 January 2018).
- [4] D. Proust, C. Fontaine, Amethyst-bearing lava flows in the Paraná Basin (Rio Grande do Sul, Brazil): Cooling, vesiculation and formation of the geodic cavities, *Geol. Mag.*, 44 (2007) 53-65.
- [5] D. Grotto, L.D. Santa Maria, S. Boeira, J. Valentini, M.F. Charão, A.M. Moro, P.C. Nascimento, V.J. Pomblum, S.C. Garcia, Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography – visible detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 43 (2007) 619-624.
- [6] M.I. Greenberg, J. Waksman, J. Curtis, Silicosis: a review, *Dis. Mon.*, 54 (2007) 394-416.
- [7] S.S. Tripathi, H.P. Pandey, B. Paul, Overview of cytokines and receptors in silicosis, *J. Appl. Pharm. Sci.*, 1 (2011) 1-5.
- [8] H. Kawasaki, A mechanistic review of silica-induced inhalation toxicity, *Inhal. Toxicol.*, 27 (2015) 363-377.
- [9] H.A. Castro, C.G. Silva, A. Lemle, Estudo de imunoglobulinas, complementos e autoanticorpos em 58 trabalhadores expostos à sílica, *J. Bras. Pneumol.*, 30 (2004) 201-206.
- [10] N.A. Raffler, J. Rivera-Nieves, K. Ley, L-selectin in inflammation, infection and immunity, *Drug Discov. Today Ther. Strateg.*, 2 (2005) 213-220.
- [11] K.S. Vinapamula, S.V. Pemmaraju, S.K. Bhattaram, A.R. Bitla, S.M. Manohar, Serum adenosine deaminase as inflammatory marker in rheumatoid arthritis, *J. Clin. Diagn. Res.*, 9 (2015) 8-10.
- [12] M.J. Sakhvidi, J.B. Ardekani, A. Firoozichahak, J. Zavarreza, M. Hajaghazade, M. Mostaghaci, A. Mehrparvar, A. Barkhordari, Exhaled breath malondialdehyde, spirometric results and dust exposure assessment in ceramics production workers, *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*, 28 (2015) 81-89.
- [13] C.D. Wegner, R.H. Gundel, R. Rothlein, G. Letts, Expression and probable roles of cell adhesion molecules in lung inflammation, *Chest*, 101 (1992) 34S-39S.

- [14] X. Shi, M. Ding, F. Chen, L. Wang, Y. Rojanasakul, V. Vallyathan, V. Castranova, Reactive oxygen species and molecular mechanism of silica-induced lung injury, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 20 (2001) 85-93.
- [15] B. Fubini, A. Hubbard, Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis, *Free Radic. Biol. Med.*, 34 (2003) 1507-1516.
- [16] H.G. Anlar, M. Bacanlı, S. İritaş, C. Bal, T. Kurt, E. Tutkun, O.H. Yılmaz, N. Basaran, Effects of occupational silica exposure on oxidative stress and immune system parameters in ceramic workers in Turkey, *J. Toxicol. Environ. Health*, 80 (2017) 1-9.
- [17] P.R. Jiang, Z. Cao, Z.L. Qiu, J.W. Pan, N. Zhang, Y.F. Wu, Plasma levels of TNF- α and MMP-9 in patients with silicosis, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 19 (2015) 1716-1720.
- [18] B.A. Muzembo, Y. Deguchi, N.R. Ngatu, M. Eitoku, R. Hirota, M. Suganuma, Selenium and exposure to fibrogenic mineral dust: a mini-review, *Environ. Int.*, 77 (2015) 16-24.
- [19] P.K. Henneberger, D.N. Weissman, Old adversaries in new places, *Occup. Environ. Med.*, 75 (2018) 1-2.
- [20] NIOSH - National Institute for Occupational Safety and Health, Health effects of occupational exposure to respirable crystalline silica, Centers for Disease Control, Cincinnati, 2002.
- [21] OSHA - Occupational Safety and Health Administration, Occupational exposure to respirable crystalline silica - review of health effects literature and preliminary quantitative risk assessment, Docket OSHA-2010-0034, 2010.
- [22] W.J. Mao, J.Y. Chen, M.F. Zheng, S.G. Ye, F. Liu, Y.J. He, B. Wu, J. Zhang, Lung transplantation for end-stage silicosis, *J. Occup. Environ. Med.*, 53 (2011) 845-849.
- [23] Z. Zhang, H.M. Shen, Q.F. Zhang, C.N. Ong, Involvement of oxidative stress in crystalline silica-induced cytotoxicity and genotoxicity in rat alveolar macrophages, *Environ. Res.*, 82 (2000) 245-252.
- [24] K. Steenland, One agent, many diseases: exposure-response data and comparative risks of different outcomes following silica exposure, *Am. J. Ind. Med.*, 48 (2005) 16-23.
- [25] IARC- International Agency for Research on Cancer, IARC Monographs Arsenic, metals, fibres and dusts, v. 100 C, Lyon, France, 2009.
- [26] X. Shi, V. Castranova, B. Halliwell, V. Vallyathan, Reactive oxygen species and silica-induced carcinogenesis, *J. Toxicol. Environ. Health*, 1 (1998) 181-197.

- [27] M.E. Peluso, A. Munnia, R.W. Giese, E. Chellini, M. Ceppi, F. Capacci, Oxidatively damaged DNA in the nasal epithelium of workers occupationally exposed to silica dust in Tuscany region, Italy, *Mutagenesis*, 30 (2015) 1-7.
- [28] M. Shoeb, P. Joseph, V. Kodali, G. Mustafa, B.Y. Farris, C. Umbright, J.R. Roberts, A. Erdely, J.M. Antonini, Silica inhalation altered telomere length and gene expression of telomere regulatory proteins in lung tissue of rats, *Sci. Rep.*, 7 (2017) 1-6.
- [29] G. Giusti, B. Galanti, Adenosine deaminase: colorimetric method. *In: Bergmeyer, H.U. Bergmeyer, Methods of Enzymatic Analysis*, third ed., Verlac Chemie, Weinheim, 1984.
- [30] M. Baierle, A. Bairros, A. Moreira, R. Bulcão, M. Roehrs, F. Freitas, J. Durgante, N. Brucker, M. Charão, S.C. Garcia, Quantificação sérica de vitamina C por CLAE-UV e estudo de estabilidade, *Quím. Nova.*, 35 (2012) 403-407.
- [31] D.W. Porter, L.L. Millecchia, P. Willard, V.A. Robinson, D. Ramsey, J. McLaurin, A. Khan, K. Brumbaugh, C.M. Beighley, A. Teass, V. Castranova, Nitric oxide and reactive oxygen species production causes progressive damage in rats after cessation of silica inhalation, *Toxicol. Sci.*, 90 (2006) 188-197.
- [32] B.D. Aggarwal, Lactate dehydrogenase as a biomarker for silica exposure-induced toxicity in agate workers, *Occup. Environ. Med.* 0 (2014) 1-5.
- [33] ILO- International Labour Office, Guidelines for the use of the ILO international classification of radiographs of pneumoconioses. Revised Edition, 2011.
- [34] M. Gulumian, P.J. Borm, V. Vallyathan, V. Castranova, K. Donaldson, G. Nelson, J. Murray, Mechanistically identified suitable biomarkers of exposure, effect, and susceptibility for silicosis and coal-worker's pneumoconiosis: a comprehensive review, *J. Toxicol. Environ. Health B*, 9 (2006) 357-395.
- [35] A. Zante, S.D. Rosen, Sulphated endothelial ligands for L-selectin in lymphocyte homing and inflammation, *Biochem. Soc. Trans.*, 31 (2003) 313-317.
- [36] K. Ley, The microcirculation in inflammation, *In: R.F. Tuma, W.N. Durán, K. Ley, Microcirculation*, second ed., Elsevier, 2008.
- [37] J.R. Mackinnon, R.M. Knott, J.V. Forrester, Altered L-selectin expression in lymphocytes and increased adhesion to endothelium in patients with diabetic retinopathy, *Br. J. Ophthalmol.*, 88 (2008) 1137-1141.
- [38] A. Klinger, A. Gebert, K. Bieber, K. Kalies, A. Ager, E.B. Bell, J. Westermann, Cyclical expression of L-selectin (CD62L) by recirculating T cells, *Int. Immunol.*, 21 (2009) 443-455.
- [39] Y. Hamaguchi, Y. Nishizawa, M. Yasui, M. Hasegawa, Y. Kaburagi, K. Komura, T. Nagaoka, E. Saito, Y. Shimada, K. Takehara, T. Kadono, D.A. Steeber, T.F.

Tedder, S. Sato, Intercellular Adhesion Molecule-1 and L-selectin regulate bleomycin-induced lung fibrosis, *Am. J. Pathol.*, 161 (2002) 1607-1618.

[40] A. Mazzone, G. Ricevuti, Leukocyte CD11/CD18 integrins: biological and clinical relevance, *Haematologica*, 80 (1995) 161-75.

[41] S.M. Tan, R.H. Hyland, A. Al-Shamkhani, W.A. Douglass, J.M. Shaw, S.K. Law, Effect of Integrin b2 subunit truncations on LFA-1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18) assembly, surface expression, and function, *J. Immunol.*, 165 (2000) 2574-2581.

[42] A.K. Abbas, A.H. Lichtman, S. Pillai, *Cellular and molecular immunology*, seventh ed., Elsevier, Philadelphia, 2012.

[43] N. Başaran, M. Shubair, Ü. Ündeğer, H. Canpınar, A. Kars, Alterations in immune parameters in foundry and pottery workers, *Toxicology*, 178 (2002) 81-88.

[44] M.S. Kalliny, M.I. Bassyouni, Immune Response Due to Silica Exposure in Egyptian Phosphate Mines, *Health Care Poor Underserved*, 22 (2011) 91-109.

[45] B.A. Mehere, M.B. Patil, S.K. Pingle, L.R. Thakkar, A.B. Butle, Determination of levels of C-Reactive Protein (CRP) and liver function test parameters among occupationally exposed stone quarry workers of Central India: A quest in pursuit of biomarkers of occupational diseases of stone quarries, *Bull. Env. Pharmacol. Life Sci.*, 5 (2016) 33-38.

[46] G. Cristalli, S. Costanzi, C. Lambertucci, G. Lupidi, S. Vittori, R. Volpini, E. Camaioni, Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors, *Med. Res. Rev.*, 21 (2001) 105-128.

[47] S. Afrasiabian, B. Mohsenpour, K.H. Bagheri, N. Sigari, K. Aftabi, Diagnostic value of serum adenosine deaminase level in pulmonary tuberculosis, *J. Res. Med. Sci.* 18 (2013) 252-254.

[48] S. Atta, A. Kassem, B. Elhadidi, H. Esawy, The diagnostic value of adenosine deaminase activity in pulmonary tuberculosis: Comparison between sputum and serum, *Egypt J. Chest Dis. Tuberc.*, 64 (2015) 103-107.

[49] X. Shi, Y. Mao, L.N. Daniel, U. Saffiotti, N.S. Dalal, V. Vallyathan, Silica radical-induced DNA damage and lipid peroxidation, *Environ. Health Perspect.*, 102 (1994) 149-154.

[50] M.R. Azari, B. Ramazani, M.A. Mosavian, M. Movahadi, S. Salehpour, Serum malondialdehyde and urinary neopterin levels in glass sandblasters exposed to crystalline silica aerosols, *Int. J. Occup. Hyg.*, 3 (2011) 29-32.

[51] H. Zhang, G. Yin, H. Jiang, C. Zhang, High-dose N-acetylcysteine decreases silica-induced lung fibrosis in the rat, *J. Int. Med. Res.*, 41 (2013) 1179-1186.

- [52] S.J. Padayatty, A.; Katz, Y. Wang, P. Eck, O. Kwon, J.H. Lee, S. Chen, C. Corpe, A. Dutta, S.K. Dutta, M. Levine, Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention, *J. Am. Coll. Nutr.*, 22 (2013) 18-35.
- [53] I. Fenoglio, S. Fonsato, B. Fubini, Reaction of cysteine and glutathione (GSH) at the freshly fractured quartz surface: a possible role in silica-related diseases?, *Free Radic. Biol. Med.*, 35 (2003) 752-762.
- [54] R.M. Miao, X.T. Zhang, P. Guo, E.Q. He, F. Zhou, D.K. Zhao, Y.Y. Zhang, Effect of oxidative stress on development of silicosis, *World J. Respirol.*, 2 (2012) 1-5.
- [55] M.Y. Sade, I. Kloog, I.F. Liberty, J. Schwartz, V. Novack, The association between air pollution exposure and glucose and lipids levels, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 101 (2016) 2460-2467.
- [56] L.G. Chubb, E.G. Cauda, Characterizing particle size distributions of crystalline silica in gold mine dust, *Aerosol Air Qual. Res.*, 17 (2017) 24-33.
- [57] D.L. Nelson, M.M. Cox, Amino acid oxidation and the production of urea, *In: D.L. Nelson, M.M. Cox, Lehninger Principles of Biochemistry*, seventh ed., Macmillan Education, Basingstoke, 2013.
- [58] W. Musch, L. Verfaillie, G. Decaux, Age-related increase in plasma urea level and decrease in fractional urea excretion: clinical application in the syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 1 (2006) 909-914.
- [59] N. Zawilla, F. Taha, Y. Ibrahim, Liver functions in silica-exposed workers in Egypt: possible role of matrix remodeling and immunological factors, *Int. J. Occup. Environ. Health*, 20 (2014) 146-156.
- [60] S. Nikose, M. Arora, P.K. Singh, S. Naik, S. Khan, D. Nikose, Hepatotoxicity and changes in liver enzymes due to use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in non-traumatic musculoskeletal painful disorders, *Molecular Enzymology and Drug Targets*, 1 (2015) 2-7.
- [61] P.A. Schmeltzer, S.A. Kosinski, D.E. Kleiner, J.A. Hoofnagle, A. Stolz, R.J. Fontana, M.W. Russo, Liver injury from nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the United States, *Liver Int.*, 36 (2016) 603-609.

Tables

Table 1. Characteristics of the study population.

	NEW (n=30)	CSEW I (n=19)	CSEW II (n=19)	SI (n=24)
Age (years)	44.57 ± 2.05	33.47 ± 2.55 ^a	45.47 ± 1.90 ^{b,c}	55.66 ± 1.10 ^{d,e,f}
BMI (kg m⁻²)	27.30 ± 0.70	26.76 ± 0.87	26.75 ± 1.22	25.29 ± 0.78
Smokers	1 (3.3%)	3 (15.8%)	1 (5.3%)	2 (8.3%)
Passive smokers	1 (3.3%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (3.3%)
Former smokers	5 (16.7%)	4 (21.1%)	6 (31.6%)	14 (58.3%) ^g
Non-smoker	23 (76.7%)	12 (63.2%)	12 (63.2%)	7 (29.2%) ^g
NSAIDs users	2 (6.7%)	2 (10.5%)	1 (5.3%)	6 (25.0%)
MS users	5 (16.7%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (4.2%)
Weekly workload (hours)	40.00 ± 0.00	36.00 ± 1.88	38.57 ± 1.43	0 ± 0
Time of exposure (years)	0 ± 0	7.78 ± 1.13 ^{c,h}	24.05 ± 1.50	28.25 ± 1.61

Results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) or n (%);

^a $p < 0.05$ compared to NEW group (Kruskal-Wallis test);

^b $p < 0.05$ compared to CSEW I group (Kruskal-Wallis test);

^c $p < 0.001$ compared to SI group (Kruskal-Wallis test);

^d $p < 0.05$ compared to NEW group (Kruskal-Wallis test);

^e $p < 0.001$ compared to CSEW I group (Kruskal-Wallis test);

^f $p < 0.05$ compared to CSEW II group (Kruskal-Wallis test);

^g $p < 0.05$ compared to NEW group (Pearson's chi-squared test);

^h $p < 0.01$ compared to CSEW II group (Kruskal-Wallis test);

Abbreviations: NEW: non-exposed workers; CSEW I: crystalline silica exposed workers with 1-15 years of occupational exposure; CSEW II: crystalline silica exposed workers above 16 years of occupational exposure; SI: silicotic individuals; MS: multivitamin supplement; NSAIDs: non-steroidal anti-inflammatory drugs.

Table 2. Results of β -2 Integrin and ICAM-1 surface protein expression.

	NEW (n=30)	CSEW I (n=19)	CSEW II (n=19)	SI (n=24)
Lymphocytes				
β-2 Integrin (%)	63.11 \pm 5.15	65.71 \pm 6.47	62.64 \pm 6.14	74.25 \pm 5.51
ICAM-1 (%)	18.23 \pm 3.03	18.60 \pm 3.80	19.87 \pm 3.62	23.88 \pm 3.24
Monocytes				
β-2 Integrin (%)	87.78 \pm 2.11	85.64 \pm 2.68	85.17 \pm 2.54	89.82 \pm 2.26
ICAM-1 (%)	77.04 \pm 3.36	71.38 \pm 4.24	72.64 \pm 4.02	69.32 \pm 3.58

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM).

Statistical analysis by UNIANOVA adjusted by age, BMI, smoking habits, non-steroidal anti-inflammatory drugs and multivitamin supplement intake. *Abbreviations:* NEW: non-exposed workers; CSEW I: crystalline silica exposed workers with 1-15 years of occupational exposure; CSEW II: crystalline silica exposed workers above 16 years of occupational exposure; SI: silicotic individuals; ICAM-1: intercellular adhesion molecule 1.

Table 3. Partial correlations among ADA, inflammatory and oxidative stress biomarkers (n=92).

	% L-selectin expression in lymphocytes	C3	Log hs-CRP	MDA
	r	r	r	r
MDA	-0.254	0.273 ^a	0.223	-
Vitamin C	0.197	-0.121	-0.326 ^a	-0.326 ^a
Log hs-CRP	-0.496 ^b	0.433 ^c	-	0.223
ADA	-0.289 ^a	0.285 ^a	0.078	0.215

^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.001$; ^c $p = 0.001$. Partial correlations adjusted by smoking habits, non-steroidal anti-inflammatory drugs and multivitamin supplement intake. *Abbreviations:* MDA: malondyaldehyde; hs-CRP: high sensitivity C reactive protein; C3: component 3 of the complement system.

Table 4. Biochemical and hematological parameters.

Parameters	NEW (n=30)	CSEW I (n=19)	CSEW II (n=19)	SI (n=24)	Reference range*
Glucose (mg dL⁻¹)	84.46 ± 1.16	92.78 ± 1.94 ^a	93.05 ± 1.56 ^b	95.08 ± 1.67 ^c	65 - 99
AST (U L⁻¹)	30.37 ± 1.09	32.68 ± 1.20	36.52 ± 2.32	40.60 ± 2.47 ^b	10 - 40
ALT (U L⁻¹)	30.90 ± 2.29	25.84 ± 1.81	33.42 ± 4.19	35.52 ± 4.24	10- 35
ALP (U L⁻¹)	75.73 ± 3.92	75.05 ± 5.04	83.05 ± 4.52	89.04 ± 5.65	27 - 100
GGT (U L⁻¹)	34.0 (25-48)	29.0 (22-35)	35.0 (25-50)	38.0 (32-53)	≤ 50
Total protein (g dL⁻¹)	6.92 ± 0.07	7.02 ± 0.12	7.03 ± 0.10	7.25 ± 0.10	6 - 8
Urea (mg dL⁻¹)	22.80 ± 1.20	31.73 ± 1.53 ^c	34.89 ± 2.10 ^c	33.41 ± 1.60 ^c	11 - 39
Serum creatinine (mg dL⁻¹)	1.03 ± 0.02	1.03 ± 0.02	1,02 ± 0.02	1,00 ± 0.02	0,4 – 1,4
Urinary creatinine (mg dL⁻¹)	1.56 ± 0.11	1.52 ± 0.14	1.53 ± 0.11	1.60 ± 0.11	-
mALB (mg g creat⁻¹)	0.63 (0-1.38)	0.77 (0-1.31)	1.07 (0-2.69)	2.48 (0-3.95)	< 17
RBC (x10⁶ µL⁻¹)	5.19 ± 0.07	5.20 ± 0.06	5.17 ± 0.08	5.05 ± 0.07	4,52 - 5,90
Hemoglobin (g dL⁻¹)	15.70 ± 0.19	15.33 ± 0.18	15.72 ± 0.20	15.23 ± 0.22	14 – 17,50
Hematocrit (%)	46.78 ± 0.53	45.59 ± 0.50	46.68 ± 0.55	45.60 ± 0.59	42 - 50
Platelets (x10³ µL⁻¹)	224.33 ± 6.71	169.73 ± 8.58	188.43 ± 14.83	184.91 ± 9.67	140 - 400
WBC (x10³ µL⁻¹)	6.65 ± 0.29	7.16 ± 0.53	5.71 ± 0.23	7.39 ± 0.25	4,4 - 11,30

Results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) or median (interquartile range) according to distribution of variables.

^a $p < 0.05$ compared to NEW group; ^b $p < 0.01$ compared to NEW group, ^c $p < 0.001$ compared to NEW group; ^d $p < 0.05$ compared to CSEW I; ^e $p < 0.001$ compared to CSEW II group by UNIANOVA adjusted by age, BMI, smoking habits, non-steroidal anti-inflammatory drugs and multivitamin supplement intake. *Abbreviations:* NEW: non-exposed workers; CSEW I: crystalline silica exposed workers with 1-15 years of occupational exposure; CSEW II: crystalline silica exposed workers above 16 years of occupational exposure; SI: silicotic individuals; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; ALP: alkaline phosphatase; GGT: gamma-glutamyl transferase; hs-CRP: high sensitivity C Reactive Protein; mALB: microalbuminuria; RBC: red blood cells; WBC: White blood cells. *Reference ranges for adult men.

Figure 1

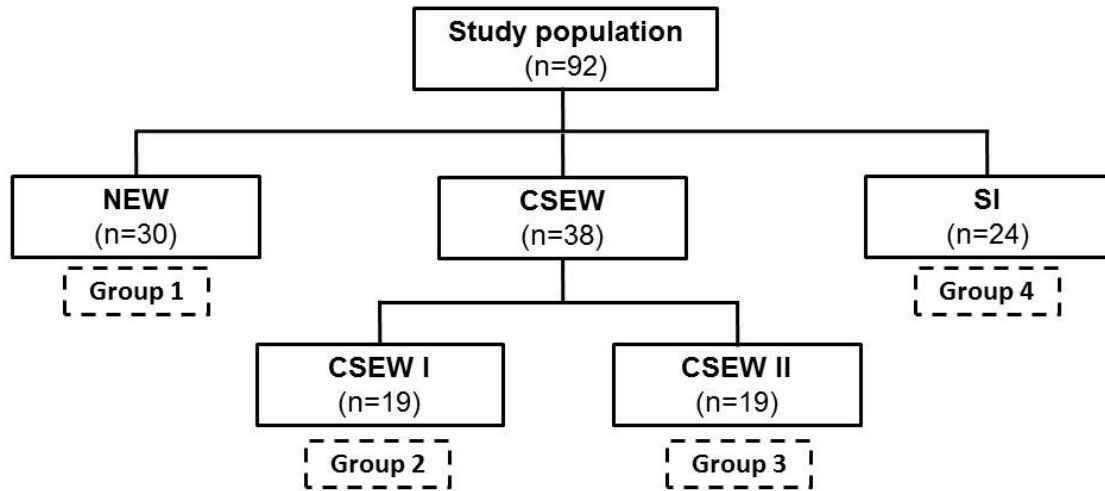


Figure 2

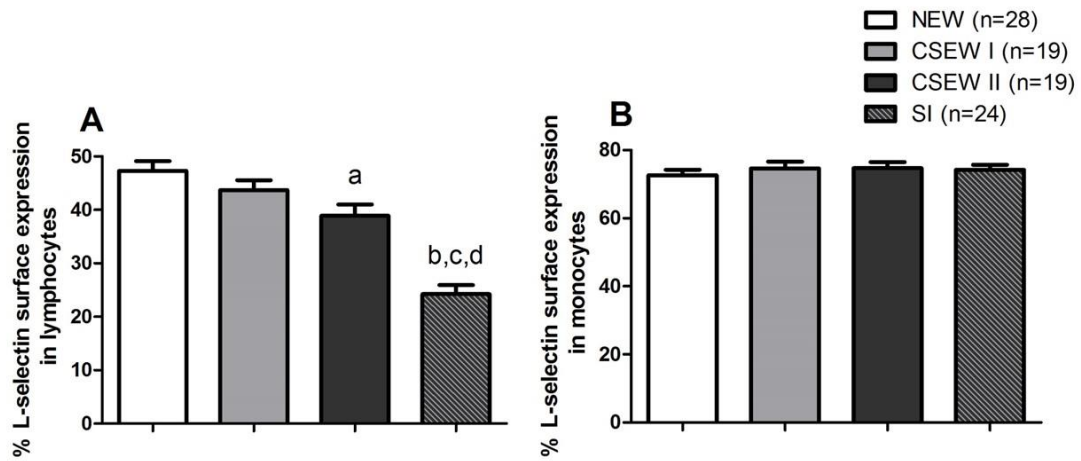


Figure 3

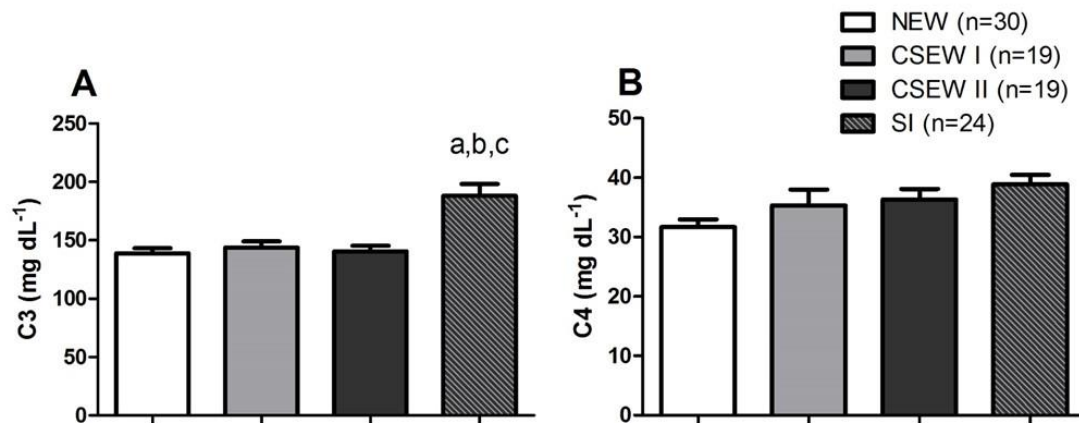


Figure 4

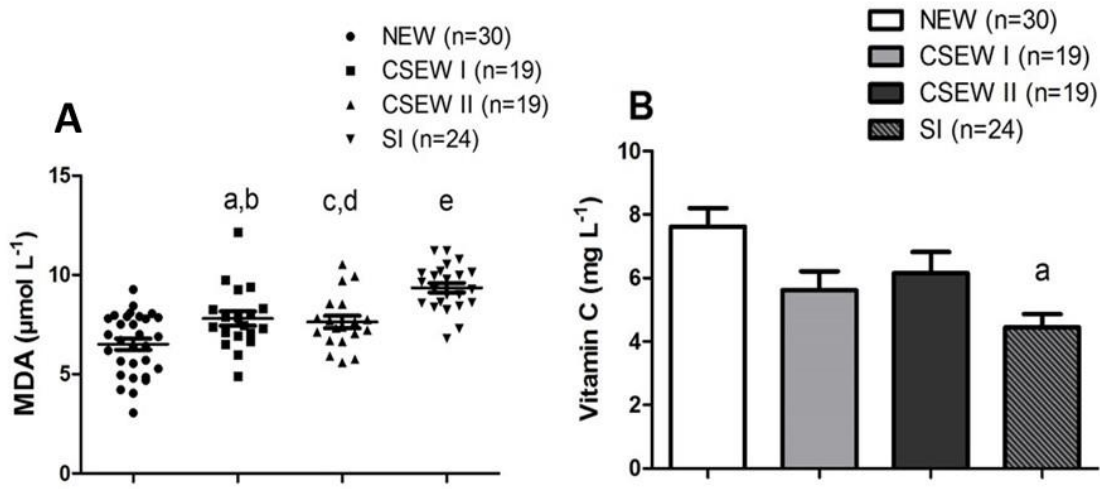


Figure 5

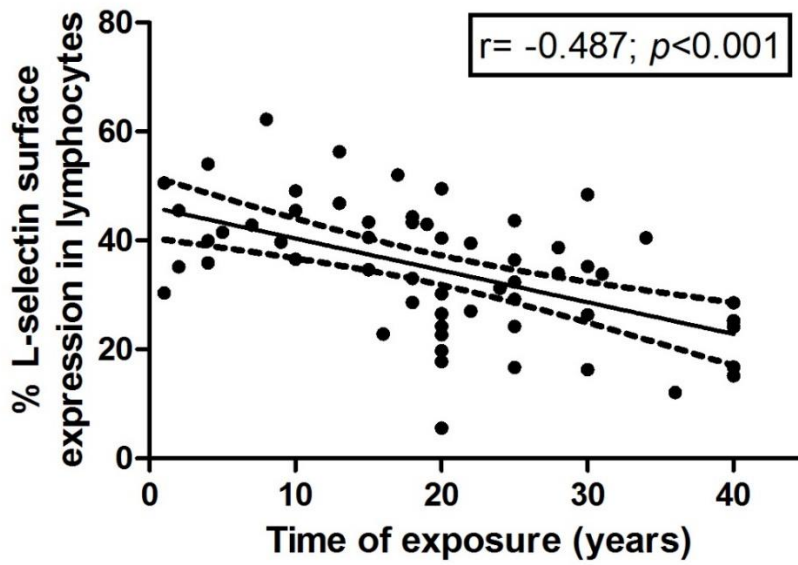


Figure captions

Figure 1. Schematic demonstration of the division of groups from the study population. *Abbreviations:* NEW: non-exposed workers; CSEW: crystalline silica exposed workers; CSEW I: crystalline silica exposed workers with 1-15 years of occupational exposure; CSEW II: crystalline silica exposed workers above 16 years of occupational exposure; SI: silicotic individuals.

Figure 2. (A) Percentage of expression of surface L-selectin in lymphocytes and (B) percentage of expression of surface L-selectin in monocytes. Results are expressed as mean \pm SEM. ^a $p < 0.05$ compared to NEW group; ^b $p < 0.001$ compared to NEW group; ^c $p < 0.001$ compared to CSEW I group and ^d $p < 0.001$ compared to CSEW II group by UNIANOVA adjusted by age, BMI, smoking habits, non-steroidal anti-inflammatory drugs and multivitamin supplement intake. *Abbreviations:* NEW: non-occupationally exposed workers; CSEW I: crystalline silica exposed workers with 1-15 years of occupational exposure; CSEW II: crystalline silica exposed workers above 16 years of occupational exposure; SI: silicotic individuals.

Figure 3. Results of inflammatory biomarkers: (A) C3 levels (B) C4 levels. Results are expressed as mean \pm SEM. ^a $p < 0.001$ compared to NEW group; ^b $p < 0.05$ compared to CSEW I group, ^c $p < 0.001$ compared to CSEW II group and ^d $p < 0.01$ compared to NEW group, by UNIANOVA adjusted by age, BMI, smoking habits, non-steroidal anti-inflammatory drugs and multivitamin supplement intake. *Abbreviations:* NEW: non-occupationally exposed workers; CSEW I: crystalline silica exposed workers with 1-15 years of occupational exposure; CSEW II: crystalline silica exposed workers above 16 years of occupational exposure; SI: silicotic individuals; C3: component 3 of the complement system; C4: component 4 of the complement system.

Figure 4. Results of oxidative stress biomarkers: (A) MDA plasma levels and (B) vitamin C serum levels. Results are expressed as mean \pm SEM. ^a $p < 0.05$ compared to NEW group; ^b $p < 0.05$ compared to SI group, ^c $p < 0.01$ compared to NEW group; ^d $p < 0.001$ compared to SI group and ^e $p < 0.001$ compared to NEW group, by UNIANOVA adjusted by age, BMI, smoking habits, non-steroidal anti-inflammatory drugs and multivitamin supplement intake. *Abbreviations:* NEW: non-occupationally exposed workers; CSEW I: crystalline silica exposed workers with 1-15 years of occupational exposure; CSEW II: crystalline silica exposed workers above 16 years of occupational exposure; SI: silicotic individuals; MDA: malondialdehyde.

Figure 5. Partial correlation between the percentage of L-selectin surface expression in lymphocytes and time of exposure in years, adjusted by smoking habits, non-steroidal anti-inflammatory drugs and multivitamin supplement intake (n=92).

A silicose é uma das principais doenças ocupacionais que acometem trabalhadores em todo o mundo. A doença é uma realidade para milhões de trabalhadores que desenvolvem atividades em ocupações onde há exposição à sílica cristalina, e ainda causa a morte de milhares de pessoas todos os anos, apesar dos esforços de organizações que visam a saúde e segurança ocupacional para amenizar o problema (ILO, 2018).

No Brasil, o setor de mineração é um dos mais acometidos pela doença. Mais especificamente, a cidade de Ametista do Sul, que ostenta o título de “capital mundial da pedra ametista”, é a principal responsável pela extração e comercialização de geodos de ametista no país e apresenta uma grande prevalência de casos de silicose dentre trabalhadores ativos de garimpos e em trabalhadores já aposentados. A mineração é a principal atividade econômica do município e é responsável pelo sustento de um grande número de famílias (SOUZA *et al.*, 2017; AMETISTA DO SUL, 2018).

Como a silicose normalmente se desenvolve após um longo período de exposição ocupacional, a legislação brasileira determina que os trabalhadores devem realizar anualmente um exame de radiografia de tórax para diagnóstico da doença. Porém, esta prática expõe o trabalhador a níveis consideráveis de radiação ao longo de sua vida profissional e, ainda, quando o indivíduo apresenta lesões fibróticas pulmonares, significa que a doença já está instalada. Além de não possuir cura, a silicose tem um caráter progressivo (BRASIL, 1978a; FUBINI & HUBBARD, 2003).

Neste sentido, este trabalho objetivou avaliar potenciais biomarcadores periféricos em componentes envolvidos no processo inflamatório e de estresse oxidativo, dois importantes mecanismos de toxicidade envolvidos no desenvolvimento da silicose, de forma a detectar alterações precoces provocadas pela exposição à sílica cristalina antes do estabelecimento da doença.

O principal achado deste trabalho foi a diminuição na expressão de L-selectina na superfície de linfócitos em trabalhadores não silicóticos com mais de 16 anos de exposição ocupacional em comparação aos indivíduos não expostos ($p < 0.05$). Esta diminuição foi ainda mais intensa em garimpeiros aposentados ($p < 0.001$), que se afastaram do trabalho no garimpo por terem sido diagnosticados com silicose. Este resultado sugere que este componente do sistema imunológico envolvido no processo inflamatório demonstra ser um potencial biomarcador periférico para acompanhamento e monitorização ao longo do tempo de vida ocupacional em

trabalhadores expostos à sílica cristalina. Estudos mais aprofundados sobre seu envolvimento na toxicidade da sílica ainda são necessários, porém, a avaliação periódica deste parâmetro inflamatório poderia se tornar uma importante ferramenta para obter um diagnóstico precoce de que a exposição à sílica cristalina está provocando alterações no organismo do trabalhador exposto, além de poder vir a ser um substituto para a realização de radiografias de tórax periódicas e assim diminuir a exposição dos trabalhadores à radiação.

A L-selectina desempenha um importante papel na inflamação aguda e crônica, pois é responsável pelo direcionamento de linfócitos para os linfonodos e de linfócitos e neutrófilos para o tecido inflamado (ZANTE & ROSEN, 2003; RAFFLER *et al.*, 2005; LEY, 2008). Células T não ativadas expressam altos níveis de L-selectina na superfície, porém, quando são ativadas, liberam a L-selectina para o plasma, consequentemente, diminuindo sua expressão na superfície celular (RAFFLER *et al.*, 2005). Ainda, os linfócitos expressam níveis diminuídos de L-selectina em sua superfície ao serem direcionados aos linfonodos, portanto, Klinger *et al.* (2009) sugerem que níveis diminuídos de L-selectina podem ser necessários para órgãos linfoides secundários para a indução de respostas imunes primárias.

Dessa forma, sabe-se que a L-selectina desempenha função importante no desenvolvimento de fibrose pulmonar induzida por diferentes agentes, porém os resultados quanto a possíveis tratamentos ainda são inconclusivos (ISHIHARA *et al.*, 2001; HAMAGUCHI *et al.*, 2002). Em um estudo de Ishihara *et al.* (2001) ratos Wistar adultos foram tratados com uma administração intratraqueal de sílica cristalina. Quatro dias antes e quatro dias depois desta administração, um grupo de animais recebeu intraperitonealmente um anticorpo capaz de bloquear a ação da L-selectina e outro grupo recebeu um anticorpo que não tem essa capacidade. Ao avaliar a resposta aguda à administração de sílica cristalina, os autores observaram que houve uma diminuição de 50% no infiltrado leucocitário no lavado bronco-alveolar, sugerindo que o bloqueio da L-selectina foi capaz de diminuir a ativação de leucócitos e sua migração para o tecido inflamatório. Porém, 3 meses após a administração do tratamento, foi observado que a formação de granulomas foi mais intensa nos pulmões dos animais que receberam o anticorpo bloqueador de L-selectina. Estudos avaliando o papel da L-selectina na exposição à sílica cristalina em seres humanos ainda não estão disponíveis na literatura, reforçando a importância do presente estudo.

Outro importante resultado observado foi a correlação negativa entre a expressão de L-selectina com o tempo de exposição ocupacional, reforçando sua relevância como um potencial biomarcador para o monitoramento da toxicidade da sílica cristalina nos trabalhadores.

A expressão de β -2 integrina e de ICAM-1 em linfócitos e monócitos, componentes do sistema imunológico também envolvidos na reação inflamatória, foi igualmente avaliada neste trabalho, porém, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de estudo. Em contraste, outros estudos mostram que a expressão de ICAM-1 aumenta no tecido pulmonar de animais expostos à sílica cristalina, tendo um papel importante no direcionamento de leucócitos para os pulmões afetados (NARIO & HUBBARD, 1996; HAMAGUCHI et al., 2002).

Outros componentes envolvidos na resposta inflamatória avaliados neste estudo foram C3, C4 e PCRus. Enquanto os níveis séricos de C4 foram semelhantes em todos os grupos avaliados, os níveis de C3 foram significativamente aumentados no grupo composto pelos indivíduos silicóticos com relação a todos os outros grupos. Dessa forma, ambos demonstraram não ser passíveis de utilização como biomarcadores precoces para avaliação da toxicidade da sílica cristalina. O mesmo foi observado para a PCRus, e resultados semelhantes foram observados por Kalliny and Bassyouni (2011). Apesar dos resultados observados, os níveis de PCRus se correlacionaram negativamente com a expressão de L-selectina em linfócitos e positivamente com os níveis de C3, reforçando a atuação da inflamação no desenvolvimento da silicose.

A atividade da enzima ADA no soro também foi determinada neste estudo, por ser considerada um marcador de imunidade mediada por células e por seu envolvimento em processos inflamatórios. É uma enzima que, quando avaliada no soro, tem baixa especificidade (AFRASABIAN *et al.*, 2015; VINAMAPULA, 2015). Apresentou níveis elevados no grupo de indivíduos diagnosticados com silicose comparado a todos os outros grupos e demonstrou-se negativamente correlacionada com a expressão de L-selectina nos linfócitos e positivamente com C3, demonstrando ter um envolvimento no desenvolvimento da silicose.

Outro resultado relevante deste estudo foi o aumento significativo de MDA no plasma dos indivíduos expostos, independentemente do tempo de exposição, e dos indivíduos silicóticos comparado ao grupo de não expostos. Diversos estudos já demonstraram o envolvimento da lipoperoxidação na exposição à sílica cristalina (SHI

et al., 1994; AZARI *et al.*, 2011; ZHANG, 2013; ANLAR *et al.*, 2017). Os níveis plasmáticos de MDA se correlacionaram com os níveis séricos de C3, reforçando o envolvimento do estresse oxidativo no processo inflamatório.

Corroborando a importância do estresse oxidativo na fisiopatologia da silicose, níveis séricos significativamente diminuídos de vitamina C foram observados nos indivíduos silicóticos comparados aos indivíduos não expostos, e este biomarcador correlacionou-se inversamente com os níveis de MDA. A vitamina C é um potente antioxidante adquirido através da ingestão alimentar e é essencial para a vida (PADAYATTY *et al.*, 2003; BAIERLE *et al.*, 2012). Um estudo conduzido por Saxena (2014) demonstrou que a administração de vitamina C associada à vitamina E foi eficaz na prevenção da toxicidade induzida por sílica cristalina em ratos albinos. A vitamina C é capaz de reduzir espécies reativas, e muitas destas substâncias já foram descritas em estudos por serem formadas durante o processo de estresse oxidativo gerado pela exposição à sílica cristalina (SHI *et al.*, 1994; ZHANG *et al.*, 2000). Neste trabalho, a vitamina C também correlacionou-se inversamente com os níveis de PCRus, reforçando o envolvimento do estresse oxidativo com o processo inflamatório desencadeado pela sílica cristalina, e resultados observados por Block *et al.* (2009) demonstraram que a administração de vitamina C é capaz de diminuir os níveis de PCR em pessoas com níveis séricos acima de 1 mg L⁻¹, corroborando a relação observada entre estes dois parâmetros.

Com relação aos resultados observados na avaliação bioquímica dos grupos estudados, foram observadas diferenças nos níveis séricos de glicose, de ureia e de AST nos grupos de estudo. Com relação à glicose, foi observado um aumento significativo nos grupos de expostos e de silicóticos em comparação aos indivíduos não expostos, porém as médias para todos os grupos permaneceram dentro dos valores de referência estabelecidos. Apesar da exposição a material particulado inferior a 10 e 2.5 µm, presente na poeira gerada nos garimpos, estar envolvida com alterações nos níveis de glicose (SADE *et al.*, 2016; CHUBB & CAUDA, 2017), como não houve correlação da glicose com outros parâmetros avaliados neste trabalho, o aumento observado provavelmente deve-se aos hábitos alimentares dos voluntários da pesquisa.

Os níveis séricos de ureia também demonstraram estar significativamente elevados nos trabalhadores expostos e nos indivíduos silicóticos em comparação aos não expostos. Porém, este aumento não foi acompanhado por aumento na creatinina

ou microalbuminúria. Como a ureia é o principal produto do catabolismo de aminoácidos, a ingestão elevada de proteínas através da alimentação pode influenciar nos seus níveis sanguíneos. A baixa ingesta de líquidos também pode levar a uma elevação nestes níveis, e outro fator que pode interferir nos níveis de ureia é a idade (MUSCH *et al.*, 2006; NELSON & COX, 2013). Diante disso, é possível acreditar que os níveis de ureia aumentados observados neste trabalho ocorreram em decorrência dos hábitos alimentares, assim como foi observado para a glicose.

Com relação à enzima AST, o único aumento significativo observado foi entre os indivíduos silicóticos comparados aos não expostos. Um trabalho conduzido por Zawilla *et al.* (2014) demonstrou que trabalhadores expostos à sílica cristalina apresentam alterações hepáticas decorrentes do processo de remodelação da matriz extracelular que ocorre no organismo dos indivíduos expostos. Ainda, no nosso trabalho, 25% dos indivíduos silicóticos informaram que utilizam anti-inflamatórios não esteroidais, os quais já demonstraram poder levar a dano hepático (NIKOSE *et al.*, 2015; SCHMELTZER *et al.*, 2016).

Este estudo apresenta algumas limitações. Primeiramente, o número de voluntários é pequeno, especialmente nos grupos de indivíduos expostos. Outro ponto limitante é a ausência da avaliação dos exames de raio X de tórax dos participantes como forma de confirmação do estado de saúde. Ainda, a falta de avaliação do perfil lipídico dos participantes é um fator limitante, pois estas informações são relevantes quando da avaliação de estados inflamatórios, e, também, a não realização da avaliação de antioxidantes endógenos é outra limitação do estudo.

- Este estudo sugeriu que a avaliação da expressão de L-selectina na superfície de linfócitos através de citometria de fluxo é um potencial biomarcador para acompanhamento e monitorização de trabalhadores expostos à sílica cristalina como forma de diagnóstico precoce das alterações provocadas por este agente, anteriormente ao desenvolvimento de silicose.
- Estudos mais aprofundados são necessários para um melhor entendimento do envolvimento da L-selectina na fisiopatologia da silicose e para permitir sua utilização na prática clínica como um biomarcador de efeito precoce.
- Os resultados observados neste estudo corroboram o envolvimento do estresse oxidativo e da resposta inflamatória no desenvolvimento da silicose.

- Finalizar as análises relativas à poeira respirável e conteúdo de sílica cristalina.
- Avaliação da expressão gênica de genes envolvidos com inflamação e câncer, especialmente L- selectina.
- Avaliação da expressão gênica – parceria com NIOSH.
- Avaliação da genotoxicidade – ensaio cometa e de micronúcleos.
- Avaliação da função pulmonar – Raio X de tórax e espirometria.
- Avaliação de outros antioxidantes exógenos – vitamina A (retinol), vitamina E (α -tocoferol), β - caroteno e licopeno.
- Projeto contemplado no edital PqG2017.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7 ed., 2012.

ABDALLA, D.A.; FAINE, L.A. Radicais livres e antioxidantes. *In*: OGA, S.; CAMARGO, M.M.; BATISTUZZO, J.A. **Fundamentos de Toxicologia**, 4 ed. Editora Atheneu. São Paulo, 2008.

AFRASIABIAN, S.; MOHSENPOUR, B.; BAGHERI, K.H.; SIGARI, N.; AFTABI, K. Diagnostic value of serum adenosine deaminase level in pulmonary tuberculosis. **J Res Med Sci**, v. 18, p. 252-254, 2013.

AMETISTA DO SUL. **Site oficial**. Disponível em: <<https://www.ametistadosul-rs.com/dado-gerais>>. Acesso em 23 jan. 2018.

AMORIM, L.C. O uso de biomarcadores na avaliação da exposição ocupacional a substâncias químicas. **Rev Bras Med Trab**, v. 1, n.2, p. 124-132, 2003.

ANLAR, H.G.; BACANLI, M.; İRITAŞ, S.; BAL, C.; KURT, T.; TUTKUN, E.; YILMAZ, O.H.; BASARAN, N. Effects of occupational silica exposure on oxidative stress and immune system parameters in ceramic workers in Turkey. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, p. 1-9, 2017.

APLIN, A.E.; HOWE, A.K.; JULIANO, R.L. Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 11, p. 737-744, 1999.

AZARI, M.R.; RAMAZANI, B.; MOSAVIAN, M.A.; MOVAHADI, M.; SALEHPOUR, S. Serum malondialdehyde and urinary neopterin levels in glass sandblasters exposed to crystalline silica aerosols. **International Journal of Occupational Hygiene**, v. 3, p. 29-32, 2011.

BADA, B.S.; OLATUNDE, K.A.; KANDE, O.A. Air quality assessment in the vicinity of quarry site. **Environment and Natural Resources Research**, v. 3, p. 111-115, 2013.

BAIERLE, M.; BAIROS, A.; MOREIRA, A.; BULCÃO, R.; ROEHR, M.; FREITAS, F.; DURGANTE, J.; BRUCKER, N.; CHARÃO, M.; GARCIA, S.C. Quantificação sérica de vitamina C por CLAE-UV e estudo de estabilidade. **Química Nova**, v. 35, p. 403-407, 2012.

BEAUCHAM, C.C.; LENTZ, T.J.; AND RICE, F.L. Expanding control banding for workplace silica exposures throughout the Americas. **Int J Occup Environ Health**, v. 18, p. 344-347, 2012.

BELTRAME, A.L.; ESTON, S.M.; IRAMINA, W.S.; CHIEREGATI, A.C.; TACHIBANA, I.K. An update in the threshold limit value for crystalline silica and its effects on respirator selection. *Rev*: **Rev Esc Minas**, v. 63, p. 621-625, 2010.

BERNARD, A.M.; GONZALEZ-LORENZO, J.M.; SILES, E.; TRUJILLANO, G.; LAUWERYS, L. Early decrease of serum Clara cell protein in silica- exposed workers. **Eur Respir J**, v. 7, p. 1932-1937, 1994.

BIRBEN, E.; SAHINER, U.M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organ J**, v. 5, p. 9-19, 2012.

BLANCO, D.; VICENT, S.; ELIZEGI, E.; PINO, I.; FRAGA, M.F.; ESTELLER, M.; SAFFIOTTI, U.; LECANDA, F.; MONTUENGA, L.M. Altered expression of adhesion molecules and epithelial–mesenchymal transition in silica-induced rat lung carcinogenesis. **Laboratory Investigation**, v. 84, p. 999-1012, 2004.

BLOCK, G.; JENSEN, C.D.; DALVI, T.B.; NORKUS, E.P.; HUDES, M; CRAWFORD, P.B.; HOLLAND, N.; FUNG, E.B.; SCHUMACHER, L.; HARMAT, P. Vitamin C treatment reduces elevated C-reactive protein. **Free Radic Biol Med**, v. 46, p. 70-77, 2009.

BONASSI, B.; MILIĆ, M.; NERI, M. Frequency of micronuclei and other biomarkers of DNA damage in populations exposed to dusts, asbestos and other fibers. A systematic review. **Mutation Research**, v. 770, p. 106-118, 2016.

BRANCO, P.M. **Dicionário de Mineralogia e Gemologia**, 2. ed. Oficina de Textos, São Paulo, 2008.

BRASIL. Ministério do Trabalho. **NR 7 - Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional**, 1978a. Disponível em: <<http://trabalho.gov.br/images/Documentos/SST/NR/NR7.pdf>>. Acesso em: 28 fev 2018.

BRASIL. Ministério do Trabalho. **NR 15 - Atividades e Operações Insalubres**. Brasília: Ministério do Trabalho e Emprego, 1978b. Disponível em: <http://www.trtsp.jus.br/geral/tribunal2/LEGIS/CLT/NRs/NR_15.html>. Acesso em: 20 fev 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Atenção à saúde dos trabalhadores expostos ao chumbo metálico**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Pneumoconioses**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **O mapa da exposição à sílica no Brasil**. Ribeiro, F.S.N. (coord). Rio de Janeiro: UERJ, 2010. 94 p.

BRASIL. Departamento Nacional de Produção Mineral. **Anuário Mineral Estadual - Rio Grande do Sul**. Coord. Técnica de José Eduardo da Costa Duarte... [et. al.]. 30 p. Brasília: DNPM, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **DATASUS**. Informações de saúde. Disponível em: <<http://datasus.saude.gov.br/informacoes-de-saude/tabnet/estatisticas-vitais>>. Acesso em 13 jan. 2018.

BRAZ, N.F.; CARNEIRO, A.P.; AMORIM, M.R.; FERREIRA, F.O.; LACERDA, A.C.R.; MIRANDA, A.S.; TEIXEIRA, M.M.T.; TEIXEIRA, A.L.; MENDONÇA, V.A. Association between inflammatory biomarkers in plasma, radiological severity, and duration of

exposure in patients with silicosis. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 46, p. 493-497, 2014.

CASTRO, H.A.; SILVA, C.G.; LEMLE, A. Estudo de imunoglobulinas, complementos e autoanticorpos em 58 trabalhadores expostos à sílica. **J Bras Pneumol**, v. 30, p. 201-206, 2004.

CHUBB, L.G.; CAUDA, E.G. Characterizing particle size distributions of crystalline silica in gold mine dust. **Aerosol Air Qual Res**, v. 17, p. 24-33, 2017.

COOGAMAI - Cooperativa de Garimpeiros do Médio Alto Uruguai. **Sobre nós – Histórico**. Disponível em: <<http://www.coogamai.com.br/sobre/>>. Acesso em 11 jan. 2018.

COTINGUIBA, G.G.; SILVA, J.R.; AZEVEDO, R.R.; ROCHA, T.J.; SANTOS, A.F. Método de avaliação da defesa antioxidante: uma revisão de literatura. **Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 15, p. 231-237, 2013.

DELLA ROSA, H.V.; SIQUEIRA, M.E.; COLACIOPPO, S. Toxicologia Ocupacional. Monitoramento Ambiental e Biológico. In: OGA, S.; CAMARGO, M.M.; BATISTUZZO, J.A. **Fundamentos de Toxicologia**, 4 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

DRIVALOS, A.; PAPATSORIS, A.G.; CHRISOFOU, M.; EFSTATHIOU, E.; DIMOPOULOS, M.A. The role of the cell adhesion molecules (integrins / cadherins) in prostate cancer. **International Braz J Urol**, v. 37, p. 302-306, 2011.

FANG, S.C.; ZHANG, H.T.; WANG, C.Y.; ZHANG, Y.M. Serum CA125 and NSE: Biomarkers of disease severity in patients with silicosis. **Clinica Chimica Acta**, v. 433, p. 123-127, 2014.

FENOGLIO, I.; FONSAATO, S.; FUBINI, B. Reaction of cysteine and glutathione (gsh) at the freshly fractured quartz surface: a possible role in silica-related diseases? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, p. 752-762, 2003.

FORMAN, H.J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Mol Aspects Med**, v. 30, p. 1-12, 2009.

FROST, G.; DARNTON, A; HARDING, A.H. The effect of smoking on the risk of lung cancer mortality for asbestos workers in Great Britain (1971-2005). **Ann Occup Hyg**, v. 55, p. 239-247, 2011.

FUBINI, B.; HUBBARD, A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, p. 1507-1516, 2003.

FUKUI, H.; ENDOH, S.; SHICHIRI, M.; ISHIDA, N.; HAGIHARA, Y.; YOSHIDA, Y.; IWAHASHI, H.; HORIE, M. The induction of lipid peroxidation during the acute oxidative stress response induced by intratracheal instillation of fine crystalline silica particles in rats. **Toxicology and Industrial Health**, v. 32, p. 1430-1437, 2016.

GREENBERG M.I.; WAKSMAN, J.; CURTIS, J. Silicosis: a review. **Dis Mon**, v. 54, p. 394-416, 2007.

GROTTO, D.; SANTA MARIA, L.D.; BOEIRA, S.; VALENTINI, J.; CHARÃO, M.F.; MORO, A.M.; NASCIMENTO, P.C.; POMBLUM, V.J.; GARCIA, S.C. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography – visible detection. **J Pharm Biomed Anal**, v.43, p.619-624, 2007.

GULUMIAN, M.; BORM, P.J.A.; VALLYATHAN, V.; CASTRANOVA, V.; DONALDSON, K.; NELSON, G.; MURRAY, J. Mechanistically identified suitable biomarkers of exposure, effect, and susceptibility for silicosis and coal-worker's pneumoconiosis: a comprehensive review. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 9, p. 357-395, 2006.

HAMAGUCHI, Y.; NISHIZAWA, Y.; YASUI, M.; HASEGAWA, M.; KABURAGI, Y.; KOMURA, K.; NAGAOKA, T.; SAITO, E.; SHIMADA, Y.; TAKEHARA, K.; KADONO, T.; STEEBER, D.A.; TEDDER, T.F.; SATO, S. Intercellular Adhesion Molecule-1 and L-selectin regulate bleomycin-induced lung fibrosis. **American Journal of Pathology**, v. 161, p. 1607-1618, 2002.

HENNEBERGER, P.K.; WEISSMAN, D.N. Old adversaries in new places. **Occup Environ Med**, v. 75, p. 1-2, 2018.

HOFFMAN, E.O.; LAMBERTY, J.; PIZZOLATO, P. et al. The ultrastructure of acute silicosis. **Arch Pathol**, v.96, p. 104-7, 1973.

IARC- International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs. **Arsenic, metals, fibres and dusts**. A review of human carcinogens. Volume 100 C, Lyon, France, 2009.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Ametista do Sul**. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rs/ametista-do-sul/panorama>>. Acesso em 10 jan. 2018.

ILO - International Labour Organization. **Guidelines for the use of the ILO international classification of radiographs of pneumoconiosis**. Geneve, 2011.

ILO– International Labour Organization. **Occupational health: Silicosis**. Disponível em: <http://www.ilo.org/safework/areasofwork/occupational-health/WCMS_108566/lang--en/index.htm>. Acesso em: 03 mar. 2018.

ISHIHARA, Y.; YASUHARA, T.; ISHIYAMA, S.; KAWASHIMA, H.; MIYASAKA, M.; MIYAZAKI, T. The role of leukocytes during acute phase inflammation in crystalline silica-induced lung injury. **Exp Lung Res**, v. 27, p. 589-603, 2001.

JIANG, P.R.; CAO, Z.; QIU, Z.L.; PAN, J.W.; ZHANG, N.; WU, Y.F. Plasma levels of TNF- α and MMP-9 in patients with silicosis. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 19, p. 1716-1720, 2015.

KALLINY, M.S.; BASSYOUNI, M.I. Immune Response Due to Silica Exposure in Egyptian Phosphate Mines. **Journal of Health Care for the Poor and Underserved**, v. 22, p. 91-109, 2011.

KAMAL, A.A.; GOMAA, A.; KHAFIF, M.E.; HAMMAD, A.E. Plasma lipid peroxides among workers exposed to silica or asbestos dusts. **Environmental Research** v. 49, p. 173-180, 1989.

KAWASAKI, H. A mechanistic review of silica-induced inhalation toxicity. **Inhalation Toxicology**, v.27, p. 363-377, 2015.

KLINGER, A.; GEBERT, A.; BIEBER, K.; KALIES, K.; AGER, A.; BELL, E.B.; WESTERMANN, J. Cyclical expression of L-selectin (CD62L) by recirculating T cells. **International Immunology**, v. 21, p. 443-455, 2009.

KURIHARA, N.; WADA, O. Silicosis and smoking strongly increase lung cancer risk in silica-exposed workers. **Ind Health**, v. 42, 303-314, 2004.

LANEY, A.S.; WEISSMAN, D.N. The classic pneumoconiosis: new epidemiological and laboratory observations. **Clin Chest Med**, v. 33, p. 745-758, 2012.

LEUNG, C.C.; IGNATIUS, T.K.Y.; CHENG, W. Silicosis. **Lancet**, 379, p. 2008-2018, 2012.

LEY, K. The Microcirculation in Inflammation. *In*: TUMA, R.F.; DURÁN, W.N.; LEY, K. **Microcirculation**. Academic Press, 2008.

LIU, X.; FANG, S.; LIU, H.; WANG, X.; DAI, X.; YIN, Q.; YUN, T.; WANG, W.; ZHANG, Y.; LIAO, H.; ZHANG, W.; YAO, H.; CHAO, J. Role of human pulmonary fibroblast-derived MCP-1 in cell activation and migration in experimental silicosis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 288, p. 152-160, 2015.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. Cell-cell adhesion and communication. *In*: LODISH, H. et al. **Molecular Cell Biology**, 4 ed. New York: W. H. Freeman; 2000.

MACHADO, F.B.; NARDY, A.J.; MELO, R.P.; OLIVEIRA, M.A.; SQUISATO, E. As rochas intrusivas da Formação Serra Geral na porção leste da Bacia do Paraná no estado de São Paulo: aspectos petrográficos e geoquímicos – resultados preliminares. **Geociências**, v. 24, p. 5-17, 2005.

MAO, W.J.; CHEN, J.Y.; ZHENG, M.F.; YE, S.G.; LIU, F.; HE, Y.J.; WU, B.; ZHANG, J. Lung transplantation for end-stage silicosis. **J Occup Environ Med**, v. 53, p. 845-849, 2011.

MARKIEWSKI, M.M.; LAMBRIS, J.D. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. **Am J Pathol**, v. 171, p. 715-727, 2007.

MEHERE, B.A.; PATIL, M.B.; PINGLE, S.K.; Thakkar, L.R.; Butle, A.B. Determination of levels of C-Reactive Protein (CRP) and liver function test parameters among occupationally exposed stone quarry workers of Central India: A quest in pursuit of biomarkers of occupational diseases of stone quarries. **Bull Env Pharmacol Life Sci**, v. 5, p. 33-38, 2016.

MIAO, R.M.; ZHANG, X.T.; GUO, P.; HE, E.Q.; ZHOU, F.; ZHAO, D.K.; ZHANG, Y.Y. Effect of oxidative stress on development of silicosis. **World J Respirol**, v. 2, p. 1-5, 2012.

MIYASAKA, M. Selectins (CD62-E/L/P). *In: Encyclopedia of Immunology*, 2nd ed., 1998.

MUETTERTIES M, O'HALLORAN SCHWARZ L, WANG R. Sandblasters. *In: GREENBERG, M., editor. Occupational, Industrial, and Environmental Toxicology*, 2nd ed. Philadelphia, PA: Mosby, 2003.

MUSCH, W.; VERFAILLIE, L.; DECAUX, G. Age-related increase in plasma urea level and decrease in fractional urea excretion: clinical application in the syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 1, p. 909-914, 2006.

MUZEMBO, B.A.; DEGUCHI, Y.; NGATU, N.R.; EITOKU, M.; HIROTA, R.; SUGANUMA, M. Selenium and exposure to fibrogenic mineral dust: a mini-review. **Environment International**, v. 77, p. 16-24, 2015.

NARIO, R.C.; HUBBARD, A.K. Silica exposure increases expression of pulmonary intercellular adhesion molecule 1 (ICAM 1) in C57Bl 6 mice. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 49, p. 599-617, 1996.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Amino acid oxidation and the production of urea. *In: NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger Principles of Biochemistry*. 7 ed, 2013.

NIKOSE, S.; ARORA, M.; SINGH, P.K.; NAIK, S.; KHAN, S.; NIKOSE, D. Hepatotoxicity and changes in liver enzymes due to use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in non-traumatic musculoskeletal painful disorders. **Molecular Enzymology and Drug Targets**, v. 1, p. 2-7, 2015.

NIOSH - National Institute for Occupational Safety and Health. **Health effects of occupational exposure to respirable crystalline silica**. Centers for Disease Control, April 2002.

NOZAL, M.J.; BERNAL, J.L.; TORIBIO, L.; MARINERO, P.; MORAL, O.; MANZANAS, L.; RODRIGUEZ, E. Determination of glutathione, cysteine and N-acetylcysteine in rabbit eye tissues using high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). **J Chromatogr A**, v. 778, p. 347-353, 1997.

OSHA - Occupational Safety and Health Administration. **Occupational exposure to respirable crystalline silica - review of health effects literature and preliminary quantitative risk assessment**. Docket OSHA-2010-0034, 2010.

PADAYATTY, S.J.; KATZ, A.; WANG, Y.; ECK, P.; KWON, O.; LEE, J.H.; CHEN, S.; CORPE, C.; DUTTA, A.; DUTTA, S.K.; LEVINE, M. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 22, p. 18-35, 2013.

PELUSO, M.E.; MUNNIA, A.; GIESE, R.W.; CHELLINI, E.; CEPPI, M.; CAPACCI, F. Oxidatively damaged DNA in the nasal epithelium of workers occupationally exposed to silica dust in Tuscany region, Italy. **Mutagenesis**, v.30, p. 1-7, 2015.

PNES – **Programa Nacional de Eliminação da Silicose**. Proposta preliminar. Brasília, dezembro de 2001.

PORTER, D.W.; MILLECCHIA, L.L.; WILLARD, P.; ROBINSON, V.A.; RAMSEY, D.; MCLAURIN, J.; KHAN, A.; BRUMBAUGH, K.; BEIGHLEY, C.M.; TEASS, A.; CASTRANOVA, V. Nitric oxide and reactive oxygen species production causes progressive damage in rats after cessation of silica inhalation. **Toxicol Sci**, v.90, p. 188-197, 2006.

PROUST, D.; FONTAINE, C. Amethyst-bearing lava flows in the Paraná Basin (Rio Grande do Sul, Brazil): Cooling, vesiculation and formation of the geodic cavities. **Geological Magazine**, v. 144, p. 53-65, 2007.

RAFFLER, N.A.; RIVERA-NIEVES, J.; LEY, K. L-selectin in inflammation, infection and immunity. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 2, p. 213-220, 2005.

SADE, M.Y.; KLOOG, I.; LIBERTY, I.F.; SCHWARTZ, J.; NOVACK, V. The association between air pollution exposure and glucose and lipids levels. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 101, p. 2460-2467, 2016.

SAKHVIDI, M.J.; ARDEKANI, J.B.; FIROOZICHAHAK, A.; ZAVARREZA, J.; HAJAGHAZADE, M.; MOSTAGHACI, M.; MEHRPARVAR, A.; BARKHORDARI, A. Exhaled breath malondialdehyde, spirometric results and dust exposure assessment in ceramics production workers. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v. 28, p. 81-89, 2015.

SANTOS, A.M.A.; CANÇADO, R.Z.L.; ANJOS, R.M.; AMARAL, N.C.; LIMA, L.C.A. Characteristics of occupational exposure to dust in the work environment of marble shops in the city of São Paulo. **Rev Bras de Saúde Ocup**, v. 32, p. 11-23, 2007.

SAUNI, R.; OSKA, P.; LEHTIMÄKI, L.; TOIVIO, P.; PALMROOS, P.; NIEMINEN, R.; MOILANEN, E.; UITTI, J. Increased alveolar nitric oxide and systemic inflammation markers in silica-exposed workers. **Occup Environ Med**, v. 69, p. 256-260, 2012.

SAXENA, S. Assessment of Vitamin E and Vitamin C against silica intoxication. **Int J Curr Microbiol App Sci**, v. 3, p. 811-816, 2014.

SHI, X.; DING, M.; CHEN, F.; WANG, L.; ROJANASAKUL, Y.; VALLYATHAN, V.; CASTRANOVA, V. Reactive oxygen species and molecular mechanism of silica-induced lung injury. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 20, p. 85-93, 2001.

SHI, X.; MAO, Y.; DANIEL, L.N.; SAFFIOTTI, U.; DALAL, N.S.; VALLYATHAN, V. Silica radical-induced DNA damage and lipid peroxidation. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, p. 149-154, 1994.

SHOEB, M.; JOSEPH, P.; KODALI, V.; MUSTAFA, G.; FARRIS, B.Y.; UMBRIGHT, C.; ROBERTS, J.R.; ERDELY, A.; ANTONINI, J.M. Silica inhalation altered telomere length and gene expression of telomere regulatory proteins in lung tissue of rats. **Scientific Reports**, 7, p. 1-6, 2017.

SCHMELTZER, P.A.; KOSINSKI, S.A.; KLEINER, D.E.; HOOFNAGLE, J.A.; STOLZ, A. FONTANA, R.J.; RUSSO, M.W. Liver injury from nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the United States. **Liver International**, v. 36, p. 603-609, 2016.

SELLAMUTHU, R.; UMBRIGHT, C.; ROBERTS, J.R.; CUMPSTON, A.; MCKINNEY, W.; CHEN, B.T.; FRAZER, D.; LI, S.; KASHON, M.; JOSEPH, P. Molecular insights into the progression of crystalline silica-induced pulmonary toxicity in rats. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, p. 301-312, 2012.

SOUZA, T.P.; WATTE, G.; GUSSO, L.M.; SOUZA, R.; MOREIRA, J.S.; KNORST, M.M. Silicosis prevalence and risk factors in semi-precious stone mining in Brazil. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 60, p. 529-536, 2017.

STEEBER, D.A.; GREEN, N.E.; SATO, S.; TEDDER, T.F. Lymphocyte migration in L-selectin-deficient mice. Altered subset migration and aging of the immune system. **J Immunol**, v. 157, p. 1096-1106, 1996.

STEENLAND, K.; MANNETJE, A.; BOFFETTA, P.; STAYNER, L.; ATTFIELD, M.; CHEN, J.; DOSEMECI, M.; DEKLERK, N.; HNIZDO, E.; KOSKELA, R.; CHECKOWAY, H. Pooled exposure-response analyses and risk assessment for lung cancer in 10 cohorts of silica-exposed workers: an IARC multicentre study. **Can Caus Cont.**, v. 12, p. 773-84, 2001.

TAKABAYASHI, T.; VANNIER, E.; CLARK, B.D.; MARGOLIS, N.H.; DINARELLO, C.A.; BURKE, J.F.; GELFAND, J.A. A new biologic role for C3a and C3a desArg: regulation of TNF- α and IL-1 β synthesis. **J Immunol**, v. 156, p. 3455-3460, 1996.

THORNE, P.S. Toxicologia Ocupacional. *In*: KLAASSEN, C.D.; WATKINS III, J.B. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull**, 2 ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

TRIPATHI, S.S.; PANDEY, H.P.; PAUL, B. Overview of cytokines and receptors in silicosis. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.1, p. 1-5, 2011.

VINAPAMULA, K.S.; PEMMARAJU, S.V.; BHATTARAM, S.K.; BITLA, A.R.; MANOHAR, S.M. Serum adenosine deaminase as inflammatory marker in rheumatoid arthritis. **J Clin Diagn Res**, v. 9, p. 8-10, 2015.

WEGNER, C.D.; GUNDEL, R.H.; ROTHLEIN, R.; LETTS, G. Expression and probable roles of cell adhesion molecules in lung inflammation. **Chest**, v. 101, p. 34S-39S, 1992.

WHO – World Health Organization. **The ILO-WHO Global Programme for the Elimination of Silicosis**. The Global Occupational Health Network, v. 12, p. 1-20, 2007.

ZAWILLA, N.; TAHA, F.; IBRAHIM, Y. Liver functions in silica-exposed workers in Egypt: possible role of matrix remodeling and immunological factors. **Int J Occup Environ Health**, v.20, p. 146-156, 2014.

ZANTE, A.; ROSEN, S.D. Sulphated endothelial ligands for L-selectin in lymphocyte homing and inflammation. **Biochem Soc Trans**, v. 31, p. 313-317, 2003.

ZHANG, Z.; SHEN, H.M.; ZHANG, Q.F.; ONG, C.N. Involvement of oxidative stress in crystalline silica-induced cytotoxicity and genotoxicity in rat alveolar macrophages. **Environmental Research**, v. 82, p. 245-252, 2000.

ZHANG, H.; YIN, G.; JIANG, H.; ZHANG, C. High-dose N-acetylcysteine decreases silica-induced lung fibrosis in the rat. **Journal of International Medical Research**, v. 41, p. 1179-1186, 2013.

ANEXO I

Descrição do processo de trabalho nos garimpos de Ametista do Sul

De acordo com informações fornecidas pelos garimpeiros de Ametista do Sul, RS participantes deste estudo, o trabalho nos garimpos consiste em uma busca individual por geodos de ametista. Os garimpos são subterrâneos, dessa forma, a cada garimpeiro é designada uma galeria (também conhecida como broca), que é um dos túneis abertos nas rochas, para explorar, como pode ser observado na Figura 4. Cada galeria recebe iluminação, mangueiras que levam água e sistema de exaustão de ar (Figura 5).

A exploração acontece primeiramente analisando-se a parede de rochas em busca de possíveis geodos, seguida da utilização de pólvora para realizar a detonação nas rochas e possibilitar a retirada da pedra. A pólvora é produzida no próprio garimpo, por um dos funcionários que tenha habilitação para manuseio do explosivo, porém, sua utilização dentro das galerias é feita por todos os garimpeiros, conforme a necessidade de cada um. Após a detonação, o garimpeiro utiliza uma ferramenta pneumática (martelete) que utiliza água para diminuir a formação de poeira, como demonstrado na Figura 6, para realizar pequenas perfurações na rocha encontrada para analisar se a ametista tem valor comercial ou não. Em caso afirmativo, ele passa a fazer contornos no geodo com o martelete, e, quando o geodo estiver quase que totalmente desprendido, o garimpeiro utiliza uma marreta para finalizar o trabalho e remover a rocha intacta da parede rochosa. Uma rocha recém retirada por um garimpeiro pode ser observada na Figura 7. Após a retirada do geodo e/ou no caso de não ter encontrado uma ametista com bom valor comercial, o garimpeiro repete todo o processo.

Os trabalhadores recebem remuneração financeira conforme a produção, ou seja, cada um recebe uma porcentagem sobre o valor total da ametista que encontrar. Essa porcentagem depende da empresa, por exemplo, em alguns garimpos os garimpeiros recebem uma porcentagem na faixa de 40%, porém, eles mesmos necessitam comprar os próprios EPIs. Em outros, a porcentagem é um pouco menor, mas o dono do garimpo é quem fornece os EPIs.



Figura 4. Garimpeiro na galeria durante trabalho de extração de geodo de ametista.
Fonte: arquivo pessoal.



Figura 5. Entrada de um dos garimpos. Pode-se observar o equipamento de exaustão de ar (flecha de cor branca) e as mangueiras que levam a água utilizada na diminuição da poeira durante o trabalho de perfuração (flechas de cor preta). Fonte: Arquivo pessoal.

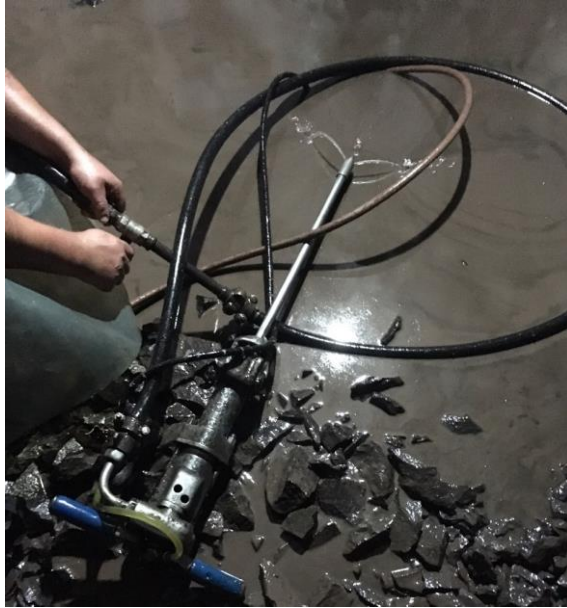


Figura 6. Martelete pneumático equipado com água utilizado durante a remoção dos geodos nos garimpos. Fonte: arquivo pessoal.



Figura 7. Geodo de ametista recém retirado pelo garimpeiro. Fonte: arquivo pessoal.

ANEXO II**Carta de confirmação da submissão do artigo**

From: Gregory Makowski <eesserver@eesmail.elsevier.com>
Date: 2018-04-10 9:49 GMT-03:00
Subject: A manuscript number has been assigned: CCA-D-18-00491
To: solange.garcia@ufrgs.br

Ms. Ref. No.: CCA-D-18-00491
Title: Inflammatory and oxidative stress parameters as potential early biomarkers for silicosis
Clinica Chimica Acta

Dear Garcia SC,

Your submission entitled "Inflammatory and oxidative stress parameters as potential early biomarkers for silicosis" has been assigned the following manuscript number: CCA-D-18-00491.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <https://ees.elsevier.com/cca/>.
Your username is: solange.garcia@ufrgs.br

If you need to retrieve password details, please go to:
http://ees.elsevier.com/cca/automail_query.asp

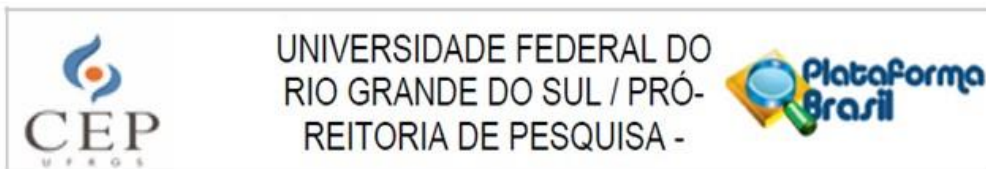
Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Clinica Chimica Acta

For further assistance, please visit our customer support site at <https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

ANEXO III

Documento de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES PRECOSES NA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL À SÍLICA E A ASBESTO

Pesquisador: Solange Cristina Garcia

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;);

Versão: 3

CAAE: 60976516.7.0000.5347

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.868.122

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

PORTO ALEGRE, 15 de Dezembro de 2016

Assinado por:

MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
(Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br

ANEXO IV

Documento de aprovação na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES PRECOSES NA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL À SILICA E A ASBESTO

Pesquisador: Solange Cristina Garcia

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;);

Versão: 4

CAAE: 60976516.7.0000.5347

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.006.409

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Situação do Parecer:
Aprovado

BRASILIA, 08 de Abril de 2017

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador)

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521
UF: DF Município: BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

ANEXO V

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – grupo de não expostos ocupacionalmente

Você está sendo convidado a participar da pesquisa **“AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES PRECOSES NA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL À SÍLICA E A ASBESTO”**. Este trabalho tem como pesquisadora responsável a professora Dr^a. Solange Cristina Garcia da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

Trabalhadores de pedreiras e empresas que realizam o beneficiamento de rochas encontram-se diariamente expostos à sílica cristalina, um material que compõe as rochas e o solo, e é liberado sempre que se praticam atividades onde acontece a quebra de minerais. Já trabalhadores de empresas que fabricam tijolos refratários e telhas de fibrocimento encontram-se diariamente expostos ao amianto (também conhecido com asbesto), um material fibroso também proveniente de rochas. Esses compostos são reconhecidos por seu alto potencial causador de prejuízos a saúde do trabalhador exposto, inclusive câncer. Por este motivo, este trabalho pretende avaliar alguns efeitos desta exposição à sílica e ao amianto sobre a saúde desses trabalhadores. Sabendo que no seu ambiente trabalho não há presença de nenhum desses compostos, você está sendo convidado a participar do grupo controle (sem exposição) para que possamos comparar os resultados obtidos dos indivíduos expostos com indivíduos não expostos.

Se você aceitar participar desse estudo, será realizada uma entrevista com questionário sobre o uso de medicamentos, seus hábitos de vida, seu histórico familiar de doenças e seu estado de saúde atual. Este questionário será realizado no dia da coleta e deve necessitar de aproximadamente 20 minutos para ser preenchido.

Também será realizada a coleta de amostras biológicas (sangue, urina, células da mucosa da boca e fluido nasal). Esta coleta será realizada no seu local de trabalho, em um único dia que será agendado com você conforme sua disponibilidade. Realizaremos alguns exames que são de rotina em laboratório de análises clínicas, como hemograma, exames de avaliação dos rins e fígado, e alguns outros, como avaliação do DNA e inflamação, que somente realizamos no laboratório de Toxicologia na Faculdade de Farmácia da UFRGS. Para a realização dos exames, será

necessário que você fique em jejum por pelo menos 8h, e, após os exames, vamos fornecer um pequeno lanche para você.

Para a coleta de sangue, o material utilizado é único para cada indivíduo. Será coletada uma amostra de 24 mL de sangue, cerca de 4 colheres de chá. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor leve decorrente da perfuração da pele. Complicações da coleta de sangue são raras, mas é possível que ocorra algum tipo de mal-estar e até mesmo desmaios. Poderá aparecer hematoma (mancha roxa) no local da punção de sangue, o qual desaparece em alguns dias. Com as amostras de sangue, faremos hemograma, avaliaremos se há alterações no fígado e rins, avaliaremos se há alterações no DNA (que é a substância onde todas as informações genéticas do seu organismo ficam guardadas) das suas células e também avaliaremos o sistema que protege seu corpo contra infecções, seu sistema imune. Avaliaremos também se genes relacionados ao aparecimento de câncer e inflamação estão presentes no sangue.

Quanto ao procedimento para coleta de urina, o indivíduo participante terá que urinar em um pequeno frasco coletor de urina e este é o único desconforto que pode vir a ocorrer. Você deverá urinar apenas a quantidade que for capaz no momento da coleta, desprezando o primeiro jato de urina para não ocorrer contaminação microbiológica (contaminação por fungos ou bactérias). A quantidade de urina necessária é até a metade do frasco. Com as amostras de urina, avaliaremos se há alterações nos rins e também avaliaremos possíveis danos no DNA.

Quanto à coleta de células da mucosa da boca, os indivíduos participantes poderão sofrer de algum desconforto do procedimento e há o risco eventual, embora pequeno, de lesão da mucosa, uma vez que se constitui de uma coleta simples, realizada com uma pequena escova de coleta de células bucais (semelhante a uma escova de dentes) através de movimentos circulares contra o interior de cada bochecha. Anteriormente à coleta de células da mucosa, o indivíduo será orientado a realizar bochecho com água mineral disponibilizada pela equipe de pesquisa, para diminuir os riscos de contaminação por microrganismos. Esta coleta será utilizada para a análise de alterações no DNA das suas células.

Para a avaliação da sua função pulmonar você realizará um exame chamado espirometria, que é um teste em que se mede a quantidade de ar que entra e que sai dos pulmões. Para isso, você deverá assoprar em um equipamento chamado de espirômetro. Além deste, você realizará um Raio-X dos pulmões, que acontecerá em

dia e local a ser combinado. Existem riscos de ocorrer mudanças no corpo que levem ao desenvolvimento de câncer, pois o exame envolve radiação. Porém, a quantidade de radiação que você será exposto é muito baixa, e pesquisas científicas mostram que o risco maior acontece quando são realizados exames repetidamente, ou seja, por muitas vezes durante a vida. Todos os custos referentes ao seu deslocamento e de um acompanhante, caso seja necessário, e à realização destes exames são de responsabilidade dos responsáveis pela pesquisa.

Para a coleta do fluido nasal, você vai estar sentado e com a cabeça inclinada para trás. Vão ser colocados 5 mL de solução fisiológica em cada narina e após 10 segundos você deverá assar o nariz dentro de um pote que iremos fornecer no momento da coleta.

Você irá receber os resultados dos exames realizados. A entrega dos resultados será realizada no seu local de trabalho em data e horário que lhe for mais conveniente. Entraremos em contato para agendarmos a entrega dos mesmos. Caso você não queira receber os resultados, deve solicitar aos responsáveis da pesquisa e eles não serão entregues a você. Você poderá entrar em contato com os participantes da pesquisa a qualquer momento para receber informações sobre seus exames, se assim desejar. Caso seja observada alguma alteração significativa nos resultados de seus exames, lhe encaminharemos para o atendimento adequado.

A participação no estudo poderá não trazer um benefício direto a você. A sua participação nesse estudo irá contribuir para o aumento do conhecimento sobre este assunto e os resultados irão auxiliar na tomada de medidas preventivas para a melhoria da qualidade de vida dos trabalhadores expostos à sílica cristalina e ao amianto.

O material biológico coletado será armazenado de forma codificada, ou seja, será utilizado um número para identificar o material de cada participante, e ninguém terá acesso aos seus dados individuais e nem aos resultados de seus exames além dos pesquisadores responsáveis. Garantimos caráter confidencial dos resultados. Os resultados serão divulgados de forma agrupada, sem a identificação dos indivíduos que participaram do estudo. Após a realização das análises previstas neste projeto, as amostras serão armazenadas. Este material, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e você será chamado para reconseguir com o uso do material.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber nas instituições envolvidas.

Você poderá solicitar a retirada das informações e do material biológico a qualquer momento, bastando solicitar por escrito ao responsável pelo projeto. Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano resultantes de sua participação na pesquisa, você tem direito à indenização e receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Você terá garantia de acesso, em qualquer etapa da pesquisa, aos profissionais responsáveis pela mesma, para esclarecimentos de eventuais dúvidas e em caso de qualquer urgência relacionada ao estudo, contatando a Prof^a Dr^a Solange Cristina Garcia pelos telefones (51) 3308-5297 ou (54) 996267487 (24 horas por dia, 7 dias por semana). A mestrande Jessica Nardi também poderá ser contatada pelos telefones (51) 3308-5297 ou pelo e-mail nardi.je@gmail.com. Também poderá contatar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, que aprovou este projeto de pesquisa, através do telefone (51) 3308-3738 ou do e-mail etica@propesq.ufrgs.br. O Comitê de Ética em Pesquisa é um comitê que existe na universidade que avalia todos os projetos de pesquisa que envolvem seres humanos. É formado por professores da instituição, que avaliam todos os projetos com muito cuidado, para garantir que o bem estar dos voluntários da pesquisa seja mantido. O endereço é na Avenida Paulo Gama, 110 - Sala 317, Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro, Porto Alegre/RS - CEP: 90040-060. O horário de funcionamento é das 8 as 12h, e das 14 as 18h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores. Além das assinaturas, todas as páginas deste termo devem ser rubricadas pelo pesquisador que o aplicou, que é autorizado pelo pesquisador responsável, e por você.

() Aceito que minhas amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

() Não aceito que minhas amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

Nome do Participante: _____

Assinatura: _____

Nome do Pesquisador: _____

Assinatura: _____

(pesquisador que aplicou o Termo)

Local e data: _____

ANEXO VI

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – grupo expostos à sílica e silicóticos

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES PRECOSES NA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL À SÍLICA E A ASBESTO**”. Este trabalho tem como pesquisadora responsável a professora Dr^a. Solange Cristina Garcia da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

Em seu ambiente de trabalho, você está diariamente exposto à sílica, um material que compõe as rochas e o solo, e é liberado sempre que se praticam atividades onde acontece a quebra das rochas (como nas pedreiras, por exemplo). A sílica é conhecida por causar diversos problemas no corpo humano, principalmente nos pulmões, inclusive câncer. Por este motivo, este trabalho pretende avaliar alguns efeitos desta exposição à sílica sobre a sua saúde.

Se você aceitar participar desse estudo, você responderá um questionário sobre sua saúde, o uso de medicamentos, seus hábitos de vida e atividades exercidas no seu trabalho. Este questionário será realizado no dia da coleta e deve necessitar de aproximadamente 20 minutos para ser preenchido. Além do questionário, coletaremos amostras biológicas (sangue, urina, células da mucosa da boca e fluido nasal) e faremos exames para avaliar sua função pulmonar.

A coleta de amostras biológicas será realizada no seu local de trabalho, em um único dia que será agendado conforme sua disponibilidade. Essas amostras serão usadas para realizar alguns exames que são de rotina em um laboratório de análises clínicas, como hemograma, exames de avaliação dos rins e fígado, e alguns outros, como avaliação do DNA e inflamação, que somente realizamos no laboratório de Toxicologia na Faculdade de Farmácia da UFRGS. Para a realização dos exames, será necessário que você fique em jejum por pelo menos 8h, e, após os exames, vamos fornecer um pequeno lanche para você.

Para a coleta de sangue, o material utilizado é único para cada indivíduo. Será coletada uma amostra de aproximadamente 24 mL de sangue, cerca de 4 colheres de chá. No momento da coleta poderá haver alguma dor leve decorrente da perfuração da pele. É possível que aconteça algum tipo de mal-estar, tontura e até mesmo desmaios durante a coleta, mas essas situações são raras. Poderá aparecer algum hematoma (mancha roxa) no local da coleta do sangue, mas o mesmo desaparece

em alguns dias. Com as amostras de sangue, faremos hemograma, avaliaremos se há alterações no fígado e rins, avaliaremos se há alterações no DNA (que é a substância onde todas as informações genéticas do seu organismo ficam guardadas) das suas células e também avaliaremos o sistema que protege seu corpo contra infecções, seu sistema imune. Avaliaremos também se genes relacionados ao aparecimento de câncer e inflamação estão presentes no sangue.

Em relação à coleta de urina, você terá que urinar em um pequeno frasco coletor de urina e este é o único desconforto que pode vir a ocorrer. Você deverá urinar apenas a quantidade que for capaz no momento da coleta, e o primeiro jato de urina deve ser desprezado (ou seja, não deve ser urinado no frasco de coleta) para não ocorrer contaminação microbiológica (contaminação por fungos ou bactérias). A quantidade de urina necessária é até a metade do frasco. Com essas amostras avaliaremos se há alterações nos seus rins.

Quanto à coleta de células da mucosa da boca, é uma coleta simples, realizada com uma pequena escova de coleta de células bucais (semelhante a uma escova de dentes) através de movimentos circulares contra o interior de cada bochecha. Você poderá sentir algum desconforto durante o procedimento e há um risco baixo de lesão da mucosa. Antes de fazer a coleta de células da mucosa, você será orientado a realizar bochecho com água mineral disponibilizada pela equipe de pesquisa, para diminuir os riscos de contaminação por microrganismos. Esta coleta será utilizada para análise de alterações no DNA das suas células.

Para a avaliação da sua função pulmonar você realizará um exame chamado espirometria, que é um teste em que se mede a quantidade de ar que entra e que sai dos pulmões. Para isso, você deverá assoprar em um equipamento chamado de espirômetro. Além deste, você realizará um Raio-X dos pulmões, que acontecerá em dia e local a ser combinado. Existem riscos de ocorrer mudanças no corpo que levem ao desenvolvimento de câncer, pois o exame envolve radiação. Porém, a quantidade de radiação que você será exposto é muito baixa, e pesquisas científicas mostram que o risco maior acontece quando são realizados exames repetidamente, ou seja, por muitas vezes durante a vida. Todos os custos referentes ao seu deslocamento e de um acompanhante, caso seja necessário, e à realização destes exames são de responsabilidade dos responsáveis pela pesquisa.

Para a coleta do fluido nasal, você vai estar sentado e com a cabeça inclinada para trás. Vão ser colocados 5 mL de solução fisiológica em cada narina e após 10

segundos você deverá assar o nariz dentro de um pote que iremos fornecer no momento da coleta.

Os exames que realizaremos com suas amostras acontecerão no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da UFRGS (avaliação dos rins, fígado, inflamação, alterações no DNA e sistema imune). Uma pequena quantidade de sangue será enviada para o National Institute for Occupational Safety and Health, nos Estados Unidos, que é um importante órgão que estuda a saúde dos trabalhadores. Nesse local, será feita a avaliação dos genes relacionados a câncer e inflamação.

Você irá receber os resultados dos exames realizados, que serão entregues no seu local de trabalho em data e horário que lhe for mais conveniente. Entraremos em contato para agendar a entrega dos mesmos. Caso você não queira receber os resultados, deve solicitar aos responsáveis da pesquisa e eles não serão entregues a você. Você poderá entrar em contato com os participantes da pesquisa a qualquer momento para receber informações sobre seus exames, se assim desejar. Caso seja observada alguma alteração significativa nos resultados de seus exames, lhe encaminharemos para o atendimento adequado.

A participação no estudo poderá não trazer um benefício direto a você. A sua participação nesse estudo irá contribuir para o aumento do conhecimento sobre este assunto e os resultados irão auxiliar na tomada de medidas preventivas para a melhoria da qualidade de vida dos trabalhadores à sílica e ao amianto.

O material biológico coletado será armazenado de forma codificada, ou seja, será utilizado um número para identificar o material de cada participante, e ninguém terá acesso aos seus dados individuais e nem aos resultados de seus exames além dos pesquisadores responsáveis. Garantimos caráter confidencial dos resultados. Os resultados serão divulgados de forma agrupada, sem a identificação dos indivíduos que participaram do estudo.

Após a realização das análises previstas neste projeto, as amostras serão armazenadas. Este material, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e você será chamado para consentir novamente com o uso do material. Você poderá solicitar a retirada das informações e do material biológico a qualquer momento, bastando solicitar por escrito ao responsável pelo projeto.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber nas instituições envolvidas. Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo relacionado aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano resultantes de sua participação na pesquisa, você tem direito à indenização e receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Você terá garantia de acesso, em qualquer etapa da pesquisa, aos profissionais responsáveis pela mesma, para esclarecimentos de eventuais dúvidas e em caso de qualquer urgência relacionada ao estudo, contatando a Prof^a Dr^a Solange Cristina Garcia pelos telefones (51) 3308-5297 ou (54) 996267487 (24 horas por dia, 7 dias por semana). A mestrande Jessica Nardi também poderá ser contatada pelos telefones (51) 3308-5297 ou pelo e-mail nardi.je@gmail.com. Também poderá contatar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, que aprovou este projeto de pesquisa, através do telefone (51) 3308-3738 ou do e-mail etica@propeq.ufrgs.br. O Comitê de Ética em Pesquisa é um comitê que existe na universidade que avalia todos os projetos de pesquisa que envolvem seres humanos. É formado por professores da instituição, que avaliam todos os projetos com muito cuidado, para garantir que o bem estar dos voluntários da pesquisa seja mantido. O endereço é na Avenida Paulo Gama, 110 - Sala 317, Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro, Porto Alegre/RS - CEP: 90040-060. O horário de funcionamento é das 8 as 12h, e das 14 as 18h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores. Além das assinaturas, todas as páginas deste termo devem ser rubricadas pelo pesquisador que o aplicou, que é autorizado pelo pesquisador responsável, e por você.

- () Aceito que minhas amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.
() Não aceito que minhas amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

Nome do Participante: _____

Assinatura: _____

Nome do Pesquisador: _____

Assinatura: _____

(pesquisador que aplicou o Termo)

Local e data: _____

ANEXO VII**Questionário de avaliação**

Entrevistador: _____

Data: _____

INFORMAÇÕES PESSOAIS

Nome: _____

Código: _____

Idade: _____ Etnia: _____

Altura: _____ Peso: _____

Empresa: _____

Até que ano você estudou?

- Nunca frequentou a escola
 Ensino Fundamental ou Primário/Ginásio incompleto
 Ensino Fundamental ou Primário/Ginásio completo
 Ensino Médio ou Segundo Grau ou Colegial incompleto
 Ensino Médio ou Segundo Grau ou Colegial completo
 Ensino Superior incompleto
 Ensino Superior completo

Qual é a renda da sua família (contando o salário de todos os familiares que convivem na mesma residência)?

- Até 1 salário mínimo
 De 1 a 2 salários mínimos
 De 2 a 3 salários mínimos
 De 3 a 4 salários mínimos
 De 4 a 5 salários mínimos
 De 5 a 10 salários mínimos
 Mais que 10 salários mínimos

Ainda sobre a sua residência, a água utilizada é proveniente de:

- Rede geral de distribuição Poço ou nascente Outro meio

A rua da sua residência é:

- Asfaltada/pavimentada Terra/cascalho

INFORMAÇÕES SOBRE O TRABALHO

Há quanto tempo você trabalha na empresa? _____

Qual é o cargo que exerce na empresa?

Em qual setor da empresa trabalha?

Qual é sua carga horária diária de trabalho? _____

Quantos dias por semana você trabalha? _____

Qual era a sua ocupação anterior? Trabalhou nesse local por quanto tempo?

Quais Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) você utiliza?

() Máscara () Luvas () Óculos () Avental () Protetor auricular

Existem outros Equipamentos de Proteção Individual na empresa que você trabalha?
Se sim, quais? _____

O protetor facial protege todo o rosto ou somente a região do nariz e da boca?

Marque com um X qual das máscaras abaixo é a que você utiliza (ou a mais parecida com a que você utiliza):

()



Fig. 13:
Respirador
do tipo
peça
facial
inteira com
filtro P3

()



Fig. 14:
Respirador
do tipo
peça
semifacial
com filtro
P3

()



Fig. 15:
Respirador do tipo peça
semifacial descartável PFF3

Com qual frequência você troca o filtro do protetor facial (máscara)?

Na sua opinião, você acha que as medidas de controle da geração de poeira (exaustão, umidificação) são eficientes para diminuir a poeira no ambiente de trabalho? () Sim () Não

Se não, por quê?

As roupas que utiliza no trabalho são lavadas em casa? () Sim () Não

Se sim, quem as lava? _____

Essa pessoa tem/teve problemas respiratórios? () Sim () Não

Se sim, qual: _____

INFORMAÇÕES DE SAÚDE E HÁBITOS DE VIDA

Na sua opinião, como está seu estado de saúde?

() Muito bom () Bom () Razoável () Ruim () Muito ruim

Se você acha que está ruim ou muito ruim, qual o motivo?

Tem o hábito de fumar? () Sim () Não

Se sim, fuma há quantos anos? _____

Quantos cigarros por dia? _____

Já fumou em algum momento da vida? () Sim () Não

Se sim, por quanto tempo?

Convive com alguém que fuma? () Sim () Não

Consome bebidas alcoólicas? () Sim () Não

Se sim, qual bebida e qual quantidade, aproximadamente?

Com que frequência? () 4 ou mais vezes por semana

() até 3 vezes por semana

() até 2 vezes por semana

() até 2 vezes por mês

Consumiu bebidas alcoólicas nos últimos 2 dias? Qual?

Algum familiar tem ou teve problemas respiratórios? () Sim () Não

Se sim, especifique quem e quais problemas:

Você apresenta alguma doença infecciosa crônica (tuberculose, AIDS, sífilis, toxoplasmose, hepatite)? () Sim () Não

Se sim, especifique qual: _____

Apresenta algum problema respiratório crônico (bronquite, alergias respiratórias, sinusite, asma)? () Sim () Não

Se sim, especifique qual: _____

Já apresentou algum problema respiratório em que necessitou de atendimento médico e/ou internação hospitalar? () Sim () Não

Se sim, especifique qual: _____

Faz uso contínuo de anti-inflamatórios (ibuprofeno, diclofenaco, nimesulida, prednisona, betametasona, hidrocortisona, dexametasona...) ou fez uso deles nos últimos 2 meses? () Sim () Não

Se sim, qual medicamento e por qual motivo:

Usa algum medicamento (incluindo polivitamínicos)? () Sim () Não

Se sim, especifique qual:

Pratica atividades físicas? () Sim () Não

Se sim, especifique qual e com que frequência:

ALIMENTAÇÃO - Com que frequência consome os alimentos listados abaixo:

	Menos de 1x na semana	1x na semana	2-3x na semana	4-6x na semana	7x na semana	Não ingere
Sucos naturais						
Frutas						
Feijão						
Refrigerantes						
Pão branco, biscoito, bolos						
Pão preto/integral						
Salada verde (vegetais crus)						
Outros vegetais (cozidos ou fritos)						
Alimentos gordurosos (carne gorda, frituras, salgados)						
Cereais com fibras ou farelos						
Batatas						
Chimarrão						
Café						