

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

**AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS EFEITOS DA POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA SOBRE A
SAÚDE DE TAXISTAS E SEUS MECANISMOS**

BRUNA GAUER

PORTO ALEGRE

2018

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

**AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS EFEITOS DA POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA SOBRE A
SAÚDE DE TAXISTAS E SEUS MECANISMOS**

Tese apresentada por **Bruna Gauer** como pré-requisito para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Solange Cristina Garcia

PORTO ALEGRE

2018

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e avaliada pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Diogo André Pilger

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profa. Dra. Natália Brucker

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Profa. Dra. Marli Maria Knorst

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dra. Sabrina Nunes do Nascimento (Banca Suplente)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

CIP - Catalogação na Publicação

GAUER, BRUNA
AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS EFEITOS DA POLUIÇÃO
ATMOSFÉRICA SOBRE A SAÚDE DE TAXISTAS E SEUS
MECANISMOS / BRUNA GAUER. -- 2018.
231 f.
Orientador: Solange Cristina Gauer.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, , Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. exposição ocupacional. 2. poluição ambiental. 3.
estresse oxidativo. 4. inflamação. 5. risco para
câncer. I. Gauer, Solange Cristina, orient. II.
Título.

Agradecimentos ao CNPq, órgão que financiou a bolsa de estudos e disponibilizou recursos financeiros (CNPq/Universal Nº 485342/2013-8) para o desenvolvimento deste trabalho. Agradecimentos à FAPERGS pelos recursos financeiros para a execução deste e outros projetos; ao PPGCF; ao HCPA, que disponibilizou espaço físico e auxílio financeiro para execução de atividades; ao Laboratório de Toxicologia (LATOX) da Faculdade de Farmácia desta Universidade, que disponibilizou equipamentos e materiais necessários para a realização das análises laboratoriais na elaboração da presente tese; e a todos os participantes que aceitaram participar de forma voluntária deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial à minha orientadora, Profa Dra Solange Garcia pela oportunidade, confiança e ensinamentos; com certeza estes foram anos de muito aprendizado e crescimento. Aos meus colegas do LATOX, minha segunda família, por todo o auxílio durante este trabalho, pois sem eles nada disso seria possível; ao Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT) da faculdade pelas análises de hemograma e cedência do local para realização das coletas dos taxistas.

Agradecimentos sinceros a todos os colaboradores, em especial: à Profa. Dra. Adriana Gioda (PUC-Rio) pelas análises de quantificação de metais; aos profissionais do HCPA: farmacêutica Alice do Serviço de Patologia, ao médico Luís Fernando, à Fernanda, Patrícia, Marina, Jeferson e Hugo da UAMP, e à Gabriela do CTG, bem como à professora Úrsula Matte pela parceria e colaboração para as análises realizadas no HCPA; à Letícia, bolsista técnica da faculdade, pelo auxílio nas análises de citometria de fluxo; ao Sérgio, diretor-geral do SEMST do Banrisul, por toda ajuda na coleta do grupos de não expostos; e ao SINTÁXI, em especial ao diretor Adão e ao taxista Nilson, pelo apoio na divulgação das coletas e recrutamento dos taxistas.

Também gostaria de agradecer a toda minha família, em especial aos meus pais, pela educação e exemplos de vida que sempre me deram, por todo incentivo e apoio, tanto emocional como financeiro, durante minha vida acadêmica; ao meu namorado João pelo apoio incondicional e compreensão durante as diferentes fases (altos e baixos) desses últimos 4 anos; às minhas amigas e colegas Elisa, Sabrina e Gabriela, presentes do LATOX pra vida, com agradecimento especial à Elisa, por ter compartilhado de todos dos desafios, angústias e vitórias deste doutorado, e por estar sempre ao meu lado quando precisei. Ainda, não posso deixar de agradecer a todos os amigos que de alguma forma acompanharam nesta trajetória e me apoiaram nesta conquista, todos foram e são muito importantes para mim.

Por fim, e não menos importante, quero agradecer a Deus por ter guiado meus passos até aqui. Sou uma pessoa abençoada por todas as pessoas e oportunidades que tive em minha vida.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”.

- John F. Kennedy

APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente tese foi redigida na forma de encarte para publicações e está organizada em seções dispostas da seguinte maneira: Parte I: Introdução e Objetivos; Parte II: Manuscritos 1, 2 e 3, e demais resultados do trabalho; Parte III: Discussão, Conclusão, Perspectivas; Referências Bibliográficas e Anexos.

A **Introdução** apresenta o embasamento teórico que nos levou ao desenvolvimento desta proposta de trabalho. Nos Objetivos constam os principais questionamentos do trabalho realizado.

Os **Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão** e as **Referências específicas** encontram-se no corpo de cada manuscrito, apresentados na forma de **Capítulo I, Capítulo II e Capítulo III**.

O **Capítulo IV** contém os demais **Materiais e Métodos e Resultados** não contemplados nos manuscritos.

A seção **Discussão** contém uma interpretação geral dos resultados obtidos e que estão descritos nos capítulos.

A seção **Conclusões** aborda as conclusões gerais dos principais resultados da tese. Em seguida, está apresentada a seção **Perspectivas**, a qual aborda os próximos estudos a serem realizados com os resultados gerados neste Doutorado.

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

A seção **Anexos** contém o aceite do Comitês de Ética em Pesquisa da UFRGS, os modelos de termo de consentimento livre e esclarecido e termo de assentimento e do questionário aplicado aos participantes do estudo.

RESUMO

A exposição à poluição atmosférica é fator de risco para inúmeras doenças e faz milhares de vítimas anualmente. Essa poluição é composta por uma mistura complexa de substâncias inorgânicas e orgânicas, material particulado (MP) e gases, oriundos da emissão de indústrias e da combustão incompleta de veículos automotores. Além da poluição atmosférica, há de se considerar a poluição interna presente em residências e diferentes locais de trabalho, sejam eles indústrias ou até mesmo escritórios. Diversos poluentes ficam adsorvidos no MP e juntos a ele são inalados, acarretando efeitos deletérios à saúde. Dentre estes poluentes presentes no MP é comum observar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), bem como metais e metaloides, substâncias sabidamente tóxicas e classificadas como carcinogênicas. Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa envolvendo taxistas associaram a exposição ocupacional destes trabalhadores a efeitos deletérios. Portanto, o presente estudo objetivou avaliar a potencial associação da exposição ocupacional de taxistas à poluição atmosférica quando comparados a um grupo de não expostos ocupacionalmente, bem como investigar possíveis mecanismos oxidativos e inflamatórios que podem levar ao aumento da suscetibilidade ao câncer nestes trabalhadores expostos. Para tanto, este estudo contou com a participação de 100 taxistas da cidade de Porto Alegre, RS, uma cidade com alto índice de poluição externa (*outdoor*). Além disso, como grupo de não expostos à poluição atmosférica, participaram 70 trabalhadores com funções administrativas que, portanto, estão expostos a uma poluição interna (*indoor*) durante a jornada de trabalho. Amostras de sangue, urina e células da mucosa oral foram coletadas. Foram realizadas análises de quantificação de biomarcadores de exposição a HPAs, pelo seu metabólito urinário 1-hidroxipireno (1-OHP), e aos elementos metálicos em sangue total. Adicionalmente, foram avaliados biomarcadores de efeito relacionados a processos oxidativos, inflamatórios, bioquímicos e de dano ao DNA. Dentro dos biomarcadores de efeito também foram avaliados marcadores moleculares de expressão de genes antioxidantes, de reparo ao DNA e relacionados a processos de iniciação e progressão tumoral. Avaliou-se também a suscetibilidade individual através da genotipagem de polimorfismos enzimáticos da biotransformação de xenobióticos. O manuscrito 1 da presente tese demonstra a maior exposição de taxistas a HPAs e aos

metais As e Ni. À essa exposição pôde-se associar mecanismos oxidativos e respostas inflamatórias em células imunes, com conseqüentes alterações em níveis transcricionais de proteínas envolvidas em processos de iniciação e progressão tumoral. O segundo manuscrito apresentou a importância do equilíbrio de elementos metálicos essenciais frente à exposição ocupacional. Neste estudo foi possível observar a exposição *indoor* de trabalhadores com atividades administrativas, apesar de os efeitos deletérios da exposição *outdoor* de taxistas serem mais significativos. A exposição *outdoor* foi novamente relacionada a processos inflamatórios. Além disso, foi demonstrado a redução da expressão gênica e inibição de diferentes enzimas, além de maiores danos ao DNA em taxistas. O manuscrito 3 foi uma complementação aos demais resultados, apresentando diferentes metais e trazendo o Hg como o principal poluente relacionado aos processos inflamatórios observados em taxistas dos estudos prévios de nosso grupo de pesquisa. Os resultados adicionais, por sua vez, trazem dados complementares ao presente estudo. Taxistas apresentaram poucas diferenças de marcadores imunes em relação ao grupo de trabalhadores administrativos, mas apresentaram hiperglicemia e maiores marcadores precoces de dano renal. Em relação aos polimorfismos, o polimorfismo nulo das enzimas de fase II glutationa-S- transferases T1 e M1 (GSTT1 e GSTM1), bem como polimorfismo de alelo mutado da enzima delta-aminolevulinato desidratase (ALAD1-2), parecem proteger dos danos resultantes da exposição. Nossos resultados demonstraram novamente que taxistas são mais um grupo de risco para a exposição à poluição atmosférica e que esta exposição exacerba processos oxidativos e inflamatórios que, por sua vez, agem a nível molecular danificando o DNA e alterando a expressão de genes importantes para o controle de danos e supressão de processos tumorigênicos. Por fim, maiores níveis de alguns antioxidantes exógenos mostraram-se associados a hábitos dietéticos saudáveis, além de efeitos protetivos sobre o estresse oxidativo, inflamação e o risco de câncer.

Palavras-chave: Exposição ocupacional; poluição ambiental; estresse oxidativo; inflamação; risco para câncer; suscetibilidade individual.

ABSTRACT

Exposure to air pollution is a risk factor for numerous diseases and makes thousands of victims annually. This pollution is composed of a complex mixture of inorganic and organic substances, particulate matter (PM) and gases, from the emission of industries and the incomplete combustion of motor vehicles. In addition to air pollution, indoor pollution in homes and workplaces, whether they are industries or even offices, must be considered. Several pollutants are absorbed in the MP and together with it are inhaled, causing deleterious effects on health. Among these pollutants present in the PM it is common to observe polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), as well as metals and metalloids, substances known to be toxic and classified as carcinogenic. Previous studies by our research group involving taxi drivers have associated occupational exposure of these workers to deleterious effects. Therefore, the present study aimed to evaluate the potential association of occupational exposure of taxi drivers to air pollution when compared to a group of non-occupationally exposed individuals, as well as to investigate possible oxidative and inflammatory mechanisms that may lead to increased susceptibility to cancer in these workers exposed. In this way, this study was comprised by 100 taxi drivers from the city of Porto Alegre, RS, a city with a high rate of external traffic pollution. In addition, as a group of non-exposed to air pollution, 70 workers with administrative functions participated, which are therefore exposed to indoor pollution during their working day. Samples of blood, urine and oral mucosa cells were collected. Quantitative analysis of biomarkers of exposure to PAHs by their urinary metabolite 1-hydroxypyrene (1-OHP) and metal elements in whole blood were performed. In addition, biomarkers of effect related to oxidative, inflammatory, biochemical and DNA damage were evaluated. Within the biomarkers of effect, molecular markers of expression of antioxidant genes, DNA repair and related to initiation and tumor progression processes were also evaluated. Individual susceptibility was also evaluated through the genotyping of biotransformation enzymatic polymorphisms of xenobiotics. The manuscript 1 of this thesis demonstrates the greater exposure of taxi drivers to PAHs and As and Ni metals. Oxidative mechanisms and inflammatory responses in immune cells could be associated with this exposition, with consequent changes in transcriptional levels of proteins involved in initiation and tumor progression processes. The second manuscript presented the

importance of the balance of essential metallic elements in front of the occupational exposure. In this manuscript it was possible to observe the indoor exposure of workers with administrative activities, although the deleterious effects of outdoor exposure of taxi drivers were more significant. The outdoor exposure was again related to inflammatory processes. In addition, it has been demonstrated the reduction of gene expression and inhibition of different enzymes, in addition to greater DNA damage in taxi drivers. The manuscript 3 was a complement to the other results, presenting different metals and bringing the Hg as the main pollutant related to the inflammatory processes observed in taxi drivers of the previous studies of our research group. The additional results, in turn, bring data complementary to the present study. Taxi drivers showed few differences in immune markers in relation to the group of administrative workers, but presented hyperglycemia and higher early markers of renal damage. In relation to polymorphisms, the null polymorphism of phase II glutathione-S-transferase enzymes T1 and M1 (GSTT1 and GSTM1), as well as mutated allele polymorphism of the enzyme delta-aminolevulinate dehydratase (ALAD1-2), appear to protect against the resulting damage from exposure. Our results reinforce that taxi drivers are another group at risk for exposure to air pollution and that this exposure exacerbates oxidative and inflammatory processes, which in turn act at a molecular level, damaging the DNA and altering the expression of genes important for control of damage and suppression of tumorigenic processes. Finally, higher levels of some exogenous antioxidants have been shown to be associated with healthy dietary habits, as well as protective effects on oxidative stress, inflammation and the risk of cancer.

Keywords: Occupational exposure; environment pollution; oxidative stress; inflammation; risk for cancer; individual susceptibility.

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO I

Table 1. Characteristics of taxi drivers and non-exposed subjects (n=140).....	78
Table 2. Levels of urinary 1-OHP and toxic elements in blood samples of subjects and reference values (n=140).....	79
Table 3. Relationship between oxidative stress, inflammatory and exposure biomarkers (n= 140).....	85
Table 4. CD62-L and CD62-P adhesion molecules associations with biomarkers of exposure and effect (n= 140).....	86
Supplemental section – Table 1. Covariates employed in ANCOVA covariation or partial correlations tests.....	108

MANUSCRITO II

Table 1. Personal information and habits of participants.....	119
Table 2. Quantification of metal elements in whole blood.....	120
Table 3. Correlations between the studied biomarkers.....	124
Table 4. Associations between oxidative, inflammatory and genotoxicity biomarkers (n= 168).....	125

MANUSCRITO III – SHORT COMMUNICATION

Table 1. Blood metals and urinary 1-hydroxypyrene metabolite levels of the studied groups.....	142
Table 2. Multiple regression linear analysis of factors affecting the levels of inflammatory biomarkers adjusted for other potential confounders (n = 132).....	143

RESULTADOS ADICIONAIS

Tabela 1. Doenças crônicas entre não expostos (n= 56) taxistas (n= 85) e histórico familiar. Sendo, HC: hipercolesterolemia. AVC= acidente vascular cerebral. HAS= hipertensão arterial sistêmica.....	168
---	------------

Tabela 2. Comparativo da classificação pessoal dos participantes sobre estado de saúde.....	169
Tabela 3. Sintomas relatados pelos participantes, dado em frequência (%), e razão de chances de taxistas apresentarem os sintomas em relação aos não expostos ocupacionalmente (NEO) a poluição atmosférica. Sendo: N (nunca), AV (às vezes), S(sempre), %: Porcentagem dentro do respectivo grupo.....	170
Tabela 4. Frequência de aderência dos participantes às recomendações do Guia Alimentar do Ministério da Saúde de 2006.....	171
Tabela 5. Parâmetros bioquímicos e hematológicos avaliados nos dois grupos de estudo.....	173
Tabela 6. Parâmetros imunológicos (sistema complemento e imunoglobulinas) avaliados nos dois grupos de estudo.....	174
Tabela 7. Avaliação do dano ao DNA e mutagenicidade entre expostos e não expostos ocupacionalmente à poluição atmosférica.....	176
Tabela 8. Frequência dos genótipos encontrados para os polimorfismos avaliados nos dois grupos do estudo.....	177
Tabela 9. Associações entre 1-OHP e elementos metálicos (n= 141).....	182

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1.** Prováveis vias de toxicidade do material particulado, com HPAs e metais adsorvidos, que influenciam as doenças pulmonares e cardíacas através de efeitos oxidativos e inflamatórios (adaptado de Mills e colaboradores (2009)).....**34**
- Figura 2.** Exposição a HPAs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) e elementos metálicos: matrizes para biomonitoramento e potenciais efeitos deletérios.....**43**
- Figura 3.** Esquema representativo da biotransformação de HPAs e metais, sua relação com sistema de defesa antioxidante endógeno e possíveis danos oxidativos ocasionados pelo desequilíbrio redox durante a exposição ocupacional (adaptado de Carochó e Ferreira (2013)).....**44**
- Figura 4.** Interação entre biomarcadores inflamatórios durante a ativação do sistema imune na resposta inflamatória aguda (adaptado de Pazos e Nader (2007)).....**52**
- Figura 5.** Fatores que influenciam na suscetibilidade ao câncer (adaptado de Abdul e colaboradores (2015)).....**59**
- Figura 6.** Estreita relação entre os efeitos oxidativos e inflamatórios ocasionados pela exposição à poluição ambiental e a suscetibilidade ao câncer.....**62**

MANUSCRITO I

- Graphical Abstract**.....**70**
- Figure 1.** Biomarkers of oxidative and inflammation status from non-occupationally exposed (NOE) individuals (n= 55) and taxi drivers (n= 85).....**81**
- Figure 2.** Peripheral assessment of phenotypic expression of adhesion molecules ICAM-1, CD18, CD62-L, and CD62-P on mononuclear cell surfaces by flow cytometry in non-occupationally exposed (NOE) individuals (n= 55) and taxi drivers (n= 85).....**82**
- Figure 3.** Scatter dot plot graphics (median and interquartile range) of gene expression in mononuclear cells (lymphocytes and monocytes) of ICAM-1 adhesion molecule (A), CD26 (B), and p53 (C) in non-occupationally exposed individuals (NOE) (n= 55) and taxi drivers (n= 85)..... **84**

Figure 4. Significant correlations (Spearman's or partial correlation) between gene expressions (n= 140). A) ICAM-1 vs. p53 (r= 0.870; p<0.001), adjusted for smoking exposure. B) ICAM-1 vs. CD26 (r= 0.543; p<0.001), adjusted for smoking exposure. C) p53 vs. CD26 (r= 0.827; p<0.001)..... **87**

MANUSCRITO II

Figure 1. Oxidative stress biomarkers in indoor exposed workers (IEW; n= 68) and taxi drivers (OWE; n= 100). **121**

Figure 2. Biomarkers of immune alterations in the indoor exposed workers (IEW) (bank workers, n= 68) and outdoor exposed workers (OEW) (taxi drivers, n= 100)..... **122**

Figure 3. Biomarkers of genotoxicity and mutagenicity in the indoor exposed workers (IEW) (bank workers, n= 68) and outdoor exposed workers (OEW) (taxi drivers, n= 100)..... **122**

MANUSCRITO III – SHORT COMMUNICATION

Figure 1. Circulating cytokine levels (pg ml⁻¹) from taxi drivers (n = 80) and the non-exposed group (n = 52). Data are expressed as mean ± SEM. *p < 0.001 compared with non-exposed workers (ANCOVA adjusted for age). IL-1β: interleukin-1β, IL-6: interleukin-6, TNF-α: tumor necrosis factor alpha, IFN-γ: interferon gamma, IL-10: interleukin-10..... **143**

RESULTADOS ADICIONAIS

Figura 1. Organograma do estudo..... **150**

Figura 2. Cor/raça autodeclaradas pelos participantes dos grupos do estudo. Valores expressos como % dentro do grupo em questão..... **165**

Figura 3. Pontos de trabalho dos taxistas dentro da cidade de Porto Alegre. Valores expressos como número de taxistas que trabalha no referido ponto de táxi. HPS: Hospital de Pronto Socorro; HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre..... **166**

Figura 4. Profissões antecedentes à atual de ambos os grupos estudados. Valores expressos como número de taxistas ou não expostos que tiveram a referida profissão.....	167
Figura 5. Níveis plasmáticos expressos como μM do antioxidante não-enzimático exógeno. A) Vitamina E. B) Betacaroteno e Retinol. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$: teste ANCOVA ajustado para idade, doença crônica e fumo passivo.....	174
Figura 6. Biomarcadores de dano renal precoce. A) Microalbuminúria urinária. B) N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) urinária. * $p < 0,05$: teste ANCOVA ajustado para idade, doença crônica e fumo passivo.....	175

LISTA DE ABREVIATURAS

ALA	– Ácido δ -aminolevulínico
ALAD	– δ -aminolevulinato Desidratase
ALT	– Alanina Aminotransferase
As	– Arsênio
AST	– Aspartato Aminotransferase
CAT	– Catalase
CD26	– Cluster de diferenciação 26 ou dipeptidil peptidase-4
CLAE	– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNPq	– Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Co	– Cobalto
CTG	– Centro de Terapia Gênica
Cu	– Cobre
DNA	– Ácido Desoxirribonucleico
EROs	– Espécies Reativas de Oxigênio
ERNs	– Espécies Reativas de Nitrogênio
Fe	– Fe
GGT	– Gama Glutamil Transferase
GPx	– Glutathione Peroxidase
GR	– Glutathione Redutase
GSH	– Glutathione Reduzida
GSSG	– Glutathione Dissulfeto
GST	– Glutathione S-transferase
HGB	– Hemoglobina
HCPA	– Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HMOX-1	– Heme Oxigenase-1
Hg	– Mercúrio
HCT	– Hematócrito
IARC	– Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
ICAM-1	– Molécula de Adesão Intercelular 1
ICP-MS	– Espectrometria de Massa por Plasma Indutivamente Acoplado
LACT	– Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas

LATOX	– Laboratório de Toxicologia
NAG	– N-acetil- β -D-glicosaminidase
MDA	– Malondialdeído
MCP1	– Proteína Quimiotática de Monócitos 1
MN	– Micronúcleos
MP	– Material Particulado
NF-Kb	– Fator de Transcrição Nuclear kB
Ni	– Níquel
OGG1	– 8-Oxoguanina DNA Glicosilase
OMS	– Organização Mundial da Saúde
Pb	– Chumbo
PCO	– Proteínas Carboniladas
PCR	– Proteína C reativa
PPGCF	– Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas
PUC	– Pontifícia Universidade Católica
RBC	– Eritrócitos
RNA	– Ácido Ribonucleico
Se	– Selênio
SOD	– Superóxido Dismutase
SNPs	– Polimorfismo de um Único Nucleotídeo
-SH	– Grupamentos tiólicos
TBA	– Ácido Tiobarbitúrico
TCEP	– Tris [2-carboxietil] Hidrocloridrato de Fosfina
Ti	– Titânio
UAMP	– Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas
UFRGS	– Universidade Federal do Rio Grande do Sul
V	– Vanádio
WBC	– Leucócitos
Zn	– Zinco

SUMÁRIO

PARTE I

INTRODUÇÃO	31
1.1 Exposição ocupacional a poluição atmosférica.....	31
1.2 Exposição à poluição atmosférica e efeitos sobre a saúde	32
2. Biomonitoramento	34
2.1 Biomarcadores de exposição.....	35
2.1.1 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e biomarcador 1- hidroxipireno (1-OHP).....	36
2.1.2 Poluentes ambientais	37
2.1.2.1 Arsênio	37
2.1.2.2 Chumbo.....	38
2.1.2.3 Cobalto.....	38
2.1.2.4 Cobre	39
2.1.2.5 Manganês	39
2.1.2.6 Mercúrio	40
2.1.2.7 Níquel.....	40
2.1.2.8 Selênio	41
2.1.2.9 Titânio	41
2.1.2.10 Vanádio	42
2.1.2.11 Zinco	42
2.2 Biomarcadores de efeito	43
2.2.1 Biomarcadores do estresse oxidativo.....	43
2.2.1.1 Enzimas antioxidantes	45
2.2.1.2 Antioxidantes não enzimáticos.....	45
2.2.1.3 Quantificação de macrocomponentes oxidados.....	47
2.2.2 Biomarcadores de inflamação	47
2.2.2.1 Moléculas de adesão	47
2.2.2.2 Quimiocinas.....	49
2.2.2.3. Proteína C Reativa	50
2.2.3 Biomarcadores do sistema imune	50
2.2.3.1 Sistema complemento.....	50
2.2.3.2 Imunoglobulinas	52
2.2.4 Biomarcadores de hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, hematotoxicidade e genotoxicidade	53

2.2.5 Alterações em nível transcricional – Expressão gênica.....	54
2.2.5.1 Proteína supressora tumoral (p53).....	54
2.2.5.2 Heme oxigenase-1	55
2.2.5.3 8-oxoguanina-glicosilase-1	55
2.2.5.4 CD26	56
2.3 Biomarcadores de suscetibilidade	56
3. Fator nuclear kappa B e sua ação em processos oxidativos e inflamatórios	58
4. Exposição a HPAs e metais e sua relação com o câncer	58
5. Estresse Oxidativo, Inflamação e Câncer	59
OBJETIVOS.....	63
1. OBJETIVO GERAL	63
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	63
PARTE II	
CAPÍTULO I.....	67
MANUSCRITO 1	67
CAPÍTULO II.....	109
MANUSCRITO 2.....	109
CAPÍTULO III.....	139
MANUSCRITO 3 – SHORT COMMUNICATION	139
CAPÍTULO IV.....	147
RESULTADOS ADICIONAIS	147
1. MATERIAIS E MÉTODOS	149
1.1. Princípios Éticos e Organograma do Estudo	149
1.2. Seleção dos Participantes do Estudo.....	150
1.3. Obtenção de Amostras Biológicas, Separação, Tratamento e Descarte	152
1.4. Aplicação de Questionário Complementar	153
1.5. Monitoramento Biológico.....	154
1.5.1. Biomarcadores de Exposição	154
1.5.1.1. 1-Hidroxipireno Urinário (1-OHP)	154
1.5.1.2. Metais em sangue total.....	154
1.5.2. Biomarcadores de Efeito.....	155
1.5.2.1. Genotoxicidade.....	155
1.5.2.1.1. Ensaio Cometa por fluorescência.....	155

1.5.2.1.2. Ensaio cometa com enzimas de reparo de DNA.....	156
1.5.2.1.3. Ensaio de Micronúcleo.....	156
1.5.2.2. Imunotoxicidade.....	157
1.5.2.2.1. Moléculas de Adesão.....	157
1.5.2.2.2. Proteína Quimiotática de Monócitos 1 (MCP1)	157
1.5.2.2.3. Imunoglobulinas e sistema complemento	158
1.5.2.3. Nefrotoxicidade.....	158
1.5.2.3.1. Microalbuminúria	158
1.5.2.3.2. N-acetil-β-D-glicosaminidase Urinária (NAG).....	158
1.5.2.3.3. Parâmetros Bioquímicos de Função Renal.....	158
1.5.2.4. Hemato e Hepatotoxicidade	159
1.5.2.4.1. Hemograma Completo	159
1.5.2.4.2. Enzimas Hepáticas.....	159
1.5.2.5. Estresse Oxidativo.....	159
1.5.2.5.1. Antioxidantes enzimáticos.....	159
1.5.2.5.2. Antioxidantes não enzimáticos	160
1.5.3. Biomarcadores de Suscetibilidade.....	161
1.5.3.1. Polimorfismo Enzimático	161
1.5.3.2. Expressão Gênica	162
1.6. Análises Estatísticas	163
2. RESULTADOS.....	165
2.1. Caraterização da população estudada.....	165
2.1.1. Resultados obtidos através do questionário	167
2.1.2. Caraterísticas alimentares	171
2.2. Biomarcadores de efeito	172
2.2.1. Análises hematológicas e bioquímicas	172
2.2.2. Biomarcadores de estresse oxidativo e inflamação	174
2.2.3. Biomarcadores de nefrotoxicidade.....	175
2.2.4. Biomarcadores de genotoxicidade.....	175
2.3. Biomarcadores de Suscetibilidade	176
2.4. Correlações.....	178
2.4.1. Sintomas <i>versus</i> biomarcadores de exposição e efeito	178
2.4.2. Biomarcadores de exposição <i>versus</i> biomarcadores de efeito	178
2.4.4. Biomarcadores de exposição e efeito <i>versus</i> biomarcadores de efeito do sistema imune.....	180

PARTE III

DISCUSSÃO	185
CONCLUSÕES	199
PERSPECTIVAS.....	201
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	203
ANEXOS	221
ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS	221
ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO- CONTROLES.....	222
ANEXO III- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - CASOS (MOTORISTAS DE TÁXI)	225
ANEXO IV- QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO	228

PARTE I



INTRODUÇÃO

1.1 Exposição ocupacional a poluição atmosférica

A Organização Internacional do Trabalho (OIT) define a doença ocupacional como a doença adquirida em decorrência da exposição a fatores de risco durante a atividade laboral e, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a doença ocupacional não pode ser simplesmente definida pela doença por si só, mas sim pela associação entre doença e exposição (Karjalainen, 1999; Lee, 2002). As doenças ocupacionais são caracterizadas como doenças crônicas não transmissíveis e a exposição a agentes químicos, físicos e biológicos ocorre, principalmente, pelas vias respiratória e dérmica. Os agravos à saúde podem ser distúrbios respiratórios, hematológicos, hepáticos, renais, neurológicos, músculo-esqueléticos, dérmicos e até contribuir para o desenvolvimento do câncer (Kang e Kim, 2010). O vasto crescimento industrial ao longo dos anos é o principal responsável pelo respectivo aumento da incidência de doenças relacionadas ao trabalho. Diante deste risco, medidas de prevenção ou redução de riscos ocupacionais devem ser tomadas pelas empresas para proteger a saúde dos trabalhadores (Papadopoulos *et al.*, 2010).

A principal medida de proteção a contaminantes presentes no ar do ambiente de trabalho é a substituição do agente tóxico, seja pela eliminação do mesmo da área de trabalho ou pela troca de atividade do trabalhador. Quando a substituição não é possível, a redução da exposição deve ser o próximo passo a ser tomado. Esta redução da exposição pode ser alcançada através da redução ou isolamento da fonte emissora, alteração de processo ou formulação, melhoria geral da higiene, ventilação ou uso de equipamentos de proteção individual. Na prática, esta redução da exposição depende da combinação de diferentes intervenções, tanto técnicas como organizacionais (Heederik *et al.*, 2012).

Motoristas de táxi (taxistas) compõem um grupo de trabalhadores que se encontram diariamente expostos aos poluentes atmosféricos durante sua jornada de trabalho, principalmente a poluentes do tráfego de veículos automotores estando, assim, ocupacionalmente expostos. O exercício da profissão de taxista se dá em um ambiente sob constante exposição à poluição atmosférica, sendo suscetível a inúmeras fontes emissoras e tipos de contaminantes. É de extrema importância

considerar que a poluição atmosférica é composta por uma mistura complexa de substâncias. Deste modo, não há exposição a apenas um agente tóxico, mas sim uma coexposição simultânea a xenobióticos que podem apresentar diferentes mecanismos de toxicidade, apresentando efeitos aditivos (sinergia) ou não, bem como podem apresentar efeitos antagônicos (Da Silva, 2016).

1.2 Exposição à poluição atmosférica e efeitos sobre a saúde

A exposição ocupacional dos taxistas à poluição atmosférica durante o exercício de sua profissão é associada ao aumento da morbidade e mortalidade de doenças respiratórias e cardiovasculares (Brook, Robert D *et al.*, 2010; Newby *et al.*, 2014). Isso porque a poluição atmosférica é uma mistura complexa de milhares de componentes, como material particulado (MP), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), metais, além de poluentes gasosos como dióxido de nitrogênio (NO₂), monóxido de carbono (CO), ozônio (O₃), dióxido de enxofre (SO₂) e compostos orgânicos voláteis como o benzeno (Uzoigwe *et al.*, 2013; Newby *et al.*, 2014).

A maioria dos xenobióticos encontra-se adsorvida no MP, cujo tamanho, área de superfície e composição é que determinam os efeitos biológicos potenciais de estresse oxidativo e inflamação. Quanto menor o tamanho do MP, maior será a sua penetração nas vias respiratórias e maior será a superfície de contato das substâncias adsorvidas nele com o organismo. A composição de substâncias adsorvidas no MP depende de diferentes fatores, sendo os principais componentes compostos orgânicos como HPAs, metais de transição e íons (De Kok *et al.*, 2006; Valavanidis *et al.*, 2006; Valavanidis *et al.*, 2008).

HPAs são substâncias químicas que contém 2 ou mais anéis de benzeno e são formadas a partir da combustão incompleta de material orgânico. As fontes de emissão de HPAs são diversas, dentre as quais estão as indústrias de coque e carvão e a emissões dos escapes de veículos a diesel, sendo os motoristas em geral um importante grupo de expostos a esta última fonte emissora. Como constituintes da poluição, os HPAs são comumente encontrados adsorvidos no MP principalmente como misturas cuja composição depende da matéria-prima e das condições de combustão (Schauer *et al.*, 2003). As vias de exposição em humanos se dá por

inalação, ingestão e contato dérmico, sendo a inalação de HPAs adsorvidos no MP a principal via de exposição ocupacional (Boffetta *et al.*, 1997; De Kok *et al.*, 2006).

Com a rápida industrialização e urbanização de países em desenvolvimento, a emissão de metais e metaloides como arsênio (As), níquel (Ni), mercúrio (Hg), cádmio (Cd), chumbo (Pb), zinco (Zn), cobre (Cu), entre outros, tem sido uma importante contaminação do meio ambiente, como consequência de processos industriais e de mineração, emissão de escapamentos de veículos e pelo uso de pesticidas e fertilizantes químicos (Fang *et al.*, 2014). Assim como os HPAs, os metais também estão presentes na poluição atmosférica adsorvidos em MP, o que influencia sua biodisponibilidade, transporte e ação sobre a saúde humana (Bibby e Webster-Brown, 2006). A contaminação ambiental por metais é uma grande preocupação, uma vez que eles persistem no meio ambiente por tempo indeterminado por não serem biodegradáveis, além de apresentarem ação tóxica em humanos mesmo em baixas concentrações (Adham *et al.*, 2011).

Dois são as vias propostas pelas quais o MP fino (tamanho abaixo de 2,5 μm), juntamente com os contaminantes adsorvidos em sua superfície (HPAs e metais) penetram e provocam danos ao organismo (Figura 1). A primeira hipótese, classificada como via clássica, sugere que as partículas inaladas se deslocam até os alvéolos e provocam uma resposta inflamatória local nos pulmões, com consequente liberação de mediadores inflamatórios para a circulação sanguínea. A segunda hipótese, a via alternativa, propõe que o MP fino (tamanho menor que 1 μm) é capaz de translocar-se rápida e diretamente dos alvéolos para a circulação e, por sua vez, estas partículas e as substâncias a elas adsorvidas podem interagir com o endotélio vascular ou agir diretamente sobre placas ateroscleróticas, causando efeitos locais de estresse oxidativo e inflamação semelhantes aos observados nos pulmões (Mills *et al.*, 2009).

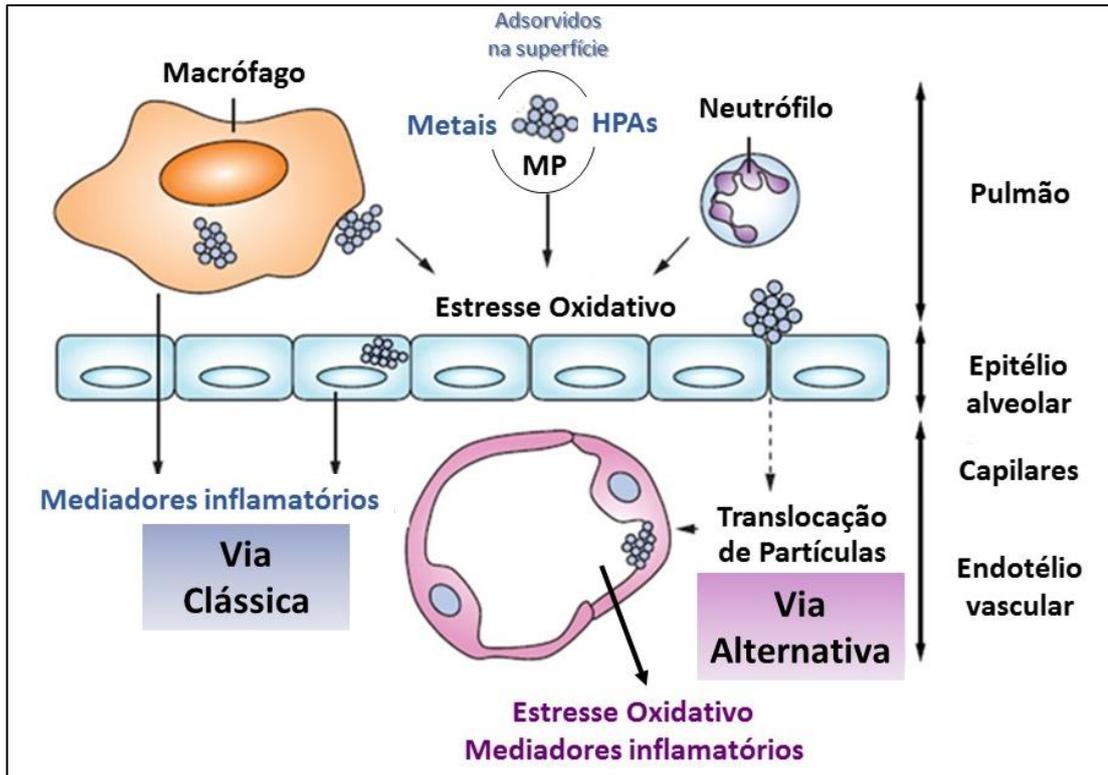


Figura 1. Prováveis vias de toxicidade do material particulado, com HPA's e metais adsorvidos, que influenciam as doenças pulmonares e cardíacas através de efeitos oxidativos e inflamatórios (adaptado de Mills e colaboradores (2009)).

O aumento do processo inflamatório resultante da exposição crônica a poluentes atmosféricos é associado a efeitos de morbidade e mortalidade (Hoek *et al.*, 2013). Além disso, esta inflamação causada pela poluição pode agravar doenças inflamatórias pré-existentes como asma e doença pulmonar obstrutiva, precipitando exacerbações agudas, bem como agir sobre placas ateroscleróticas, precipitando síndrome coronária aguda por favorecer a progressão, desestabilização ou ruptura destas placas (Smeeth *et al.*, 2004; Newby *et al.*, 2014). Desta forma, a exposição a poluentes atmosféricos pode contribuir para o início e progressão de aterosclerose, hipertensão e diabetes, e é um fator de risco para eventos coronários agudos e outros problemas cardíacos (Brook, R. D. *et al.*, 2010; Pope *et al.*, 2016).

2. Biomonitoramento

A quantificação da exposição a agentes químicos pode ser realizada, basicamente, pelo monitoramento ambiental e biomonitoramento. Este último estima a exposição através de marcadores biológicos que podem ser usados dentro de

qualquer nível da organização biológica (molecular, celular ou em nível de órgãos) (Morais *et al.*, 2012). O biomonitoramento é realizado através de protocolos padronizados que objetivam a detecção de alterações biológicas precoces e preferencialmente reversíveis (biomarcadores). Estes biomarcadores podem então ser comparados a valores de referência adequados de uma condição potencial de exposição capaz de gerar danos ou doenças ao indivíduo (Manno *et al.*, 2010).

Os biomarcadores são classificados em três tipos: I) biomarcadores de exposição, que inferem a exposição a algum agente químico pela determinação dos níveis do próprio agente, seus metabólitos ou sua ligação a moléculas-alvo em tecidos ou fluidos corporais; II) biomarcadores de efeito, que quantificam a alteração de substâncias endógenas corporais em tecidos ou fluidos, podendo englobar efeitos precoces ou clínicos; e III) biomarcadores de suscetibilidade, que se referem a uma habilidade inerente ou adquirida do organismo (ex: metabolismo ou sensibilidade de moléculas-alvo) para responder à exposição a determinada substância (Aitio *et al.*, 2007).

Para o biomonitoramento é interessante que amostras biológicas sejam de fácil acesso, permitindo coletar-se volume suficiente de amostra sem causar desconforto e risco para a saúde do indivíduo. As amostras de sangue e urina são as mais utilizadas, uma vez que o sangue representa o compartimento central do organismo, estando em equilíbrio com todos os órgãos, e a urina permite a coleta de grandes volumes de forma não invasiva, além de ser a principal via de excreção de muitos xenobióticos e seus metabólitos (Angerer *et al.*, 2007; Angerer *et al.*, 2011).

As amostras biológicas usuais para quantificação da exposição a metais são sangue e urina. Fios de cabelo também são coletados de forma simples e não invasiva e podem ser usados na quantificação da exposição a metais em conjunto com outras matrizes biológicas, com a vantagem de que o cabelo é capaz de refletir exposições crônicas (acúmulo de substâncias ao longo do crescimento dos fios), ao passo que sangue e urina limitam-se a detectar exposições recentes (Kordas *et al.*, 2010).

2.1 Biomarcadores de exposição

Na avaliação da exposição através da quantificação de biomarcadores que determinem a concentração do xenobiótico ou seu metabólito na amostra biológica, é importante que haja uma boa correlação da concentração obtida dos biomarcadores

com a efetiva exposição. Além disso, é de extrema importância entender as diferentes vias de absorção dessa substância, sua distribuição para os diferentes compartimentos do organismo, sua biotransformação e excreção, ou seja, a toxicocinética do xenobiótico precisa ser conhecida (Moreau e Siqueira, 2014; Terry *et al.*, 2016).

A Conferência Governamental Americana de Higienistas Industriais (ACGIH) estabelece valores de biomarcadores de exposição ou índices biológicos de exposição (IBEs), como limites de concentrações abaixo das quais os trabalhadores não teriam efeitos adversos à saúde. Os IBEs são estabelecidos para substâncias carcinogênicas e não carcinogênicas (Acgih, 1995). Vários países têm agências reguladoras que estabelecem valores de referência máximos permitidos biologicamente para os diferentes tipos de xenobióticos, seja pela sua quantificação direta ou através de metabólitos.

2.1.1 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e biomarcador 1-hidroxi pireno (1-OHP)

Após a sua absorção, a primeira fase de biotransformação dos HPAs envolve as enzimas do citocromo P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 e CYP3A4), através da formação de epóxidos reativos com propriedades mutagênicas e carcinogênicas e formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). A biotransformação destes metabólitos secundários é realizada por enzimas de fase II da classe das glutathione-S-transferases (GST), através da conjugação destes elementos com a glutathione, facilitando assim sua excreção (Fanou *et al.*, 2006)

Os efeitos adversos de HPAs, principalmente os relacionados à carcinogenicidade destes compostos, são bem estabelecidos. Sabe-se que esses efeitos são secundários à sua biotransformação, a qual leva a formação de derivados responsáveis por causar danos a macromoléculas (Ciarrocca *et al.*, 2014), fazendo com que os HPAs sejam reconhecidos pela IARC (Agência Internacional para Pesquisa em Câncer) como prováveis carcinógenos para humanos (Cancer, 2012).

O 1-OHP é o principal metabólito dos pirenos e é considerado o principal biomarcador para avaliar a exposição a HPAs, uma vez que o pireno está presente em altas concentrações em misturas de HPAs e há uma boa correlação entre os níveis externos de exposição e de excreção do 1-OHP na urina. Este biomarcador tem a

vantagem de fornecer uma quantificação integrada de várias vias de exposição (inalatória, dérmica ou digestiva). No entanto, ele apresenta como desvantagem a não distinção entre as diferentes fontes de exposição (Leroyer *et al.*, 2010; Ciarrocca *et al.*, 2014). O estudo de (Jongeneelen, 2014) apresenta como valor máximo recomendado a concentração de 1 μmol 1-OHP/mol de creatinina.

2.1.2 Poluentes ambientais

Os metais ocorrem naturalmente na crosta terrestre e sua distribuição no ambiente pode variar entre diferentes locais devido a propriedades dos metais e influência de fatores ambientais. Dos 92 elementos de ocorrência natural, aproximadamente 30 metais e metaloides são potencialmente tóxicos para os humanos e dentre eles estão o arsênio (As), cobre (Cu), níquel (Ni), mercúrio (Hg), chumbo (Pb), titânio (Ti) e vanádio (V) (Morais *et al.*, 2012).

Além das fontes naturais, diversas são as fontes de poluição ambiental de metais, mas como principais é possível citar as emissões industriais e do tráfego, bem como efluentes agrários através do uso de pesticidas. Estas emissões têm aumentado cada vez mais nos últimos anos devido às atividades antropogênicas (De Souza Araújo *et al.*, 2014; Gil *et al.*, 2016). Desta forma, a exposição humana a estes elementos ocorre pela inalação de poluentes ambientais que apresentam MP contendo metais adsorvidos em sua superfície, e através da ingestão de alimentos e água contaminados pelo uso indiscriminado de agrotóxicos (Nasreddine e Parent-Massin, 2002; Nordberg *et al.*, 2014).

2.1.2.1 Arsênio

O As é considerado um metaloide, pois possui características de metais e não metais, e a exposição à sua forma inorgânica através do consumo de alimentos contaminados, água e ar. A exposição crônica a baixas doses de As pode gerar inúmeras complicações denominadas “arsenicoses” (Abdul *et al.*, 2015).

A contaminação da água pode ocorrer pelo uso de agrotóxicos arsênicos, depósitos minerais naturais ou através do uso inapropriado de reagentes químicos contendo As (Jaishankar *et al.*, 2014). As fontes de poluição atmosférica de As são as mais diversas possíveis, podendo ser naturais (crosta terrestre, oceanos, queima de

florestas), como antropogênicas, através de emissões do tráfego e de indústrias metalúrgicas (Duan e Tan, 2013).

A IARC classifica o As como carcinogênico do grupo 1, pois há evidências de relação entre a exposição ao As inorgânico e o desenvolvimento de alguns tipos de câncer (pulmão, pele, bexiga e rins) (Organization, 2004). Um dos mecanismos por trás dos efeitos genotóxicos e carcinogênicos do As é o estresse oxidativo, onde espécies reativas são formadas durante sua biotransformação, e este metaloide é associado ao aumento do risco a diversos tipos de câncer (Faita *et al.*, 2013).

2.1.2.2 Chumbo

As fontes de exposição ambiental ao chumbo podem ser naturais ou antropogênicas, sendo que a última é a maior causa de acúmulo de Pb em humanos e está fortemente associada à poluição emitida por veículos automotores (Poręba *et al.*, 2011). Os humanos se contaminam com Pb normalmente através da alimentação, seguido pela exposição do ar e pela água e tendo a toxicidade em células vivas por mecanismo iônico e estresse oxidativo como consequência.

A exposição ocupacional ocorre principalmente em profissões desempenhadas no tráfego, postos de gasolina, oficinas e indústrias de tintas e baterias (Driscoll *et al.*, 2015). A IARC classifica o Pb como provável carcinógeno, e a exposição ocupacional ao metal também mostra associação com alguns tipos de câncer (Wynant *et al.*, 2013).

2.1.2.3 Cobalto

O metal de transição cobalto (Co) é obtido através da dieta em quantidades mínimas através de vegetais, carnes vermelhas, peixes e água e é um micronutriente essencial na formação da hidroxocobalamina (vitamina B12) em ruminantes. A vitamina B12, por sua vez, funciona como cofator enzimático em duas vias diferentes: na via da enzima metilmalonil-coenzima-A-mutase na formação da glicose, e na via da metionina sintase para síntese de metano, acetato e metionina (Al-Habsi *et al.*, 2007), sendo a B12 essencial para a produção de células vermelhas sanguíneas e para a manutenção do sistema nervoso (Sanjari *et al.*, 2014).

Por outro lado, o Co inorgânico não é necessário ao organismo, podendo o próprio metal e seus sais terem efeitos genotóxicos, principalmente através da produção de EROs e dano ao DNA combinados à inibição do reparo do DNA (Simonsen *et al.*, 2012).

2.1.2.4 Cobre

O cobre (Cu) tem ocorrência natural e é ubíquo no meio ambiente, sendo que os humanos são expostos a ele através da alimentação, água, solo e lixo contaminado. O Cu é essencial para o funcionamento e desenvolvimento normal do organismo e também é cofator para diversas enzimas, dentre elas a citocromo C oxidase e superóxido dismutase (SOD). Embora seja um elemento nutricionalmente necessário, quando em altos níveis pode ser tóxico e levar à dano hepático, uma vez que o fígado é o primeiro sítio de deposição de Cu após sua absorção (Gaetke e Chow, 2003; Reis *et al.*, 2015).

O excesso de Cu livre é muito mais comum na população humana do que a deficiência cúprica, principalmente devido à ingestão de Cu inorgânico presente em suplementos vitamínicos e minerais e aos encanamentos de cobre (Pal, 2014). Muitos são os mecanismos propostos para explicar a toxicidade celular do Cu, dentre eles está a participação de íons Cu livres na formação de EROs. Tanto os íons cúpricos quanto os cuprosos podem participar de reações de redução e oxidação. Agentes redutores como vitamina C ou glutathione reduzida (GSH) e também o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) podem reduzir o íon cúprico (Cu^{2+}) ao íon cuproso (Cu), formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que pode, por sua vez, ser decomposto a radicais hidroxilas (OH^{\cdot}) (Reação de Fenton) (Gaetke e Chow, 2003; Kalyanaraman, 2013).

2.1.2.5 Manganês

O manganês (Mn) é um elemento traço essencial para diversas funções fisiológicas como sistemas de transporte biológico, sendo a sua ingestão estritamente regulada pela sua excreção e a exposição ambiental a Mn é geralmente pequena. Portanto, é através da inalação de Mn em ambientes ocupacionais que a exposição excessiva normalmente ocorre, e esta exposição tem sido associada a efeitos neurotóxicos através de disfunções contínuas provocadas por este elemento (Aschner

et al., 2005; Pesch *et al.*, 2012). Acredita-se que os efeitos neurológicos relacionados à inalação de Mn acontecem pelo fato de que, após inalado, o metal é absorvido e atravessa a barreira hematoencefálica antes de ser eliminado do organismo, sendo então o Mn sanguíneo um bom biomarcador da exposição (Baker *et al.*, 2016).

2.1.2.6 Mercúrio

O mercúrio (Hg) é um metal tóxico para os seres humanos que se encontra extensivamente distribuído no ambiente, sendo considerando um dos maiores poluentes ambientais, pois é amplamente utilizado na indústria, agricultura e medicina (Park e Zheng, 2012). O Hg é também um poluente atmosférico emitido, principalmente, a partir de atividades de combustão, incineração e gaseificação (Pudasainee *et al.*, 2017).

Exposição ocupacional a vapores de Hg pode afetar o sistema imune e resultar no aumento de suscetibilidade a infecções, câncer ou desregulações imunes que podem favorecer o desenvolvimento de alergia ou autoimunidade, bem como aumentar o risco de doenças cardiovasculares (Park e Zheng, 2012; Eom *et al.*, 2014). A concentração total de Hg no cabelo é normalmente utilizada para avaliar a exposição ambiental ao metal (Abad *et al.*, 2016), enquanto amostras de urina são mais adequadas para avaliar a exposição crônica ao Hg inorgânico e o Hg sanguíneo reflete melhor as exposições recentes ao metilmercúrio oriundo da contaminação alimentar (Eom *et al.*, 2014).

2.1.2.7 Níquel

O níquel (Ni) é um elemento metálico que está naturalmente presente na crosta terrestre. Devido a propriedades físicas e químicas, o níquel metálico e seus compostos são amplamente utilizados na indústria moderna. O alto consumo de produtos contendo Ni leva, inevitavelmente, à poluição ambiental com seus subprodutos em todas as fases de produção, reciclagem e descarte. A exposição humana ao Ni ocorre principalmente por inalação e ingestão (Denkhaus e Salnikow, 2002).

A exposição ocupacional ao Ni se dá principalmente via inalação e a exposição crônica a baixas doses induz diversas doenças pulmonares com danos à cavidade e

mucosa nasais (Schaumlöffel, 2012). O Ni é reconhecidamente genotóxico, pois seu metabolismo envolve a formação de EROs, sendo capaz de afetar tanto a atividade antioxidante de enzimas celulares como também depletar os níveis de glutatona intracelular (Beyersmann e Hartwig, 2008; Ni *et al.*, 2014). Ademais, acredita-se que as predisposições genéticas, incluindo variações no metabolismo e capacidade antioxidante também podem desempenhar um papel importante na carcinogênese do Ni (Denkhaus e Salnikow, 2002).

2.1.2.8 Selênio

O selênio (Se) é um oligoelemento encontrado no solo, água, vegetais (alho, cebola, grãos e oleaginosas), alimentos marinhos e carne. O Se pode reduzir o risco de câncer através da estimulação de células do sistema imune, mas também por proteção contra os radicais livres. O papel protetivo do Se contra o dano oxidativo se dá pelo fato de que o elemento compõe o sítio ativo de várias enzimas antioxidantes, incluindo a GPx (Jaworska-Bieniek *et al.*, 2015).

Em baixas concentrações, o Se é antioxidante, anticarcinogênico e imunomodulador. O Se já mostrou ser preventivo em câncer de pulmão, de cólon e reto e de próstata. Humanos normalmente ingerem este oligoelemento através de produtos animais e vegetais e algumas vezes em alimentos funcionais ou suplementos (Hurst *et al.*, 2013).

2.1.2.9 Titânio

A principal de exposição ao titânio (Ti) não se dá em sua forma metálica, mas na forma de óxidos, como principal exemplo citam-se as partículas de TiO₂ (Vijayaraghavan *et al.*, 2012), muito usado em cosméticos e alimentos (Fage *et al.*, 2016). A inalação de partículas de TiO₂ causa toxicidade por mecanismos oxidativos e inflamatórios em ratos (Liu *et al.*, 2009), incluindo efeitos pró-oxidantes e depleção de antioxidantes (Afaq *et al.*, 1998), além de danos ao DNA e instabilidade genética (Trouiller *et al.*, 2009).

2.1.2.10 Vanádio

O vanádio (V) é considerado elemento essencial por ter funções no metabolismo da glicose e dos lipídios. Entretanto, sua concentração circulante precisa ser rigorosamente controlada para evitar efeitos tóxicos adversos (Srivastava, 2000). Compostos de vanádio usados em suplementação já foram associados a danos oxidativos ao DNA (Stemmler e Burrows, 2001). Além disso, esses compostos vanádicos já mostraram ter efeito pró e antitumorais, a depender da dose e do tipo de composto (Gruzewska *et al.*, 2014).

2.1.2.11 Zinco

O zinco (Zn) age como catalisador, coativo ou como unidade estrutural de algumas enzimas, além de ser cofator de metalo-enzimas. A deficiência de Zn pode afetar o crescimento, o desenvolvimento, a reprodução e o sistema imune, bem como a deficiência crônica de Zn pode aumentar a suscetibilidade ao estresse oxidativo (Tapiero e Tew, 2003). O Zn é capaz de proteger de forma indireta as estruturas celulares do dano oxidativo por participar da manutenção de metalotioneínas (que capturam e eliminam metais e radicais livres também), por ser um componente essencial da enzima SOD e por agir como um agente protetor de grupamento tiólicos (Bray e Bettger, 1990; Tapiero e Tew, 2003).

O elemento Zn por si só dificilmente causa toxicidade a humanos. Contudo, o desenvolvimento industrial e o crescente uso de nanomateriais têm exposto os humanos a nanopartículas de Zn, como o óxido de zinco (ZnO), utilizados em vários tipos de indústrias como as de tintas, cosméticos e produtos biomédicos (Huang *et al.*, 2015). O zinco atmosférico é emitido a partir de incineradores, veículos a motor e várias indústrias, e existe principalmente sob formas oxidadas, sendo o ZnO um exemplo (Nriagu e Coker, 1980). Estudos recentes têm mostrado que o processo inflamatório decorrente desta exposição a nanopartículas de Zn, inclusive no meio ocupacional, pode ser associado a problemas alérgicos e respiratórios (Adamson *et al.*, 2000; Ahsan *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2015).

2.2 Biomarcadores de efeito

A partir do biomonitoramento da exposição ocupacional e estudo de biomarcadores de efeito que indicam possíveis alterações decorrentes dessa exposição, pode-se tentar estabelecer uma relação dose-resposta dos diferentes tipos de xenobióticos estudados. A Figura 2 traz as principais matrizes biológicas utilizadas para o biomonitoramento da exposição ocupacional a HPAs e metais, bem como as principais alterações fisiológicas que podem ser observadas após tal exposição e que podem ser usadas como biomarcadores de efeito.

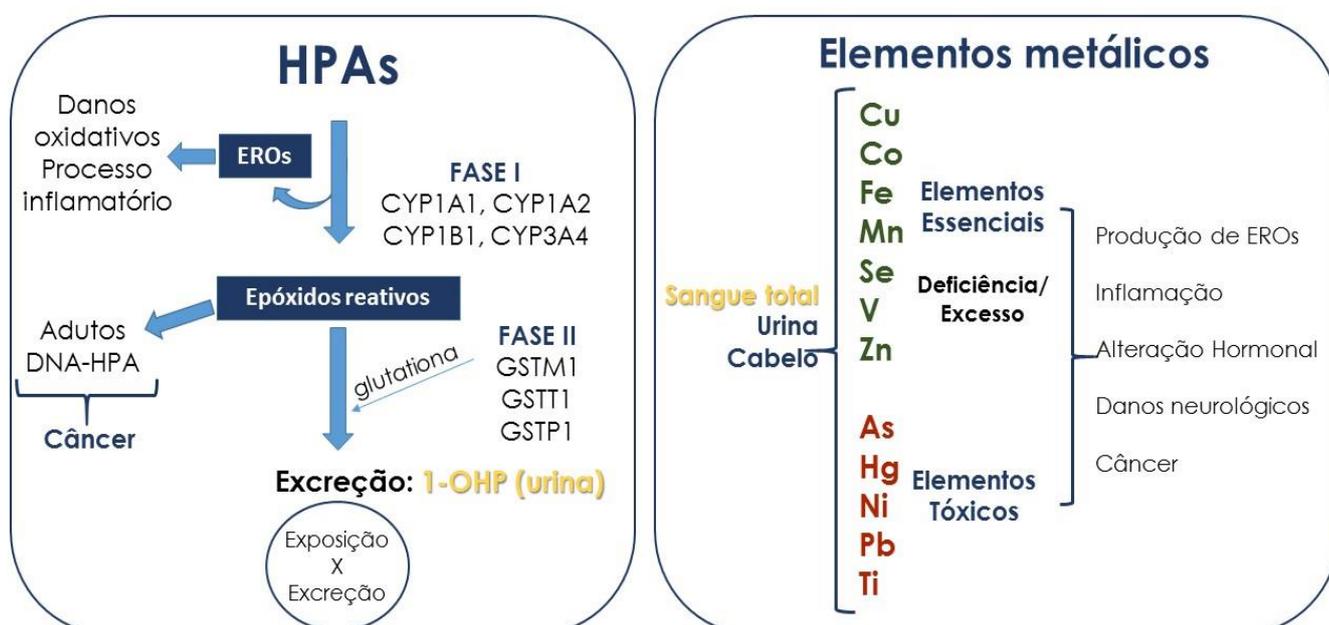


Figura 2. Exposição a HPAs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) e elementos metálicos: matrizes para biomonitoramento e potenciais efeitos deletérios.

2.2.1 Biomarcadores do estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (EROs) têm uma meia-vida muito curta e conseqüentemente não podem ser medidas precisamente de forma direta, desta forma costuma-se avaliar as substâncias por elas danificadas, as quais incluímos nos grupos de biomarcadores de efeito. Compostos endógenos celulares que neutralizam as EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) em excesso podem ser classificados como antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Pamplona e Costantini, 2011).

A principal função do citocromo P450 é a detoxificação de compostos exógenos em produtos menos tóxicos e, para isto, este conjunto de enzimas faz uso do oxigênio para oxidar estes compostos. Além disso, a citocromo P450 também realiza reações de hidroxilação para remover ou inativar compostos tóxicos do organismo. Durante estas reações de oxidação e hidroxilação, elétrons podem ser perdidos para moléculas de oxigênio, formando radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Valko *et al.*, 2004). Já a produção de radicais hidroxila ($OH^{\cdot-}$) próximo ao DNA facilita a reação deste radical com bases ou com a própria cadeia do DNA, o que causa danos às bases ou até mesmo quebras nas fitas de DNA. A maior parte da produção de radicais hidroxila *in vivo* ocorre pela quebra de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) catalisada por metais de transição (reação de Fenton) (Figura 3).

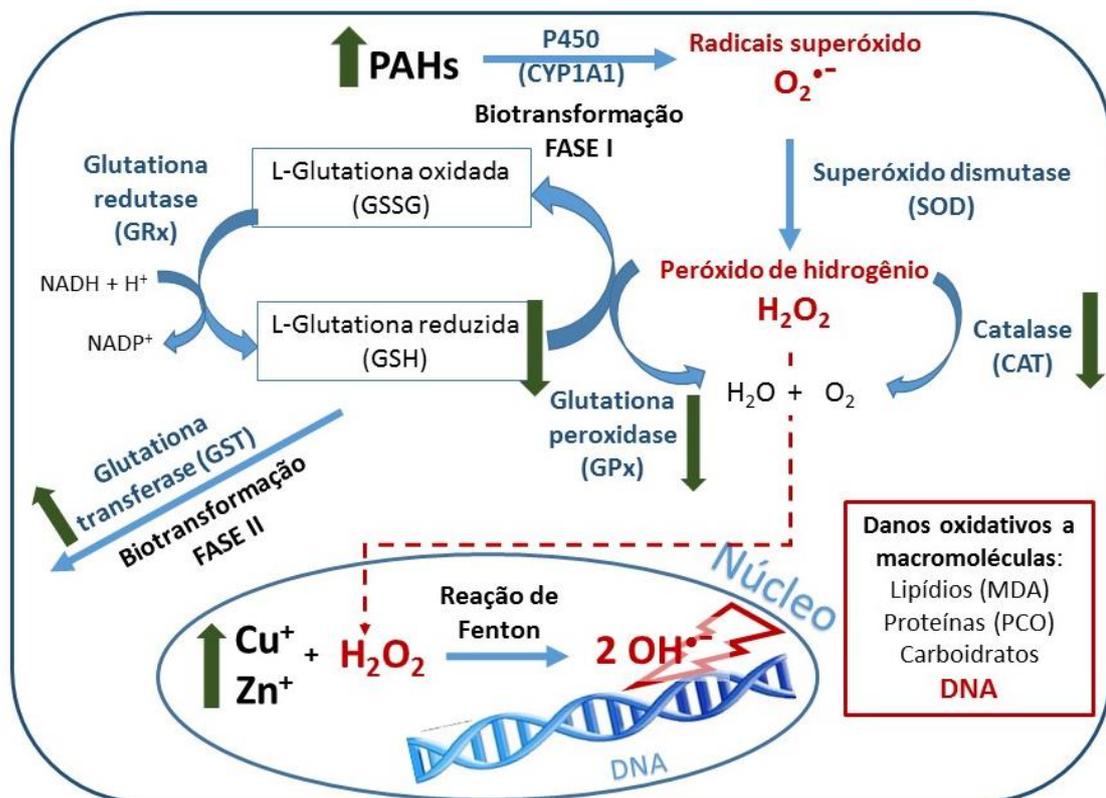


Figura 3. Esquema representativo da biotransformação de HPAs e metais, sua relação com sistema de defesa antioxidante endógeno e possíveis danos oxidativos ocasionados pelo desequilíbrio redox durante a exposição ocupacional (adaptado de Carochi e Ferreira (2013)).

2.2.1.1 Enzimas antioxidantes

Como enzimas antioxidantes podemos citar a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GRx) e glutaciona transferase (GST). A enzima SOD catalisa a redução do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) à peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que por sua vez é convertido em água e oxigênio pelas enzimas CAT ou GPx. A enzima GPx é dependente de Se, e reduz o peróxido de hidrogênio através da oxidação da glutaciona reduzida (GSH) em glutaciona oxidada (GSSG). A GRx, por sua vez, regenera a GSH a partir da GSSG, utilizando NADPH como agente redutor. A GPx também reduz hidroperóxidos lipídicos e não lipídicos enquanto oxida a GSH (Rocha *et al.*, 2012).

2.2.1.2 Antioxidantes não enzimáticos

Os antioxidantes não enzimáticos são divididos entre endógenos (ou metabólicos) e exógenos (ou nutrientes). Os antioxidantes endógenos GSH, L-arginina, coenzima Q10, melatonina, ácido úrico, bilirrubina e proteínas quelantes de metais são produzidos pelo metabolismo. Ao passo que os antioxidantes exógenos como vitamina E, C e A, licopeno, beta caroteno, oligoelementos (Se, Mn e Zn), flavonoides e ômega 3 e 6 são compostos que não são produzidos pelo metabolismo e por isso precisam ser adquiridos através da alimentação ou suplementação.

2.2.1.2.1 Antioxidante não enzimático endógeno

Glutaciona é um tripeptídeo formado por ácido glutâmico, cisteína e glicina. Ela pode existir em duas formas: oxidada (GSSG), apenas 1%, ou reduzida (GSH). A GSH é um antioxidante tiólico endógeno não-enzimático que fornece proteção contra o estresse oxidativo no organismo, através da doação de átomos de hidrogênio de seus grupos tiólicos para reduzir os radicais livres, tornando-os menos reativos. Nos eritrócitos, mais de 90% dos grupamentos tiólicos existentes são representados pela GSH (Raftos *et al.*, 2010).

2.2.1.2.2 Antioxidantes não enzimáticos exógenos

A vitamina E é uma vitamina lipossolúvel com alto potencial antioxidante, sendo o α -tocoferol o seu estereoisômero mais bioativo. Devido à sua lipossolubilidade, o α -tocoferol protege as membranas da peroxidação lipídica causada por EROs. Embora a vitamina E tenha sido proposta na prevenção de alguns tipos de câncer e doenças cardiovasculares, alguns estudos a apontam como fator de risco (Kong, 2013).

A vitamina C ou ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel essencial para o colágeno, carnitina e biossíntese de neurotransmissores, sendo benéfica como antioxidante, anti-aterogênica, anti-carcinogênica e imunomoduladora. Esta vitamina já foi relatada como prevenção a diversos tipos de câncer (Naidu, 2003).

O betacaroteno (β -caroteno) é o membro lipossolúvel dos carotenoides, sendo considerado uma pró-vitamina, uma vez que pode ser convertido em vitamina A ativa. O β -caroteno é convertido à retinol, que é essencial para visão. Apesar de ser um forte antioxidante e o melhor quelante de oxigênio singlete, a suplementação com β -caroteno já foi associada ao aumento do risco de câncer de pulmão e próstata, bem como ao aumento da mortalidade em doenças cardiovasculares (Silalahi, 2002; Druesne-Pecollo *et al.*, 2010).

O licopeno é outro tipo de carotenoide, e apresenta propriedades antioxidantes e antiproliferativas, embora sua ação anticâncer em humanos ainda é controversa. No entanto, o licopeno já se mostrou ser muito protetivo contra câncer de próstata (Gann *et al.*, 1999).

O retinol é a forma mais ativa da vitamina A, sendo vital para funções biológicas como visão, crescimento ósseo, reprodução, divisão e diferenciação celular. Embora seja essencial ao organismo, há estudos que mostram a conexão de vitamina A com a suscetibilidade à carcinogênese (Mishra e Kim, 2012).

Uma dieta rica em nutrientes, com uma ingestão adequada de alimentos fontes de vitaminas como frutas, oleaginosas, verduras, carnes, é uma forma natural e saudável de obtê-las. As vitaminas não funcionam como elementos estruturais no organismo, tampouco seu metabolismo fornece energia significativa, mas são imprescindíveis para a manutenção de funções vitais através da sua capacidade antioxidante, exercendo papel de cofatores enzimáticos e passando pelo funcionamento dos mais diversos sistemas (imune, endócrino, nervoso), e até mesmo protegendo contra o câncer (Combs Jr e McClung, 2016).

2.2.1.3 Quantificação de macrocomponentes oxidados

Macromoléculas, incluindo lipídios e proteínas, são alvos de radicais livres, que as atacam prejudicando o seu funcionamento normal. O malondialdeído (MDA) é um produto que pode ser excessivamente formado após a peroxidação lipídica mediada por EROs, resultando em dano às membranas celulares. Além disso, muitas das modificações oxidativas de proteínas envolve algum tipo de carbonilação, o que pode resultar na perda irreversível da função proteica. A quantificação de proteínas carboniladas (PCO) pode ser usada como avaliação do estresse oxidativo sobre proteínas. Da mesma forma, modificações redox em resíduos de tirosina por peroxinitrito e outras ERNs à 3-nitrotirosina, podem levar à disfunção de vias de sinalização celular, mudanças em atividades enzimáticas e estresse nitrosativo (Delfino *et al.*, 2011).

A enzima delta-aminolevulinato desidratase (ALA-D) é uma metalo-enzima que utiliza o zinco como cofator para catalisar a síntese de compostos tetrapirrólicos como o heme e a sua inibição leva ao acúmulo do seu substrato, o ácido delta-aminolevulínico (ALA) que acentua a produção de espécies reativas (Sauer *et al.*, 2014). A ALA-D é utilizada como marcador de estresse oxidativo pois seus grupamentos tiólicos (-SH) são vulneráveis à oxidação ou ligação reversível a metais e também à elementos pró-oxidantes, tendo como consequência a inibição da sua atividade enzimática (Rocha *et al.*, 2012). Assim sendo, a inibição da atividade da ALA-D por agentes tóxicos ou condições patológicas associadas ao estresse oxidativo pode criar um ciclo pró-oxidante vicioso, onde a inibição da ALA-D e o acúmulo de seu metabólito tóxico ALA irá aumentar ainda mais a produção de EROs.

2.2.2 Biomarcadores de inflamação

2.2.2.1 Moléculas de adesão

Moléculas de adesão são glicoproteicas transmembranares ou ligadas à superfície que realizam a ligação entre células, ou de células com algum substrato. São expressas em leucócitos e células endoteliais, estão envolvidas em processos de recrutamento de leucócitos para sítios de inflamação e na transmigração endotelial dos mesmos para uma ação sítio-específica tecidual. Este processo de transmigração

envolve basicamente 3 fases: primeiro os leucócitos são atraídos (ancoragem) e se deslocam (por rolamento) até o sítio de inflamação, logo após as integrinas são ativadas para, por fim, aumentarem a adesão dos leucócitos ao endotélio e facilitar sua transmigração. As principais classes são as moléculas de adesão intercelulares, integrinas, selectinas e caderinas (Ala *et al.*, 2003).

A molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) é a principal molécula expressa em células endoteliais vasculares e em alguns linfócitos e monócitos, sendo reconhecida principalmente por monócitos (Hubbard e Rothlein, 2000; Li *et al.*, 2011). Esta molécula de adesão participa do tráfego de células inflamatórias, na função de leucócitos, na adesão de células apresentadoras de antígenos a linfócitos T, em patogenias microbianas e em vias de sinalização através da transdução celular de sinais externos e internos. O aumento da expressão de ICAM-1 em vários tipos celulares tem sido atribuído a estimulação por citocinas inflamatórias e espécies oxidantes (Hubbard e Rothlein, 2000; Elmarakby e Sullivan, 2012).

A CD18 faz parte da família das beta-2-integrinas (β 2-integrinas) e são expressas exclusivamente em leucócitos. Tem a capacidade de se ligar em moléculas de adesão intercelulares (ICAMs), favorecendo a adesão de leucócitos ao endotélio e permitindo o seu extravasamento para outros sítios (Tan, 2012).

Selectinas são moléculas de adesão vasculares envolvidas em interações de aderência de leucócitos e plaquetas ao endotélio. A família das selectinas é composta por 3 membros: E, L e P-selectina (Bendas e Borsig, 2012). A L-selectina (CD62-L) é expressa na maioria das células B, células T virgens, neutrófilos, monócitos e eosinófilos e contribui para a captura de leucócitos nas fases iniciais da cascata de adesão (Ala *et al.*, 2003). P-selectina ou CD62-P é uma molécula de adesão expressa na superfície de células endoteliais e de plaquetas ativadas que exerce um importante papel na inflamação através do recrutamento de leucócitos para locais danificados. Assim sendo, a captura de leucócitos é mediada pela CD62-P plaquetária e a estabilização da adesão é realizada por β 2-integrinas leucocitárias (Ed Rainger *et al.*, 2015). Além disso, a ativação de plaquetas e consequente produção de CD62-P induz a ativação e propagação do sistema complemento (Lam *et al.*, 2015).

As moléculas de adesão são substâncias-chave para o funcionamento normal do sistema imunológico por mobilizarem células imunes para solucionar algum problema através do processo inflamatório. Entretanto, a cronicidade desta inflamação

pode favorecer o surgimento de doenças crônicas inflamatórias, como aterosclerose ou problemas respiratórios (Schaefer *et al.*, 2014). Além disso, a ação de integrinas e selectinas pode facilitar a adesão, extravasamento e metastização de tumores por facilitar a interação entre células tumorais e as células endoteliais em tecidos distantes (Bendas e Borsig, 2012).

2.2.2.2 Quimiocinas

A proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP1) é membro da família de quimiocinas CC e está relacionada à ativação de monócitos, macrófagos e linfócitos, sinalizando principalmente o recrutamento de monócitos para que eles executem suas funções contra agentes estranhos em sítios de inflamação (Mukaida *et al.*, 1998).

A presença das células certas, no local e no tempo certo é essencial para permitir as interações esperadas entre os diferentes subtipos de leucócitos e entre leucócitos e patógenos, resultando na funcionalidade apropriada do sistema imune. Desta forma, os níveis de MCP1 circulantes são importantes para a função imune, mas, por outro lado, hiperativação do sistema imune com maiores liberações de MCP1 ou a persistência contínua desta proteína circulante, pode resultar em respostas autoimunes e alérgicas (Lin *et al.*, 2014). A expressão de MCP1 também é regulada em nível transcricional pelo NF-Kb (Maciel *et al.*, 2016).

A interleucina 8 (IL-8) é membro da família de quimiocinas CXC, sendo produzida por vários tipos celulares como macrófagos e células endoteliais, e funciona como mediador da resposta inflamatória através de propriedades quimioatrativas para neutrófilos. Além disso, a IL-8 estimula a transmigração de neutrófilos, através da liberação de L-selectina (CD62-L) (Mukaida *et al.*, 1998). Devido às suas propriedades pró-inflamatórias e sua capacidade de promover o crescimento e angiogênese de tumores, a IL-8 é extremamente controlada e apresenta baixos níveis de expressão em tecidos normais, sendo a sua expressão induzida principalmente pelo fator NF-kB (Sanmamed *et al.*, 2014). Já a interleucina 10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória produzida principalmente por monócitos que age em processos imunorregulatórios e de inflamação (Wang, S. *et al.*, 2016).

2.2.2.3. Proteína C Reativa

A proteína C reativa (PCR) é uma proteína de fase aguda encontrada no sangue que se liga à fosfocolina expressa na superfície de células danificadas para ativar o sistema complemento durante o processo inflamatório. A PCR é o biomarcador mais extensivamente estudado em associação com a poluição do ar (Elvidge *et al.*, 2013).

2.2.3 Biomarcadores do sistema imune

O sistema imune envolve um complexo de processos bioquímicos e permite a detecção de patógenos que ameaçam a saúde do hospedeiro. O processo imune é tradicionalmente dividido em dois subsistemas baseando-se em suas funções de defesa. O sistema imune adaptativo é organizado nas classes de linfócitos B e T, que exercem um vasto repertório de reconhecimento de receptores antígenos-específicos e realizam a identificação específica para eliminação de patógenos, bem como medidas imunes adaptativas que garantem resposta imune adaptada, além de memória imunológica de longa duração contra reinfecções. Por outro lado, o sistema imune inato é composto por agentes imunológicos que executam respostas robustas, imediatas e não específicas, dentre os quais estão inclusos processos humorais, celulares e mecânicos primitivos que, da mesma forma, tem um papel essencial na proteção do hospedeiro contra alterações patogênicas (Dunkelberger e Song, 2010; Abbas *et al.*, 2014).

2.2.3.1 Sistema complemento

O sistema complemento apresenta várias funções, sendo as funções de opsonização, quimiotaxia e lise as mais bem documentadas (Lubbers *et al.*, 2017). Trata-se de uma cascata de proteínas com bases na defesa imune inata, mas com amplos efeitos que atingem a imunidade adaptativa. O sistema complemento marca alvos para destruição e remoção, e desempenha não apenas um papel no combate de micróbios invasores, mas também na manutenção da homeostase, por exemplo,

através da depuração controlada de células mortas e em processo de apoptose (Verschoor e Langer, 2013).

As funções do sistema complemento vão além da robusta resposta imune inata, pois também realiza a interface dela com a resposta adaptativa de linfócitos T e B (Dunkelberger e Song, 2010). Além disso, o complemento participa de diversos processos como maturação de sinapses, remoção de complexos imunes, mobilização de células-tronco hematopoiéticas, angiogênese, regeneração de tecidos e metabolismo de lipídios (Ricklin *et al.*, 2010).

Células polimorfonucleares (neutrófilos) são os leucócitos mais abundantes que são capazes de secretar e ativar o C3 em sítios inflamatórios, bem como apresentam receptores em sua superfície para vários tipos de proteínas do complemento, dentre elas C3 e C4. Os monócitos são precursores de macrófagos teciduais e células dendríticas e são capazes de produzir quase a totalidade das proteínas do complemento, participando assim de várias vias (Lubbers *et al.*, 2017).

O sistema complemento é estritamente controlado em condições fisiológicas normais para manter o balanço homeostático, pois assim como o complemento age para lesar microrganismos ou células anormais, ele também pode lesar tecidos do hospedeiro através da formação de potentes moléculas pró-inflamatórias, como quimiocinas (Wagner e Frank, 2010). Além de agir sobre a resposta imune, os efeitos inflamatórios do sistema complemento podem ter ação sobre complicações cardiovasculares de diabetes e doenças metabólicas relacionadas (Hertle *et al.*, 2012), bem como contribuir para o desenvolvimento de tumores através de cascatas de sinalização para produção de fatores do crescimento, angiogênese, invasão celular e proteção contra imunidade antitumoral e apoptose (Rutkowski *et al.*, 2010).

A Figura 4 traz um breve esquema da interação entre os diferentes biomarcadores de inflamação para a ativação do sistema imune contra agentes estressores, como a poluição atmosférica.

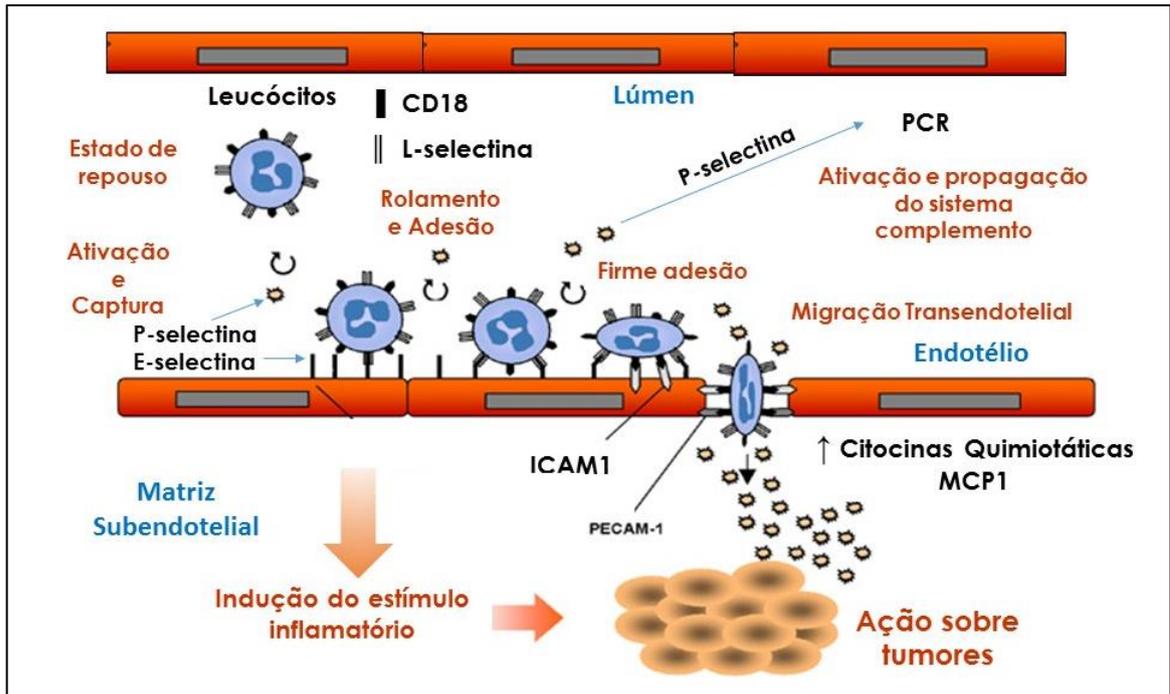


Figura 4. Interação entre biomarcadores inflamatórios durante a ativação do sistema imune na resposta inflamatória aguda (adaptado de Pazos e Nader (2007)).

2.2.3.2 Imunoglobulinas

Imunoglobulinas são glicoproteínas produzidas pelos plasmócitos em resposta a um imunógeno (antígeno) e que funcionam como anticorpos. Medeiam uma variedade de funções efetoras, como a fixação ao complemento para lise de células e liberação de moléculas biologicamente ativas, além da ligação a vários tipos celulares (células fagocitárias, linfócitos, plaquetas, entre outros) para ativá-los a exercer algumas funções.

Zhao e colaboradores (2013) mostraram que a exposição de policiais de trânsito à poluição aumentou os níveis de IgG, IgM e IgE, mas diminuiu os níveis de IgA, demonstrando mais um grupo de risco ocupacional que pode sofrer respostas inflamatórias ou danos ao sistema imune. Níveis aumentados de IgE são encontrados em pacientes com asma. A interação de IgE com o antígeno leva a reações de hipersensibilidade do tipo I que inclui degranulação de mastócitos e liberação de mediadores vasoativos como histamina e leucotrienos (Peters *et al.*, 2016).

2.2.4 Biomarcadores de hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, hematotoxicidade e genotoxicidade

As enzimas hepáticas transaminase glutâmico oxalacética (TGO), transaminase glutâmico pirúvica (TGP) e gama-glutamilttransferase (GGT) refletem a homeostase do fígado e as suas quantificações no soro refletem dano hepático que ocasiona a liberação destas enzimas para a circulação. Entretanto, tais enzimas são inespecíficas, pois não indicam a causa exata da injúria e são mais adequadas no diagnóstico de doenças hepatocelulares agudas, não tendo expressiva aplicabilidade em diagnósticos de doenças ocupacionais (Hyder *et al.*, 2013).

Alguns parâmetros de nefrotoxicidade, como a creatinina sérica, são parâmetros tardios para detecção do dano renal, desta forma, o uso de marcadores sensíveis de dano tubular ou glomerular são capazes de detectar alterações na função renal mais precocemente (Damman *et al.*, 2011). A N-Acetil- β -D-glucosaminidase (NAG) é uma enzima lisossômica cuja presença é distribuída ao longo de todo o néfron, mas tem sua atividade concentrada nos túbulos proximais. Devido ao seu elevado peso molecular, esta enzima não é filtrada nos glomérulos, sendo eliminada na urina. Portanto, a observação de maior atividade desta enzima na urina é indício de lesão em células tubulares. Desta forma, a NAG é útil como um marcador urinário específico para dano tubular renal (Peres *et al.*, 2013; Spasovski, 2013). A microalbuminúria, por sua vez, é a primeira manifestação quando há dano na barreira de filtração glomerular, pois, na presença de lesão, a albumina deixa de ser reabsorvida e extravasa dos glomérulos para a urina (Sandhu *et al.*, 2016).

O hemograma é composto por três determinações básicas que incluem as avaliações dos eritrócitos (série vermelha), dos leucócitos (série branca) e das plaquetas (série plaquetária). A análise da série vermelha fornece subsídios para o diagnóstico das principais causas de anemias. Análise da série branca avalia as contagens total e diferencial (valores relativo e absoluto) dos leucócitos, bem como a morfologia dos neutrófilos, linfócitos e monócitos, principalmente. As leucocitoses (aumento do número de leucócitos) podem ter origens naturais, infecciosas (bactérias) ou patológicas (leucemias), ao passo que leucopenia (redução de leucócitos) pode ser de causas fisiológica ou induzida por drogas e poluentes, reativa e processos imunológicos (Cheze e Leporrier, 2003; Naoum e Naoum, 2008).

As plaquetas também têm ação sobre mecanismos inflamatórios como alergias (liberação de histamina ativa plaquetas) e em processos ateroscleróticos, participando de eventos trombóticos e também da liberação de moléculas de adesão para o recrutamento de leucócitos para sítios de inflamação, o que pode favorecer a formação de placas ateroscleróticas (Lam *et al.*, 2015).

Vários biomarcadores são usados para avaliar a genotoxicidade da exposição a misturas complexas de agentes tóxicos, sendo mais comuns o ensaio cometa, a frequência de micronúcleos (MN), aberrações cromossômicas (AC) e as trocas entre cromátides-irmãs (Da Silva, 2016). O ensaio cometa por eletroforese já se mostrou ser um método muito sensível para detectar danos ao DNA no biomonitoramento humano, pois detecta quebras nas cadeias e sítios álcali-lábeis no DNA, além de *crosslinking* e reparo por excisão de bases incompleto (Collins, 2004; Cassini *et al.*, 2011). Os micronúcleos se originam de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que ficam externos ao núcleo da célula-filha durante a divisão nuclear. O aumento da frequência de MN revela efeitos de danos irreversíveis que podem levar à mutagenicidade, podendo então prever o risco de câncer (Bonassi *et al.*, 2011).

2.2.5 Alterações em nível transcricional – Expressão gênica

2.2.5.1 Proteína supressora tumoral (p53)

A proteína p53 é um regulador transcricional que suprime a oncogênese em resposta a uma variedade de estímulos que incluem danos ao DNA, reações oxidativas, hipóxia, comprometimento energético e sinalização oncogênica. O p53 age como fator de transcrição de um conjunto diversificado de genes que promovem apoptose, interrupção do ciclo celular e fosforilação oxidativa, suprimem a glicólise aeróbia, o crescimento celular e modulam a síntese de proteínas (Wei *et al.*, 2006; Hasty *et al.*, 2016).

Além disso, o p53 tem atividades que são distintas da transcrição, como a regulação do processamento de microRNAs, reparo do DNA, função mitocondrial e biogênese de ribossomos. Assim, p53 é uma proteína multifuncional que responde a uma gama diversa de ações estressoras, agindo principalmente como um supressor tumoral, por inibir o crescimento de células danificadas dirigindo-as à morte por

apoptose e impedindo assim que mutações malignas se propaguem com a divisão destas células (Pulice, 2014; Hasty *et al.*, 2016). A perda de função do p53, seja através de mutações no próprio p53, perturbações nas vias de sinalização ou por supressão da expressão do gene p53, é uma característica comum na maioria dos tipos de câncer humanos (Muller e Vousden, 2013).

2.2.5.2 Heme oxigenase-1

A heme oxigenase-1 (HMOX-1) é conhecida como a proteína do estresse que pode ter efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios. A expressão da HMOX-1 exerce funções citoprotetivas, antioxidantes, antiapoptóticas, anti-inflamatórias e possivelmente imunomodulatórias em células vasculares, muitas das quais exercem proteção contra aterogênese (Araujo *et al.*, 2012). Além disso, catalisa o passo de limitação da taxa de metabolismo do grupamento heme pró-oxidante à monóxido de carbono, biliverdina e ferro livre (Otterbein *et al.*, 2003).

A indução da expressão da HMOX-1 ocorre através da via do fator de transcrição NF-κB em processos oxidativos ou inflamatórios (Kim e Vaziri, 2010). De fato, a HMOX-1 já mostrou ter efeitos protetivos ao estresse ocasionado pela exposição de células a poluentes químicos ambientais (Lawal *et al.*, 2015). Evidências experimentais têm mostrado o envolvimento da HMOX-1 na biologia celular do câncer (Tsai *et al.*, 2012). De um lado, a HMOX-1 protege as células saudáveis da transformação à células neoplásicas por contrabalanço da carcinogênese mediada por EROs e, por outro lado, ela também pode proteger células malignas, aumentando à sua sobrevivência e sua resistência ao tratamento do câncer (Jozkowicz *et al.*, 2007).

2.2.5.3 8-oxoguanina-glicosilase-1

A 8-oxoguanina-glicosilase-1 (OGG1) é a enzima responsável pela excisão da 7,8-di-hidro-8-oxoguanina (8-oxoG), uma das lesões mais importantes, extremamente mutagênica, produzida no DNA por agentes formadores de radicais de oxigênio (Boiteux e Radicella, 2000; Janssen *et al.*, 2001). Polimorfismos no gene desta enzima, por afetarem sua atividade de reparo, já foram demonstrados de aumentar a

mutagenicidade e o risco de desenvolvimento de certos tipos de câncer, principalmente de pulmão (Le Marchand *et al.*, 2002; Kohno *et al.*, 2006).

2.2.5.4 CD26

A exoprotease dipeptidil peptidase IV ou CD26 é uma glicoproteína transmembrana, cujo domínio extracelular apresenta atividade enzimática para clivar dipeptídeos N-terminais. Sendo assim, muitas proteínas regulatórias como citocinas, quimiocinas, integrinas e neuropeptídeos são clivados por ela, fazendo com que ela atue em diversos processos fisiológicos como migração, adesão, invasão, apoptose e imunomodulação (Beckenkamp *et al.*, 2016).

A ação da CD26 no sistema imune é uma combinação da sua atividade enzimática e sua interação com diferentes moléculas. A diminuição da expressão do CD26 e consequente perda da sua atividade enzimática permite a acumulação de quimiocinas que irão interagir com seus receptores e consequentemente ativar outras moléculas de sinalização (Mortier *et al.*, 2016).

2.3 Biomarcadores de suscetibilidade

Variantes genômicas são normalmente representadas como polimorfismo de um único nucleotídeo (SNPs), sendo estimados cerca de 10 milhões de SNPs no genoma humano (Gibbs *et al.*, 2003). Os SNPs são mudanças de uma única base no genoma presentes em mais de 1% da população. Os SNPs podem ou não resultar na mudança de um aminoácido (sinônimo ou não-sinônimo), e podem afetar direta ou indiretamente a expressão gênica e fenótipo de um indivíduo. SNPs sinônimos em regiões de íntrons ou éxons podem afetar a fita simples de DNA durante a replicação, a estabilidade do DNA e de ligação de fatores de transcrição, eficiência da DNA polimerase e montagem dos nucleossomos.

Os SNPs definem o genótipo em heterozigoto ou homozigoto quando o SNP está presente em um ou ambos alelos, sendo o alelo ancestral chamado de alelo selvagem (Multani e Saranath, 2016). Essa troca de pares de bases pode, por exemplo, resultar no aumento e diminuição da atividade de enzimas envolvidas nas diferentes fases dos processos de metabolização de xenobióticos ou ainda de

enzimas que reparam possíveis lesões no organismo, afetando assim a suscetibilidade individual frente a diferentes exposições.

O metabolismo de HPAs a compostos mais hidrofílicos tem como objetivo facilitar sua excreção. A principal via de biotransformação ocorre em dois passos: primeiro ocorre a funcionalização por enzimas de fase I do metabolismo como as do citocromo p450, seguido por conjugação com glicuronídeo, glutatona ou outras frações por enzimas de fase II. Na primeira fase, os HPAs são metabolizados e formam fenóis, dihidrodiois, quinonas e enântiômeros diol-epóxido que tem a capacidade se ligar ao DNA a formar adutos HPA-DNA. Já na segunda fase, a conjugação com compostos hidrofílicos diminui a toxicidade e facilita a excreção (Marinković *et al.*, 2013). Sendo assim, um polimorfismo que afete a atividade de algumas destas enzimas envolvidas no metabolismo, pode levar ao acúmulo do próprio xenobiótico ou de seus metabólitos ativos tóxicos no organismo, podendo então aumentar ou diminuir a sensibilidade do organismo a processos inflamatórios e carcinogênicos.

O SNP da CYP1A1 2455 A>G (m2) (rs1048943) resulta na substituição de uma isoleucina na posição 462 por uma valina (Ile462Val). Essa troca de aminoácidos na enzima resulta no aumento da sua atividade e assim a formação de mais moléculas ativas tóxicas. Este polimorfismo tem sido extensivamente estudado e relacionado a diversos tipos de câncer, entretanto, frequência do alelo mutado na população caucasiana é baixa e as consequências deste SNP ainda são ambíguas e necessitam mais estudos (Gil *et al.*, 2014).

Já as enzimas GSTM1 e GSTT1 apresentam normalmente polimorfismos de deleção. A deleção total desses genes é consequência da ausência absoluta de ambos alelos, resultando em déficit parcial ou total da atividade enzimática. Heterozigotos com apenas um alelo nulo normalmente apresentam apenas reduzida atividade de GSTM1 e GSTT1 (Bagryantseva *et al.*, 2010; Marinković *et al.*, 2013).

As EROs podem ocasionar a formação de 7,8-diidro-8-oxoguanina (8-oxo-G) e consequentes sítios apurínicos/apirimidínicos (AP) e quebras de fitas simples do DNA. Essas lesões são revertidas pela via de reparo de excisão de bases (BER), onde a 8-oxoguanina-glicosilase-1 (OGG1) é quem remove a 8-oxo-G do DNA e a redução na excisão desses erros do DNA pode levar à mutações pelo acúmulo de lesões oxidativas (Zienolddiny e Skaug, 2012). Já foi demonstrado que o SNP da OGG1

Ser326Cys (rs1052133) reduz as taxas de reparo em indivíduos expostos à poluição portadores de pelo menos um alelo mutado se mostraram mais suscetíveis a acumular mutações sob condições de estresse oxidativo (Goode *et al.*, 2002; Bravard *et al.*, 2009; Bagryantseva *et al.*, 2010).

3. Fator nuclear kappa B e sua ação em processos oxidativos e inflamatórios

O fator nuclear kappa B (NF-κB) é nitidamente um dos mais importantes reguladores da expressão gênica pró-inflamatória (Tak e Firestein, 2001). O NF-κB é mantido inativo no citoplasma através da associação com a proteína inibitória IκB. Os estímulos de citocinas pró-inflamatórias como o fator de transcrição nuclear alfa (TNF-α), interferon gama (IFN-γ), interleucina-1-beta (IL-1β), através de diferentes vias de sinalização, convergem na ativação de uma quinase IκB (IKK). A molécula IκB fosforilada pela enzima IKK sofre ubiquitinação, deixando-a marcada para ser degradada pelo proteassomo. Assim, o fator de transcrição NF-κB fica livre para ser deslocado até o núcleo e se ligar no DNA nos seus respectivos sítios de ativação gênica (Lawrence *et al.*, 2001).

A ativação do NF-κB aumenta a expressão de moléculas de adesão como selectinas, VCAM-1 e ICAM-1, enquanto que sua inibição reduz a migração e adesão de leucócitos (Chen *et al.*, 1995). Wang, J.-S. e colaboradores (2016) em um estudo recente, verificaram *in vitro* que a exposição a poluentes atmosféricos estimula a liberação de moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1 e selectinas) bem como da citocina MCP1. Adicionalmente, Lee e colaboradores (2012) confirmaram que a expressão induzida de ICAM-1 se dá através da ativação do NF-κB.

4. Exposição a HPAs e metais e sua relação com o câncer

Segundo a OMS, HPAs (benzo(a)pireno) e metais (arsênio, níquel e cromo) estão relacionados com alguns tipos de câncer ocupacionais, como de pulmão, pele e bexiga, mesotelioma e leucemia (Boyle e Levin, 2008). Uma vez que EROs e os produtos de peroxidação lipídica são potenciais substratos para GSTT1 ou M1, a extensão dos danos no DNA e o conseqüente risco de câncer podem ser afetados por CYP e enzimas GST polimórficos (Bartsch *et al.*, 2000). A exposição ocupacional a

HPAs é um fator de risco para o desenvolvimento de câncer urotelial de bexiga e evidências crescentes confirmam a influência de predisposição genética (Kiriluk *et al.*, 2012). Polimorfismos em enzimas do citocromo P450 também aumentam a suscetibilidade a câncer em fumantes (Bartsch *et al.*, 2000).

As diferenças na atividade de enzimas metabólicas em virtude de polimorfismos podem influenciar suscetibilidade individual à exposição a xenobióticos. Desta forma, o somatório de efeitos oxidativos e inflamatórios decorrentes da exposição ocupacional pode surtir efeitos diferentes entre os trabalhadores, levando à maior ou menor risco de desenvolver efeitos genotóxicos e mutagênicos que podem ter o câncer como consequência (Chen *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 2014).

A Figura 5 traz um breve resumo dos principais fatores envolvidos no desenvolvimento de câncer, muitos dos quais podem ser exacerbados pela exposição ocupacional à poluição atmosférica.



Figura 5. Fatores que influenciam na suscetibilidade ao câncer (adaptado de Abdul e colaboradores (2015)).

5. Estresse Oxidativo, Inflamação e Câncer

As células buscam manter um equilíbrio redox, condição ideal para os processos celulares como diferenciação e proliferação, permitindo adaptação ao

metabolismo e estresse imune. Em condições fisiológicas, EROs são continuamente geradas por produtores de EROs e eliminados através de sistemas antioxidantes a fim de manter o equilíbrio redox. Além disso, EROs agem como mensageiros secundários na sinalização celular e são necessários para vários processos biológicos em células normais (Mittler, 2017). Alterações neste equilíbrio, podem levar tanto ao aumento nos níveis de EROs, resultando em dano celular, estresse oxidativo e sinalização celular aberrante, ou até mesmo à diminuição de EROs, levando ao distúrbio da sinalização celular e consequente ruptura da homeostase celular (Glasauer e Chandel, 2014).

O desequilíbrio redox e o estresse oxidativo são características de muitos tipos de câncer. EROs podem causar mutações ao DNA, ativar oncogenes e inativar genes supressores tumorais, além de contribuir com a iniciação, promoção e progressão de câncer, através de vias que regulam a proliferação, sobrevivência, angiogênese e metástase (Angelé-Martínez *et al.*, 2014). Entretanto, níveis exacerbados de EROs em células cancerígenas também podem induzir sinalização de morte, senescência e repressão do ciclo celular (Valko *et al.*, 2004).

O estresse oxidativo é pró-inflamatório e muitos genes pró-inflamatórios são responsivos a ele. Da mesma forma, a inflamação é pró-oxidativa, o que leva a um círculo vicioso que culmina em altos níveis de estresse oxidativo (Newby *et al.*, 2014). O conceito-chave é de que um processo inflamatório normal, por exemplo, inflamação associada à cicatrização de feridas, é normalmente auto-limitada; entretanto, a desregulação de algum fator pode levar a anormalidades e até mesmo patologias como doenças crônicas e progressão neoplásica. Além de estar envolvidas em processo tumorigênico, as EROs também já se mostraram estar associadas com doenças cardiovasculares, neurológicas, pulmonares e renais. E, de fato, é difícil definir a causalidade, e pode-se pensar que independente do que ocorra primeiro, uma vez iniciado, o estresse oxidativo favorece a inflamação e vice-versa (Ventura *et al.*, 2009).

O processo tumorigênico que leva células normais ao câncer pode ser dividido em três fases: iniciação, promoção e progressão tumoral. Na fase de iniciação, o DNA das células é mutado por agentes carcinogênicos químicos ou físico, levando à ativação de oncogenes e/ou a inativação de genes supressores tumorais como o p53. A segunda fase ou promoção da tumorigênese é onde ocorre a expansão clonal das

células iniciadas, devido à intensa proliferação e/ou redução da morte celular. O processo inflamatório é um importante promotor tumoral e várias citocinas, como IL-1 β e TNF- α , podem promover o crescimento tumoral. Por fim, a fase de invasão e metástase, assim como um aumento no tamanho do tumor, são características da terceira fase de progressão tumoral. Nesse período, mutações adicionais podem ser adquiridas, e isso faz com que a célula cancerígena ganhe uma futura vantagem no crescimento por adquirir um fenótipo ainda mais maligno (Karin e Greten, 2005). A Figura 6 resume os principais biomarcadores estudados neste trabalho e a possível inter-relação entre exposição ocupacional à poluição atmosférica e a suscetibilidade ao câncer.

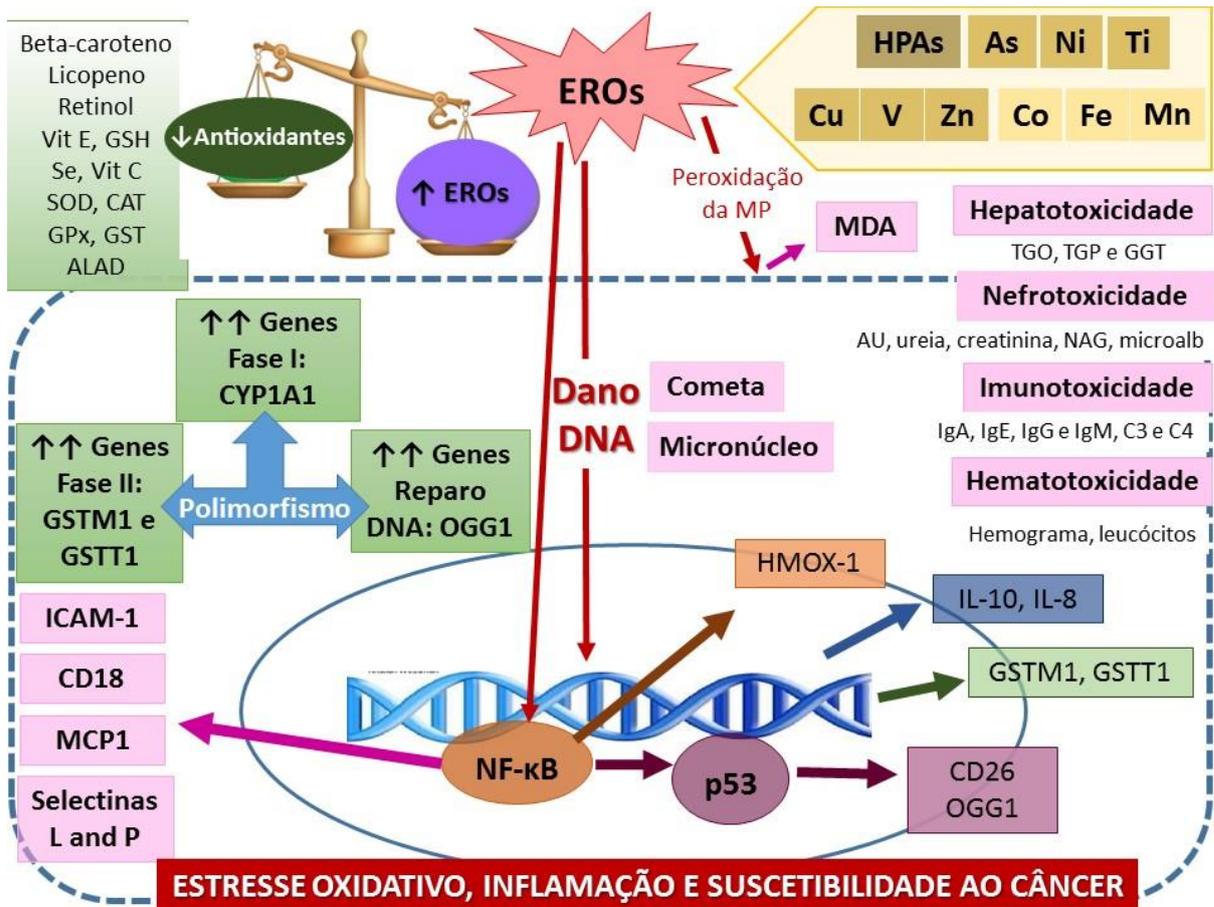


Figura 6. Estreita relação entre os efeitos oxidativos e inflamatórios ocasionados pela exposição à poluição ambiental e a suscetibilidade ao câncer. A exposição ocupacional à HPAs e elementos metálicos tóxicos (essenciais ou não) leva ao desequilíbrio do controle redox do organismo, levando à produção de EROs capazes de causar danos oxidativos a macromoléculas como proteínas, membranas plasmáticas e ao próprio DNA. Além disso, as EROs podem afetar a expressão gênica de diversos genes envolvidos em processos oxidativos, inflamatórios e de reparo, em busca de reverter o quadro oxidativo e inflamatório inicial. Desta forma, a capacidade antioxidante individual é de extrema importância, bem como a presença de polimorfismos que podem aumentar ou diminuir a suscetibilidade a esses danos ocasionados pela exposição.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a potencial associação dose-resposta da exposição ocupacional de taxistas à poluição atmosférica quando comparados a um grupo de não expostos ocupacionalmente. Adicionalmente, investigar possíveis mecanismos oxidativos e inflamatórios que podem levar ao aumento da suscetibilidade ao câncer.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Quantificar o biomarcador de exposição aos HPAs, 1-OHP urinário, e os níveis sanguíneos de elementos metálicos em taxistas e indivíduos com atividades administrativas;

2) Avaliar se há a influência da exposição a poluição atmosférica sobre os potenciais biomarcadores de efeito oxidativo e inflamatórios;

3) Avaliar a associação entre histórico familiar, hábitos de vida, local de trabalho, fatores genéticos, contato prévio com fumo, etnia, idade ou indícios de doença sobre os biomarcadores de efeito analisados em ambos os grupos;

4) Estudar se a expressão gênica de marcadores tumorais, proteínas inflamatórias e enzimas envolvidas nos danos oxidativos e reparo do DNA em taxistas apresentam diferenças comparados a indivíduos não expostos ocupacionalmente à poluição atmosférica;

5) Estudar possíveis associações entre os fatores de suscetibilidade individual e os resultados obtidos dos biomarcadores de exposição e efeito nos grupos de estudo;

6) Estudar a possível inter-relação entre estresse oxidativo, inflamação e suscetibilidade ao câncer em expostos ocupacionais aos HPAs e elementos metálicos oriundos da poluição atmosférica outdoor e indoor.

PARTE II



CAPÍTULO I

MANUSCRITO 1

Cellular response to oxidative and inflammatory processes and cancer susceptibility in individuals occupationally exposed to atmospheric pollution

Manuscrito a ser submetido à revista *Toxicology Research*.

As seguintes páginas (70 – 108) foram excluídas desta versão parcial pois correspondem ao manuscrito que será submetido à revista *Toxicology Research*.

Esse capítulo aborda o estudo que avaliou a exposição ocupacional de taxistas da cidade de Porto Alegre-RS à poluição atmosférica. Para isso, 85 taxistas e 55 trabalhadores não expostos ocupacionalmente participaram desse estudo. Foi avaliado nesse estudo a resposta celular frente a xenobióticos como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e metais, bem como os efeitos oxidativos e inflamatórios decorrentes da exposição, tanto em nível proteico quanto em alterações na expressão de genes envolvidos em processos tumorigênicos.

CAPÍTULO II

MANUSCRITO 2

Occupational effects of exposure to outdoor e indoor pollution

Manuscrito a ser submetido à revista Archives of Toxicology.

As seguintes páginas (112 – 138) foram excluídas desta versão parcial pois correspondem ao manuscrito que será submetido à revista *Archives of Toxicology*.

Esse capítulo aborda o estudo que avaliou a exposição ocupacional de taxistas e bancários da cidade de Porto Alegre a poluições atmosféricas *outdoor* e *indoor*. Participaram deste estudo 100 taxistas e 68 bancários com atividades administrativas internas da cidade de Porto Alegre-se. Foram avaliados elementos metálicos essenciais e tóxicos em ambos os grupos para verificar se havia associação com a jornada de trabalho, bem como os possíveis efeitos desta exposição ocupacional sobre processos oxidativos, inflamatórios, genotóxicos e mutagênicos.

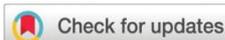
CAPÍTULO III

MANUSCRITO 3 – SHORT COMMUNICATION

Are metals and pyrene levels additional factors playing a pivotal role in air pollution-induced inflammation in taxi drivers?

Manuscrito publicado na revista *Toxicology Research*

DOI: 10.1039/C7TX00203C (Communication) *Toxicol. Res.*, 2018, 7, 8-12



Cite this: *Toxicol. Res.*, 2018, 7, 8

Received 21st July 2017,
Accepted 9th October 2017

DOI: 10.1039/c7tx00203c

rsc.li/toxicology-research

Are metals and pyrene levels additional factors playing a pivotal role in air pollution-induced inflammation in taxi drivers?

Bruna Gauer,^{a,b} Natália Brucker,^c Anelise Barth,^a Marcelo D. Arbo,^{a,b} Adriana Gioda,^d Flávia V. Thiesen,^e Jessica Nardi^{a,b} and Solange C. Garcia^b *^{a,b}

This study aimed to evaluate which xenobiotic (As, Hg, Pb or pyrenes) is primarily responsible for the inflammatory process in taxi drivers. Multiple regression analysis showed that Hg is the main xenobiotic responsible for the increase of cytokine levels. These associations suggest that co-exposure to pollutants could be a risk factor for health effects.

Introduction

Traffic-derived emissions are a prominent source of urban pollution, due to their ubiquity and increasing prevalence, especially in urban areas.¹ The World Health Organization estimated that 23% of all deaths that occurred in 2012 were attributable to environmental factors and that around 7 million people died – one in eight of total global deaths – as a result of air pollution exposure.^{2,3} Environmental pollution exposure has been associated with a risk factor in the morbidity and mortality of respiratory and cardiovascular diseases.^{4,5}

Motor vehicles emit a large mixture of several harmful chemical components, such as toxic gases, particulate matter (PM) and other residues of incomplete combustion,⁶ into the atmosphere. The PM released into the environment carries various constituents that can cause damaging health effects adsorbed onto its surface, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and heavy metals.^{7,8} Traffic-related PM is the major source of air pollution in metropolitan areas, and outdoor workers such as taxi drivers are expected to have a

greater exposure to air pollutants than the general population.⁹ 1-Hydroxypyrene (1-OHP) is a metabolite of pyrenes, and it is considered the main biomarker for assessing exposure to PAHs, since pyrenes are present in high concentrations in mixtures of PAHs. There is a good correlation between external exposure from traffic-related air pollution and excretion levels of 1-OHP in urine.¹⁰

It is established that pyrenes associated with air PM lead to reactive oxygen species (ROS) production in the organism, resulting in oxidative and inflammatory responses.¹¹ Likewise, it has been observed that the presence of PAHs jointly with metals in traffic exhaust particles has substantial pro-inflammatory and oxidative effects.¹²

Studies performed in our laboratory have already demonstrated that the occupational exposure of taxi drivers to PAHs and metals present in traffic-air pollution correlated with oxidative and inflammatory damage.^{13,14} It is known that atmospheric pollution is due to a complex mixture of chemical agents and in the present work some agents were evaluated. On the other hand, we concentrated on analysing the main metabolite of pyrenes, 1-OHP, and trace metals, *e.g.* As, Hg and Pb, because these pollutants showed the most pro-oxidant and inflammatory effects, according to our previous results from studies with taxi drivers.¹⁵ Although these previous studies have shown an association between air pollution and inflammation, few studies have examined additive or synergistic effects. This study focused on evaluating which of these xenobiotics (metals or pyrenes) is primarily responsible for the inflammatory process observed in taxi drivers. Therefore, we have gathered data from individuals recruited over three years of study in order to better evaluate these risks of exposure.

Materials and methods

This study comprised one hundred and thirty two non-smoker males. Subjects older than 60 years, smokers, with a history of chronic diseases, taking vitamin supplementation and those who had failed to collect samples or participate in any stage of

^aLaboratory of Toxicology (LATOX), Department of Analysis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail: solange.garcia@ufrgs.br; Fax: (+55) 51 3308-5437; Tel: (+55)51 3308-5297

^bPost-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

^cDepartment of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Roraima 1000, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^dDepartment of Chemistry, Pontifical Catholic University of Rio de Janeiro (PUC-Rio), Rua Marquês de São Vicente 225, 22451-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^ePharmacy Faculty and Toxicology Institute, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6681, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

the study were excluded. The group of workers who are potentially exposed to outdoor air pollution on the streets during their daily work consisted of 80 taxi drivers of Porto Alegre, the capital of Rio Grande do Sul (RS), a southern state in Brazil. The city is located in the extreme south of the country, with approximately 1.5 million habitants and 822 thousand licensed vehicles in circulation, resulting in a mean of 1.8 inhabitants per vehicle (Detran/2016). The group of workers who are expected not to be exposed to outdoor pollution at work consisted of 52 individuals with administrative occupation and living in the same city as the exposed group. The mean age of taxi drivers was higher (47.78 ± 1.11 years) than that of the control group (40.87 ± 1.48 years) ($p < 0.01$).

The participants were recruited through advertising and leafletting. Both the groups were simultaneously submitted to equivalent examinations and procedures. The Committee on Research Ethics at Federal University of Rio Grande do Sul (No. 20322/11) approved this study. All the participants were informed about the study and signed a consent form according to the guidelines of the local committee.

All recruitment and sample collections were performed during winter because this season is characterized by high levels of air pollutants. Pre-work shift urine was collected for the determination of 1-hydroxypyrene and creatinine levels. Blood samples were collected from all participants by venipuncture into Vacutainer™ tubes. Blood-heparin tubes were collected and aliquots were stored at -20 °C inside free metal tubes until analysis to determine the toxic metallic elements lead (Pb), mercury (Hg) and arsenic (As). A tube, collected without anticoagulant, was centrifuged at $1500g$ for 10 min at room temperature and the serum obtained was frozen and kept under -80 °C for subsequent determination of inflammatory cytokines.

The levels of the urinary metabolite of pyrenes, 1-hydroxypyrene (1-OHP), were determined in urine samples by the enzymatic hydrolysis of the conjugated metabolite, followed by solid phase extraction and analysis of the reconstituted extract by high performance liquid chromatography (HPLC) equipped with a fluorescence detector.¹⁴ Urinary creatinine was determined by spectrophotometry using commercial kits (Doles, Brazil). The concentrations of 1-OHP were expressed in $\mu\text{mol mol}^{-1}$ creatinine.

The levels of metals mercury (Hg) and lead (Pb) and the metalloid arsenic (As) in whole blood were analyzed by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS; PerkinElmer-Sciex).¹⁵ As and Hg were expressed as $\mu\text{g l}^{-1}$, while Pb as $\mu\text{g dl}^{-1}$.

Inflammatory cytokines were quantified using immunologic ELISA methods for human interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10) (R&D Systems), according to the manufacturer's instructions. The results were expressed as pg ml^{-1} .

Statistical analysis was performed using the SPSS software (version 22). Normality was assessed through the Shapiro-Wilk test. Results were reported as mean \pm standard error of the mean (SEM). Comparisons between groups were achieved by ANCOVA covariation adjusted for age. Multiple linear regression analyses were performed to evaluate whether inflammatory biomarkers are influenced by trace elements and 1-OHP, using as covariates age, 1-OHP, As, Hg and Pb. Values of $p \leq 0.05$ were considered significant.

Results and discussion

Experimental and epidemiological studies have highlighted the association of PM with negative respiratory and cardiovascular effects, the inflammatory process being an important mechanism behind these diseases.^{16,17} Furthermore, it is already proved that PM is able to carry various compounds like metals and pyrenes adsorbed onto its surface, and they, in turn, are responsible for triggering the inflammation that can cause tissue damage.^{18,19}

The results obtained in the present study showed that the concentrations of toxic elements (As, Hg, and Pb) quantified in whole blood were significantly higher in taxi drivers in relation to the non-exposed group, controlled by age ($p < 0.001$) (Table 1). The same was observed in the urinary levels of 1-OHP (Table 1). Regarding the serum biomarkers of inflammation, significant increases of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α and IFN- γ) were observed in the taxi drivers, while the anti-inflammatory cytokine IL-10 was lower in this group compared with the control ($p < 0.001$) (Fig. 1).

There is particular concern that co-exposure to PAHs (pyrenes) and toxic elements may result in additive or synergistic effects. A multiple regression analysis was performed to evaluate which of these risk factors may influence more on the inflammatory biomarkers (Table 2). Interestingly, blood Hg was the major predictor of increase in all pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , and IFN- γ) and decrease in the anti-inflammatory cytokine IL-10 levels. This model accounted

Table 1 Blood metals and urinary 1-hydroxypyrene metabolite levels of the studied groups

	Taxi drivers ($n = 80$)	Non-exposed ($n = 52$)	Limits recommended ²⁰
As ($\mu\text{g l}^{-1}$)	$19.56 \pm 0.61^{**}$	13.18 ± 0.50	2 to 20
Hg ($\mu\text{g l}^{-1}$)	$17.79 \pm 2.43^{**}$	2.75 ± 0.32	2 to 20
Pb ($\mu\text{g dl}^{-1}$)	$2.08 \pm 0.15^{**}$	1.29 ± 0.07	5 to 15
1-OHP ($\mu\text{mol mol}^{-1}$ creatinine)	$0.114 \pm 0.010^*$	0.077 ± 0.004	—

Abbreviations: As: arsenic. Hg: mercury. Pb: lead. 1-OHP: 1-hydroxypyrene. Results are expressed as mean \pm SEM. ANCOVA covariation, adjusted for age: * $p < 0.01$ compared with non-exposed individuals. ** $p < 0.001$ compared with non-exposed individuals.

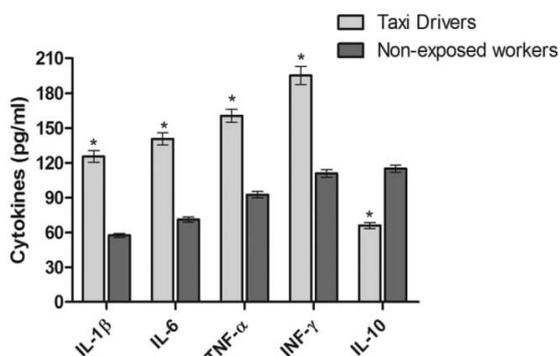


Fig. 1 Circulating cytokine levels (pg ml^{-1}) from taxi drivers ($n = 80$) and the non-exposed group ($n = 52$). Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.001$ compared with non-exposed workers (ANCOVA adjusted for age). IL-1 β : interleukin-1 β , IL-6: interleukin-6, TNF- α : tumor necrosis factor alpha, INF- γ : interferon gamma, IL-10: interleukin-10.

for 33% IL-1 β ($R^2 = 0.329$), 37% IL-6 ($R^2 = 0.371$), 36% TNF- α ($R^2 = 0.357$), 43% IFN- γ ($R^2 = 0.425$) and for 25% IL-10 ($R^2 = 0.252$). It was demonstrated that other chemical agents contribute to the inflammatory process, but the role of Hg in environment-exposed workers must not be underestimated. Nevertheless, the urinary levels of 1-OHP were the second most important biomarker associated with an increase of the cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α and IFN- γ , while the arsenic levels in blood were the second best marker of decreased IL-10. The parameters age and Pb levels in the blood were weak predictors of IFN- γ changes in this model.

The taxi drivers presented a mean concentration next to the maximum limit of As and Hg, while the levels of Pb were within the reference value.²⁰ Although the concentrations found in taxi drivers do not exceed the maximum value established by WHO, it was possible to observe significant changes in the inflammatory markers in the exposed group. In this context, our results indicated that relatively normal levels of exposure to these toxic elements are potentially harmful to these workers. Furthermore, applying biomarkers of exposure and effect could be useful in providing insight into the biological mechanisms.

In this study, blood Hg was the major marker influencing the increase of pro-inflammatory cytokines. This is in accordance with our previous results; however, the previous statistical model used did not consider 1-OHP as a parameter. The deleterious effects induced by Hg are already described, since this metal accumulates in several tissues.²¹ Data from *in vitro* and *in vivo* studies indicate the involvement of Hg in the development of the inflammatory process by ROS production due to its physicochemical properties.^{22,23} However, human exposure effects depend on the chemical form and sources of exposure that include the inhalation of polluted air or the ingestion of contaminated food.²⁴ In fact, exposure to multiple chemicals may lead to many interactions with a wide array of underlying mechanisms that may result in diverse health outcomes. Air pollution exposure contributes to an increase in the inflammatory process; however, other factors may also influence inflammation, such as the time of exposure, lipid profile, and genetic chronic diseases.^{25,26} In this line, the weak correlation coefficients found could be justified by the mixture of chemical pollutant agents in air, which may be affecting the individual correlations obtained for exposure biomarkers when they are grouped in the multifactorial analysis.

Although 1-OHP was not the main predictor of the changes in inflammatory biomarkers by our statistical model, we cannot underestimate its contribution to the inflammatory process triggered by occupational exposure to air pollution. PAHs are able to stimulate inflammation through different ways and mechanisms, most of them are related to oxidative stress. An example is the aryl hydrocarbon receptor (AhR) pathway, where PAHs bind to the receptor and then activate the expression of genes such as CYP1A1, which is related to the excessive production of ROS and the formation of DNA adducts. The activation of AhR also stimulates the production of COX-2, the first step in the inflammatory cascade.²⁷

Conclusions

The results revealed that co-exposure to xenobiotics related to the traffic air pollution such as Hg, As, Pb, and pyrenes can significantly contribute to the inflammatory process in daily

Table 2 Multiple regression linear analysis of factors affecting the levels of inflammatory biomarkers adjusted for other potential confounders ($n = 132$)

	IL-1 β (pg ml^{-1})		IL-6 (pg ml^{-1})		TNF- α (pg ml^{-1})		IFN- γ (pg ml^{-1})		IL-10 (pg ml^{-1})	
	$R^2 = 0.329$		$R^2 = 0.371$		$R^2 = 0.357$		$R^2 = 0.425$		$R^2 = 0.252$	
	β	p -Values	β	p -Values	β	p -Values	β	p -Values	β	p -Values
Age (years)	0.033	0.686	-0.063	0.425	-0.130	0.104	-0.155	0.040	0.010	0.908
As ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.199	0.016	0.211	0.008	0.184	0.022	0.152	0.046	-0.228	0.009
Hg ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.435	< 0.001	0.447	< 0.001	0.409	< 0.001	0.527	< 0.001	-0.388	< 0.001
Pb ($\mu\text{g dL}^{-1}$)	0.094	0.300	0.173	0.051	0.234	0.009	0.214	0.012	-0.033	0.732
1-OHP ($\mu\text{mol mol}^{-1}$ creatinine)	0.244	0.003	0.267	0.001	0.292	< 0.001	0.214	0.005	-0.222	0.011

As: arsenic. Hg: mercury. Pb: lead. 1-OHP: 1-hydroxypyrene. IL-1 β : interleukin-1 β . IL-6: interleukin-6. TNF- α : tumor necrosis factor- α . IFN- γ : interferon- γ . IL-10: interleukin-10.

exposed workers. However, there are many other chemical agents in atmospheric pollution that also influence the inflammatory process, as suggested through a multiple linear regression model. This study has provided important evidence that Hg is the main xenobiotic responsible for the increase in the pro-inflammatory cytokines, as well as the decrease of the anti-inflammatory capacity represented by IL-10. This indicates that the detection of biomarkers is an important step to demonstrate health effects after exposure to pollutants. Besides this, the inflammation process has been proposed as the factor involved in mediating the pollutant effects on cardiovascular disease and this co-exposure to xenobiotics could be a risk factor for adverse health effects.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest to declare.

Acknowledgements

This work was supported by the FAPERGS and PPSUS grant to SC Garcia, CNPq, Capes. SC Garcia is a recipient of the CNPq research fellowship.

References

- 1 B. Niemann, S. Rohrbach, M. R. Miller, D. E. Newby, V. Fuster and J. C. Kovacic, Oxidative Stress and Cardiovascular Risk: Obesity, Diabetes, Smoking, and Pollution: Part 3 of a 3-Part Series, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2017, **70**, 230–251.
- 2 P. Braveman and L. Gottlieb, The social determinants of health: it's time to consider the causes of the causes, *Public Health Rep.*, 2014, **129**, 19–31.
- 3 P. Venkatesan, WHO report: air pollution is a major threat to health, *Lancet Respir. Med.*, 2016, **4**, 351.
- 4 G. Hoek, R. M. Krishnan, R. Beelen, A. Peters, B. Ostro, B. Brunekreef and J. D. Kaufman, Long-term air pollution exposure and cardio-respiratory mortality: a review, *Environ. Health*, 2013, **12**, 43.
- 5 B. Brunekreef and B. Hoffmann, Air pollution and heart disease, *Lancet*, 2016, **388**, 640–642.
- 6 F. J. Kelly and J. C. Fussell, Size, source and chemical composition as determinants of toxicity attributable to ambient particulate matter, *Atmos. Environ.*, 2012, **60**, 504–526.
- 7 T. Wang, W. Feng, D. Kuang, Q. Deng, W. Zhang, S. Wang, M. He, X. Zhang, T. Wu and H. Guo, The effects of heavy metals and their interactions with polycyclic aromatic hydrocarbons on the oxidative stress among coke-oven workers, *Environ. Res.*, 2015, **140**, 405–413.
- 8 K. Ravindra, R. Sokhi and R. Van Grieken, Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: source attribution, emission factors and regulation, *Atmos. Environ.*, 2008, **42**, 2895–2921.
- 9 H. Choudhary and S. M. Tarlo, Airway effects of traffic-related air pollution on outdoor workers, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, **14**, 106–112.
- 10 M. Ciarrocca, M. V. Rosati, F. Tomei, A. Capozzella, G. Andreozzi, G. Tomei, A. Bacaloni, T. Casale, J. C. André and M. Fioravanti, Is urinary 1-hydroxypyrene a valid biomarker for exposure to air pollution in outdoor workers? A meta-analysis, *J. Exposure Anal. Environ. Epidemiol.*, 2014, **24**, 17–26.
- 11 Y. Zhang, S. Dong, H. Wang, S. Tao and R. Kiyama, Biological impact of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons (ePAHs) as endocrine disruptors, *Environ. Pollut.*, 2016, **213**, 809–824.
- 12 A. I. Totlandsdal, M. Låg, E. Lilleaas, F. Cassee and P. Schwarze, Differential proinflammatory responses induced by diesel exhaust particles with contrasting PAH and metal content, *Environ. Toxicol.*, 2015, **30**, 188–196.
- 13 A. Barth, N. Brucker, A. M. Moro, S. Nascimento, G. Goethel, C. Souto, R. Fracasso, E. Sauer, L. Altknecht and B. da Costa, Association between inflammation processes, DNA damage, and exposure to environmental pollutants, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2017, **24**, 353–362.
- 14 N. Brucker, A. M. Moro, M. F. Charão, J. Durgante, F. Freitas, M. Baierle, S. Nascimento, B. Gauer, R. P. Bulcão and G. B. Bubols, Biomarkers of occupational exposure to air pollution, inflammation and oxidative damage in taxi drivers, *Sci. Total Environ.*, 2013, **463**, 884–893.
- 15 N. Brucker, A. Moro, M. Charão, G. Bubols, S. Nascimento, G. Goethel, A. Barth, A. C. Prohmann, R. Rocha and R. Moresco, Relationship between blood metals and inflammation in taxi drivers, *Clin. Chim. Acta*, 2015, **444**, 176–181.
- 16 A. Baulig, S. Singh, A. Marchand, R. Schins, R. Barouki, M. Garlatti, F. Marano and A. Baeza-Squiban, Role of Paris PM 2.5 components in the pro-inflammatory response induced in airway epithelial cells, *Toxicology*, 2009, **261**, 126–135.
- 17 L. D. Knibbs and L. Morawska, Traffic-related fine and ultrafine particle exposures of professional drivers and illness: An opportunity to better link exposure science and epidemiology to address an occupational hazard?, *Environ. Int.*, 2012, **49**, 110–114.
- 18 J. M. Brito, L. Belotti, A. C. Toledo, L. Antonangelo, F. S. Silva, D. S. Alvim, P. A. Andre, P. H. Saldiva and D. H. Rivero, Acute cardiovascular and inflammatory toxicity induced by inhalation of diesel and biodiesel exhaust particles, *Toxicol. Sci.*, 2010, **116**, 67–78.
- 19 N. L. Mills, K. Donaldson, P. W. Hadoke, N. A. Boon, W. MacNee, F. R. Cassee, T. Sandström, A. Blomberg and D. E. Newby, Adverse cardiovascular effects of air pollution, *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.*, 2009, **6**, 36–44.
- 20 WHO, *Trace elements in human nutrition and health*, World Health Organization, 1996.
- 21 J. Aazami, A. Esmaili-Saria, N. Bahramifar and M. Savabieasfahani, Total and organic mercury in liver,

- kidney and muscle of waterbirds from wetlands of the Caspian Sea, Iran, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2012, **89**, 96–101.
- 22 S. C. Bondy, in *Inflammation, Aging, and Oxidative Stress*, Springer, 2016, pp. 3–16.
- 23 S. H. Kim and R. P. Sharma, Cytotoxicity of inorganic mercury in murine T and B lymphoma cell lines: involvement of reactive oxygen species, Ca²⁺ homeostasis, and cytokine gene expression, *Toxicol. in Vitro*, 2003, **17**, 385–395.
- 24 A. A. Tinkov, O. P. Ajsuvakova, M. G. Skalnaya, E. V. Popova, A. I. Sinitskii, O. N. Nemereshina, E. R. Gatiatulina, A. A. Nikonorov and A. V. Skalny, Mercury and metabolic syndrome: a review of experimental and clinical observations, *BioMetals*, 2015, **28**, 231–254.
- 25 N. Brucker, M. F. Charão, A. M. Moro, P. Ferrari, G. Bubols, E. Sauer, R. Fracasso, J. Durgante, F. V. Thiesen and M. M. Duarte, Atherosclerotic process in taxi drivers occupationally exposed to air pollution and co-morbidities, *Environ. Res.*, 2014, **131**, 31–38.
- 26 G. Pawelec, D. Goldeck and E. Derhovanessian, Inflammation, ageing and chronic disease, *Curr. Opin. Immunol.*, 2014, **29**, 23–28.
- 27 L. Yang, X.-Y. Hou, Y. Wei, P. Thai and F. Chai, Biomarkers of the health outcomes associated with ambient particulate matter exposure, *Sci. Total Environ.*, 2017, **579**, 1446–1459.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS ADICIONAIS



1. MATERIAIS E MÉTODOS

1.1. Princípios Éticos e Organograma do Estudo

Este estudo foi encaminhado ao Comitê de Ética e seguiu os princípios éticos estabelecidos nas diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos do Conselho Nacional de Saúde (resolução Nº 466, de 12 de dezembro de 2012). O projeto teve aprovação do Comitê de Ética da UFRGS (Nº 1.499.204) (anexo I), com subsequente aprovação do comitê de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Nº 1.553.525) e comitê de ética do Instituto de Cardiologia de Porto Alegre (Nº 1.657.050) como centros coparticipantes. O organograma do estudo está representado na Figura 1. Os voluntários do estudo, antes do início de sua participação, assinaram e dataram pessoalmente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexos II e III). Esse também foi assinado e datado pessoalmente pelos responsáveis pelo estudo.

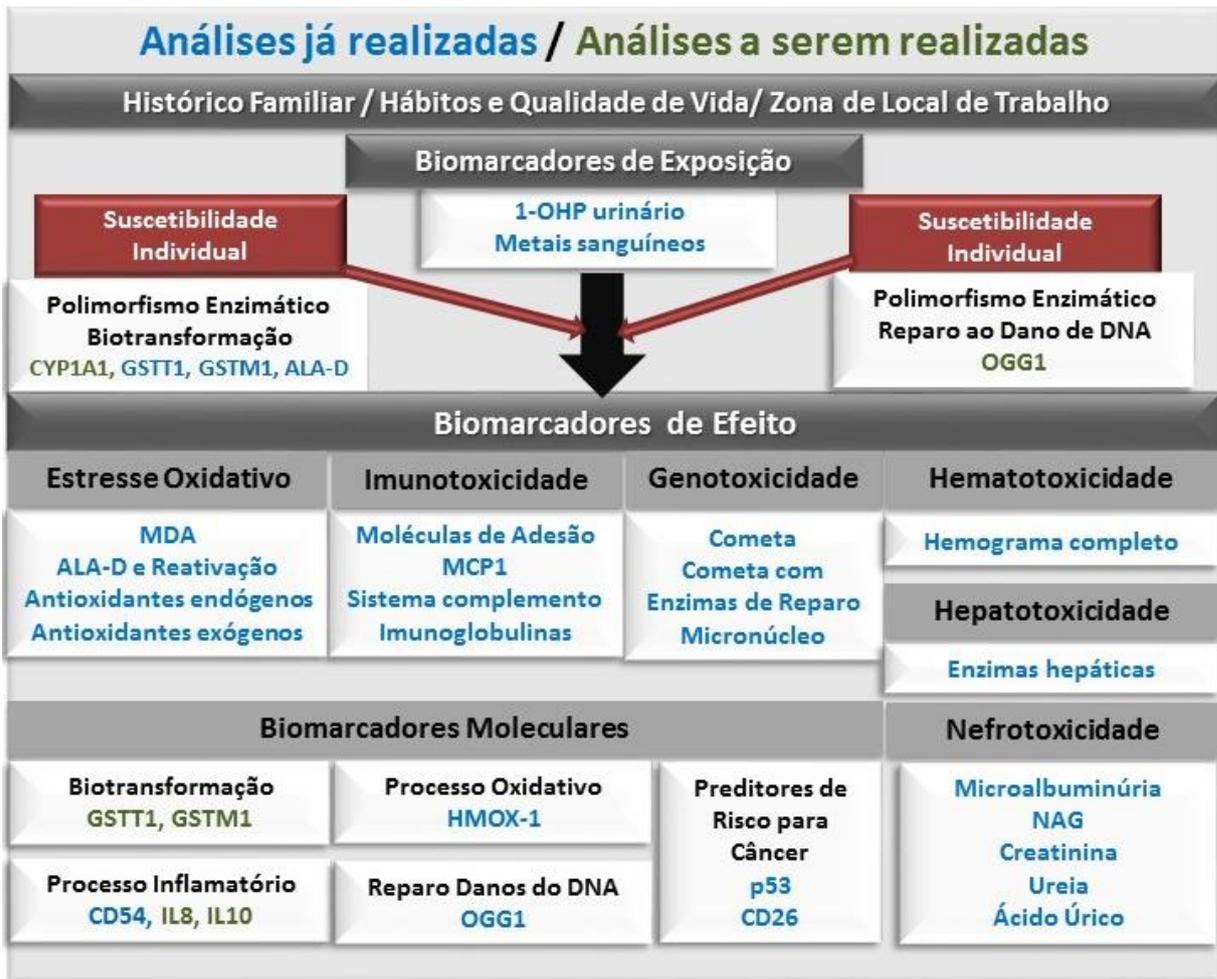


Figura 1. Organograma do estudo. Lista de Abreviaturas: CYP1A1- Citocromo P450 família 1; GSST1 – Glutathione S Transferase Theta-1; GSTM1 – Glutathione S Transferase Mu-1; ALA-D – Aminolevulinato Desidratase; OGG1 – 8-oxoguanina DNA glicosilase-1; MDA – Malondialdeído; MCP1- Proteína Quimiotática de Monócitos-1; CD54 – Cluster de Diferenciação 54 ou Molécula de Adesão Intracelular-1; IL8, IL10 – Interleucinas 8 e 10; HMOX-1 – Heme Oxigenase-1; p53 – Proteína Supressora Tumoral; CD26 – Cluster de Diferenciação 26 ou Dipeptidil peptidase-4; NAG - N-acetil-β-D-glicosaminidase.

1.2. Seleção dos Participantes do Estudo

A fase de coletas deste estudo se deu no inverno de 2016, entre os meses de junho a agosto. Foram coletadas amostras biológicas de um total de 100 indivíduos expostos ocupacionalmente aos poluentes atmosféricos, com permanência mínima de 8 horas diárias na atividade funcional. O grupo de indivíduos expostos foi composto por taxistas da cidade de Porto Alegre-RS. O grupo de não expostos ocupacionalmente a poluição atmosférica foi composto por indivíduos com atividades administrativas, sendo coletadas amostras biológicas de 70 indivíduos saudáveis ao total, do sexo masculino, com atividades administrativas internas.

Critérios de Inclusão: Indivíduos ocupacionalmente expostos a poluição atmosférica, com exposição mínima de 6 meses (taxistas).

Critérios de Exclusão: Indivíduos fumantes, com histórico de doenças crônicas infecciosas e/ou que fizessem uso de suplementos vitamínicos.

Os indivíduos que aceitaram participar deste projeto de pesquisa responderam a um questionário de avaliação com questões sobre hábitos de vida, uso de medicamentos, tempo de exposição, entre outros aspectos relevantes.

Os taxistas foram recrutados através do apoio do SINDITAXI de Porto Alegre e os mesmos foram convidados a comparecer ao Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT) da Faculdade de Farmácia da UFRGS para realização das coletas de amostras biológicas e aplicação do questionário. Além disso, foram distribuídos panfletos em forma de convite aos taxistas em pontos de táxi da cidade, solicitando que entrassem em contato com os pesquisadores em caso de interesse em participar da pesquisa, e para agendar a coleta dos dados e amostras. O grupo controle foi composto por indivíduos trabalhadores de uma agência bancária da cidade de Porto Alegre. Após o aceite do CEP, contato com a instituição e aceite da mesma em participar, as coletas foram realizadas nas dependências da agência bancária.

A fim de garantir a privacidade dos participantes e o caráter confidencial dessa pesquisa, foi utilizado um sistema de codificação e, para isso, a cada um dos participantes foi entregue um número e este foi utilizado para identificação dos tubos de coleta e respectivo questionário de avaliação.

Todas as coletas foram realizadas por pessoal capacitado e treinado do grupo de pesquisa da responsável por esse projeto de pesquisa (Prof^a Dr^a Solange Cristina Garcia). As coletas de amostras biológicas, bem como a realização das análises clínicas de exames a serem entregues aos participantes, foram realizados independentemente do resultado de avaliação do questionário (item 1.4 e anexo IV) o qual poderia indicar presença de critério de exclusão, como, por exemplo, fumo, indivíduos com doenças crônicas infecciosas e/ou uso de polivitamínicos.

Cabe salientar que os dados utilizados no Capítulo III (short communication) eram oriundos de trabalhos prévios do grupo de pesquisa, realizados entre os anos de 2010 a 2015. Ademais, dependendo da abordagem a ser avaliada (manuscritos I e II, e resultados adicionais), foram selecionados indivíduos de cada grupo de forma a manter o número máximo de dados para as variáveis estudadas.

1.3. Obtenção de Amostras Biológicas, Separação, Tratamento e Descarte

As amostras biológicas somente foram coletadas após o consentimento formal dos participantes, obtido pela assinatura do TCLE. Foram coletadas amostras de urina, sangue venoso e células da mucosa bucal.

As amostras de urina foram coletadas ocasionalmente dos indivíduos controles e expostos, e foram estocadas sob refrigeração de 2 a 8 °C até a separação. Alíquotas para a determinação da creatinina urinária foram mantidas refrigeradas até a análise. Foram separadas alíquotas para a determinação dos biomarcadores 1-hidroxipireno, NAG e microalbuminúria, as quais foram armazenadas a -80 °C até a realização das análises.

Em relação às amostras sanguíneas, indivíduos em jejum tiveram amostras de sangue coletadas por venopunção, com e sem anticoagulantes (EDTA e heparina). As amostras foram mantidas em banho de gelo até a chegada no laboratório. Foram coletados 18 mL de sangue de cada participante. Destes, 6 mL de sangue foram coletados em tubos à vácuo Vacuette® contendo heparina sódica como anticoagulante. Alíquotas de sangue total foram separadas para a dosagem de metais, determinação da atividade de enzimas antioxidantes (CAT e GPx), realização do ensaio cometa, e para determinação da atividade enzimática da ALAD. As alíquotas para a dosagem de metais e para o ensaio cometa foram mantidas refrigeradas até as análises, enquanto as alíquotas para as dosagens das atividades das enzimas antioxidantes e ALAD foram armazenadas a -80 °C. O restante do sangue foi centrifugado a 1.500 g por 10 minutos para a separação do plasma. O plasma também foi congelado a -80 °C. Ainda, 2 mL de sangue foram coletados em tubos a vácuo Vacuette® com EDTA como anticoagulante e mantidos sobre refrigeração até a separação de células mononucleares e subsequente extração de RNA das mesmas. Outro tubo de 2 mL com EDTA foi coletado e armazenado a -80 °C para posterior extração de DNA. Um terceiro tubo de 4 mL com EDTA como anticoagulante foi coletado e alíquotas de sangue total foram separadas e mantidas sob refrigeração por no máximo 6h para posterior avaliação do hemograma e moléculas de adesão por citometria. O restante do sangue deste último tubo de EDTA foi centrifugado a 1.500 g por 10 minutos para a separação do plasma para as dosagens do biomarcadores de estresse oxidativo (MDA) e inflamatório (MCP1), bem como para a determinação dos

níveis dos antioxidantes exógenos vitamina E, retinol, β -caroteno e licopeno. Com exceção da alíquota de plasma de MDA, que foi processada no mesmo dia, as demais alíquotas de plasma foram armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização das análises.

Finalmente, 4 mL de sangue foram coletados em tubos a vácuo Vacuette® sem anticoagulante e imediatamente centrifugados a 1.500 g por 10 minutos para obtenção do soro. Alíquotas foram separadas para as análises bioquímicas, quantificação de IgE (HCPA), bem como para a quantificação dos níveis de vitamina C. O restante de soro também foi aliquotado e armazenado. Com exceção das alíquotas para as análises bioquímicas, que foram mantidas refrigeradas, as demais alíquotas foram mantidas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização das análises.

Amostras de células epiteliais da mucosa bucal foram coletadas para análise de micronúcleos (dano de DNA), utilizando escova tipo *Cytobrush*. Foi solicitado que os participantes realizassem um “bochecho” com água para eliminar possíveis resíduos alimentares e, posteriormente, que fizessem dez movimentos circulares com a escova do lado de dentro da boca, em cada lado da bochecha. Após, a escova foi mergulhada em uma solução de NaCl 0,9% contida em um tubo de polipropileno de 15 mL, que foi mantido refrigerado. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 1.500 rpm a 10 min para separação do pellet de células, que foi ressuspenso com 1 mL de uma solução fixadora contendo metanol:ácido acético (3:1, v/v) para preparação das lâminas e realização das colorações.

Os materiais utilizados durante a coleta das amostras sanguíneas foram segregados e identificados como perfurocortantes em caixas de papelão (Descarpack) apropriadas para transporte e descarte desses materiais. Os materiais biológicos que não foram utilizados e os equipamentos de proteção individual contaminados com materiais biológicos foram acondicionados em sacos de lixo branco leitoso e identificados como Resíduos Biológicos (Grupo A). Os solventes e reagentes utilizados nesse trabalho foram devidamente identificados, segregados e descartados conforme orientações da COSAT. O descarte de todos os materiais utilizados na realização desse trabalho foi realizado conforme a COSAT/Faculdade de Farmácia (UFRGS).

1.4. Aplicação de Questionário Complementar

A fim de obter mais informações dos participantes, além dos critérios de exclusão, foi aplicado um questionário complementar. Os participantes foram questionados sobre sua qualidade de vida, através de relatos de doenças crônicas (infecciosas ou não), uso crônico de medicamentos e frequência de sintomas que poderiam ser relacionados ao trabalho e exposição. Também, foram questionados sobre seu histórico familiar com respeito a doenças crônicas relacionadas a problemas cardiovasculares e também histórico de câncer e quais os tipos. Por fim, os participantes também responderam a um questionário alimentar, elaborado com bases no Guia Alimentar do Ministério da Saúde de 2006 (Ms e Brasil, 2006).

1.5. Monitoramento Biológico

1.5.1. Biomarcadores de Exposição

1.5.1.1. 1-Hidroxipireno Urinário (1-OHP)

O metabólito urinário do B[a]P, 1-OHP, foi analisado utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo metodologia previamente implementada. Resumidamente, a urina foi diluída com tampão acetato e é adicionada a enzima β -glucuronidase, seguida de incubação a 37°C durante 2h. Subsequentemente, as amostras foram submetidas ao procedimento de extração em fase sólida (SPE). A eluição foi realizada com isopropanol, seguido por evaporação sob uma corrente de ar comprimido a 37 °C e a reconstituição em metanol antes da injeção no cromatógrafo. A detecção se deu em detector de fluorescência, com comprimentos de onda de excitação e emissão a 242 e 388 nm, respectivamente. Os resultados foram expressos como ng g⁻¹ de creatinina.

1.5.1.2. Metais em sangue total

Os níveis de elementos essenciais (Co, Cu, Mn, Se, V e Zn) e tóxicos (As, Ni e Ti) foram determinados em sangue total com heparina. Para a quantificação, 1 mL de ácido nítrico ultrapuro 65% foi adicionado a 500 μ L de sangue em tubo de polipropileno para digestão. A mistura foi digerida por aquecimento a 95 °C durante 4 horas. Os extratos foram resfriados a temperatura ambiente e o volume foi completo até 10 mL

com água ultrapura. As concentrações dos elementos foram determinadas por espectrometria de massa por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS; Perkin Elmer-SCIEX, USA), de acordo com o método de Mateus et al., (2013). O padrão utilizado foi o ródio (Rh) $400 \mu\text{g L}^{-1}$, preparado em solução aquosa acidificada com ácido nítrico (HNO_3) 1%. As concentrações da curva de calibração variaram entre 5 e $80 \mu\text{g L}^{-1}$. As soluções de calibração foram preparadas utilizando uma solução estoque $10.000 \mu\text{g L}^{-1}$ (Perkin Elmer 29).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados baseados no desvio padrão (DP) dos brancos de calibração ($n= 10$): 3 vezes os DP para LD (ou 10 vezes para o LQ), dividido pelo declive da curva de calibração. A precisão e acurácia do método analítico foram monitoradas através do uso de materiais de referência, analisados a cada 15 amostras. Quando ocorriam diferenças $> 10\%$, a calibração era repetida. A acurácia do método foi avaliada através do material de referência certificado para sangue total ClinCal® Whole Blood Calibrator (RECIPE® Chemicals, Munique, Alemanha), analisado utilizando o mesmo procedimento realizado para as amostras.

1.5.2. Biomarcadores de Efeito

1.5.2.1. Genotoxicidade

1.5.2.1.1. Ensaio Cometa por fluorescência

O ensaio cometa foi realizado em sangue total conforme descrito por Göethel e colaboradores (2014), com algumas modificações. Resumidamente, células do sangue ($5 \mu\text{L}$ de sangue total periférico) foram embebidas em $95 \mu\text{L}$ de agarose de baixo ponto de fusão. Essa mistura foi transferida para uma lâmina já coberta com agarose normal. Após a solidificação, as lâminas foram mergulhadas em solução de lise gelada (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM e Tris 10 mM, pH 10,0-10,5), com adição de 1 % Triton X-100 e dimetil sulfóxido (DMSO) 10% por no mínimo uma hora e no máximo duas semanas. Posteriormente, as lâminas foram incubadas na cuba de eletroforese com tampão de eletroforese (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH 12,6) por 20 min.

Posteriormente foi realizada a corrida de eletroforese por 15 min a 25 volts (0,90 V / cm) e 300 mA, a uma temperatura de 4°C. Após a corrida eletroforética as lâminas foram cobertas com solução neutralizadora (Tris 0,4 M (pH 7,5)). No dia da análise das lâminas em microscópio óptico as lâminas foram coradas com Gel Red® (diluição 1:500). Para a visualização do dano no DNA foram analisadas 100 células por participante em microscópio com fluorescência (Olympus IX71, Olympus Corp, Japão). As lâminas foram feitas em duplicata, sendo contadas 50 células de cada lâmina. Os resultados foram analisados através do software Comet Score™ e expressos por porcentagem de DNA na cauda (% DNA *in tail*) e momento de cauda.

1.5.2.1.2. Ensaio cometa com enzimas de reparo de DNA

O dano de DNA foi analisado utilizando a versão alcalina do teste cometa segundo Göethel e colaboradores (2014). As lâminas permaneceram na solução de lise e após foram lavadas duas vezes com tampão (tampão HEPES 40 mM, KCl 0,1M, BSA – albumina de soro bovino 0,2 mg/mL e EDTA 0,5 mM, pH 8,0). As enzimas foram utilizadas nas seguintes concentrações: FPG - Formamidopirimidina – DNA glicosilase (8.000 U/mL) e ENDO III - Endonuclease (10.000U/mL). A diluição das enzimas foi realizada com tampão 1 M. Na etapa seguinte foi adicionado 60 µL da solução enzimática sobre as lâminas, deixando agir por 30 minutos (enzima FPG) e por 45 minutos (Endo III), ambas à 37° C em presença de umidade, para detecção de pirimidinas e purinas oxidadas, respectivamente. Em seguida, foi realizada a eletroforese e as demais etapas do ensaio cometa, seguindo o protocolo do cometa alcalino.

1.5.2.1.3. Ensaio de Micronúcleo

Células bucais foram coletadas usando um procedimento estabelecido por Göethel e colaboradores (2014), utilizando escova tipo *Cytobrush*. Antes da coleta das células bucais, foi solicitado que os participantes lavassem a boca cuidadosamente com água através de bochechos para remover quaisquer detritos indesejados. As células foram removidas com auxílio de escovas dentais através de 10 movimentos circulares contra o interior de cada bochecha, a partir de um ponto central com

aumento gradual de circunferência. Em seguida, as cabeças das escovas foram colocadas individualmente em tubos de 15 ml, que continham NaCl 0,9% e foram mantidas em geladeira. As células passaram por ciclos de lavagem e centrifugação e foram ressuspensas com 1 mL de uma solução fixadora contendo metanol:ácido acético (3:1, v/v). A solução de células foi distribuída em lâminas para serem coradas com fucsina e Fast green. Posteriormente, 1000 células foram analisadas por lâmina utilizando microscopia óptica e avaliando a presença de células com formação de micronúcleo.

1.5.2.2. Imunotoxicidade

1.5.2.2.1. Moléculas de Adesão

Foi utilizado sangue total para quantificação da porcentagem de linfócitos e monócitos expressando as moléculas de adesão CD54, CD18, CD62-P e CD62-L. Para quantificar a expressão das moléculas de adesão, o sangue total (50 µL) foi incubado no escuro por 30 minutos com 3 µL do respectivo anticorpo monoclonal. Os eritrócitos foram lisados após adição de uma solução de lise (Becton & Dickinson, São José, CA, EUA) e, após centrifugação, os leucócitos foram ressuspensos com PBS.

As células foram analisadas em citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton & Dickinson). Os linfócitos e monócitos foram selecionados por GATE manual, através dos parâmetros de granulosidade e complexidade. Por fim, a expressão das moléculas de adesão em linfócitos e monócitos do grupo de taxistas foi comparada à expressão das mesmas no grupo de não expostos ocupacionais. Os resultados são expressos como % de células (linfócitos ou monócitos) expressando a molécula de adesão em sua superfície.

1.5.2.2.2. Proteína Quimiotática de Monócitos 1 (MCP1)

As concentrações de MCP1 foram quantificadas em amostras de plasma utilizando método imunoenzimático (ELISA), de acordo com especificações fornecidas pelo fabricante (Becton & Dickinson, São José, CA, EUA). Os resultados foram expressos como pg mL⁻¹.

1.5.2.2.3. Imunoglobulinas e sistema complemento

Os níveis das imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA) e dos complementes 3 e 4 foram avaliados em soro por imunoturbidimetria utilizando kits Bioclin no equipamento BS-120 (Mindray, China). Já os níveis de IgE também foram quantificados em soro, mas em parceria com o HCPA, no Serviço de Patologia Clínica, utilizando imunoturbidimetria no equipamento Architect Ci 4100 da ABBOTT e utilizando kits da marca ABBOTT. Os resultados foram expressos como mg dL⁻¹ para as imunoglobulinas (G, M e A) e sistema complemento, e como UI mL⁻¹ para a IgE.

1.5.2.3. Nefrotoxicidade

1.5.2.3.1. Microalbuminúria

Os níveis urinários de albumina foram quantificados através de kit comercial imunoturbidimétrico da Bioclin no equipamento BS-120 (Mindray®, China). Os valores foram corrigidos pelo valor da creatinina urinária e os resultados expressos como mg microalbuminúria g⁻¹ creatinina.

1.5.2.3.2. N-acetil-β-D-glicosaminidase Urinária (NAG)

A quantificação da N-acetil-β-D-glicosaminidase urinária (NAG) foi realizada de acordo com Maruhn (1976). A amostra foi adicionada à uma solução contendo p-nitrofenil- N-acetil-β-D-glicosaminida dissolvida em solução tampão citrato de sódio 0,2 mol L⁻¹ (pH 4,4). A mistura resultante foi incubada a 37 °C por 15 minutos para que ocorresse hidrólise enzimática do substrato com liberação do íon p-nitrofenilato. O produto da reação foi quantificado por espectrofotometria em 405 nm. Os valores foram corrigidos pela concentração de creatinina urinária e expressos como U NAG g⁻¹ creatinina.

1.5.2.3.3. Parâmetros Bioquímicos de Função Renal

Creatinina urinária e sérica, ureia e ácido úrico séricos foram quantificados em soro através de Kits Comerciais Bioclin® por espectrofotometria no equipamento BS-120 (Mindray®, China).

1.5.2.4. Hemato e Hepatotoxicidade

1.5.2.4.1. Hemograma Completo

Os hemogramas completos foram realizados por método automatizado (Pentra XL80) e microscopia complementar (para contagem diferencial de leucócitos). Análise realizada no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT) da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

1.5.2.4.2. Enzimas Hepáticas

As dosagens séricas da aspartato aminotransferase (AST) alanina aminotransferase (ALT) e gama glutamiltransferase (GGT) foram realizadas por método colorimétrico enzimático utilizando kits Bioclin no equipamento BS-120 Mindray®.

1.5.2.5. Estresse Oxidativo

1.5.2.5.1. Antioxidantes enzimáticos

1.5.2.5.1.1. Atividade e Reativação da Enzima δ -aminolevulinato desidratase

A atividade e os índices de reativação da enzima δ -aminolevulinato desidratase (ALAD) foram dosados em sangue total com heparina por espectrofotometria, seguindo o método de Sassa (1981). A atividade enzimática foi determinada pela taxa de formação de porfobilinogênio (PBG) na presença e na ausência dos agentes ditioneitol (DTT) e $ZnCl_2$. Para a atividade da ALAD, a amostra hemolisada com triton foi pré-incubada por 10 minutos e a reação enzimática foi iniciada pela adição de ácido δ -aminolevulínico (ALA) 4 mM em solução tampão fosfato de potássio (TFK) pH 6,8,

perfazendo 1 h de reação a 37°C. Para a determinação dos índices de reativação da enzima, a única diferença foi a adição de DTT 2 mM e ZnCl₂ 100 mM nos tubos antes do período de pré-incubação. O produto de ambas as reações foi quantificado a 555 nm. Os índices de reativação foram determinados pela equação: $A - B / A \times 100$, onde A= absorbância da ALAD com DTT/ ZnCl₂; B= absorbância da ALAD sem DTT/ ZnCl₂. A atividade da ALAD foi expressa em U/L (nmol PBG/h/mg Hb) e os índices de reativação em porcentagem (%).

1.5.2.5.2. Antioxidantes não enzimáticos

1.5.2.5.2.1. Antioxidante não enzimático endógeno

Os níveis de grupos tiólicos não-proteicos, representados majoritariamente pela glutathiona reduzida (GSH) eritrocitária, foram determinados por espectrofotometria a 412 nm, de acordo com método de Ellman (1959). O conteúdo de tióis não-proteicos foi expresso em GSH mM * (Ht/Hb).

1.5.2.5.2.2. Antioxidantes não enzimáticos exógenos

A quantificação simultânea de vitamina E, retinol, β-caroteno e licopeno foi realizada de acordo com Charão e colaboradores (2012). As amostras plasmáticas foram extraídas com uma solução de etanol:n-butanol (50:50, v/v) e o sobrenadante foi injetado no sistema de CLAE. A quantificação do β-caroteno e licopeno foi realizada com detector visível em 450 nm. A fluorescência com dois diferentes comprimentos de onda de excitação e emissão foi monitorada para a quantificação do retinol (exc.: 340 e em.: 520 nm) e α-tocoferol (exc.: 298 e em.: 328 nm). Os resultados foram expressos em μmol L⁻¹.

Os níveis séricos de vitamina C foram determinados por CLAE com detector ultravioleta, de acordo com o método de (Baierle *et al.*, 2012). O tris [2-carboxietil] hidrocloreto de fosfina (TCEP) foi utilizado como agente redutor. Após a desproteinização da amostra com ácido perclórico 10% (v/v), o sobrenadante obtido após centrifugação foi injetado no cromatógrafo. Os níveis séricos de vitamina C foram expressos em mg L⁻¹.

1.5.3. Biomarcadores de Suscetibilidade

1.5.3.1. Polimorfismo Enzimático

O material genético foi isolado a partir de sangue total com EDTA pelo método de salting out (Lahiri e Nurnberger Jr, 1991). O polimorfismo da enzima ALAD foi determinado através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real utilizando sondas Taqman® para a detecção do SNP rs1800435, através do equipamento StepOne (Applied Biosystems). O volume de reação final foi de 13 µL, e a ciclagem do equipamento foi programada para as amostras serem aquecidas por 30 segundos a 60 °C, seguidos de 10 minutos a 95 °C e incubação de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C. Em todas as reações foram realizados controles negativos, e foi realizado sequenciamento dos 2 genótipos encontrados nos resultados de PCR para confirmação do SNP.

Já os polimorfismos de alelo nulo para as enzimas GSTM1 e GSTT1 foi determinado usando os seguintes primers (5'-3'):

GSTM1: F-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC e R-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG;

GSTT1: F-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC e R-TCACCGGATCATGGCCAGCA;

ALBUMINA: F-GCCCTCTGCTAACAAGTCCTAC e R-GCCCTAAAAAGAAAATCGCCAATC.

A reação de amplificação foi realizada utilizando um protocolo de PCR no instrumento Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) com 100 ng de DNA e volume final de reação de 25 µL. As reações ocorreram utilizando 0,02 U µL⁻¹ de Taq Polymerase em tampão contendo 0,4 µM de cada primers; 0,2 mM de cada dNTP (adenosina, citosina, guanina e timidina); tris-HCl 10 mM pH 8,9; KCl 50 mM; e MgCl₂ 2 mM. As amostras foram aquecidas no termociclador por 5 minutos a 95 °C, e as incubações continuaram por 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 45 segundos a 62 °C e 30 segundos a 72 °C. Os produtos de PCR de 215 pb (GSTM1), 350 pb (albumina) e 480 pb (GSTT1) foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com SYBR Safe (Thermo Fisher Scientific) após a corrida eletroforética de 30 min, a 15 A e 300 mV.

Os polimorfismos das enzimas OGG1 (SNP rs1052133) e CYP1A1 (SNP rs1048943) serão ainda avaliados por genotipagem através do método de PCR em tempo real. Estas análises foram e serão realizadas em parceria com o HCPA na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) e no Centro de Terapia Gênica (CTG).

1.5.3.2. Expressão Gênica

Expressões gênicas de marcadores de câncer (p53 e CD26), da molécula de adesão ICAM-1, enzima antioxidante heme oxigenase-1 (HMOX-1) e da enzima de reparo ao DNA 8-oxoguanina DNA glicosilase-1 (OGG1) foram realizadas na UAMP do HCPA.

Após a separação da células mononucleares por densidade de centrifugação utilizando o Ficcol-Histopaque (Sigma Aldrich), o RNA total foi extraído dos mononucleares através lise celular com trizol na proporção 1:3 (amostra:trizol). As amostras foram então extraídas com clorofórmio agitando-se em vórtex por 15 segundos e centrifugando-se a 12000xg por 15 minutos para separar as fases orgânica e aquosa. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e a ela foi adicionado 500 µL de álcool isopropílico para biologia molecular (Sigma Aldrich) a fim de precipitar o RNA em banho de gelo por 10 minutos. Após centrifugação por 10 min a 12000xg e 4 °C, o isopropanol foi removido por inversão do tubo e foi adicionado 1 mL de etanol 70% (etanol para biologia molecular, Sigma Aldrich) preparado com água DEPC para lavar o pellet de RNA e auxiliar na secagem do mesmo. Depois de secas por não mais que 10 minutos, as amostras foram ressuspendidas em 20 µL de água DEPC.

A concentração e pureza do RNA foram quantificadas utilizando o espectrofotômetro Nanodrop Thermo 1000 (Thermo Scientific, EUA). Após a quantificação, as amostras foram tratadas com DNase (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), na proporção de 1 µL DNase:1 µg RNA, com o objetivo de eliminar qualquer resíduo de DNA na amostra. Em seguida, a conversão do RNA a cDNA foi realizada utilizando o kit High Capacity cDNA Transcription (Thermo Scientific) e utilizando o termociclador Veriti® 96-Well Fast (Applied Biosystems™, EUA) com as

condições ideais para atividade da enzima transcriptase reversa, de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras de cDNA obtidas foram então diluídas para uma concentração final de $1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ com água DEPC. O ensaio de expressão gênica ocorreu como uma reação duplex no sistema de PCR em tempo real StepOne (Thermo Scientific) com um volume final de reação de $10 \mu\text{L}$ por poço e utilizando sondas TaqMan (Thermo Scientific). Como controle endógeno foi utilizado a beta-actina.

As reações se deram em placas de 48 poços, adicionando-se $5 \mu\text{L}$ do tampão de expressão gênica Master Mix (Thermo Scientific), $0,5 \mu\text{L}$ de cada par de primers (gene alvo (FAM) e beta-actina (VIC)), $1 \mu\text{L}$ de água DEPC e $3 \mu\text{L}$ de amostra (total 3 ng). As reações foram realizadas em duplicata para cada amostra, bem como um controle negativo com água foi utilizado em cada placa de reações. Os resultados foram analisados no próprio software do equipamento. O número de vezes que a expressão gênica dobra em relação ao gene constitutivo e em relação ao grupo controle foi calculada como $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. O $\Delta\Delta\text{Ct}$ foi calculado usando o ΔCt1 (Ct do gene alvo – Ct da beta-actina) – ΔCt2 (média total de todos ΔCt1 do grupo controle).

1.6. Análises Estatísticas

As análises estatísticas dos resultados adicionais deste Capítulo IV foram realizadas com o total de 141 indivíduos (85 taxistas e 56 indivíduos NEO). Os dados foram analisados utilizando o *software* IBM SPSS *Statistics* versão 22. Em relação às variáveis contínuas, primeiramente foi realizado o teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* para verificar a distribuição de cada uma e classificá-la como paramétrica ou não paramétrica. As variáveis foram então comparadas entre grupos utilizando-se o teste *t* de *Student* (paramétricas) ou *Mann-Whitney* (não paramétricas) e as correlações entre variáveis foram avaliadas através da correlação de *Pearson* ou *Spearman*, conforme a distribuição das variáveis em estudo. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EP) ou como mediana (intervalo interquartil ou amplitude). Para comparações de frequência entre duas variáveis categóricas, foi empregado o teste Qui-Quadrado. Quando alguma variável do estudo apresentou relação com a idade, presença de doença crônica ou fumo passivo, foi realizado teste de covariação ANCOVA para controlar estes fatores e fazer comparações entre

grupos. Além disso, correlações parciais também foram realizadas ajustando-se esses fatores confundidores. O nível de significância estatística utilizado foi de 5% ($p < 0,05$).

2. RESULTADOS

2.1. Caracterização da população estudada

Em relação à sua cor/raça, a maioria dos participantes do estudo se autodeclarou como branca, sendo que o grupo de não expostos ocupacionalmente à poluição atmosférica (NEO) apresentou maior porcentagem de autodeclarados brancos e não houve nenhum autodeclarado de cor parda dentro deste mesmo grupo (Figura 2).

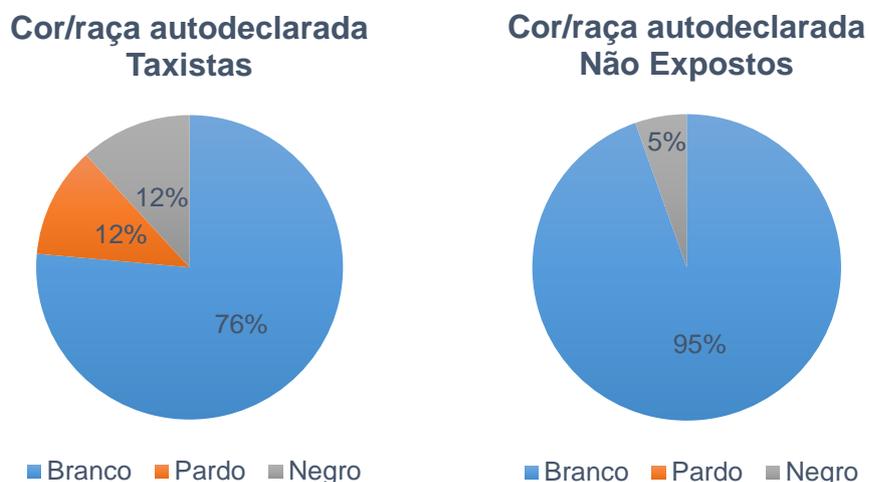


Figura 2. Cor/raça autodeclaradas pelos participantes dos grupos do estudo. Valores expressos como % dentro do grupo em questão.

Em relação ao local de trabalho, todos os indivíduos do grupo de NEO trabalhavam com atividades administrativas internas à instituição bancária participante e, portanto, reclusos da exposição à poluição atmosférica durante o trabalho. Quanto aos taxistas, a grande maioria indicou trabalhar em pontos de táxi localizados em meio a intenso tráfego de veículos como pode ser observado na Figura 3.

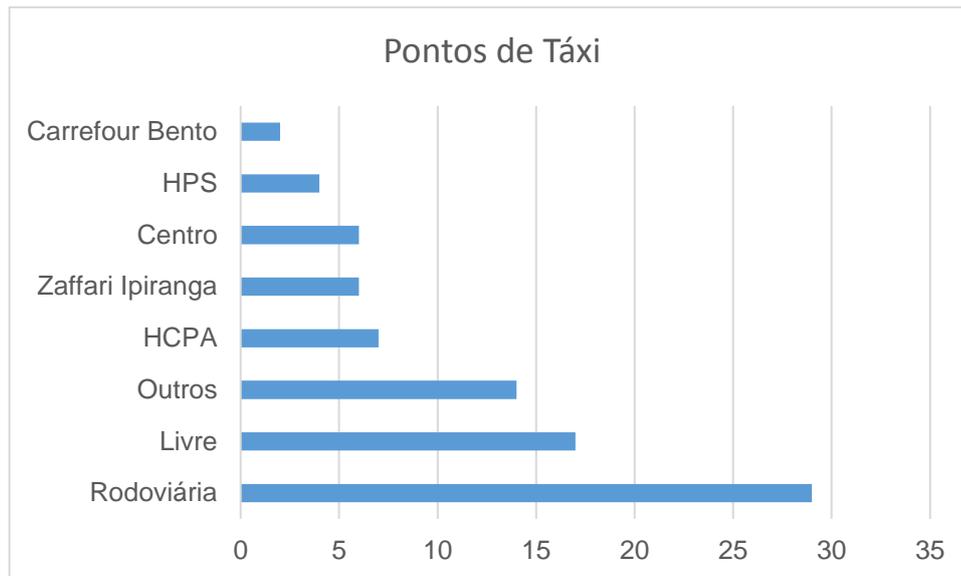


Figura 3. Pontos de trabalho dos taxistas dentro da cidade de Porto Alegre. Valores expressos como número de taxistas que trabalha no referido ponto de táxi. HPS: Hospital de Pronto Socorro; HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Quando questionados sobre sua profissão anterior à atual, apenas 12,5% dos indivíduos do grupo controle relataram ter alguma outra profissão que não envolvesse atividade administrativa em local fechado, garantindo que os indivíduos deste grupo de fato foram ou são menos expostos ocupacionalmente à poluição que o grupo de taxistas. Além disso, 42,3% dos taxistas também relataram uma profissão anterior com atividades administrativas, demonstrando que a atual exposição ocupacional à poluição nestes participantes não apresenta efeitos cumulativos. Entretanto, 15 taxistas (quase 18%) informaram terem trabalhado profissionalmente como motoristas antes e 7% dos taxistas informaram que sempre trabalharam nesta profissão, apresentando então uma exposição e riscos de dano inerentes a ela e cumulativos ao longo dos anos (Figura 4).

Profissão Anterior NEO

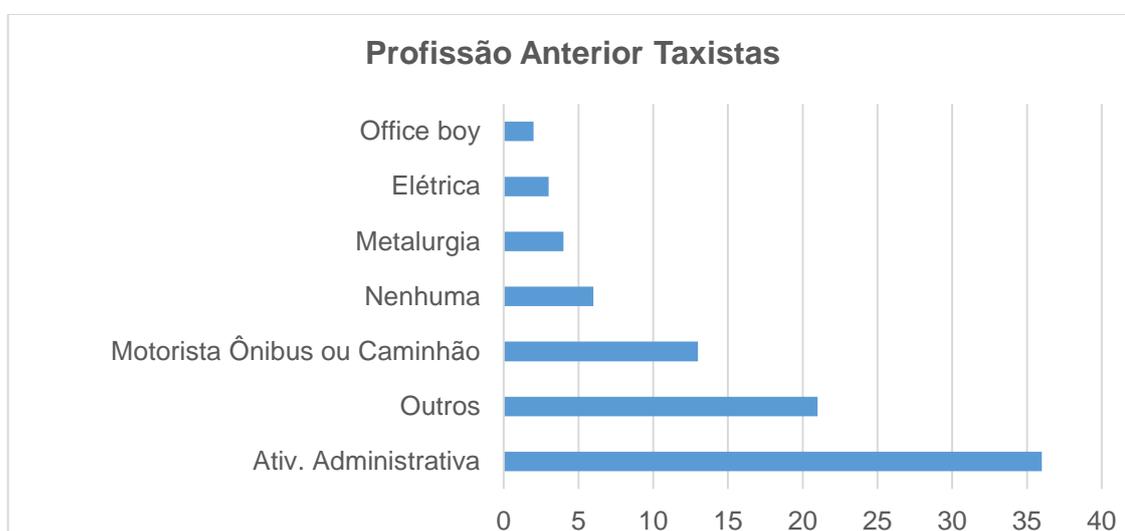
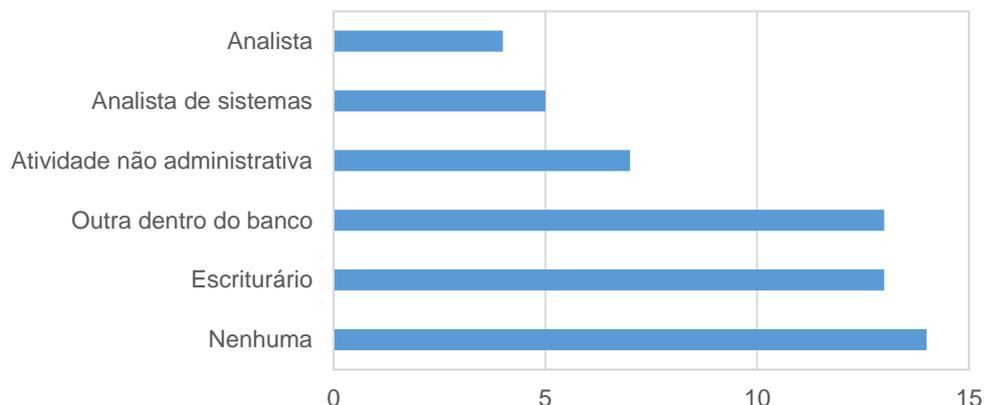


Figura 4. Profissões antecedentes à atual de ambos os grupos estudados. Valores expressos como número de taxistas ou não expostos que tiveram a referida profissão.

2.1.1. Resultados obtidos através do questionário

Quando questionados sobre o histórico familiar de câncer, os tipos mais citados dentre os participantes do grupo NEO foram: câncer de mama (32,1%), no trato digestivo (23,2%), não especificado (19,6%), de pulmão (16,1%), de próstata (14,1%), leucemia (8,9%), de pele (8,9%), boca/traqueia/esôfago (8,9%) e renal (7,1%). Já no grupo de taxistas, os cânceres mais citados foram: não especificado (20%), trato digestivo (17,6%) próstata (17,6), boca/traqueia/esôfago (12,9%), pulmão (8,2%), mama (7,1%) e de pele (5,9%) e leucemia (4,7%).

Além disso, os participantes também responderam se eram portadores de alguma doença crônica não infecciosa e se em sua família havia histórico das mesmas

(Tabela 1). De uma maneira geral, os taxistas apresentam mais doenças crônicas que os indivíduos não expostos, com destaque para diabetes e hipercolesterolemia, ao passo que os indivíduos não expostos relataram ligeiramente mais casos de hipertensão arterial que os taxistas. Semelhantemente, quando comparados o histórico familiar dos grupos, é possível observar que os pais dos taxistas também apresentaram maior frequência de doenças crônicas, podendo então estas doenças terem cunho genético e não ocupacional.

Tabela 1. Doenças crônicas entre não expostos (n= 56) taxistas (n= 85) e histórico familiar. Sendo, HC: hipercolesterolemia. AVC= acidente vascular cerebral. HAS= hipertensão arterial sistêmica.

	Grupos	Participante		Histórico Familiar			
		n (%)	Pai (%)	Mãe (%)	Irmãos (%)	Avós (%)	Primos/Tios (%)
Diabetes	1	6 (10,7)	7,1	14,3	25	3,6	23,2
	2	14 (16,5)	22,3	24,7	18,8	7,1	17,6
HC	1	2 (3,5)	1,8	3,6	-	1,8	-
	2	11 (12,9)	2,3	4,7	-	1,2	-
AVC	1	-	7,1	7,1	26,8	1,8	7,1
	2	-	14,1	10,6	9,4	3,5	10,6
Problemas	1	-	23,2	10,7	33,9	1,8	12,5
Cardíacos	2	1 (1,2)	28,2	16,5	16,5	4,7	17,6
HAS	1	15 (26,8)	23,2	25	30,4	16,1	17,9
	2	20 (23,5)	20	24,7	16,5	9,4	4,7

1= NEO (não expostos ocupacionalmente); 2= taxistas.

Seguindo a classificação proposta aos participantes através do questionário, foi possível observar que a maioria dos taxistas e NEO classificam seu estado de saúde como “bom”, mas uma maior porcentagem de NEO em relação aos taxistas classifica ainda seu estado de saúde como “muito bom”. Além disso, houve uma diferença estatística significativa entre a média geral das frequências (%) de classificação dos grupos, provando que há diferença sobre a opinião pessoal dos trabalhadores sobre seu estado de saúde, tendo uma pior classificação entre os taxistas (Tabela 2).

Tabela 2. Comparativo da classificação pessoal dos participantes sobre estado de saúde.

Sentem-se	NEO	Taxistas
Muito Mal (n) (%)	0 (0%)	1 (1,2%)
Mal (n) (%)	2 (3,6%)	4 (4,7%)
Bem (n) (%)	37 (66,1%)	71 (83,5%)*
Muito Bem (n) (%)	17 (30,4%)	9 (10,6%)*

NEO: não expostos ocupacionalmente à poluição atmosférica. %: Porcentagem dentro do respectivo grupo. * Média das frequências significativamente diferente em relação ao grupo NEO ($p < 0,05$) (teste qui-quadrado).

Em relação à frequência de sintomas relatada em resposta ao questionário, foi possível observar que os taxistas relatam maior frequência de sintomas de irritação nos olhos e no nariz, ao passo que os indivíduos do grupo NEO relatam mais sintomas de alergia, rinite, dor muscular, insônia, sonolência e distúrbios respiratórios. Em relação à razão de chances, taxistas apresentaram relevantes chances, porém não significativas, em relação aos NEO de apresentar irritação nos olhos e na pele, coceiras, bronquite, alteração na salivação (boca seca ou salivação excessiva) e tremores (Tabela 3).

Tabela 3. Sintomas relatados pelos participantes, dado em frequência (%), e razão de chances de taxistas apresentarem os sintomas em relação aos não expostos ocupacionalmente (NEO) a poluição atmosférica. Sendo: N (nunca), AV (às vezes), S(sempre), %: Porcentagem dentro do respectivo grupo.

Sintomas (%)	NEO (n= 56)			Taxistas (n= 85)			Razão de Chances
	N	AV	S	N	AV	S	Taxistas/ NEO
Dor de Cabeça	33,9	62,5	3,6	38,8	55,3	5,9	0,809
Tontura	80,4	19,6	0,0	78,8	17,6	3,5	1,099
Vertigem	89,3	10,7	0,0	88,2	10,6	1,2	1,111
Dor de Estômago	62,5	37,5	0,0	69,4	25,9	4,7	0,848
Irritação no Nariz*	53,6	39,3	7,1	57,6	22,4	20,0	0,734
Irritação nos Olhos*	58,9	41,1	0,0	45,9	42,4	11,8	1,614
Irritação na Pele	75,0	25,0	0,0	81,2	17,6	1,2	1,692
Lesão nas Mãos	94,6	3,6	1,8	92,9	3,5	3,6	0,696
Coceira	69,6	30,4	0,0	76,5	21,2	2,4	1,342
Alergia**	62,5	35,7	1,8	88,2	10,6	1,2	0,706
Palpitações	76,8	23,2	0,0	84,7	14,1	1,2	0,597
Bronquite	94,6	5,4	0,0	89,4	7,1	3,5	2,092
Falta de Ar	85,7	14,3	0,0	85,9	12,9	1,2	0,986
Rinite*	46,4	48,2	5,4	54,1	28,2	17,6	0,735
Dor na Coluna	41,1	46,4	12,5	40,0	42,4	17,6	1,045
Cansaço	33,9	60,7	5,4	41,2	43,5	15,3	0,734
Problema Auditivo	78,6	21,4	0,0	76,5	17,6	5,9	1,128
Dor Muscular**	44,6	55,4	0,0	56,5	30,6	12,9	0,622
Sonolência**	41,1	57,1	1,8	65,9	27,1	7,1	0,361
Alteração Salivação	89,3	10,7	0,0	75,3	20,0	4,7	2,734
Tremores	96,4	3,6	0,0	91,8	5,9	2,4	2,423
Insônia*	66,1	32,1	1,8	80,0	14,1	5,9	0,487
Alteração de Humor	53,6	44,6	1,8	52,9	40,0	7,1	1,026
Distúrbio	82,1	16,1	1,8	89,4	4,7	5,9	0,545
Respiratório*							

* e **: Frequência de sintomas significativamente diferente entre os grupos ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). Razão de chances para observação dos sintomas entre os grupos (taxistas sobre controles), calculada considerando a soma da frequência das respostas às vezes e sempre de cada grupo e considerando um intervalo de confiança de 95%.

2.1.2. Características alimentares

Os hábitos alimentares dos participantes foram avaliados e classificados de acordo com os passos recomendados pelo Guia Alimentar do Ministério da Saúde de 2006 (Guia De Alimentação, 2006) em aderidos ou não aderidos, como segue:

Passo 1: Aderido = ingerir frutas, verduras e legumes diariamente;

Passo 2: Aderido = consumir feijão pelo menos quatro vezes por semana;

Passo 3: Aderido = consumir alimentos gordurosos no máximo uma vez por semana;

Passo 4: Aderido = resposta negativa à pergunta sobre adição de sal nos alimentos já preparados;

Passo 5: Aderido = reduzir à duas vezes ou menos por semana a frequência do consumo de alimentos ricos em açúcar;

Passo 6: Aderido = consumir refrigerantes e bebidas alcoólicas em uma frequência igual ou inferior a seis vezes;

Passo 7: Aderido = negativa à pergunta relativa à velocidade da refeição.

Passo 8: Aderido = praticar algum tipo de atividade física pelo menos duas vezes na semana.

Tabela 4. Frequência de aderência dos participantes às recomendações do Guia Alimentar do Ministério da Saúde de 2006.

	NEO (n= 56)	Taxistas (n= 85)
Passo 1 (n) (%)	4 (7,1%)	16 (18,8%)*
Passo 2 (n) (%)	22 (39,3%)	59 (69,4%***
Passo 3 (n) (%)	16 (28,6%)	23 (27,1%)
Passo 4 (n) (%)	46 (82,1%)	71 (83,5%)
Passo 5 (n) (%)	33 (58,9%)	45 (52,9%)
Passo 6 (n) (%)	51 (91,1%)	61 (71,8)**
Passo 7 (n) (%)	19 (33,9%)	36 (42,3%)
Passo 8 (n) (%)	32 (57,1%)	29 (34,1%)**

NEO: não expostos ocupacionalmente à poluição atmosférica. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$: frequência de aderência significativamente diferente entre os grupos (teste qui-quadrado).

Foi possível observar que os taxistas têm uma maior frequência na ingestão de frutas, saladas, legumes e oleaginosas (feijão), ao passo que também ingerem mais refrigerantes e praticam menos atividade física em relação aos indivíduos NEO.

2.2. Biomarcadores de efeito

2.2.1. Análises hematológicas e bioquímicas

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos nas análises hematológicas e bioquímicas realizadas nas amostras sanguíneas em ambos os grupos de estudo. A Tabela 6 mostra os resultados das análises de parâmetros imunológicos (sistema complemento e imunoglobulinas).

O grupo de indivíduos expostos apresentou uma contagem sanguínea significativamente maior de linfócitos, monócitos e basófilos ($p < 0,05$). Quanto aos parâmetros bioquímicos, os taxistas apresentaram níveis circulantes significativamente maiores de glicose, triglicerídeos e IgA e níveis diminuídos de HDL.

O grupo dos taxistas apresentou níveis médios de glicose circulante significativamente maiores que o grupo não exposto ($p < 0,001$). Cerca de 48,2% dos taxistas e apenas 12,5% dos NEO estavam acima dos valores de referência estabelecidos, sendo estas porcentagens significativamente diferentes ($p < 0,001$). Considerando estes valores, os taxistas têm 3,86 vezes mais chances de apresentar hiperglicemia que os NEO.

Apesar de os taxistas apresentarem níveis significativamente mais baixos de colesterol HDL que o grupo de NEO ($p < 0,001$), a média de ambos os grupos estava abaixo do valor de referência: 92,9% dentre os taxistas e 73,2% dentre os NEO e estas porcentagens também foram significativamente diferentes ($p < 0,01$).

Quando avaliados os níveis de triglicerídeos circulantes, a média de ambos os grupos estava acima dos valores de referência. Além disso, foi observada média triglicéridica maior nos taxistas ($p < 0,05$), dos quais 57,6% estavam acima dos valores de referência contra 39,3% dos não expostos (diferença de porcentagens significativa ($p < 0,05$)).

Tabela 5. Parâmetros bioquímicos e hematológicos avaliados nos dois grupos de estudo.

	NEO (n= 56)	Taxistas (n= 85)	Valores de referência
Parâmetros Hematológicos ^a			
Eritrócitos (10 ⁶ mm ⁻³)	4,96 ± 0,06	5,01 ± 0,53	4,5 – 6,1
Hemoglobina (g dl ⁻¹)	15,15 ± 0,18	15,19 ± 0,15	12,8 – 17,8
Hematócrito (%)	45,10 ± 0,51	45,60 ± 0,43	39 – 53
Leucócitos (10 ³ mm ⁻³)	6,88 ± 0,21	7,21 ± 0,18	3,6 – 11
Neutrófilos (10 ³ mm ⁻³)	3,79 ± 0,18	4,05 ± 0,13	1,5 – 7,0
Neutrófilos (%) ^b	53,98 ± 1,12	55,75 ± 0,79	36 – 66
Linfócitos (10 ³ mm ⁻³)	2,33 ± 0,07	2,34 ± 0,07	1,0 – 4,5
Linfócitos (%) ^b	35,32 ± 1,01	32,82 ± 0,74*	25 – 45
Monócitos (10 ³ mm ⁻³)	0,49 ± 0,02	0,55 ± 0,02*	0,1 – 1,0
Monócitos (%) ^b	7,20 ± 0,24	7,73 ± 0,25	2 – 10
Eosinófilos (10 ³ mm ⁻³)	0,23 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,0 – 0,5
Eosinófilos (%) ^b	3,34 ± 0,24	3,55 ± 0,18	2 – 4
Basófilos (10 ³ mm ⁻³)	0,011 ± 0,00	0,013 ± 0,00*	0,0 – 0,2
Basófilos (%) ^b	0,16 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,0 – 1,0
Plaquetas (10 ³ mm ⁻³)	236,16 ± 7,73	242,40 ± 7,55	140 – 400
Parâmetros Bioquímicos ^b			
PCR (mg L ⁻¹)	3,40 ± 0,55	3,96 ± 0,48	Desejável < 8
Glicose (mg dL ⁻¹)	89,89 ± 2,58	108,18 ± 3,52***	65 a 99
Colesterol Total (mg dL ⁻¹)	216,25 ± 6,73	218,82 ± 5,49	Desejável < 200
Colesterol HDL (mg dL ⁻¹)	53,36 ± 1,30	47,07 ± 1,02***	Desejável > 60
Triglicérides (mg dL ⁻¹)	158,63 ± 12,25	215,74 ± 23,66*	Desejável < 150
FAL (U L ⁻¹)	75,09 ± 3,32	76,33 ± 2,28	27 – 100
AST (U L ⁻¹)	27,88 ± 1,10	27,92 ± 1,58	11 – 39
ALT (U L ⁻¹)	31,91 ± 1,86	34,88 ± 2,40	11 – 45
GGT (U L ⁻¹)	37,23 ± 2,26	47,12 ± 4,55	< 60,0
Proteínas Totais (g dL ⁻¹)	7,73 ± 0,05	7,73 ± 0,06	6 – 8
Ácido Úrico (mg dL ⁻¹)	6,17 ± 0,19	5,99 ± 0,23	2,5 – 7,0
Creatinina (mg dL ⁻¹)	1,01 ± 0,02	1,03 ± 0,01	0,4 – 1,4
Ureia (mg dL ⁻¹)	32,84 ± 0,82	34,84 ± 0,84	15 – 40

NEO: não expostos ocupacionalmente a poluição atmosférica; PCR: proteína C reativa; FAL: fosfatase alcalina; AST: aspartato amino transferase; ALT: alanina amino transferase; GGT: gama-glutamil transferase. Valores expressos como média ± erro padrão da média.

^a Os valores de referência apresentados foram fornecidos pelo LACT e são referentes ao sexo e idade do paciente.

^b Valores de referência informados em bulas dos kits utilizados da marca Bioclin.

Tabela 6. Parâmetros imunológicos (sistema complemento e imunoglobulinas) avaliados nos dois grupos de estudo.

Parâmetros imunológicos séricos	NEO (n= 56)	Taxistas (n= 85)	Valores de referência
C3 (mg dL ⁻¹)	138,3 (109,1-194,9)	141,3 (99,6-192,3)	75 – 175
C4 (mg dL ⁻¹)	28,0 (16,9-58,7)	29,7 (13,8-53,9)	9 – 36
IgA (mg dL ⁻¹)	231 (108-672)	313 (109-752)***	70 – 380
IgE (UI mL ⁻¹) ^a	49,6 (25-401)	45,85 (25-1617)	< 100
IgG (mg dL ⁻¹)	1195 (958-1733)	1218 (709-1870)	650 – 1500
IgM (mg dL ⁻¹)	94,1 (31,7-252,0)	75,4 (24,5-813,1)	38 – 280

NEO: Não expostos ocupacionalmente. Valores expressos como mediana (limite inferior-limite superior). Valores de referência informados em bulas dos kits utilizados da marca Bioclin. ^aValores de referência estabelecido pelo kit comercial marca Abbott.

2.2.2. Biomarcadores de estresse oxidativo e inflamação

Na análise de atividade das enzimas antioxidantes endógenas, observamos que o grupo de taxistas apresentou maior atividade de GST ($3,66 \pm 0,16$ U mg⁻¹ protein) em relação ao grupo de NEO ($3,09 \pm 0,10$ U mg⁻¹ proteína) ($p < 0,05$).

As concentrações plasmáticas dos antioxidantes exógenos vitamina E, betacaroteno e retinol (Figuras 5A e 5B) encontravam-se significativamente aumentadas no grupo de expostos em relação aos NEO ($p < 0,05$).

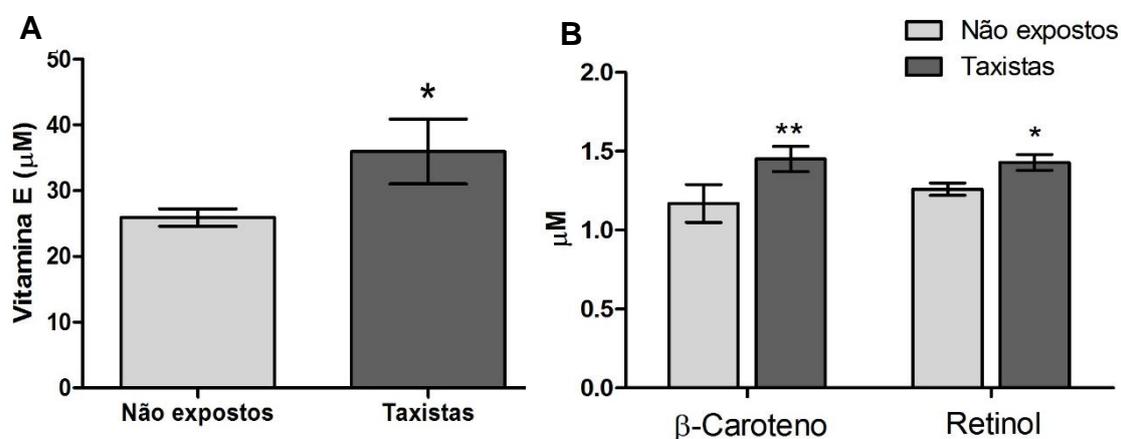


Figura 5. Níveis plasmáticos expressos como µM do antioxidante não-enzimático exógeno. **A)** Vitamina E. **B)** Betacaroteno e Retinol. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$: teste ANCOVA ajustado para idade, doença crônica e fumo passivo.

2.2.3. Biomarcadores de nefrototoxicidade

Os biomarcadores precoces de dano renal em nível de glomérulos e túbulos renais, microalbuminúria e NAG, mostraram-se significativamente maiores no grupo dos ocupacionalmente expostos ($p < 0,05$), como pode ser observado na Figura 6.

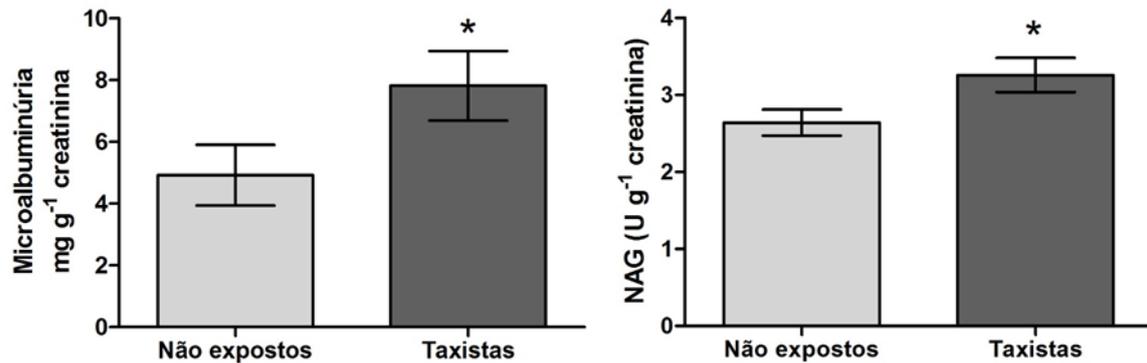


Figura 6. Biomarcadores de dano renal precoce. **A)** Microalbuminúria urinária. **B)** N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) urinária. * $p < 0,05$: teste ANCOVA ajustado para idade, doença crônica e fumo passivo.

2.2.4. Biomarcadores de genotoxicidade

O grupo de taxistas apresentou níveis significativamente maiores de dano ao DNA observado através do ensaio cometa, tanto pela variável % DNA na cauda quanto pela variável momento de cauda ($p < 0,001$), bem como maior frequência de células apresentando micronúcleos ($p < 0,001$) em relação ao grupo de NEO (Tabela 7).

Tabela 7. Avaliação do dano ao DNA e mutagenicidade entre expostos e não expostos ocupacionalmente à poluição atmosférica.

Cometa		NEO	Taxistas
Não enzimático	% DNA na cauda	7,37 (6,9-8,4)	9,39 (9,6-10,7) ^a
	Momento de cauda	2,07 (2,3-3,4)	2,44 (2,1-3,2) ^a
FPG	% DNA na cauda	-	8,74 (6,7-11,9) ^b
	Momento de cauda	-	2,05 (1,4-4,4) ^c
ENDO II	% DNA na cauda	-	8,84 (6,5-11,1) ^d
	Momento de cauda	-	2,05 (1,5-5,4) ^d
Frequência de MN/10 ³ células		0,0 (0,0-2,0)	1,0 (0,0-4,0) ^e

Resultados expressos como mediana (limite inferior-limite superior). NEO: não expostos ocupacionalmente à poluição atmosférica outdoor.

^a Diferença significativa entre grupo não exposto (n= 47) e grupo exposto (n= 78) ($p < 0,001$). Teste ANCOVA ajustado para idade, doença crônica e fumo passivo.

^b Diferença significativa entre cometa não enzimático e com FPG em taxistas (n= 35) ($p < 0,001$). Teste de Wilcoxon que compara as diferenças de medianas entre amostras pareadas.

^c Diferença significativa entre cometa não enzimático e com FPG em taxistas (n= 35) ($p < 0,01$). Teste de Wilcoxon que compara as diferenças de medianas entre amostras pareadas.

^d Diferença significativa entre cometa não enzimático e com ENDOIII em taxistas (n= 23) ($p < 0,01$). Teste de Wilcoxon que compara as diferenças de medianas entre amostras pareadas.

^e Diferença significativa entre grupo não exposto ocupacionalmente (n= 51) e taxistas (n= 82) ($p < 0,001$). Teste ANCOVA ajustado para idade, doença crônica e fumo passivo.

2.3. Biomarcadores de Suscetibilidade

Para análise dos polimorfismos das enzimas GSTM1 e GSTT1 foram considerados os alelos nulo (alelos duplamente negativos para a respectiva enzima) e positivo (alelos duplamente positivos ou com um alelo negativo e outro positivo para as respectivas enzimas). Nenhum participante apresentou o genótipo homozigoto mutado (GG ou ALAD2) para a enzima ALAD. Além disso, não houve diferença estatística entre os grupos estudados para genótipos das 3 enzimas avaliadas até o momento (Tabela 8).

Para avaliar a diferença dos biomarcadores entre os grupos de genótipos de cada enzima, foi realizada a análise de covariação ANCOVA, controlando para idade, doença crônica e fumo passivo.

Indivíduos com o genótipo nulo de GSTT1 apresentaram níveis significativamente menores de IgE ($108,25 \pm 46,32$ UI mL⁻¹) e ácido úrico ($5,56 \pm 0,28$ mg dL⁻¹) quando comparados aos de genótipo positivo para esta enzima ($157,92 \pm 31,77$ UI mL⁻¹ e $6,22 \pm 0,19$ mg dL⁻¹, respectivamente) ($p < 0,05$).

Para o polimorfismo da GSTM1 foram encontrados valores significativamente menores dos metais de Cu e As, e maiores de CD18 em monócitos nos indivíduos que apresentaram genótipo nulo da enzima quando comparados aos de genótipo positivo ($p < 0,05$), sendo os níveis de Cu: $758,09 \pm 17,22$ (nulo) vs. $800,83 \pm 12,96$ (positivo); As: $12,24 \pm 0,51$ µg L⁻¹ (nulo) vs. $13,63 \pm 0,50$ µg L⁻¹ (positivo); e CD18 em monócitos: $98,67\% \pm 0,20$ µg L⁻¹ (nulo) vs. $97,49\% \pm 0,49$ µg L⁻¹ (positivo). Além disso, o genótipo nulo mostrou ter efeito protetivo contra o dano oxidativo ao DNA, onde a % de DNA na cauda revelado pela enzima de reparo endonuclease III foi significativamente menor nos indivíduos com deleção dos alelos de GSTM1 ($7,70 \pm 0,26$) quando comparados aos de genótipo positivo ($9,10 \pm 0,34$) ($p < 0,01$).

Adicionalmente, foram observadas diferenças significativas para os níveis de Cu, Zn e CD62-L em linfócitos entre os participantes com genótipo ALAD homozigoto selvagem (ALAD1) e com genótipo ALAD heterozigoto (ALAD1-2) ($p < 0,05$). Em suma, foi observado redução nestes biomarcadores de exposição e efeito nos indivíduos no alelo mutado para ALAD (valores descritos abaixo).

Cu: $788,51 \pm 11,00$ µg L⁻¹ (ALAD1) vs. $729,54 \pm 35,50$ µg L⁻¹ (ALAD1-2);

Zn: 5467 ± 82 µg L⁻¹ (ALAD1) vs. 5185 ± 259 µg L⁻¹ (ALAD1-2);

CD62-L em linfócitos: $61,19\% \pm 0,98$ (ALAD1) vs. $52,26\% \pm 2,15$ (ALAD1-2).

Tabela 8. Frequência dos genótipos encontrados para os polimorfismos avaliados nos dois grupos do estudo.

	Alelos	NEO n= 56	Taxistas n= 85
GSTM1 (%)	Nulo	47,3	49,4
	Positivo	52,7	50,6
GSTT1 (%)	Nulo	23,6	24,1
	Positivo	76,4	75,9
ALAD (%)	CC	89,3	87,1
	CG	10,7	12,9

NEO: não expostos ocupacionalmente à poluição outdoor.

2.4. Correlações

2.4.1. Sintomas *versus* biomarcadores de exposição e efeito

Quanto maior a carga horária semanal e maiores os níveis de As pior foi a avaliação do estado de saúde dos participantes ($r = -0,210$ e $-0,221$; $p < 0,05$), enquanto o Co e Mn estavam associados à melhora do escore de avaliação pessoal quanto ao estado de saúde ($r = 0,247$ e $0,212$; $p < 0,05$). Por outro lado, menor foi o escore de qualificação do estado de saúde, ou seja, o estado de saúde foi pior avaliado quanto maior a frequência relatada de sintomas como vertigem ($r = -0,235$; $p < 0,01$), palpitações ($r = -0,209$; $p < 0,05$) e cansaço ($r = -0,347$; $p < 0,001$).

Observando a frequência de sintomas relatados pelos indivíduos e sua relação com biomarcadores de efeito, quanto maiores os níveis de colesterol, maior era a frequência relatada de distúrbios respiratórios ($r = 0,240$; $p < 0,01$), irritação no nariz ($r = 0,240$; $p < 0,01$), rinite ($r = 0,204$; $p < 0,05$) e falta de ar ($r = 0,201$; $p < 0,05$).

O maior número de neutrófilos pareceu estar relacionado com a diminuição da frequência de alguns sintomas como rinite ($r = -0,239$; $p < 0,01$), dor muscular ($r = -0,237$, $p < 0,01$), alergia ($r = -0,222$; $p < 0,05$) e irritação no nariz ($r = -0,200$; $p < 0,05$); ao passo que maiores níveis de eosinófilos associaram-se com a maior frequência de alergia ($r = 0,278$; $p < 0,01$), coceira ($r = 0,264$; $p < 0,01$) e falta de ar ($r = 0,215$; $p < 0,05$).

A frequência de dor de estômago associou-se com hábitos alimentares, onde consumir saladas mais vezes na semana aparentemente diminui a dor ($r = -0,282$; $p < 0,01$), enquanto o maior consumo de alimentos gordurosos ($r = 0,271$; $p < 0,01$) (e consequente aumento de colesterol ($r = 0,301$; $p < 0,001$) e triglicérides ($r = 0,256$; $p < 0,01$)) aumentam os relatos de episódios de dor de estômago.

A vitamina C e o Se, importantes antioxidantes exógenos, correlacionaram-se com a diminuição da frequência de alteração de humor ($r = -0,204$ e $r = -0,268$; $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente), e apenas a vitamina C com a redução de sonolência e irritação ocular ($r = -0,222$ e $r = -0,296$; $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente).

2.4.2. Biomarcadores de exposição *versus* biomarcadores de efeito

Corroborando com os manuscritos I e II, a Tabela 9 mostra que níveis sanguíneos dos elementos metálicos As, Cu, Ni, Ti, V e Zn correlacionaram

positivamente com o 1-OHP urinário e com o número de horas trabalhadas por dia ($p < 0,001$), indicando uma fonte comum de exposição ocupacional. Por outro lado, os minerais Co, Fe e Mn apresentaram uma associação negativa com todos os demais biomarcadores de exposição ($p < 0,05$).

Também foi possível observar que todos os biomarcadores de exposição tiveram associação com a redução de pelo menos um antioxidante endógeno (GPx ou CAT) e exógeno (licopeno ou vitamina C). V e Ti associaram-se com menores níveis circulantes de licopeno ($r = -0,422$ e $-0,203$; $p < 0,001$ e $p < 0,05$). Por outro lado, o mineral Co parece aumentar a atividade das enzimas antioxidantes (manuscrito II) e os níveis de GSH endógena ($r = 0,384$; $p < 0,001$), além de possivelmente ter uma origem comum ao antioxidante exógeno licopeno ($r = 0,560$; $p < 0,001$). Nesta linha, níveis plasmáticos de licopeno associaram-se a menores índices de dano ao DNA através do ensaio cometa ($r = -0,207$; $p < 0,05$) e com menor atividade da enzima NAG na urina (dano tubular renal) ($r = -0,286$; $p < 0,01$). A vitamina C, por sua vez, apresentou a associação com o aumento da expressão gênica da enzima de reparo do DNA OGG1 ($r = 0,221$; $p < 0,05$) e da enzima antioxidante HMOX-1 ($r = 0,229$; $p < 0,01$). Com relação ao gene CD26, o Co mostrou relação com o aumento da sua expressão ($r = 0,231$; $p < 0,01$).

Maiores concentrações urinárias de 1-OHP e sanguíneas dos elementos As e Ni associaram-se com maior reativação da enzima ALAD quando utilizado o ditioneitol (DTT) ($r = 0,430$; $0,367$ e $0,392$; $p < 0,001$). O DTT é um agente redutor que tem a capacidade de reverter a inibição da enzima por deslocar os agentes oxidantes que ficam ligados nos grupamentos $-SH$ da enzima. Sendo assim, estas associações nos revelam que os metais não inibem a enzima pela ligação direta a ela, mas sim através da produção de espécies reativas após a exposição a esses agentes tóxicos.

Além dos efeitos genotóxicos e mutagênicos observados no manuscrito II, foi possível observar que quanto maior o número de horas trabalhadas por semana e maiores níveis de 1-OHP, As e Ni, maior dano ao DNA foi revelado pelo ensaio cometa (respectivamente: $r = 0,252$; $0,201$; $0,366$ e $0,263$; $p < 0,05$) e pelo teste de micronúcleos ($r = 0,319$, $0,182$; $0,331$ e $0,384$; $p < 0,05$).

O As esteve associado ao aumento da glicemia e triglicérides circulantes ($r = 0,212$ e $0,221$; $p < 0,05$). Também foi possível observar uma estreita relação entre os níveis sanguíneos de Ni com a tendência à hiperglicemia no grupo de expostos ($r =$

0,298; $p < 0,001$) e com a presença de danos renais glomerular e tubular pela quantificação de microalbuminúria e NAG urinárias ($r = 0,213$ e $0,201$; $p < 0,05$). Além disso, quanto maior a glicemia observada nos participantes, maiores foram os indícios encontrados de danos renal glomerular e tubular ($r = 0,361$ e $0,387$; $p < 0,001$). O V também mostrou associação com o metabolismo da glicose ($r = 0,436$; $p < 0,001$) e dos lipídios, através dos níveis de triglicerídeos ($r = 0,234$; $p < 0,01$) e de HDL ($r = -0,255$; $p < 0,01$) circulantes. Por fim, o elemento essencial Co parece ter relação com a melhora dos níveis circulantes de HDL e redução da hiperglicemia de jejum ($r = 0,310$ e $-0,301$; $p < 0,001$), enquanto o Mn parece ter efeito protetivo contra os danos renais glomerulares ($r = -0,241$; $p < 0,01$). Nenhum elemento metálico sanguíneo nem o 1-OHP urinário mostrou efeito sobre as enzimas hepáticas avaliadas. O ferro foi o único elemento que teve associação com a série vermelha sanguínea, mostrando sua importância para evitar efeitos anêmicos, por estar relacionado ao aumento do número de hemácias e consequente aumento do hematócrito ($r = 0,229$ e $0,280$; $p < 0,01$) e também com maiores valores de hemoglobina ($r = 0,291$; $p < 0,01$).

2.4.4. Biomarcadores de exposição e efeito *versus* biomarcadores de efeito do sistema imune

As imunoglobulinas E, G e M não mostraram associação com o 1-OHP e com nenhum elemento metálico. Por outro lado, níveis sanguíneos de Ni e V mostraram associações positivas com os níveis séricos de IgA ($r = 0,227$ e $0,229$; $p < 0,01$), quanto o Co pareceu reduzir os níveis circulantes desta imunoglobulina ($r = -0,307$; $p < 0,01$). Além disso, a IgA também correlacionou com vários marcadores dos processos oxidativo e inflamatório, sendo esta correlação positiva para MDA ($r = 0,301$; $p < 0,001$), expressão de CD62-L em monócitos ($r = 0,274$; $p < 0,01$) e glicose ($r = 0,223$; $p < 0,01$), e negativa para licopeno, HDL e atividade da enzima GPx ($r = -0,265$, $-0,255$ e $-0,246$; $p < 0,01$, respectivamente). Por fim, o aumento de monócitos e linfócitos teve relação com o aumento de IgA ($r = 0,249$ e $0,235$, respectivamente, $p < 0,01$).

O aumento da IgG apenas mostrou relação com o aumento de linfócitos circulantes ($r = 0,241$; $p < 0,01$), enquanto o antioxidante não enzimático exógeno retinol e a GSH endógena parecem reduzi-la ($r = -0,209$ e $-0,204$, respectivamente; $p < 0,05$).

O complemento C3 do sistema imune apresentou associação com níveis aumentados de Cu ($r= 0,206$; $p<0,05$), PCR ($r= 0,491$; $p<0,001$), colesterol ($r= 0,211$; $p<0,05$), triglicerídeos ($r= 0,200$; $p<0,05$), plaquetas ($r= 0,223$; $p<0,01$) e das enzimas hepáticas TGP, TGO e GGT ($r= 0,325$; $0,220$ e $0,233$; $p<0,01$, respectivamente). A maior contagem de leucócitos totais, bem como especificamente de monócitos e neutrófilos, também foram associados a maiores níveis de C3 ($r= 0,239$; $0,224$ e $0,206$, respectivamente; $p<0,05$). Além disso, o aumento de C3 também foi relacionado com a ingesta de alimentos gordurosos e refrigerantes ($r= 0,221$ e $0,219$, respectivamente; $p<0,05$) e com o biomarcador de dano renal glomerular microalbuminúria ($r= 0,230$; $p<0,01$), ao passo que maiores concentrações circulantes do antioxidante exógeno selênio e a maior consumo de saladas parecem reduzi-lo ($r= -0,205$ e $-0,203$, respectivamente; $p<0,01$). Já o complemento C4 não apresentou relação com a exposição, mas sim com o aumento da PCR ($r= 0,396$; $p<0,001$) e do colesterol ($r= 0,203$; $p<0,05$).

Tabela 9. Associações entre 1-OHP e elementos metálicos (n= 141).

	1-OHP	As	Cu	Ni	Ti	V	Zn	Co	Fe	Mn
Horas/sem	0,452 ^c	0,524 ^c	0,449 ^c	0,589 ^c	0,502 ^c	0,499 ^c	0,388 ^c	-0,584 ^c	-0,191 ^a	-0,465 ^c
1-OHP		0,505 ^c	0,308 ^c	0,501 ^c	0,463 ^c	0,470 ^c	0,368 ^c	-0,504 ^c	-	-0,291 ^c
As			0,618 ^c	0,623 ^c	0,572 ^c	0,833 ^c	0,357 ^c	-0,653 ^c	-0,193 ^a	-0,410 ^c
Cu				0,421 ^c	0,543 ^c	0,448 ^c	0,387 ^c	-0,473 ^c	-	-0,363 ^c
Ni					0,431 ^c	0,626 ^c	0,323 ^c	-0,607 ^c	-0,313 ^c	-0,351 ^c
Ti						0,480 ^c	0,633 ^c	-0,696 ^c	-	-0,286 ^c
V							0,264 ^c	-0,582 ^c	-0,265 ^c	-0,422 ^c
Zn								-0,460 ^c	0,315 ^c	-
Co									0,242 ^b	0,560 ^c
Fe										0,424 ^c

Horas/sem: carga horária semanal. 1-OHP: 1-hidroxi-pireno urinário. Correlações de Spearman. ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$ e ^c $p < 0,001$.

PARTE III



DISCUSSÃO

Estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa demonstraram que a exposição ocupacional de taxistas à poluição atmosférica produz efeitos deletérios sobre a saúde destes trabalhadores (Brucker *et al.*, 2013; Brucker *et al.*, 2014; Brucker *et al.*, 2015; Barth *et al.*, 2017). Nesse sentido, o presente estudo foi realizado com o intuito de corroborar os achados anteriores e aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos por trás dos danos evidenciados, a fim de buscar alternativas para detectá-los precocemente e prevenir agravos maiores à saúde destes trabalhadores.

Nesta linha, foi possível observar maiores concentrações urinárias de 1-OHP, bem como maiores concentrações sanguíneas dos elementos metálicos As e Ni no grupo de taxistas quando comparados ao grupo de não expostos ocupacionalmente à poluição atmosférica (NEO). Também foi evidente um quadro de desequilíbrio de elementos essenciais, possivelmente em decorrência da exposição ocupacional, onde taxistas apresentaram déficit de Co, Fe e Mn, e excesso dos elementos-traço Cu, V e Zn quando comparados ao grupo NEO. Além disso, observamos elevadas concentrações sanguíneas de Ti em ambos os grupos, mostrando que o grupo de NEO pode também estar exposto ocupacionalmente a uma poluição *indoor*.

O manuscrito 3, publicado na revista *Toxicology Research*, abordou resultados prévios do nosso grupo de pesquisa envolvendo taxistas, cujas coletas de amostras biológicas e realização ocorreram no período entre os anos 2012 a 2015. Este estudo pôde demonstrar que as alterações em citocinas inflamatórias observadas nos taxistas estavam principalmente relacionadas à exposição ao Hg, apesar de o 1-OHP e os elementos As e Pb também terem apresentado importantes efeitos inflamatórios.

Neste estudo foi observado que níveis sanguíneos dos elementos As, Cu, Ni, Ti, V e Zn correlacionaram-se positivamente com o 1-OHP urinário, indicando uma fonte comum de exposição e, uma vez que todos estes biomarcadores estavam aumentados no grupo de taxistas e se correlacionaram positivamente com a carga horária de trabalho diária, podemos sugerir que esta exposição é essencialmente ocupacional. Por outro lado, os elementos Co, Fe, Mn e Se apresentaram uma associação negativa com todos os demais biomarcadores de exposição, o que sugere uma fonte diferente de exposição ou então a interferência entre metais, que poderia

ser explicada pela competição, deposição ou maior eliminação de um na presença de outro (Dolovich *et al.*, 1984; Bal *et al.*, 1998).

Tanto o 1-OHP quanto os elementos tóxicos metálicos mostraram influência sobre os biomarcadores de efeito, demonstrando a coexposição ocupacional a agentes tóxicos presentes na poluição atmosférica. Sabe-se que profissões relacionadas ao tráfego, como a de taxista, expõem os trabalhadores aos poluentes na forma de misturas com composições e concentrações variadas. Além disso, os tipos e concentrações dos poluentes variam entre locais dentro da mesma cidade, sendo que em locais com maior tráfego de veículos ou áreas industriais são esperadas maiores concentrações e, provavelmente, mais tipos de poluentes, ao passo que, em áreas rurais ou com menor urbanização, as concentrações de poluentes tendem a diminuir (Li *et al.*, 2015). Em nosso estudo, os taxistas relataram dirigir livremente pela cidade de Porto Alegre, a qual sabidamente tem altos níveis de poluição (Dallarosa *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2008; Brucker *et al.*, 2013) e, além disso, a grande maioria possuía pontos fixos próximos a um tráfego intenso de veículos, o que justifica os maiores níveis de 1-OHP e elementos metálicos encontrados neste grupo. Estudo realizado previamente por Fanou e colaboradores (2006) encontrou não só diferença entre a composição atmosférica entre zonas de pouco, médio e alto tráfego de veículos, mas também diferença entre motociclistas que trabalhavam nestas áreas, sendo observados maiores níveis de HPAs nas áreas de intenso tráfego bem como 1-OHP nos motociclistas que circulavam dentro destas regiões. Autrup e colaboradores (1999) destacaram a importância de se considerar a mistura de compostos presentes na poluição atmosférica, uma vez que eles observaram maiores concentrações urinárias de 1-OHP em motoristas de ônibus, mas este aumento estava relacionado apenas em alguns casos com a maior formação de adutos de DNA, indicando que o aumento nos outros casos poderia ser consequência da coexposição a diferentes poluentes. Esta importância da exposição mista a poluentes também foi observada no estudo de Burgaz e colaboradores (2002), onde encontraram uma frequência de aberração cromossômica linfocitária significativamente maior em taxistas que em um grupo de não expostos, mas este aumento não foi associado aos níveis excretados de 1-OHP. Além disso, Fanou e colaboradores (2006) também encontraram maior oxidação, metilação e formação de adutos de DNA em motociclistas expostos, mas devido à exposição simultânea a HPAs e compostos orgânicos voláteis. Até mesmo

no meio aquático já foi demonstrado a coexposição entre HPAs e metais (Cu e Ni) e o somatório de seus efeitos oxidativos (Gauthier *et al.*, 2015).

Como relatado no manuscrito 2, foi observado que os participantes não expostos ocupacionalmente à poluição (NEO) apresentaram, em média, níveis 16 vezes maiores de Co comparados aos indivíduos do grupo exposto ocupacionalmente. De acordo com os valores de referência da OMS, ambos os grupos estão com valores sanguíneos de Co dentro dos limites estabelecidos. Já dados mais atualizados da Fundação de Pesquisa Alemã (DFG) de 2002 estabelecem diferentes valores de referência de Co em sangue total para grupo de trabalhadores expostos e de pessoas não expostas, sendo $5 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (DFG, 2002). Baseando-se nos valores estabelecidos pela DFG, o grupo de taxistas apresenta concentrações sanguíneas de indivíduos não expostos ao Co, enquanto que o grupo de NEO apresenta níveis sanguíneos de indivíduos expostos. Entretanto, além do grupo de taxistas apresentar valores sanguíneos equivalentes a indivíduos não expostos ao Co tanto pela OMS quanto pela DFG, a menor concentração de Co nestes indivíduos foi associada a maiores efeitos oxidativos e inflamatórios.

O Co é um microelemento essencial importante para diversas funções biológicas, e estas concentrações extremamente mais baixas de Co no grupo de taxistas pode ser indício de uma deficiência fisiológica deste elemento. Pesquisas mais recentes na área de oncologia tem dado importância não só à toxicidade de elementos metálicos, mas também às deficiências de microelementos essenciais, e os pesquisadores têm demonstrado que tanto o acúmulo quanto a deficiência de certos elementos tem correlação direta com a incidência e progressão de certos tipos de câncer (Boyle e Ferlay, 2005; Ray *et al.*, 2011). Contudo, a deficiência de Co em humanos adultos é rara, sendo mais comum em crianças, e predispõe os pacientes à anemia e condições pré-malignas por diminuir a capacidade de reparo do sistema imune (Prashanth *et al.*, 2015). Entretanto, no presente estudo a concentração de Co não apresentou qualquer correspondência com componentes do hemograma vinculados à anemia, como se poderia esperar. Por outro lado, a deficiência de Co observada nos taxistas poderia estar afetando o metabolismo energético, a síntese proteica e, conseqüentemente, a capacidade do sistema imune (McClure, 2008).

Baixos níveis de Co podem levar à deficiência de vitamina B12, que pode, por sua vez, levar ao acúmulo de homocisteína e aumentar o risco de doenças vasculares,

incluindo acidente vascular cerebral, doença arterial coronária ou periférica e trombose venosa profunda (Ahn e Brown, 2005; Sigel *et al.*, 2013). Acredita-se também que a deficiência de Co somada à presença de fatores inflamatórios como citocinas poderiam influenciar a patogênese de doenças crônicas e, este quadro, aliado a agravantes como fumo ou exposição a xenobióticos, seria capaz de produzir adicional estresse inflamatório, favorecendo a persistência de uma condição pré-cancerosa e futuramente a promoção desta situação à malignidade (Ray *et al.*, 2011).

De fato, como mostrado no manuscrito 2, a depleção dos níveis sanguíneos de Co em taxistas estava associada com o aumento de vários biomarcadores oxidativos e inflamatórios observados neste grupo (MDA, MCP1 e moléculas de adesão). Além disso, o aumento de Co estava associado com menores danos de DNA (cometa e micronúcleo), com o aumento de antioxidantes endógenos e com a maior expressão de genes antitumorais (p53 e CD26), sugerindo efeitos protetivos deste elemento essencial sobre o DNA e possíveis alterações moleculares decorrentes de lesões.

Por outro lado, ao direcionarmos nossa atenção para níveis de Co no grupo de NEO, observamos que seriam equivalentes a um grupo de pessoas expostas ao Co segundo os valores de referência da DFG de 2002. Considerando que Co teve uma associação negativa com o metabólito 1-OHP, podemos inferir que ele advém de outra fonte de exposição que não a poluição ambiental externa. Corroborando com isso, Co apresentou associação positiva com a frequência de alergia, a qual também foi mais relatada dentre o grupo de NEO. Desta forma, não podemos descartar uma exposição dos trabalhadores NEO à poluição interna do ambiente de trabalho. Contudo, a suposta exposição de indivíduos NEO no ambiente interno de trabalho não apresentou correlações importantes com outros biomarcadores deletérios. Desta forma, parece ser mais evidente um quadro de deficiência de Co no grupo de taxistas, já que menores níveis deste elemento essencial foram associados a efeitos oxidativos e inflamatórios importantes.

Ainda considerando uma exposição ocupacional *indoor*, quando se analisou os relatos pessoais obtidos no questionário de avaliação, houve diferenças na percepção de sintomas corporais individuais, onde os trabalhadores NEO relataram maior frequência de sintomas respiratórios alérgicos, e estas diferenças devem ser consideradas. Entretanto, diversos fatores podem influenciar nesta percepção pessoal de sintomas, dentre eles as próprias condições de trabalho, aspectos psicológicos e

até mesmo educacionais. Como exemplo, os indivíduos NEO podem ter maior percepção de alterações em seu organismo (por ter maior conhecimento da relação entre sintomatologia e doenças). Além disso, a menor percepção de alguns sintomas no caso dos taxistas pode ser devido às exigências do trabalho, onde o trânsito exige muito mais atenção do motorista, restando pouca atenção para perceber alterações sintomáticas do próprio organismo. Por outro lado, o assunto poluição em ambientes internos tem sido extensivamente explorado e estudos recentes têm relatado a presença de elementos metálicos no interior de empresas administrativas, principalmente devido ao uso de fotocopiadoras e impressoras que podem liberar nanopartículas destes compostos (Bello *et al.*, 2013; Szewczyńska *et al.*, 2013). Por fim, há indícios de que os trabalhadores administrativos também estejam expostos a compostos alergênicos no ambiente interno de trabalho. Para maiores esclarecimentos, seria imprescindível realizar uma amostragem do ar interno da agência bancária para avaliar quali e quantitativamente elementos tóxicos a que estes trabalhadores poderiam estar expostos.

No segundo manuscrito, apresentamos 2 novos elementos metálicos com resultados inéditos para expostos às poluições *indoor* e *outdoor*. De um lado, o elemento traço V, com funções importantes para o organismo e cuja concentração sanguínea estava aumentada em ambos os grupos, de acordo com valores de referência estabelecidos pela OMS. Entretanto, os maiores níveis observados no grupo de taxistas puderam ser associados a diferentes efeitos oxidativos e inflamatórios. De outro lado, o elemento tóxico Ti estava com valores aumentados em ambos os grupos estudados, sugerindo uma exposição a esse metal tanto na poluição outdoor, como na indoor.

Como outros estudos já relataram, o V pode ter um papel dúbio em organismos vivos, a depender do tipo de composto vanádico e da concentração (Gruzewska *et al.*, 2014). Em nosso estudo, a elevada concentração de V encontrada em ambos os grupos foi relacionada à desregulação do metabolismo glicêmico e lipídico, provavelmente em decorrência de mecanismos oxidativos e inflamatórios aos quais o V também se associou.

A exposição a nanopartículas de Ti já mostrou ter uma associação dose-dependente com efeitos inflamatórios e imuno, hemato e hepatotóxicos em ratos (Duan *et al.*, 2010). Em concordância com nossos achados, foi demonstrado

experimentalmente que a inalação dessas nanopartículas de Ti pode aumentar a peroxidação lipídica, diminuir o conteúdo de GSH endógena, inibir enzimas antioxidantes e aumentar os níveis de citocinas inflamatórias (Liu *et al.*, 2013). Além disso, um estudo *in vitro* demonstrou previamente que os danos ao DNA decorrentes da exposição ao Ti se dão através de mecanismos oxidativos (Saquib *et al.*, 2012), o que corrobora nossos resultados obtidos.

Em nossos resultados adicionais foi possível observar maiores níveis de imunoglobulina A no grupo de taxistas, sendo o seu aumento associado a maiores níveis dos elementos Ni e V. Entretanto, não foi possível observar neste trabalho alguma relação entre exposição e níveis circulantes das imunoglobulinas E, G ou M. Por outro lado, Leonardi e colaboradores (2000) encontraram associação entre a exposição a material particulado e níveis alterados de imunoglobulinas sanguíneas.

Estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa mostrou maiores índices de dano ao DNA através do ensaio cometa após exposição (Göethel *et al.*, 2014), demonstrando portanto a maior ocorrência de danos reversíveis ao DNA em taxistas quando comparados a não expostos ocupacionalmente. Além disso, estudo publicado mais recentemente por nosso grupo de pesquisa demonstrou igualmente maiores níveis de dano ao DNA em taxistas, tanto danos reversíveis (cometa) como irreversíveis (teste de micronúcleos) quando comparados a indivíduos não expostos ocupacionalmente, além de importantes associações entre o 1-OHP urinário e estes tipos de dano (Barth *et al.*, 2017). O presente estudo corroborou com os resultados deste último, porém é a primeira vez que mostramos também a associação de outros biomarcadores de exposição (metais) com o dano ao DNA.

Em populações não expostas a xenobióticos ambientais ou ocupacionais, o aumento da frequência de MN pode estar associado ao gênero e à idade (Da Silva, 2016). Nosso estudo contou apenas com indivíduos homens e, mesmo quando os testes comparativos entre os grupos foram controlados pela idade, foi possível observar uma frequência significativamente maior no grupo dos expostos ocupacionalmente, ressaltando a influência da exposição à poluição oriunda do tráfego de veículos sobre a mutagenicidade em indivíduos sob constante exposição já observados em outros estudos (Pedersen *et al.*, 2006; Pedersen *et al.*, 2009). Além da diferença encontrada entre os grupos, também foi possível observar que houve

maior frequência de MN nos trabalhadores com maior carga horária diária de trabalho, e esta associação também foi observada no estudo de (Cassini *et al.*, 2011).

O dano oxidativo ao DNA observado nas exposições a HPAs pode ser causado por ataques ao DNA por radicais hidroxilas produzidos através da reação de H₂O₂ com metais de transição reduzidos, como o Cu⁺ (reação de Fenton), ligados ao DNA (Kalyanaraman, 2013). Muitos HPAs estão relacionados à produção dose e tempo-dependente de H₂O₂ (através da sua metabolização pelo CYP1A1), e este, por sua vez, é capaz de atravessar as membranas celulares e nucleicas, sendo a única ERO que consegue alcançar com extrema facilidade o DNA nuclear (Marczynski *et al.*, 2002).

Sob uma ampla perspectiva, conseguimos associar alguns fatores que justificam os danos ao DNA encontrados nos trabalhadores expostos: 1) taxistas apresentaram maiores níveis de excreção de 1-OHP, logo sugere-se maior exposição a HPAs e maior formação de espécies reativas, como o H₂O₂ (confirmados pela peroxidação lipídica – MDA); 2) taxistas apresentaram atividades reduzidas das enzimas CAT e GPx, responsáveis pela detoxificação do H₂O₂, e portanto, apresentam um possível acúmulo desta ERO; 3) taxistas também apresentaram maiores níveis dos metais Zn e Cu que podem reagir com o H₂O₂ e formar radicais hidroxilas (reação de Fenton) dentro do núcleo. Estas EROs, por sua vez, são altamente eletrofílicas e causam danos oxidativos ao DNA; 4) observa-se, então, a formação tanto de danos reversíveis (ensaio cometa), quanto danos irreversíveis (MN) ao DNA que facilmente levam a mutações mais graves (Bonassi *et al.*, 2011); 5) Não obstante, alterações à nível de transcrição gênica também foram observadas no grupo dos taxistas, sendo a redução do gene supressor tumoral (p53) a mais relevante, pois demonstra ainda mais a suscetibilidade aos efeitos carcinogênicos de HPAs e metais, uma vez que a reduzida expressão gênica de p53 encontrada nos taxistas se mostrou fortemente associada com os metais Zn e Cu, e também aos danos oxidativos avaliados neste estudo.

Além dos efeitos apresentados no manuscrito 1, os metais As e Ni também mostraram significativa relação com possíveis efeitos genotóxicos através dos ensaios cometa e MN, onde maiores concentrações sanguíneas destes elementos estavam associadas com a elevação dos índices de cometa e número de MN observados. Da mesma forma, o estudo de Lou e colaboradores (2013) também observou maior

formação de EROs, peroxidação lipídica (MDA) e índices de cometa após a exposição *in vitro* de células humanas ao Ni, e em outro estudo também foi observado que além de lesar o DNA, baixas doses de Ni também afetaram o reparo do dano ao DNA induzido por luz UV em outro tipo de linhagem celular (Dally e Hartwig, 1997).

Maiores níveis de excreção de 8-oxo-G já foram observados em indivíduos expostos à poluição atmosférica (Marczynski *et al.*, 2002; Göethel *et al.*, 2014). Entretanto, não observamos diferenças na expressão gênica da enzima de reparo OGG1, bem como não foram observadas associações entre a expressão da OGG1 e os biomarcadores de dano ao DNA (cometa, cometa com enzimas de reparo e micronúcleo). Entretanto, esta enzima não é exclusiva para situações de dano oxidativo, sendo que outras enzimas de reparo poderiam então ser recrutadas (Martinet *et al.*, 2002).

Por outro lado, maiores níveis séricos de vitamina C associaram-se com a maior expressão gênica de OGG1 e da HMOX-1, e maiores níveis de licopeno estavam associados com menores índices de dano ao DNA (ensaio cometa). Porrini e Riso (2000) avaliaram mulheres com uma dieta com consumo de tomates (fonte de licopeno) e observaram redução de danos ao DNA pelo ensaio cometa, indicando que estes antioxidantes exógenos obtidos da alimentação poderiam auxiliar na proteção do DNA.

Revisão realizada por Szeto (2007) mostrou que vários antioxidantes exógenos, em diferentes situações e em concentrações adequadas, têm efeitos significativos na proteção do DNA. De acordo com nossos resultados, esta proteção pode ocorrer tanto através da captura e redução de EROs, como através do aumento da expressão de genes protetivos aos efeitos do estresse oxidativo. Seguindo esta mesma linha, como observado nos resultados do manuscrito 2, as enzimas antioxidantes endógenas CAT e GPx também se relacionaram com menor % de DNA na cauda. Estes resultados da capacidade antioxidante total (endógena e exógena) reforçam a importância de se buscar reverter precocemente o estresse oxidativo causado pela exposição ocupacional, a fim de permitir que os danos recentes ao DNA possam ser reparados, e assim evitar um estágio mais avançado da exposição com ações de mutagenicidade.

Apesar de ambos os grupos apresentarem concentrações séricas dentro dos valores de referência para retinol (1,05 a 2,80 μM), vitamina E (12 a 42 μM) e β -

caroteno (0,19 a 1,58 μM) (Burtis e Bruns, 2014), maiores níveis desses antioxidantes exógenos foram observados no grupo de taxistas. Estes resultados são opostos aos encontrados para o licopeno (manuscrito 1), cujos níveis plasmáticos estavam aumentados no grupo de NEO e apresentaram efeito protetivo ao estresse oxidativo, inflamação e, conseqüentemente, ao risco de câncer. Ao contrário do esperado e corroborando, então, com estes nossos achados, alguns estudos mostraram que vitamina E e β -caroteno podem ter efeitos nulos ou até mesmo deletérios na prevenção de câncer (Druesne-Pecollo *et al.*, 2010; Fortmann *et al.*, 2013; Kong, 2013).

Ao observar a frequência de sintomas relatados pelos indivíduos no questionário (rinite, falta de ar e distúrbios respiratórios) e a sua relação com biomarcadores de efeito, ressalta-se a influência que o processo inflamatório decorrente do aumento do colesterol pode ter sobre a incidência de problemas pulmonares e respiratórios. Diversos estudos têm relatado a importância da hipercolesterolemia não apenas diretamente sobre processos ateroscleróticos, mas também sobre desordens respiratórias como hipertensão pulmonar e doenças obstrutivas pulmonares (formação de granulomas de colesterol) que aumentam as chances de mortalidade em doenças cardiovasculares (Nolan *et al.*, 1999; Sin e Man, 2005).

O p53, além do seu papel no controle da progressão tumoral, exerce função no processo aterosclerótico, especialmente quando expresso em macrófagos e monócitos, pois controla a apoptose destas células e diminui o acúmulo de lesões em placas de sítios ateroscleróticos, aumentando assim a estabilidade das placas e evitando síndromes coronarianas (Van Vlijmen *et al.*, 2001; Martinet *et al.*, 2002). Neste mesmo sentido, a oxidação de lipoproteínas de alta e baixa densidade (HDL e LDL) é catalisada por íons Cu, e esta oxidação afeta o papel destas moléculas no transporte e metabolismo do colesterol sanguíneo, bem como a produção de lipoperóxidos, que pode ter contribuição da vitamina E (Raveh *et al.*, 2000; Gaetke e Chow, 2003).

Em nosso estudo, como já mencionado no manuscrito 2, maiores concentrações de Cu associaram-se com a menor expressão de p53. Além disso, nossos resultados adicionais mostram que maiores níveis de Cu podem estar relacionados com menores níveis de HDL e com maiores níveis de C3 e PCR. Estes

achados reiteram a possível influência do Cu não só sobre a suscetibilidade ao crescimento de tumores, mas também sobre a predisposição a doenças cardiovasculares. Em um estudo recente, Markert *et al.* (2016) observaram que a exposição à Zn e Cu separadamente, bem como a exposição simultânea de Zn e Cu, aumentaram as concentrações plasmáticas de PCR, sendo este aumento maior nos expostos ao Cu isoladamente.

A PCR, por sua vez, tem participação no processo aterogênico, onde a sua presença na placa fibrosa ativa principalmente a via clássica do sistema complemento (Niculescu e Rus, 2004). Corroborando com este mecanismo, foi observado em nossos dados adicionais que maiores níveis de PCR estavam associados com maiores níveis de C3 e C4. Além disso, o C3 também mostrou associação positiva com outros fatores de risco para aterosclerose, como colesterol, triglicerídeos, número de plaquetas (possível efeito pró-trombótico), além da associação com maus hábitos alimentares, como ingestão de comidas gordurosas e consumo de refrigerantes. Quanto aos efeitos pró-trombóticos do sistema complemento, sua interação com plaquetas pode ocorrer via receptores não típicos do sistema complemento, como a P-selectina (Verschoor e Langer, 2013). Entretanto, em nosso estudo não foi observada associação entre C3 ou C4 e a expressão da molécula de adesão CD62-P. Uma justificativa desta ausência de associação é que realizamos a avaliação da expressão de CD62-P somente em linfócitos e monócitos, mas não em plaquetas onde essa molécula de adesão é constitutivamente expressa e poderia, de fato, apresentar relação com ativação de processos pró-trombóticos (Scholz *et al.*, 2002).

Além do processo crônico inflamatório de aterosclerose, altas concentrações sistêmicas de complemento C3 já mostraram ser um fator de risco para o desenvolvimento de diabetes em homens (Engström *et al.*, 2005), mas isto não foi observado em nossos resultados. Por outro lado, maiores níveis plasmáticos de C3 estavam associados com maiores níveis de microalbuminúria urinária, indicando uma possível influência do sistema imune sobre dano renal. Em partes, este aumento observado em glomerulonefrites pode ser uma reação normal para remover complexos imunes e células lesadas dos glomérulos (Noris e Remuzzi, 2013).

Ainda com foco em doenças crônicas não transmissíveis e os processos inflamatórios decorrentes, nossos resultados adicionais mostram uma ligação direta entre a exposição ao Ni e a tendência à hiperglicemia no grupo de taxistas. O aumento

das concentrações de glicose circulantes, por sua vez, foi direta e significativamente relacionado a biomarcadores oxidativos e inflamatórios bem como a danos renais glomerulares e tubulares, mecanismo este já bem estudado em doenças renais de diabéticos (Forbes *et al.*, 2008). Além disso, antioxidantes endógenos (GPx e CAT) e exógenos (licopeno e vitamina C), e lipoproteínas de alta densidade (HDL) parecem amenizar esta sucessão de efeitos deléteiros. Vários trabalhos têm utilizado antioxidantes ou estimulantes da defesa antioxidante renal na prevenção de doenças renais em casos de diabetes (Gokturk *et al.*, 2014; Naik *et al.*, 2014; Rahimi-Madiseh *et al.*, 2016).

De um modo geral, quanto à influência dos biomarcadores de exposição sobre o estresse oxidativo, observamos que para a atividade da enzima ALAD, apenas maiores níveis Ni mostraram relação direta com a redução da atividade enzimática, enquanto os demais elementos (As, Cu, Ni, Ti, V e Zn) e o 1-OHP apenas mostraram uma relação indireta, através da reativação da enzima, tanto com o uso do agente redutor DTT (ditiotreitól) como com o uso do seu co-fator enzimático (o Zn). Estes resultados nos indicam que estes agentes (elementos metálicos e 1-OHP) podem estar agindo sobre a inibição da enzima tanto diretamente, através da sua ligação aos grupamentos tiólicos da enzima (revertido pelo Zn), como pela ação de espécies reativas formadas durante seu metabolismo que acabam oxidando os grupamento tiólicos (revertido pelo DTT) da enzima, inibindo-a (Baierle *et al.*, 2014; Sauer *et al.*, 2014). Além disso, como mostrado no manuscrito 2, os elementos essenciais Co e Fe também pareceram aumentar a atividade da ALAD. Ademais, o Fe também mostrou associação com desfechos finais que envolvem o heme (hematócrito e concentração de hemoglobina eritrocitária), reforçando seu efeito protetor contra o desenvolvimento de anemia.

Os resultados adicionais mostram uma maior atividade da enzima GST no grupo de taxistas, e a ação das enzimas GSTT1 e GSTM1 parece estar envolvida no aumento das concentrações sanguíneas de alguns metais e sua toxicidade, uma vez que o polimorfismo nulo que, em tese, reduz ao mínimo a expressão das mesmas, se mostrou diminuir dos níveis de metais e alguns biomarcadores de efeito. Chuang e Chang (2007) também não conseguiram mostrar diferenças significativa na excreção de 1-OHP entre os genótipos positivo e nulo das enzimas GSTM1 e GSTT1, e Marczyński e colaboradores (2002) também não encontraram diferença significativa

quanto ao dano de DNA (ensaio cometa e excreção urinária de 8-oxo-G) entre os diferentes polimorfismos de CYP1A1, GSTM1 e GSTT1 avaliados em expostos ocupacionalmente a HPAs.

Garcia-Closas e colaboradores (2004) sugerem que há maior risco para o câncer de bexiga dentre os indivíduos expostos a HPAs com deleção do gene da GSTM1 e em outro estudo, os autores verificaram que o polimorfismo de alelo nulo da GSTT1 aumenta a suscetibilidade ao desenvolvimento de adenocarcinoma (Sunaga *et al.*, 2002; Garcia-Closas *et al.*, 2004). Entretanto, para câncer de pulmão, Carlsten e colaboradores (2008) não encontraram maior risco entre os indivíduos caucasianos com genótipo nulo para GSTM1. Inclusive, alguns estudos mostram um efeito protetivo do genótipo nulo da GSTM1 contra danos ao DNA através dos ensaios cometa (Novotna *et al.*, 2007; Bagryantseva *et al.*, 2010) e micronúcleo (Leopardi *et al.*, 2003) em trabalhadores expostos à poluição atmosférica, o que corrobora, ao menos em partes, nossos achados.

Várias podem ser as explicações para os diferentes efeitos da exposição em indivíduos portadores de genótipo nulo para as GSTs dos isotipos M1 e T1, onde ora a deleção mostra maior suscetibilidade aos danos causados por agentes tóxicos e ora parece proteger dos mesmos. A primeira explicação é que o genótipo nulo nem sempre determina a completa deleção da expressão gênica destas enzimas, podendo ocorrer apenas redução na expressão delas, possibilitando então uma atividade normal, apenas reduzida (Koch *et al.*, 2010). Por isto, é interessante fazer a avaliação da expressão gênica nos indivíduos para verificar se a expressão está de fato sendo afetada pelo polimorfismo. A segunda, é que justamente por haver diversos isotipos desta enzima, por mais que um esteja em deleção no indivíduo, outro isotipo poderia compensar essa perda e manter a funcionalidade final da enzima. A terceira possibilidade é a de que certos compostos podem ser convertidos a metabólitos tóxicos por estas enzimas (Anders *et al.*, 1988; Menegon *et al.*, 1998), e mesmo que a via normal de ação delas esteja relacionada à detoxificação de alguns xenobióticos, devemos levar em consideração a coexposição destes trabalhadores aos diversos tipos de agentes presentes na poluição atmosférica. Por fim, Chasseaud (1979) sugerem que a GSTP1, outro tipo de glutathione transferase, está mais relacionado à biotransformação de metabólitos secundários de HPAs do que as isotipos M1 e T1.

Nossos resultados adicionais também mostraram que o polimorfismo da ALAD aparenta ter um efeito protetor em relação a alguns biomarcadores de exposição e efeito. A maioria dos estudos envolvendo avaliação da exposição a metais e o polimorfismo da enzima ALAD apontam que o alelo ALAD2 acaba protegendo os indivíduos expostos, uma vez que este genótipo determina redução nos níveis circulantes destes metais (Sakai *et al.*, 2000). Entretanto, Montenegro e colaboradores (2006) observaram que em trabalhadores expostos ao Pb apresentando níveis sanguíneos maiores de $10 \mu\text{g dL}^{-1}$, os níveis de Pb nos indivíduos com genótipo ALAD2 foram maiores, mostrando um efeito bioacumulador do polimorfismo. Os níveis de Pb abaixo dos valores de referência preconizados, em ambos nossos grupos de estudo (dados não mostrados), justificariam então o efeito protetivo do alelo ALAD1-2 observado em nossos resultados. Em nosso estudo, os polimorfismos da GSTM1 (nulo) e da ALAD (alelo ALAD1-2) parecem ter influência sobre uma maior eliminação do Cu do organismo, demonstrando certa proteção aos efeitos negativos da exposição ao Cu, evidentes no grupo de taxistas.

Além destes polimorfismos de enzimas de metabolização já estudados, a avaliação de uma enzima de reparo de danos ao DNA como a OGG1 é bastante relevante, até porque já foi demonstrado que polimorfismos na enzima OGG1 teriam associação com carcinoma celular e dano ao DNA pela maior detecção de 8-oxoguanina urinária em pacientes com câncer (Kumar *et al.*, 2011). E, como exposição ocupacional a compostos carcinogênicos, como os HPAs, e a exposição crônica a elementos metálicos são importantes fatores de risco para o desenvolvimento de diversos tipos de câncer (Fernández *et al.*, 2012; Burger *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2014; Rengarajan *et al.*, 2015), a avaliação da capacidade de reparo do DNA se faz importante.

As associações observadas entre as respostas obtidas através do questionário sobre a percepção pessoal e avaliação de aspectos relacionados à saúde demonstram a influência que a elevada carga horária de trabalho, somada a relatos de sintomas de algum tipo de mal-estar, têm sobre a qualidade de vida e avaliação do estado de saúde. Além disso, de uma maneira geral, os níveis aumentados de Ni, C3 e também o maior número ou porcentagem de monócitos, eosinófilos e basófilos circulantes se correlacionaram com o aumento da frequência de sintomas. Em

compensação, maiores níveis de vitamina C e Se aparentemente protegem contra o aparecimento destes sintomas.

De uma maneira geral, os estudos classificam a alimentação dentro de padrões dietéticos saudáveis, onde se aplica uma dieta com alto teor de frutas, legumes, aves, peixe, cereais integrais e uma baixa ingestão diária de gorduras; e um padrão pouco saudável, tendo dieta com alto teor de carne vermelha e/ou carne processada, açúcares refinados, batatas, alimentos doces e uma alta ingestão diária de gorduras (Ruiz e Hernández, 2014). Nossos resultados (manuscrito 1) revelaram uma relação inversa entre antioxidantes que podem ser obtidos através da dieta e a carga horária de trabalho. Isso mostra que a sobrecarga de trabalho pode interferir na busca por hábitos alimentares saudáveis, aumentando ainda mais os riscos dos trabalhadores, uma vez que, além de expostos ocupacionalmente à poluição, ainda apresentam deficiência em sua capacidade antioxidante, o que amenizaria os efeitos deletérios destes agentes. Com isso, aumenta-se a predisposição a doenças crônicas inflamatórias não transmissíveis como diabetes e aterosclerose, bem como a predisposição ao desenvolvimento de câncer. Por fim, a possível vinculação da regulação de todos os genes estudados ao fator de transcrição nuclear NF- κ B, ressalta a importância de se avaliar expressão gênica do próprio NF- κ B no grupo de expostos e buscar melhor entendimento de como se dá esta interação regulador-gene.

CONCLUSÕES

Os níveis de 1-OHP, As, Ni, Ti, V, Zn e Cu estavam aumentados no grupo de taxistas quando comparado ao grupo de NEO. Além disso, estes biomarcadores fortemente associados entre si, sugerindo uma mesma fonte de exposição. Por outro lado, taxistas apresentaram menores níveis sanguíneos de Co, Fe e Mn que os indivíduos NEO. Também foi possível observar a relação entre os xenobióticos estudados e o aumento de marcadores oxidativos, inflamatórios, de genotoxicidade e de mutagenicidade, além da depleção de antioxidantes exógenos, cujos níveis plasmáticos associaram-se a hábitos alimentares saudáveis. Mais do que isso, nosso estudo demonstrou a importância do equilíbrio de elementos essenciais circulantes para o bom e correto funcionamento do organismo. A tendência à predisposição de doenças crônicas não transmissíveis, como hiperglicemia e hipercolesterolemia, também foi observada entre os taxistas, sendo associada direta (biomarcadores de exposição) ou indiretamente (biomarcadores de efeito) à exposição ocupacional. A exposição ocupacional no grupo de taxistas também mostrou efeitos diretos e indiretos sobre a expressão de genes relacionados a processos tumorigênicos, indicando uma maior predisposição ao desenvolvimento de tumores que, aliados ao panorama de estresse oxidativo e inflamação observado nesses trabalhadores, poderiam ser direcionados à malignidade do câncer. Em relação aos polimorfismos enzimáticos estudados até o presente momento, nenhum mostrou ter significativa influência sobre os biomarcadores avaliados e sobre a suscetibilidade a danos, inclusive, mostraram certo efeito protetivo.

PERSPECTIVAS

- Avaliar o polimorfismo da enzima OGG1 e da proteína p53 para associar aos respectivos níveis de expressão gênica, bem como com os danos ao DNA observados nos taxistas;
- Avaliar a expressão dos genes: fator de transcrição NF-Kb e enzimas GSTT1 e GSTM1, para relacionar com os polimorfismos e expressões proteicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, S. Q.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, P.; ALONSO, J. I. G. Evidence of the direct adsorption of mercury in human hair during occupational exposure to mercury vapour. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 36, p. 16-21, 2016. ISSN 0946-672X.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Basic immunology: functions and disorders of the immune system**. Elsevier Health Sciences, 2014. ISBN 1455707074.

ABDUL, K. S. M. et al. Arsenic and human health effects: A review. **environmental toxicology and pharmacology**, v. 40, n. 3, p. 828-846, 2015. ISSN 1382-6689.

ACGIH, A. C. O. G. I. H. Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. 1995, American Conference of Governmental Industrial Hygienists.

ADAMSON, I. et al. Zinc is the toxic factor in the lung response to an atmospheric particulate sample. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 166, n. 2, p. 111-119, 2000. ISSN 0041-008X.

ADHAM, K. G.; AL-EISA, N. A.; FARHOOD, M. H. Impact of heavy metal pollution on the hemogram and serum biochemistry of the libyan jird, *Meriones libycus*. **Chemosphere**, v. 84, n. 10, p. 1408-1415, 2011. ISSN 0045-6535.

AFAQ, F. et al. Cytotoxicity, pro-oxidant effects and antioxidant depletion in rat lung alveolar macrophages exposed to ultrafine titanium dioxide. *Journal of Applied Toxicology: An International Forum Devoted to Research and Methods Emphasizing Direct Clinical, Industrial and Environmental Applications*, 1998, Wiley Online Library. p.307-312.

AHN, S. C.; BROWN, A. W. Cobalamin deficiency and subacute combined degeneration after nitrous oxide anesthesia: a case report. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 86, n. 1, p. 150-153, 2005. ISSN 0003-9993.

AHSAN, S. A. et al. Metal fume fever: a review of the literature and cases reported to the Louisiana Poison Control Center. **J La state Med soc**, v. 161, n. 6, p. 348-51, 2009.

AITIO, A. et al. CHAPTER 4 - Biological Monitoring and Biomarkers. In: (Ed.). **Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition)**. Burlington: Academic Press, 2007. p.65-78. ISBN 978-0-12-369413-3.

AL-HABSI, K. et al. Effects of low concentrations of dietary cobalt on liveweight gains, haematology, serum vitamin B 12 and biochemistry of Omani goats. **The Veterinary Journal**, v. 173, n. 1, p. 131-137, 2007. ISSN 1090-0233.

ALA, A.; DHILLON, A.; HODGSON, H. Role of cell adhesion molecules in leukocyte recruitment in the liver and gut. **International journal of experimental pathology**, v. 84, n. 1, p. 1-16, 2003. ISSN 1365-2613.

ANDERS, M. et al. Biosynthesis and biotransformation of glutathione S-conjugates to toxic metabolites. **CRC critical reviews in toxicology**, v. 18, n. 4, p. 311-341, 1988. ISSN 0045-6446.

ANGELÉ-MARTÍNEZ, C.; GOODMAN, C.; BRUMAGHIM, J. Metal-mediated DNA damage and cell death: mechanisms, detection methods, and cellular consequences. **Metallomics**, v. 6, n. 8, p. 1358-1381, 2014.

ANGERER, J. et al. Human biomonitoring assessment values: approaches and data requirements. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 214, n. 5, p. 348-360, 2011. ISSN 1438-4639.

ANGERER, J.; EWERS, U.; WILHELM, M. Human biomonitoring: state of the art. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 210, n. 3, p. 201-228, 2007. ISSN 1438-4639.

ASCHNER, M.; ERIKSON, K. M.; DORMAN, D. C. Manganese dosimetry: species differences and implications for neurotoxicity. **Critical reviews in toxicology**, v. 35, n. 1, p. 1-32, 2005. ISSN 1040-8444.

AUTRUP, H. et al. Biomarkers for exposure to ambient air pollution--comparison of carcinogen-DNA adduct levels with other exposure markers and markers for oxidative stress. **Environmental health perspectives**, v. 107, n. 3, p. 233, 1999.

BAGRYANTSEVA, Y. et al. Oxidative damage to biological macromolecules in Prague bus drivers and garagemen: impact of air pollution and genetic polymorphisms. **Toxicology letters**, v. 199, n. 1, p. 60-68, 2010. ISSN 0378-4274.

BAIERLE, M. et al. Serum quantification of vitamin C by HPLC-UV and stability study. **Química Nova**, v. 35, n. 2, p. 403-407, 2012. ISSN 0100-4042.

BAIERLE, M. et al. Are delta-aminolevulinatase dehydratase inhibition and metal concentrations additional factors for the age-related cognitive decline? **International journal of environmental research and public health**, v. 11, n. 10, p. 10851-10867, 2014.

BAKER, M. G. et al. Using exposure windows to explore an elusive biomarker: blood manganese. **International archives of occupational and environmental health**, v. 89, n. 4, p. 679-687, 2016. ISSN 0340-0131.

BAL, W. et al. Multi-metal binding site of serum albumin. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 70, n. 1, p. 33-39, 1998. ISSN 0162-0134.

BARTH, A. et al. Association between inflammation processes, DNA damage, and exposure to environmental pollutants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 1, p. 353-362, 2017. ISSN 0944-1344.

BARTSCH, H. et al. Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 9, n. 1, p. 3-28, 2000. ISSN 1055-9965.

BECKENKAMP, A. et al. DPPIV/CD26: a tumor suppressor or a marker of malignancy? **Tumor Biology**, v. 37, n. 6, p. 7059-7073, 2016. ISSN 1010-4283.

BELLO, D. et al. Physicochemical and morphological characterisation of nanoparticles from photocopiers: implications for environmental health. **Nanotoxicology**, v. 7, n. 5, p. 989-1003, 2013. ISSN 1743-5390.

BENDAS, G.; BORSIG, L. Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. **International journal of cell biology**, v. 2012, 2012. ISSN 1687-8876.

BEYERSMANN, D.; HARTWIG, A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. **Archives of toxicology**, v. 82, n. 8, p. 493, 2008. ISSN 0340-5761.

BIBBY, R. L.; WEBSTER-BROWN, J. G. Trace metal adsorption onto urban stream suspended particulate matter (Auckland region, New Zealand). **Applied Geochemistry**, v. 21, n. 7, p. 1135-1151, 2006. ISSN 0883-2927.

BOFFETTA, P.; JOURENKOVA, N.; GUSTAVSSON, P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Cancer causes & control**, v. 8, n. 3, p. 444-472, 1997. ISSN 0957-5243.

BOITEUX, S.; RADICELLA, J. P. The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 377, n. 1, p. 1-8, 2000. ISSN 0003-9861.

BONASSI, S. et al. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 93-100, 2011. ISSN 0267-8357.

BOYLE, P.; FERLAY, J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. **Annals of oncology**, v. 16, n. 3, p. 481-488, 2005. ISSN 0923-7534.

BOYLE, P.; LEVIN, B. **World cancer report 2008**. IARC Press, International Agency for Research on Cancer, 2008. ISBN 9283204239.

BRAVARD, A. et al. Oxidation status of human OGG1-S326C polymorphic variant determines cellular DNA repair capacity. **Cancer research**, v. 69, n. 8, p. 3642-3649, 2009. ISSN 0008-5472.

BRAY, T. M.; BETTGER, W. J. The physiological role of zinc as an antioxidant. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 8, n. 3, p. 281-291, 1990. ISSN 0891-5849.

BROOK, R. D. et al. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease. **Circulation**, v. 121, n. 21, p. 2331-2378, 2010. ISSN 0009-7322.

BROOK, R. D. et al. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: an update to the scientific statement from the American heart association. **Circulation**, v. 121, 2010. Disponível em: < <https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e3181d8e318> >.

BRUCKER, N. et al. Atherosclerotic process in taxi drivers occupationally exposed to air pollution and co-morbidities. **Environmental research**, v. 131, p. 31-38, 2014. ISSN 0013-9351.

BRUCKER, N. et al. Relationship between blood metals and inflammation in taxi drivers. **Clinica Chimica Acta**, v. 444, p. 176-181, 2015. ISSN 0009-8981.

BRUCKER, N. et al. Biomarkers of occupational exposure to air pollution, inflammation and oxidative damage in taxi drivers. **Science of the Total Environment**, v. 463, p. 884-893, 2013. ISSN 0048-9697.

BURGAZ, S. et al. Chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes of traffic policemen and taxi drivers exposed to urban air pollution. **Chemosphere**, v. 47, n. 1, p. 57-64, 2002. ISSN 0045-6535.

BURGER, M. et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. **European urology**, v. 63, n. 2, p. 234-241, 2013. ISSN 0302-2838.

BURTIS, C. A.; BRUNS, D. E. **Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics**. Elsevier Health Sciences, 2014. ISBN 0323292062.

CARLSTEN, C. et al. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) polymorphisms and lung cancer: a literature-based systematic HuGE review and meta-analysis. **American journal of epidemiology**, v. 167, n. 7, p. 759-774, 2008. ISSN 0002-9262.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013. ISSN 0278-6915.

CASSINI, C. et al. Occupational risk assessment of oxidative stress and genotoxicity in workers exposed to paints during a working week. **International journal of occupational medicine and environmental health**, v. 24, n. 3, p. 308, 2011. ISSN 1232-1087.

CHARÃO, M. F. et al. Simultaneous quantification of lycopene, β -carotene, retinol and α -tocopherol in plasma after a simple extraction procedure: stability study and application to human volunteers. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 8, p. 1441-1449, 2012. ISSN 0103-5053.

CHASSEAUD, L. The role of glutathione and glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. **Advances in cancer research**, v. 29, p. 175-274, 1979. ISSN 0065-230X.

CHEN, C. C. et al. Selective inhibition of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 expression by inhibitors of I kappa B-alpha phosphorylation. **The Journal of Immunology**, v. 155, n. 7, p. 3538-3545, 1995. ISSN 0022-1767.

CHEN, S. et al. Polymorphisms of the CYP1A1 and GSTM1 genes in relation to individual susceptibility to lung carcinoma in Chinese population. **Mutation Research/Mutation Research Genomics**, v. 458, n. 1, p. 41-47, 2001. ISSN 1383-5726.

CHEZE, S.; LEPORRIER, M. Hemogram: indications and interpretation. Diagnostic orientation. **La Revue du praticien**, v. 53, n. 2, p. 177, 2003. ISSN 0035-2640.

CHUANG, C.-Y.; CHANG, C.-C. Urinary 1-hydroxypyrene level relative to vehicle exhaust exposure mediated by metabolic enzyme polymorphisms. **Journal of occupational health**, v. 49, n. 2, p. 140-151, 2007. ISSN 1341-9145.

- CIARROCCA, M. et al. Is urinary 1-hydroxypyrene a valid biomarker for exposure to air pollution in outdoor workers? A meta-analysis. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v. 24, n. 1, p. 17-26, 2014. ISSN 1559-0631.
- COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249, 2004. ISSN 1073-6085.
- COMBS JR, G. F.; MCCLUNG, J. P. **The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health**. Academic press, 2016. ISBN 0128029838.
- DA SILVA, J. DNA damage induced by occupational and environmental exposure to miscellaneous chemicals. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 770, p. 170-182, 2016. ISSN 1383-5742.
- DALLAROSA, J. B. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particles in the metropolitan area of Porto Alegre, Brazil. **Atmospheric Environment**, v. 39, n. 9, p. 1609-1625, 2005. ISSN 1352-2310.
- DALLY, H.; HARTWIG, A. Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel (II) and cadmium (II) in mammalian cells. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 5, p. 1021-1026, 1997. ISSN 0143-3334.
- DAMMAN, K. et al. Volume status and diuretic therapy in systolic heart failure and the detection of early abnormalities in renal and tubular function. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 57, n. 22, p. 2233-2241, 2011. ISSN 0735-1097.
- DE KOK, T. M. et al. Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: a review of recent studies. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 613, n. 2, p. 103-122, 2006. ISSN 1383-5742.
- DE SOUZA ARAÚJO, D. F. et al. The concentration of minerals and physicochemical contaminants in conventional and organic vegetables. **Food Control**, v. 44, p. 242-248, 2014. ISSN 0956-7135.
- DELFINO, R. J.; STAIMER, N.; VAZIRI, N. D. Air pollution and circulating biomarkers of oxidative stress. **Air Quality, Atmosphere & Health**, v. 4, n. 1, p. 37-52, 2011. ISSN 1873-9318.
- DENKHAUS, E.; SALNIKOW, K. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 42, n. 1, p. 35-56, 2002. ISSN 1040-8428.
- DFG. **Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area. List of MAK and BAT values 2002. Maximum concentrations and biological tolerance values at the workplace**: Weinheim, FRG: Wiley-VCH 2002.
- DOLOVICH, J.; EVANS, S.; NIEBOER, E. Occupational asthma from nickel sensitivity: I. Human serum albumin in the antigenic determinant. **British journal of industrial medicine**, v. 41, n. 1, p. 51-55, 1984. ISSN 1470-7926.
- DRISCOLL, T. R. et al. The Australian Work Exposures Study: occupational exposure to lead and lead compounds. **Annals of Occupational Hygiene**, p. mev056, 2015. ISSN 0003-4878.

DRUESNE-PECOLLO, N. et al. Beta-carotene supplementation and cancer risk: a systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. **International journal of cancer**, v. 127, n. 1, p. 172-184, 2010. ISSN 1097-0215.

DUAN, J.; TAN, J. Atmospheric heavy metals and arsenic in China: situation, sources and control policies. **Atmospheric Environment**, v. 74, p. 93-101, 2013. ISSN 1352-2310.

DUAN, Y. et al. Toxicological characteristics of nanoparticulate anatase titanium dioxide in mice. **Biomaterials**, v. 31, n. 5, p. 894-899, 2010. ISSN 0142-9612.

DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W.-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell research**, v. 20, n. 1, p. 34-50, 2010. ISSN 1001-0602.

ED RAINGER, G. et al. The role of platelets in the recruitment of leukocytes during vascular disease. **Platelets**, v. 26, n. 6, p. 507-520, 2015. ISSN 0953-7104.

ELMARAKBY, A. A.; SULLIVAN, J. C. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. **Cardiovascular therapeutics**, v. 30, n. 1, p. 49-59, 2012. ISSN 1755-5922.

ELVIDGE, T. et al. Feasibility of using biomarkers in blood serum as markers of effect following exposure of the lungs to particulate matter air pollution. **Journal of Environmental Science and Health, Part C**, v. 31, n. 1, p. 1-44, 2013. ISSN 1059-0501.

ENGSTRÖM, G. et al. Complement C3 is a risk factor for the development of diabetes. **Diabetes**, v. 54, n. 2, p. 570-575, 2005. ISSN 0012-1797.

EOM, S.-Y. et al. Reference levels of blood mercury and association with metabolic syndrome in Korean adults. **International archives of occupational and environmental health**, v. 87, n. 5, p. 501-513, 2014. ISSN 0340-0131.

FAGE, S. W. et al. Titanium: a review on exposure, release, penetration, allergy, epidemiology, and clinical reactivity. **Contact Dermatitis**, v. 74, n. 6, p. 323-345, 2016. ISSN 0105-1873.

FAITA, F. et al. Arsenic-induced genotoxicity and genetic susceptibility to arsenic-related pathologies. **International journal of environmental research and public health**, v. 10, n. 4, p. 1527-1546, 2013.

FANG, Y. et al. Concentrations and health risks of lead, cadmium, arsenic, and mercury in rice and edible mushrooms in China. **Food Chemistry**, v. 147, p. 147-151, 2014. ISSN 0308-8146.

FANOUE, L. A. et al. Survey of air pollution in Cotonou, Benin—air monitoring and biomarkers. **Science of the Total Environment**, v. 358, n. 1, p. 85-96, 2006. ISSN 0048-9697.

FERNÁNDEZ, M. I. et al. Long-term impact of arsenic in drinking water on bladder cancer health care and mortality rates 20 years after end of exposure. **The Journal of urology**, v. 187, n. 3, p. 856-861, 2012. ISSN 0022-5347.

FORBES, J. M.; COUGHLAN, M. T.; COOPER, M. E. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p. 1446-1454, 2008. ISSN 0012-1797.

FORTMANN, S. P. et al. Vitamin and mineral supplements in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: an updated systematic evidence review for the US Preventive Services Task Force. **Annals of internal medicine**, v. 159, n. 12, p. 824-834, 2013. ISSN 0003-4819.

GAETKE, L. M.; CHOW, C. K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. **Toxicology**, v. 189, n. 1, p. 147-163, 2003. ISSN 0300-483X.

GANN, P. H. et al. Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma lycopene levels. **Cancer research**, v. 59, n. 6, p. 1225-1230, 1999. ISSN 0008-5472.

GARCIA-CLOSAS, M. et al. **NAT2 slow acetylation and GSTM1 null genotype increase bladder cancer risk: confirmatory results from the spanish bladder cancer study**: AACR 2004.

GAUTHIER, P. T. et al. Metal–Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Mixture Toxicity in *Hyalella azteca*. 2. Metal Accumulation and Oxidative Stress as Interactive Co-toxic Mechanisms. **Environmental science & technology**, v. 49, n. 19, p. 11780-11788, 2015. ISSN 0013-936X.

GIBBS, R. A. et al. The international HapMap project. **Nature**, v. 426, n. 6968, p. 789-796, 2003. ISSN 0028-0836.

GIL, F.; HERNÁNDEZ, A. F.; MARTÍN-DOMINGO, M. C. Toxic contamination of nutraceuticals and food ingredients. **Nutraceuticals: efficacy, safety and toxicity**, ed. R. Gupta, p. 825-837, 2016.

GIL, J. et al. CYP1A1 Ile462Val polymorphism and colorectal cancer risk in Polish patients. **Medical Oncology**, v. 31, n. 7, p. 1-5, 2014. ISSN 1357-0560.

GLASAUER, A.; CHANDEL, N. S. Targeting antioxidants for cancer therapy. **Biochemical pharmacology**, v. 92, n. 1, p. 90-101, 2014. ISSN 0006-2952.

GÖETHEL, G. et al. Evaluation of genotoxicity in workers exposed to benzene and atmospheric pollutants. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 770, p. 61-65, 2014. ISSN 1383-5718.

GOKTURK, H. et al. Long-term treatment with a beta-blocker timolol attenuates renal-damage in diabetic rats via enhancing kidney antioxidant-defense system. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 395, n. 1-2, p. 177-186, 2014. ISSN 0300-8177.

GOODE, E. L.; ULRICH, C. M.; POTTER, J. D. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 11, n. 12, p. 1513-1530, 2002. ISSN 1055-9965.

GRUZEWSKA, K. et al. Essentiality and toxicity of vanadium supplements in health and pathology. **J Physiol Pharmacol**, v. 65, n. 5, p. 603-611, 2014.

GUIA DE ALIMENTAÇÃO, C.-G. D. P. Nutrição, Secretaria de Atenção à Saúde, Ministério da Saúde. **Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

- HASTY, P.; CAMPISI, J.; SHARP, Z. D. Do p53 stress responses impact organismal aging? **Translational Cancer Research**, v. 5, n. 6, p. 685-691, 2016. ISSN 2219-6803.
- HEEDERIK, D.; HENNEBERGER, P. K.; REDLICH, C. A. Primary prevention: exposure reduction, skin exposure and respiratory protection. **European Respiratory Review**, v. 21, n. 124, p. 112-124, 2012. ISSN 0905-9180.
- HERTLE, E.; VAN GREEVENBROEK, M.; STEHOUWER, C. Complement C3: an emerging risk factor in cardiometabolic disease. **Diabetologia**, v. 55, n. 4, p. 881-884, 2012. ISSN 0012-186X.
- HOEK, G. et al. Long-term air pollution exposure and cardio- respiratory mortality: a review. **Environmental Health**, v. 12, n. 1, p. 43, May 28 2013. ISSN 1476-069X. Disponível em: < <https://doi.org/10.1186/1476-069X-12-43>>.
- HUANG, K.-L. et al. Zinc oxide nanoparticles induce eosinophilic airway inflammation in mice. **Journal of hazardous materials**, v. 297, p. 304-312, 2015. ISSN 0304-3894.
- HUBBARD, A. K.; ROTHLEIN, R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 9, p. 1379-1386, 2000. ISSN 0891-5849.
- HURST, R. et al. EURRECA—estimating selenium requirements for deriving dietary reference values. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 53, n. 10, p. 1077-1096, 2013. ISSN 1040-8398.
- HYDER, M. A.; HASAN, M.; MOHIELDEIN, A. H. Comparative levels of ALT, AST, ALP and GGT in liver associated diseases. **European journal of experimental biology**, v. 3, n. 2, p. 280-284, 2013.
- IARC. Agents classified by the IARC Monographs, Volumes 1–105. **France: World Health Organization**, 2012.
- JAISHANKAR, M. et al. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. **Interdisciplinary toxicology**, v. 7, n. 2, p. 60-72, 2014. ISSN 1337-9569.
- JANSSEN, K. et al. DNA repair activity of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) in human lymphocytes is not dependent on genetic polymorphism Ser 326/Cys 326. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 486, n. 3, p. 207-216, 2001. ISSN 0921-8777.
- JAWORSKA-BIENIEK, K. et al. Selenium and Cancer. In: (Ed.). **Selenium**, 2015. p.377-390.
- JONGENEELLEN, F. J. A guidance value of 1-hydroxypyrene in urine in view of acceptable occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Toxicology letters**, v. 231, n. 2, p. 239-248, 2014. ISSN 0378-4274.
- JOZKOWICZ, A.; WAS, H.; DULAK, J. Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend? **Antioxidants & redox signaling**, v. 9, n. 12, p. 2099-2118, 2007. ISSN 1523-0864.
- KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox biology**, v. 1, n. 1, p. 244-257, 2013. ISSN 2213-2317.

KANG, S.-K.; KIM, E. A. Occupational diseases in Korea. **Journal of Korean medical science**, v. 25, n. Suppl, p. S4-S12, 2010. ISSN 1011-8934.

KARIN, M.; GRETEN, F. R. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 10, p. 749-759, 2005. ISSN 1474-1733.

KARJALAINEN, A. **International statistical classification of diseases and related health problems (ICD-10) in occupational health**. World Health Organization, Sustainable Development and Healthy Environments, Protection of the Human Environment Geneva, 1999.

KIRILUK, K. J. et al. Bladder cancer risk from occupational and environmental exposures. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 2012, Elsevier. p.199-211.

KOCH, F. et al. Influence of class M1 glutathione S-transferase (GST Mu) polymorphism on GST M1 gene expression level and tumor size in oral squamous cell carcinoma. **Oral oncology**, v. 46, n. 2, p. 128-133, 2010. ISSN 1368-8375.

KOHNO, T. et al. Association of the OGG1-Ser326Cys polymorphism with lung adenocarcinoma risk. **Cancer science**, v. 97, n. 8, p. 724-728, 2006. ISSN 1349-7006.

KONG, A.-N. T. **Inflammation, oxidative stress, and cancer: dietary approaches for cancer prevention**. CRC Press, 2013. ISBN 146650370X.

KORDAS, K. et al. Prevalence and predictors of exposure to multiple metals in preschool children from Montevideo, Uruguay. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 20, p. 4488-4494, 2010. ISSN 0048-9697.

KUMAR, A. et al. Role of OGG1 Ser326Cys polymorphism and 8-oxoguanine DNA damage in risk assessment of squamous cell carcinoma of head and neck in North Indian population. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 726, n. 2, p. 227-233, 2011. ISSN 1383-5718.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER JR, J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic acids research**, v. 19, n. 19, p. 5444, 1991.

LAM, F. W.; VIJAYAN, K. V.; RUMBAUT, R. E. Platelets and their interactions with other immune cells. **Comprehensive Physiology**, 2015. ISSN 0470650710.

LAWRENCE, T. et al. Possible new role for NF- κ B in the resolution of inflammation. **Nature medicine**, v. 7, n. 12, p. 1291-1297, 2001.

LE MARCHAND, L. et al. Association of the hOGG1 Ser326Cys polymorphism with lung cancer risk. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 11, n. 4, p. 409-412, 2002. ISSN 1055-9965.

LEE, C.-C. et al. Motorcycle exhaust particles up-regulate expression of vascular adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 in human umbilical vein endothelial cells. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 4, p. 552-560, 2012. ISSN 0887-2333.

LEE, Y.-W. **Recording and Notification of Occupational Accidents and Diseases and ILO List of Occupational Diseases**. International Labour Office, 2002. ISBN 9220138026.

LEONARDI, G. et al. Immune biomarkers in relation to exposure to particulate matter: a cross-sectional survey in 17 cities of Central Europe. **Inhalation toxicology**, v. 12, n. sup4, p. 1-14, 2000. ISSN 0895-8378.

LEOPARDI, P. et al. Analysis of micronuclei in peripheral blood lymphocytes of traffic wardens: Effects of exposure, metabolic genotypes, and inhibition of excision repair in vitro by ARA-C. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 41, n. 2, p. 126-130, 2003. ISSN 1098-2280.

LEROYER, A. et al. 1-Hydroxypyrene and 3-hydroxybenzo [a] pyrene as biomarkers of exposure to PAH in various environmental exposure situations. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 5, p. 1166-1173, 2010. ISSN 0048-9697.

LI, Q. et al. Monocytes induce proximal tubular epithelial–mesenchymal transition through NF-kappa B dependent upregulation of ICAM-1. **Journal of cellular biochemistry**, v. 112, n. 6, p. 1585-1592, 2011. ISSN 1097-4644.

LI, W. et al. Concentrations and origins of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons and oxy-polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air in urban and rural areas in northern China. **Environmental pollution**, v. 197, p. 156-164, 2015. ISSN 0269-7491.

LIN, J.; KAKKAR, V.; LU, X. Impact of MCP-1 in atherosclerosis. **Current pharmaceutical design**, v. 20, n. 28, p. 4580-4588, 2014. ISSN 1381-6128.

LIU, H. et al. Comparative study of respiratory tract immune toxicity induced by three sterilisation nanoparticles: silver, zinc oxide and titanium dioxide. **Journal of hazardous materials**, v. 248, p. 478-486, 2013. ISSN 0304-3894.

LIU, R. et al. Pulmonary toxicity induced by three forms of titanium dioxide nanoparticles via intra-tracheal instillation in rats. **Progress in natural science**, v. 19, n. 5, p. 573-579, 2009. ISSN 1002-0071.

LOU, J. et al. DNA damage and oxidative stress in human B lymphoblastoid cells after combined exposure to hexavalent chromium and nickel compounds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 533-540, 2013. ISSN 0278-6915.

LUBBERS, R. et al. Production of complement components by cells of the immune system. **Clinical & Experimental Immunology**, 2017. ISSN 1365-2249.

MACIEL, R. A. P. et al. p-cresol but not p-cresyl sulfate stimulate MCP-1 production via NF-κB p65 in human vascular smooth muscle cells. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 38, n. 2, p. 153-160, 2016. ISSN 0101-2800.

MANNO, M. et al. **Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA)**: Elsevier 2010.

MARCZYNSKI, B. et al. Analysis of 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine and DNA strand breaks in white blood cells of occupationally exposed workers: comparison with ambient monitoring, urinary metabolites and enzyme polymorphisms. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 2, p. 273-281, 2002. ISSN 0143-3334.

MARINKOVIĆ, N.; PAŠALIĆ, D.; POTOČKI, S. Polymorphisms of genes involved in polycyclic aromatic hydrocarbons' biotransformation and atherosclerosis. **Biochemia medica**, v. 23, n. 3, p. 255-265, 2013. ISSN 1330-0962.

MARKERT, A. et al. Single and Combined Exposure to Zinc-and Copper-Containing Welding Fumes Lead to Asymptomatic Systemic Inflammation. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 58, n. 2, p. 127-132, 2016. ISSN 1076-2752.

MARTINET, W. et al. Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques. **Circulation**, v. 106, n. 8, p. 927-932, 2002. ISSN 0009-7322.

MARUHN, D. Rapid colorimetric assay of β -galactosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase in human urine. **Clinica Chimica Acta**, v. 73, n. 3, p. 453-461, 1976. ISSN 0009-8981.

MCCLURE, S. How minerals may influence the development and expression of immunity to endoparasites in livestock. **Parasite immunology**, v. 30, n. 2, p. 89-100, 2008. ISSN 1365-3024.

MENEGON, A. et al. Parkinson's disease, pesticides, and glutathione transferase polymorphisms. **The Lancet**, v. 352, n. 9137, p. 1344-1346, 1998. ISSN 0140-6736.

MILLS, N. L. et al. Adverse cardiovascular effects of air pollution. **Nature clinical practice Cardiovascular medicine**, v. 6, n. 1, p. 36-44, 2009. ISSN 1743-4297.

MISHRA, S. K.; KIM, M. K. Vitamin A and Cancer Risk. In: (Ed.). **Vitamin A and Carotenoids**, 2012. p.485-500.

MITTLER, R. ROS are good. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 1, p. 11-19, 2017. ISSN 1360-1385.

MONTENEGRO, M. F. et al. A polymorphism in the delta-aminolevulinic acid dehydratase gene modifies plasma/whole blood lead ratio. **Archives of toxicology**, v. 80, n. 7, p. 394-398, 2006. ISSN 0340-5761.

MORAIS, S.; E COSTA, F. G.; DE LOURDES PEREIRA, M. **Heavy metals and human health**. INTECH Open Access Publisher, 2012. ISBN 9533078545.

MOREAU, R. L. D. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. D. Toxicologia analítica. In: (Ed.). **Toxicologia analítica**, 2014. p.318-318.

MORTIER, A. et al. CD26/dipeptidylpeptidase IV—chemokine interactions: double-edged regulation of inflammation and tumor biology. **Journal of leukocyte biology**, v. 99, n. 6, p. 955-969, 2016. ISSN 0741-5400.

MS; BRASIL, S. D. A. À. S. C. G. D. P. D. A. E. N.-M. D. S.-. **Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável**: MS Brasília 2006.

MUKAIDA, N.; HARADA, A.; MATSUSHIMA, K. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 9, n. 1, p. 9-23, 1998. ISSN 1359-6101.

MULLER, P. A.; VOUSDEN, K. H. p53 mutations in cancer. **Nature cell biology**, v. 15, n. 1, p. 2-8, 2013. ISSN 1465-7392.

MULTANI, S.; SARANATH, D. Genotypic distribution of single nucleotide polymorphisms in oral cancer: global scene. **Tumor Biology**, v. 37, n. 11, p. 14501-14512, 2016. ISSN 1010-4283.

NAIDU, K. A. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. **Nutrition Journal**, v. 2, n. 1, p. 7, 2003. ISSN 1475-2891.

NAIK, S. R. et al. Protective activity profile of herbomineral medicine in early diabetic nephropathy rats: restoration of kidney antioxidants, hemodynamics and suppression of proinflammatory mediators. **Biomedicine & Aging Pathology**, v. 4, n. 1, p. 33-41, 2014. ISSN 2210-5220.

NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A. Interpretação Laboratorial do Hemograma. **São José do Rio Preto**, v. 405, 2008.

NASREDDINE, L.; PARENT-MASSIN, D. Food contamination by metals and pesticides in the European Union. Should we worry? **Toxicology letters**, v. 127, n. 1, p. 29-41, 2002. ISSN 0378-4274.

NEWBY, D. E. et al. Expert position paper on air pollution and cardiovascular disease. **European heart journal**, p. ehu458, 2014. ISSN 0195-668X.

NI, W. et al. Associations of neonatal lead, cadmium, chromium and nickel co-exposure with DNA oxidative damage in an electronic waste recycling town. **Science of the Total Environment**, v. 472, p. 354-362, 2014. ISSN 0048-9697.

NICULESCU, F.; RUS, H. The role of complement activation in atherosclerosis. **Immunologic research**, v. 30, n. 1, p. 73-80, 2004. ISSN 0257-277X.

NOLAN, R. L. et al. Pulmonary cholesterol granulomas in patients with pulmonary artery hypertension: chest radiographic and CT findings. **AJR. American journal of roentgenology**, v. 172, n. 5, p. 1317-1319, 1999. ISSN 0361-803X.

NORDBERG, G. F.; FOWLER, B. A.; NORDBERG, M. **Handbook on the Toxicology of Metals**. Academic Press, 2014. ISBN 0123973392.

NORIS, M.; REMUZZI, G. Overview of complement activation and regulation. *Seminars in nephrology*, 2013, Elsevier. p.479-492.

NOVOTNA, B. et al. Impact of air pollution and genotype variability on DNA damage in Prague policemen. **Toxicology letters**, v. 172, n. 1, p. 37-47, 2007. ISSN 0378-4274.

NRIAGU, J. O.; COKER, R. D. Trace metals in humic and fulvic acids from Lake Ontario sediments. **Environmental science & technology**, v. 14, n. 4, p. 443-446, 1980. ISSN 0013-936X.

ORGANIZATION, W. H. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 88: Formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tert-butoxypropan-2-ol**. World Health Organization, 2004. ISBN 9283212886.

OTTERBEIN, L. E. et al. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. **Trends in immunology**, v. 24, n. 8, p. 449-455, 2003. ISSN 1471-4906.

PAL, A. Copper toxicity induced hepatocerebral and neurodegenerative diseases: an urgent need for prognostic biomarkers. **Neurotoxicology**, v. 40, p. 97-101, 2014. ISSN 0161-813X.

PAMPLONA, R.; COSTANTINI, D. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, n. 4, p. R843-R863, 2011. ISSN 0363-6119.

PAPADOPOULOS, G. et al. Occupational and public health and safety in a changing work environment: An integrated approach for risk assessment and prevention. **Safety Science**, v. 48, n. 8, p. 943-949, 2010. ISSN 0925-7535.

PARK, J.-D.; ZHENG, W. Human exposure and health effects of inorganic and elemental mercury. **Journal of Preventive Medicine and Public Health**, v. 45, n. 6, p. 344-352, 2012. ISSN 1975-8375.

PAZOS, M.; NADER, H. B. Effect of photodynamic therapy on the extracellular matrix and associated components. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 8, p. 1025-1035, 2007. ISSN 0100-879X.

PEDERSEN, M. et al. Cytogenetic effects in children and mothers exposed to air pollution assessed by the frequency of micronuclei and fluorescence in situ hybridization (FISH): a family pilot study in the Czech Republic. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 608, n. 2, p. 112-120, 2006. ISSN 1383-5718.

PEDERSEN, M. et al. Increased micronuclei and bulky DNA adducts in cord blood after maternal exposures to traffic-related air pollution. **Environmental research**, v. 109, n. 8, p. 1012-1020, 2009. ISSN 0013-9351.

PERES, L. A. B. et al. Biomarcadores da injúria renal aguda. **J Bras Nefrol**, p. 229-236, 2013.

PESCH, B. et al. Levels and predictors of airborne and internal exposure to manganese and iron among welders. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v. 22, n. 3, p. 291-298, 2012. ISSN 1559-0631.

PETERS, M. C.; NGUYEN, M.-L. T.; DUNICAN, E. M. Biomarkers of Airway Type-2 Inflammation and Integrating Complex Phenotypes to Endotypes in Asthma. **Current allergy and asthma reports**, v. 16, n. 10, p. 71, 2016. ISSN 1529-7322.

POPE, C. A. et al. Exposure to Fine Particulate Air Pollution Is Associated With Endothelial Injury and Systemic Inflammation Novelty and Significance. **Circulation Research**, v. 119, n. 11, p. 1204-1214, 2016. ISSN 0009-7330.

POREBA, R. et al. Environmental and occupational exposure to lead as a potential risk factor for cardiovascular disease. **environmental toxicology and pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 267-277, 2011. ISSN 1382-6689.

PORRINI, M.; RISO, P. Lymphocyte lycopene concentration and DNA protection from oxidative damage is increased in women after a short period of tomato consumption. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 2, p. 189-192, 2000. ISSN 0022-3166.

PRASHANTH, L. et al. A review on role of essential trace elements in health and disease. **Journal of Dr. NTR University of Health Sciences**, v. 4, n. 2, p. 75, 2015. ISSN 2277-8632.

PUDASAINEE, D. et al. Mercury co-beneficial capture in air pollution control devices of coal-fired power plants. **International Journal of Coal Geology**, v. 170, p. 48-53, 2017. ISSN 0166-5162.

PULICE, G. Role of the tumour suppressor pathway p53-p21 in the regulation of metabolism. 2014.

RAFTOS, J. E.; WHILLIER, S.; KUCHEL, P. W. Glutathione Synthesis and Turnover in the Human Erythrocyte Alignment of a model based on detailed enzyme kinetics with experimental data. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 31, p. 23557-23567, 2010. ISSN 0021-9258.

RAHIMI-MADISEH, M. et al. The research and development on the antioxidants in prevention of diabetic complications. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 9, p. 825-831, 2016. ISSN 1995-7645.

RAVEH, O. et al. Kinetic analysis of copper-induced peroxidation of HDL, autoaccelerated and tocopherol-mediated peroxidation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 2, p. 131-146, 2000. ISSN 0891-5849.

RAY, J. et al. Correlation of trace elemental profiles in blood samples of Indian patients with leukoplakia and oral submucous fibrosis. **Biological trace element research**, v. 144, n. 1-3, p. 295-305, 2011. ISSN 0163-4984.

REIS, A. et al. Investigating relationships between biomarkers of exposure and environmental copper and manganese levels in house dusts from a Portuguese industrial city. **Environmental geochemistry and health**, v. 37, n. 4, p. 725-744, 2015. ISSN 0269-4042.

RENGARAJAN, T. et al. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 3, p. 182-189, 2015. ISSN 2221-1691.

RICKLIN, D. et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature immunology**, v. 11, n. 9, p. 785-797, 2010. ISSN 1529-2908.

ROCHA, J. B. et al. Aminolevulinatase (δ -ALA-D) as marker protein of intoxication with metals and other pro-oxidant situations. **Toxicology Research**, v. 1, n. 2, p. 85-102, 2012.

RUIZ, R. B.; HERNÁNDEZ, P. S. Diet and cancer: risk factors and epidemiological evidence. **Maturitas**, v. 77, n. 3, p. 202-208, 2014. ISSN 0378-5122.

RUTKOWSKI, M. J. et al. Cancer and the complement cascade. **Molecular Cancer Research**, v. 8, n. 11, p. 1453-1465, 2010. ISSN 1541-7786.

SAKAI, T. et al. Relationship between delta-aminolevulinic acid dehydratase genotypes and heme precursors in lead workers. **American journal of industrial medicine**, v. 38, n. 3, p. 355-360, 2000. ISSN 1097-0274.

SANDHU, P. S. et al. Association of Microalbuminuria with Intimal Medial Thickness of the Superficial Femoral Artery in Type 2 Diabetes Mellitus. 2016.

SANJARI, M.; GHOLAMHOSEINIAN, A.; NAKHAE, A. The association between cobalt deficiency and endemic goiter in school-aged children. **Endocrinology and Metabolism**, v. 29, n. 3, p. 307-311, 2014. ISSN 2093-596X.

SANMAMED, M. F. et al. Serum interleukin-8 and its relationship to tumor burden and treatment response across malignancies of multiple tissue origins. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 15_suppl, p. e22135-e22135, 2014. Disponível em: < http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2014.32.15_suppl.e22135 >.

SAQUIB, Q. et al. Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 2, p. 351-361, 2012. ISSN 0887-2333.

SASSA, S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. **Enzyme**, v. 28, n. 2-3, p. 133-145, 1981. ISSN 0013-9432.

SAUER, E. et al. Liver δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Activity is Inhibited by Neonicotinoids and Restored by Antioxidant Agents. **International journal of environmental research and public health**, v. 11, n. 11, p. 11676, 2014. ISSN 1660-4601. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1660-4601/11/11/11676> >.

SCHAEFER, A. et al. Actin-binding proteins differentially regulate endothelial cell stiffness, ICAM-1 function and neutrophil transmigration. **J Cell Sci**, v. 127, n. 20, p. 4470-4482, 2014. ISSN 0021-9533.

SCHAUER, C.; NIESSNER, R.; PÖSCHL, U. Polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air particulate matter: decadal and seasonal trends, chemical degradation, and sampling artifacts. **Environmental science & technology**, v. 37, n. 13, p. 2861-2868, 2003. ISSN 0013-936X.

SCHAUMLÖFFEL, D. Nickel species: analysis and toxic effects. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 26, n. 1, p. 1-6, 2012. ISSN 0946-672X.

SCHOLZ, T. et al. Transfer of tissue factor from platelets to monocytes: role of platelet-derived microvesicles and CD62P. **Thrombosis and haemostasis**, v. 88, n. 6, p. 1033-1039, 2002. ISSN 0340-6245.

SHEN, H. et al. Global lung cancer risk from PAH exposure highly depends on emission sources and individual susceptibility. **Scientific reports**, v. 4, p. 6561, 2014. ISSN 2045-2322.

SIGEL, A.; SIGEL, H.; SIGEL, R. K. **Interrelations between essential metal ions and human diseases**. Springer, 2013. ISBN 9400775008.

SILALAH, J. Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 11, n. 1, p. 79-84, 2002. ISSN 1440-6047.

SIMONSEN, L. O.; HARBAK, H.; BENNEKOU, P. Cobalt metabolism and toxicology—a brief update. **Science of the Total Environment**, v. 432, p. 210-215, 2012. ISSN 0048-9697.

SIN, D. D.; MAN, S. P. Chronic obstructive pulmonary disease as a risk factor for cardiovascular morbidity and mortality. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 2, n. 1, p. 8-11, 2005. ISSN 1546-3222.

SMEETH, L. et al. Risk of myocardial infarction and stroke after acute infection or vaccination. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 25, p. 2611-2618, 2004. ISSN 0028-4793.

SPASOVSKI, D. Renal markers for assessment of renal tubular and glomerular dysfunction. **Journal of Nephro pharmacology**, v. 2, n. 2, p. 23, 2013.

SRIVASTAVA, A. K. Anti-diabetic and toxic effects of vanadium compounds. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 206, n. 1-2, p. 177-182, 2000. ISSN 0300-8177.

STEMMLER, A. J.; BURROWS, C. J. Guanine versus deoxyribose damage in DNA oxidation mediated by vanadium (IV) and vanadium (V) complexes. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 100-106, 2001. ISSN 0949-8257.

SUNAGA, N. et al. Contribution of the NQO1 and GSTT1 polymorphisms to lung adenocarcinoma susceptibility. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 11, n. 8, p. 730-738, 2002. ISSN 1055-9965.

SZETO, Y. T. Single-cell gel electrophoresis: a tool for investigation of DNA protection or damage mediated by dietary antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 13, p. 2359-2381, 2007. ISSN 1097-0010.

SZEW CZYŃSKA, M.; POŚNIAK, M.; KOWALSKA, J. The study of polycyclic aromatic hydrocarbons in particulate fractions emitted by office printers and copiers. **Medycyna pracy**, v. 65, n. 6, p. 733-741, 2013. ISSN 0465-5893.

TAK, P. P.; FIRESTEIN, G. S. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. **The Journal of clinical investigation**, v. 107, n. 1, p. 7-11, 2001. ISSN 0021-9738.

TAN, S.-M. The leucocyte β 2 (CD18) integrins: the structure, functional regulation and signalling properties. **Bioscience reports**, v. 32, n. 3, p. 241-269, 2012. ISSN 0144-8463.

TAPIERO, H.; TEW, K. D. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, n. 9, p. 399-411, 2003. ISSN 0753-3322.

TEIXEIRA, E. C.; FELTES, S.; SANTANA, E. R. R. D. Estudo das emissões de fontes móveis na região metropolitana de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 244-248, 2008.

TERRY, C. et al. Implementing a framework for integrating toxicokinetics into human health risk assessment for agrochemicals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 75, p. 89-104, 2016. ISSN 0273-2300.

TROUILLER, B. et al. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. **Cancer research**, p. 0008-5472. CAN-09-2496, 2009. ISSN 0008-5472.

TSAI, J.-R. et al. High expression of heme oxygenase-1 is associated with tumor invasiveness and poor clinical outcome in non-small cell lung cancer patients. **Cellular Oncology**, v. 35, n. 6, p. 461-471, 2012. ISSN 2211-3428.

UZOIGWE, J. C. et al. The emerging role of outdoor and indoor air pollution in cardiovascular disease. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 5, n. 8, p. 445-453, 2013.

VALAVANIDIS, A.; FIOTAKIS, K.; VLACHOGIANNI, T. Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. **Journal of Environmental Science and Health, Part C**, v. 26, n. 4, p. 339-362, 2008. ISSN 1059-0501.

VALAVANIDIS, A. et al. Characterization of atmospheric particulates, particle-bound transition metals and polycyclic aromatic hydrocarbons of urban air in the centre of Athens (Greece). **Chemosphere**, v. 65, n. 5, p. 760-768, 2006. ISSN 0045-6535.

VALKO, M. et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 266, n. 1-2, p. 37-56, 2004. ISSN 0300-8177.

VAN VLIJMEN, B. J. et al. Macrophage p53 deficiency leads to enhanced atherosclerosis in APOE* 3-Leiden transgenic mice. **Circulation Research**, v. 88, n. 8, p. 780-786, 2001. ISSN 0009-7330.

VENTURA, E. et al. Homocysteine and inflammation as main determinants of oxidative stress in the elderly. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 6, p. 737-744, 2009. ISSN 0891-5849.

VERSCHOOR, A.; LANGER, H. F. Crosstalk between platelets and the complement system in immune protection and disease. **Thrombosis and haemostasis**, v. 110, n. 5, p. 910-919, 2013. ISSN 0340-6245.

VIJAYARAGHAVAN, V.; SABANE, A. V.; TEJAS, K. Hypersensitivity to titanium: a less explored area of research. **The Journal of Indian Prosthodontic Society**, v. 12, n. 4, p. 201-207, 2012. ISSN 0972-4052.

WAGNER, E.; FRANK, M. M. Therapeutic potential of complement modulation. **Nature reviews Drug discovery**, v. 9, n. 1, p. 43-56, 2010. ISSN 1474-1776.

WANG, J.-S.; TSENG, C.-Y.; CHAO, M.-W. Diesel Exhaust Particles Contribute to Endothelial Apoptosis via Autophagy Pathway. **Toxicological Sciences**, p. kfw237, 2016. ISSN 1096-6080.

WANG, S. et al. Interleukin-10 deficiency impairs regulatory T cell-derived neuropilin-1 functions and promotes Th1 and Th17 immunity. **Scientific reports**, v. 6, 2016.

WEI, C.-L. et al. A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. **Cell**, v. 124, n. 1, p. 207-219, 2006. ISSN 0092-8674.

WYNANT, W. et al. Occupational exposure to lead and lung cancer: results from two case-control studies in Montreal, Canada. **Occupational and environmental medicine**, p. oemed-2012-100931, 2013. ISSN 1470-7926.

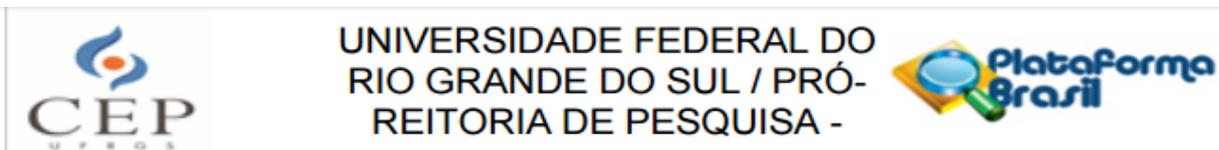
ZHAO, J. et al. The biological effects of individual-level PM_{2.5} exposure on systemic immunity and inflammatory response in traffic policemen. **Occupational and environmental medicine**, p. oemed-2012-100864, 2013. ISSN 1470-7926.

ZHAO, Q. et al. Potential health risks of heavy metals in cultivated topsoil and grain, including correlations with human primary liver, lung and gastric cancer, in Anhui province, Eastern China. **Science of the Total Environment**, v. 470, p. 340-347, 2014. ISSN 0048-9697.

ZIENOLDDINY, S.; SKAUG, V. Single nucleotide polymorphisms as susceptibility, prognostic, and therapeutic markers of nonsmall cell lung cancer. **Lung Cancer: Targets and Therapy**, v. 3, p. 1-14, 2012.

ANEXOS

ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDOS IN VIVO E IN VITRO PARA AVALIAR OS POTENCIAIS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Pesquisador: Solange Cristina Garcia

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 51687315.5.0000.5347

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO
Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.499.204

Apresentação do Projeto:

Trata-se do projeto de pesquisa que tem como pesquisador responsável Solange Cristina Garcia, intitulado "ESTUDOS IN VIVO E IN VITRO PARA AVALIAR OS POTENCIAIS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS" a ser executado de 2014/1 a 2018/1 e que pretende avaliar biomarcadores de exposição, efeito e de susceptibilidade individual in vivo para investigar uma possível relação dose-resposta da exposição a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e potenciais efeitos imunotóxicos e inflamatórios.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 14 de Abril 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 II - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO- CONTROLES

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “Estudos *in vivo* e *in vitro* para avaliar os Potenciais Efeitos da Exposição a Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos”. Este trabalho tem como pesquisadora responsável a professora Dr^a. Solange Cristina Garcia da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

Taxistas encontram-se diariamente expostos aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – HPAs – (compostos presentes na poluição). 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 aos HPAs 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 e células da mucosa da boca). 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 que somente realizamos no laboratório de Toxicologia na Faculdade de Farmácia da UFRGS.

Para a coleta de sangue, o material utilizado é único para cada indivíduo. Será coletada uma amostra de 20 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 no local da punção de sangue, o qual desaparece em alguns dias. Todos os cuidados necessários serão tomados para minimizar esses riscos. Com as amostras de sangue, faremos hemograma, avaliaremos se há alterações no fígado e rins, avaliaremos possíveis danos no DNA e também avaliaremos seu sistema imune.

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, e o volume não precisa exceder a metade do frasco de coleta. 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, minimizando os riscos de contaminação. Esta coleta será utilizada para a análise de dano ao DNA.

No dia da coleta, você receberá um amostrador passivo que deverá ficar pendurado em sua roupa durante toda sua jornada de trabalho deste dia. Este amostrador é pequeno, do tamanho de um broche e não deve interferir na realização de suas atividades de trabalho. O amostrador tem a função de coletar ao longo do dia alguns dos componentes do ar a que você fica exposto. No final do seu dia de trabalho, recolheremos este amostrador para que possamos analisar tais compostos.

Realizaremos também uma avaliação clínica e cardiovascular que incluirá um exame de ecografia das carótidas por Doppler no Instituto Cardiologia de Porto Alegre. Agendaremos uma data para a realização deste exame, conforme sua disponibilidade. As artérias carótidas são localizadas no pescoço, a ecografia das carótidas permite tanto a visualização quanto a audição do fluxo sanguíneo dentro dos vasos. Para este exame, o médico irá aplicar um gel sobre sua pele e posicionará um aparelho portátil chamado transdutor. O transdutor é apertado firmemente sobre a pele e é movido de um lado para outro, para se obter imagens completas das áreas de interesse. O exame é usualmente indolor, podendo haver algum desconforto decorrente da pressão do transdutor sobre a pele ou de posições um pouco incômodas, que serão necessárias para a realização do exame.

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 seja observado alguma alteração significativa nos resultados de seus exames, faremos o possível para lhe fornecer exames mais aprofundados que estejam a nosso alcance ou então lhe encaminhar 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 ao benzeno e aos HPA.

O material biológico coletado será armazenado de forma codificada. 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, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Garantimos a sua não identificação e o caráter confidencial dos resultados. Os resultados serão divulgados de forma agrupada, sem a identificação dos indivíduos que participaram do estudo.

Você terá garantia de acesso, em qualquer etapa da pesquisa, aos profissionais responsáveis pela mesma, para esclarecimentos de eventuais dúvidas, contatando a Prof^a Dr^a Solange Cristina Garcia pelo telefone (51) 3308-5297. A pesquisadora Bruna Gauer também poderá ser contatada pelo telefone (51) 3308-5297 ou pelo e-mail bruna_gauer@hotmail.com.

Também poderá contatar os comitês de ética em pesquisa, que aprovaram este projeto, para esclarecimento de dúvidas.

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no segundo andar do HCPA, sala 2227, ou através do telefone (51) 3359-7640 das 8 às 17 horas, de segunda a sexta.

Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, Av. Princesa Isabel, 395, ou através do telefone (51) 3235-4136, das 9 às 17 horas, de segunda a sexta.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

() 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 III- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - CASOS (MOTORISTAS DE TÁXI)

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “Estudos *in vivo* e *in vitro* para avaliar os Potenciais Efeitos da Exposição a Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos”. 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 a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), pois eles estão presentes na poluição atmosférica. Essas substâncias são liberadas pela queima de matéria orgânica (queima de campos e florestas, emissão de motores de veículos, incêndios, etc) e já se sabe que alguns destes HPAs podem causar sérios problemas em seres humanos, inclusive câncer. Por este motivo, este trabalho pretende avaliar alguns efeitos desta exposição a HPAs sobre a sua saúde.

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 e células da mucosa da boca). Esta coleta será realizada uma única vez, em um único dia que será agendado com você conforme sua disponibilidade. A coleta será realizada na Faculdade de Farmácia da UFRGS, no endereço Av. Ipiranga, 2752 (térreo), Bairro Santana. Não cobriremos seus gastos de deslocamento até o local, ficando estes sob sua responsabilidade. Realizaremos alguns exames que são de rotina em laboratório de análises clínicas, como hemograma, exames de avaliação dos rins e fígado, e alguns outros que somente realizamos no laboratório de Toxicologia na Faculdade de Farmácia da UFRGS.

Para a coleta de sangue, o material utilizado é único para cada indivíduo. Será coletada uma amostra de 20 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 no local da punção de sangue, o qual desaparece em alguns dias. Todos os cuidados necessários serão tomados para minimizar esses riscos. Com as amostras de sangue, faremos hemograma, avaliaremos se há alterações no fígado e rins, avaliaremos possíveis danos no DNA e também avaliaremos seu sistema imune.

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, e o volume não precisa exceder a metade do frasco de coleta. 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, minimizando os riscos de contaminação. Esta coleta será utilizada para a análise de dano ao DNA.

No dia da coleta, você receberá um amostrador passivo que deverá ficar pendurado em sua roupa durante toda sua jornada de trabalho deste dia. Este amostrador é pequeno, do tamanho de um broche e não deve interferir na realização de suas atividades de trabalho. O amostrador tem a função de coletar ao longo do dia alguns dos componentes do ar a que você fica exposto. No final do seu dia de trabalho, pedimos que você nos devolva o amostrador no local onde foram realizadas as coletas (Faculdade de Farmácia/UFRGS), para que possamos analisar tais compostos. Caso você não possa vir até a faculdade, tentaremos combinar com você o local mais apropriado para recolhermos o amostrador no mesmo dia ou então pediremos que você guarde o amostrador em um saco plástico para agendarmos a entrega/busca no dia seguinte.

Realizaremos também uma avaliação clínica e cardiovascular que incluirá um exame de ecografia das carótidas por Doppler no Instituto Cardiologia de Porto Alegre. Agendaremos uma data para a realização deste exame, conforme sua disponibilidade. As artérias carótidas são localizadas no pescoço, a ecografia das carótidas permite tanto a visualização quanto a audição do fluxo sanguíneo dentro dos vasos. Para este exame, o médico irá aplicar um gel sobre sua pele e posicionará um aparelho portátil chamado transdutor. O transdutor é apertado firmemente sobre a pele e é movido de um lado para outro, para se obter imagens completas das áreas de interesse. O exame é usualmente indolor, podendo haver algum desconforto decorrente da pressão do transdutor sobre a pele ou de posições um pouco incômodas, que serão necessárias para a realização do exame.

Você irá receber os resultados dos exames realizados. A entrega dos resultados será realizada no local da coleta das amostras biológicas em data e horário que lhe for mais conveniente. Entraremos em contato para agendarmos a entrega dos mesmos. Caso seja observada alguma alteração significativa nos resultados de seus exames, faremos o possível para lhe fornecer exames mais aprofundados que estejam a nosso alcance ou então lhe encaminhar 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 a poluição atmosférica. Você terá acesso aos resultados laboratoriais realizados durante esse estudo. Caso haja alguma alteração em seus exames, tentaremos fazer o seu encaminhamento a médicos

especializados, através do auxílio do CEREST/RS, para que seja feito acompanhamento dessas alterações e resolução das mesmas, quando possível.

O material biológico coletado será armazenado de forma codificada. 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, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Garantimos a sua não identificação e o caráter confidencial dos resultados. Os resultados serão divulgados de forma agrupada, sem a identificação dos indivíduos que participaram do estudo.

Você terá garantia de acesso, em qualquer etapa da pesquisa, aos profissionais responsáveis pela mesma, para esclarecimento de eventuais dúvidas, contatando a Profª Drª Solange Cristina Garcia pelo telefone (51) 3308-5297. A pesquisadora Bruna Gauer também poderá ser contatada pelo telefone (51) 3308-5297 ou pelo e-mail bruna_gauer@hotmail.com.

Também poderá contatar os comitês de ética em pesquisa, que aprovaram este projeto, para esclarecimento de dúvidas:

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no segundo andar do HCPA, sala 2227, ou através do telefone (51) 33597640 das 8 às 17 horas, de segunda a sexta.

Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, Av. Princesa Isabel, 395, ou através do telefone (51) 3235-4136, das 9 às 17 horas, de segunda a sexta.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

- () 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 IV- QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO
ESTUDOS *IN VIVO* E *IN VITRO* PARA AVALIAR OS POTENCIAIS EFEITOS DA
EXPOSIÇÃO A HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Entrevistador: _____

DADOS GERAIS.

Código da amostra:

Idade: _____ Data de nascimento: ____/____/____

Etnia: _____

Profissão: _____

Função: _____

Local de trabalho (posto/ponto): _____

Tempo que exerce a função: _____

Número de horas diárias de permanência no trabalho? _____

Turno: (1) Manhã (2) Tarde (3) Noite

Jornada de Trabalho Semanal: _____

Função Anterior: _____

Tempo da função anterior: _____

DADOS DE DIAGNÓSTICO

Como você acha que está o seu estado geral de saúde?

() Muito bom () Bom () Mau () Muito mau

Portador de doenças crônicas?

() Sim () Não

Se sim, qual(ais) delas:

() Hipertensão

() Doenças Auto-imunes

() Diabetes

() Tuberculose

() Hipercolesterolemia

() Sífilis

() Câncer

() HIV

() Doenças respiratórias

() Hepatite

Faz uso de medicamentos? Quais? Por quanto tempo?

Faz uso de Polivitamínicos? _____

Apresenta alguns destes sintomas?

- () dor de cabeça () tontura
- () vertigem () dor de estômago
- () dor pernas () irritação olhos
- () irritação nariz () irritação pele
- () lesão nas mãos () coceira
- () alergia () palpitações
- () bronquite () falta de ar
- () rinite alérgica () dor coluna
- () cansaço () problemas auditivos
- () dor muscular () sonolência
- () alteração salivação () tremores
- () insônia () alteração humor
- () distúrbios respiratórios
- () outros sintomas :

HISTÓRICO FAMILIAR

Indique as doenças familiares mais relevantes dos seus avós, tios e irmãos: Hipertensão arterial, infarto do miocárdio, derrame cerebral (AVC), diabetes mellitus
Avós:
Tios:
Irmãos:
Sobre o seu pai: Está vivo () Idade: anos. Doenças:

Falecido () Idade: anos. Causa de morte:
Sobre a sua mãe:
Está viva () Idade: anos. Doenças:
Falecida () Idade: anos. Causa de morte:

HÁBITOS DE VIDA

FUMO: () Nunca fumou () Fumante () Ex-fumante
Se sim, quantos cigarros por dia? ____
Com que idade começou a fumar? _____ anos
Ex-fumante
Se sim, quantos cigarros por dia? _____
Há quanto tempo parou de fumar? _____ anos ____ meses
Mora com alguém que é fumante? () SIM () NÃO

ETILISMO

Faz uso de bebidas alcoólicas? () SIM () NÃO
Qual a frequência, a quantidade e o tipo de bebida (por semana)?

Fez uso de bebidas alcoólicas nos últimos 2 dias? Qual? _____

REINCIDÊNCIA DE INFECÇÕES? ()SIM ()NÃO

Quais:

ATIVIDADES FÍSICAS

Pratica regularmente atividades físicas () SIM () NÃO

Qual atividade e com que frequência?

DIETA

Pense sobre sua alimentação no último ano. Desde <mês> do ano passado, com que frequência o(a) sr.(a) comeu cada um dos seguintes alimentos?

Caso o(a) entrevistado(a) responda entre dois números que aparecem em colunas diferentes, por exemplo, 1 ou 2 vezes por semana, repita a pergunta e peça para ele(a) dizer como foi na maioria das vezes.

MARQUE UM X EM CADA COLUNA PARA CADA ALIMENTO							
	<1x/sem (0)	1x/sem (1)	2-3x/sem (2)	4-6x(sem) (3)	7x/sem (4)	Escore	Não ingere
Sucos							
Frutas							
Feijão							
Refrigerantes							
Pão branco, biscoito, bolos							
Pão preto/integral							
Salada verde (vegetais crus)							
Outros vegetais (cozidos ou fritos)							
Alimentos gordurosos (carne com gordura, salsicha, frituras, salgadinhos)							
Cereais com fibras ou farelos							
Batatas							

Quantos dias por semana costuma comer doces, balas e bolachas recheadas?

- Não consome doces
- <1 por semana
- 1 vez por semana
- 2 vezes por semana
- 3 vezes por semana
- 4 ou mais vezes por semana

Costuma colocar mais sal nos alimentos quando já servidos em seu prato?

- Não Sim Não consome sal

Costuma comer muito rápido?

- Não Sim