UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

WILLIAN ROBERT GOMES

Exposição ocupacional ao chumbo (Pb): efeitos sobre o estado redox celular e a influência de polimorfismos genéticos sobre a toxicocinética do metal

Ribeirão Preto
2019

WILLIAN ROBERT GOMES

Exposição ocupacional ao chumbo (Pb): efeitos sobre o estado redox celular e a influência de polimorfismos genéticos sobre a toxicocinética do metal

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Rafael Mazzaron Barcelos.

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 12/07/2019. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Gomes, Willian Robert.

Exposição ocupacional ao chumbo (Pb): efeitos sobre o estado redox celular e a influência de polimorfismos genéticos sobre a toxicocinética do metal. Ribeirão Preto, 2019.

72 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Barcelos, Gustavo Rafael Mazzaron.

1. Metais. 2. Variações genéticas. 3. Toxicidade. 4. Toxicocinética.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Willian Robert Gomes.
Exposição ocupacional ao chumbo (Pb): efeitos sobre o estado redox celular e a influência de polimorfismos genéticos sobre a toxicocinética do metal.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedico este trabalho a meus pais.

Obrigado por todo o apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, às agências de fomento que financiaram esta pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo 2013/06033-8.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), ao Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas e ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, por oferecer a infraestrutura necessária para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Professor Gustavo R. M. Barcelos, pela atenção, paciência e por todos os ensinamentos que me foram transmitidos desde a Iniciação Científica até a conclusão desta dissertação de Mestrado.

Ao Professor Fernando Barbosa Jr., por permitir que eu utilizasse o espaço e a infraestrutura do Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, por todos os conselhos e ajuda prestada.

À Professora Lusânia M. G. Antunes, pelo apoio e espaço concedido em seu laboratório para a realização de diferentes etapas desta pesquisa, e ao seu aluno e colega de Pós-Graduação, Diego Luís Ribeiro, por me acompanhar durante as inúmeras reações de PCR.

À Professora Denise Grotto, da Universidade de Sorocaba, ao Professor Bruno Lemos Batista, da Universidade Federal do ABC, e ao Professor Kurunthachalam Kannan, do *Department of Health, Wadsworth Center*, EUA, pelas colaborações com as análises realizadas neste projeto.

Agradeço também ao Bruno Alves Rocha, pós-doutorando no laboratório, pelos conselhos dados e ajuda oferecida durante diversas etapas deste trabalho.

À Paula Pícoli Devóz, integrante do grupo e minha dupla na realização de todos os experimentos deste e de outros projetos.

Aos demais colegas de laboratório, Ana, Cecília, Cibele, Débora, João Carlos, Mariana, Marília, Silvana e Wellington, pelo companheirismo e apoio.

Às técnicas, Vanessa Souza e Cidinha, pelas sugestões, auxílios com experimentos e dedicação ao bom funcionamento do laboratório.

Aos funcionários da FCFRP, em especial à Rosemary e Rosana, pela prestatividade e apoio a todos os alunos do Programa.

Agradeço, sobretudo, a todos os voluntários participantes da pesquisa, pois não teríamos como realizar este trabalho sem eles.

E a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para que esta pesquisa fosse concluída.

Muito obrigado.

Resumo

GOMES, W.R. **Exposição ocupacional ao chumbo (Pb): efeitos sobre o estado redox celular e a influência de polimorfismos genéticos sobre a toxicocinética do metal.** 2019. 72f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

O chumbo (Pb) é um metal tóxico encontrado no ambiente e amplamente utilizado em diversos setores industriais, como na produção de baterias Pb-ácidas. Pode causar uma variedade de efeitos adversos à saúde humana, como distúrbios gastrointestinais, renais, neurológicos e hematopoiéticos, e estresse oxidativo. A toxicidade induzida pelo Pb é modulada por diversas proteínas e enzimas, além de sistemas antioxidantes e, neste sentido, é presumível que alterações genéticas possam influenciar na toxicocinética do metal no organismo. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto de polimorfismos (SNPs) em genes relacionados à toxicocinética do Pb (*ALAD, GPx1*, *GSR, GSS, GSTP1, HFE, SLC11A1, SLC11A2* e *VDR*) sobre as concentrações do metal no sangue (Pb-s), plasma (Pb-p) e urina (Pb-u) e sobre biomarcadores do estado redox, isto é, glutationa reduzida (GSH), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx), glutationa S-transferase (GST) e 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina urinária (8-OHdG). 236 trabalhadores de fábricas de baterias automotivas e 40 indivíduos não-expostos ocupacionalmente ao Pb foram incluídos no estudo. As concentrações de Pb foram determinadas por espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) e as genotipagens realizadas através do método TaqMan, por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real. As atividades das enzimas sanguíneas foram avaliadas por espectrofotometria e as concentrações de 8-OHdG foram determinadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS). As médias ± desvios padrão de Pb-s, Pb-p e Pb-u no grupo exposto foram de 21 ± 12 µg/dL, 0,60 ± 0,71 µg/dL e 37 ± 42 µg/g creatinina, respectivamente. No grupo não-exposto, os valores foram de 1,2 ± 1,2 µg/dL, 0,048 ± 0,053 µg/dL e 0,52 ± 0,48 µg/g creatinina, respectivamente ($p < 0,0010$). O grupo exposto também apresentou maiores concentrações de GSH e GPx e menores concentrações de CAT e 8-OHdG em comparação ao grupo não-exposto($p < 0,0010$). Correlações Spearman e análises de regressão multivariadas apontaram para associações entre Pb-s, Pb-p e 8-OHdG urinária. Um dos polimorfismos em *HFE* (rs1799945) foi associado positivamente a Pb-p ($\beta = 0,15$; $p = 0,050$). Indivíduos carreadores do alelo polimórfico do SNP rs1800562, também em *HFE,* apresentaram aumento da atividade de GPx e diminuição da concentração sanguínea de GSH. A atividade de GPx ainda foi positivamente associada ao SNP rs2228570, em *VDR,* e a variação alélica A>G em *GSTP1* (rs1695), foi correlacionada à diminuição da atividade de GST. Os resultados obtidos demonstram que diferentes polimorfismos podem influenciar a toxicocinética do Pb e as concentrações de biomarcadores de estresse oxidativo em indivíduos expostos cronicamente ao metal.

Palavras-chave: metais, variabilidade genética, toxicidade, toxicocinética.

Abstract

GOMES, W.R. **Occupational exposure to lead (Pb): effects on the cellular redox status and the influence of genetic polymorphisms on the metal toxicokinectics.** 2019. 72p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Lead (Pb) is a toxic metal found in the environment and widely used in several industry sectors, such as the manufacturing of Pb-acid batteries. It may cause a number of adverse effects to human health, such as gastrointestinal, renal, neurological and hematopoietic disorders and oxidative stress. Pb-induced toxicity is modulated by several proteins, enzymes and antioxidant systems and, thus, it is presumed that genetic variations may influence the toxicokinectics of the metal in the body. Therefore, the objective of this work was to evaluate the impact of polymorphisms (SNPs) in genes related to Pb toxicokinectics (*ALAD, GPx1, GSR, GSS, GSTP1, HFE, SLC11A1, SLC11A2* and *VDR*) on the metal concentrations in blood (Pb-b), plasma (Pb-p) and urine (Pb-u) and also on biomarkers of the redox status, i.e., glutathione (GSH), catalase (CAT), glutathione-peroxidase (GPX), glutathione S-transferase (GST) and urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG). 236 workers from automotive battery factories and 40 individuals non-occupationally exposed to Pb were enrolled in the study. Pb concentrations in the three biomarkers were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and genotyping was performed using the TaqMan method through the Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR). Enzyme activity was assessed through spectrophotometry and 8-OHdG was quantified through liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS). Mean values ± standard deviations of Pb-b, Pb-p and Pb-u for the exposed group were 21 ± 12 µg/dL, 0.60 ± 0.71 µg/dL and 37 ± 42 µg/g creatinine, respectively. For the unexposed group, the levels were of 1.2 ± 1.2 µg/dL, 0.048 ± 0.053 µg/dL and 0.52 ± 0.48 µg/g creatinine, respectively ($p < 0.0010$). The exposed group also showed higher levels of GSH and GPx, and lower levels of CAT and 8-OHdG, when compared to the unexposed group ($p < 0.0010$). Spearman correlations and multivariate linear regressions showed associations between urinary 8-OHdG, Pb-b and Pb-p. One of the *HFE* polymorphisms (rs1799945) was positively associated to Pb-p ($\beta = 0.15$; $p = 0.050$). Carriers of the polymorphic allele for the *HFE* rs1800562 SNP showed an increase in the activity of GPx and a decrease of the blood levels of GSH. GPx activity was also positively associated to the SNP rs2228570, in *VDR*, and the A>G allelic variation on *GSTP1* (rs1695) was correlated to a lowered GST activity. The results demonstrate that different polymorphisms may play a role on Pb toxicokinectics and on the levels of oxidative stress biomarkers in workers chronically exposed to the metal.

Keywords: metals, genetic variability, toxicity, toxicokinectics.

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1 – Via biossintética do grupamento heme 7

Figura 2 – Toxicocinética do Pb 10

Quadro 1 – Genes e polimorfismos envolvidos no presente estudo 11

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características gerais dos grupos estudados.....20

Tabela 2 – Concentrações de Pb e biomarcadores de estresse oxidativo.....21

Tabela 3 – Regressões logísticas para comparação entre grupos.....22

Tabela 4 – Correlações Spearman entre marcadores de estresse oxidativo, tempo de trabalho, IMC, idade e concentrações de Pb.....23

Tabela 5 – Regressões multivariadas para associações entre Pb e biomarcadores do sistema antioxidante endógeno.....24

Tabela 6 – Regressões multivariadas para associações entre Pb e 8-OHdG.....26

Tabela 7 – Frequências dos genótipos avaliados no estudo - grupo exposto.....27

Tabela 8 – Regressões multivariadas para as associações entre genótipos e concentrações de Pb-s, Pb-p e Pb-u.....28

Tabela 9 – Regressões multivariadas para associações entre genótipos e biomarcadores do sistema antioxidante, em função de Pb-s.....30

Tabela 10 – Regressões multivariadas para associações entre genótipos e biomarcadores do sistema antioxidante, em função de Pb-p.....32

Tabela 11 – Regressões multivariadas para associações entre genótipos e biomarcadores do sistema antioxidante, em função de Pb-u.....33

Tabela 12 – Regressões multivariadas para associações entre genótipos e 8-OHdG.....35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-OHdG	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina
ALA	Ácido delta-aminolevulínico
ALAD	Ácido delta-aminolevulínico desidratase
ALA-U	Ácido delta-aminolevulínico urinário
CAT	Catalase
Creat	Creatinina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa reduzida
GSR	Glutationa redutase
GSS	Glutationa sintetase
GSSG	Glutationa oxidada
GST	Glutationa S-transferase
GSTP1	Glutationa S-transferase P
Hb	Hemoglobina
HFE	Gene/Proteína da hemocromatose
IBMP	Índice Biológico Máximo Permitido
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente
IMC	Índice de Massa Corporal
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem
Min	Minuto
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NR	Norma Regulamentadora
rs	Referência do SNP
Pb-p	Chumbo no plasma
Pb-s	Chumbo no sangue
Pb-u	Chumbo na urina
SLC	Carreadores de soluto
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SOD	Superóxido dismutase
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UV/VIS	Ultravioleta/Visível
VDR	Receptor de vitamina D
ZPP	Zincoprotoporfirina no sangue

LISTA DE SÍMBOLOS

Pb	Chumbo
µg	Micrograma
dL	Decilitro
±	Mais ou menos
m^3	Metro cúbico
Fe^{2+}	Íon ferroso
-SH	Sulfidrila
$O2^{\bullet -}$	Superóxido
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
$OH^{\bullet}$	Radical hidroxil
$^1O2$	Oxigênio singlete
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina
mL	Mililitros
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
m	Massa
v	Volume
M	Massa molar
g	Grama
nm	Nanômetro
nmol	Nanomol
k	Constante
µmol	Micromol
µL	Microlitro
mm	Milímetro
χ^2	Chi-quadrado
p	Significância
≤	Menor ou igual a
<	Menor que
m^2	Metro quadrado
X	Média aritmética
n	Número amostral
β	Coeficiente de inclinação
r_s	Coeficiente de Spearman

SUMÁRIO

Resumo ..... **i**
Abstract ..... **ii**
Lista de figuras e quadros ..... **iii**
Lista de tabelas ..... **iv**
Lista de abreviaturas e siglas ..... **v**
Lista de símbolos ..... **vi**
1. INTRODUÇÃO **1**
1.1. Características do Pb e formas de exposição 1
1.2. Exposição ocupacional ao Pb no Brasil 2
1.3. Toxicodinâmica 4
1.4. Toxicocinética 8
1.5. Efeitos genéticos sobre a toxicocinética e toxicidade induzida pelo Pb 9
2. OBJETIVOS **13**
2.1. Gerais 13
2.2. Específicos 14
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS **14**
3.1. Seleção dos voluntários e coleta das amostras 14
3.2. Determinação de Pb no sangue, plasma e urina 15
3.3. Determinação dos parâmetros relacionados ao estado redox 16
3.3.1. Tiois totais (GSH) 16
3.3.2. Atividade da glutationa peroxidase (GPx) 16
3.3.3. Atividade da catalase (CAT) 17
3.3.4. Atividade da glutationa S-transferase (GST) 17
3.3.5. Concentrações de 8-hidroxi-2’-deoxiguanosina urinária (8-OHdG) 17
3.4. Extração do DNA sanguíneo 18
3.5. Genotipagens 18
3.6. Análise estatística 18
4. RESULTADOS **19**
4.1. Características gerais, parâmetros bioquímicos e concentrações de Pb 19
4.2. Correlações Spearman 22
4.3. Potenciais fatores de influência sobre parâmetros de estresse oxidativo 24

4.4. Genotipagens e associação entre genótipos, concentrações de Pb e parâmetros de estresse oxidativo do grupo exposto 27
5. DISCUSSÃO 36
6. CONCLUSÕES 46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 47
APÊNDICES 68
APÊNDICE A – Questionário aplicado aos participantes da pesquisa 68
ANEXOS 70
ANEXO A – Resumo de projeto de pesquisa vinculado ao presente trabalho 70
ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa 71
ANEXO C – Aprovação de emenda pelo Comitê de Ética em Pesquisa 72

1. INTRODUÇÃO

1.1. Características do Pb e formas de exposição

O chumbo (Pb) é um elemento químico tóxico, de número atômico 82 e massa atômica de 207,21, pertencendo ao grupo dos metais na classificação periódica dos elementos. Seu ponto de fusão é de 337 ºC, ocorrendo emissão de vapores a 550 ºC e ebulição a 1.740 ºC. (CORDEIRO; LIMA-FILHO, 1995; ATSDR, 2019). É classificado como o 38º elemento mais abundante na crosta terrestre, sendo encontrado a uma concentração de 15 a 20 mg/kg, o que o caracteriza como um metal relativamente incomum quando comparado a outros de maior abundância, como alumínio e ferro (EMSLEY, 2011; ATSDR, 2019). No ambiente, o Pb é raramente encontrado em sua forma livre, já que os principais depósitos brutos do metal estão na forma de galena (PbS), anglesita ($PbSO_4$) e cerusita ($PbCO_3$) (OMS, 2010).

As fontes naturais de emissão do Pb incluem atividades vulcânicas, erosão, desagregação de rochas e transporte de partículas através dos ventos (REUTER et al., 2005; MUSHAK, 2011). Entretanto, as emissões de origem antropogênica são as maiores responsáveis pela exposição humana a este elemento. A ocorrência de Pb fora de seus locais de depósito naturais aumentou consideravelmente nos últimos três séculos devido à utilização do metal em processos industriais que resultam em contaminação de corpos d’água, ar, solo e cadeia alimentar (TCHOUNWOU et al., 2012; ATSDR, 2019). A utilização do composto Pb-tetraetila como aditivo antidetonante na gasolina, iniciada na década de 1920, teve um papel crucial na contaminação da atmosfera. Mesmo com a proibição desta prática ao final do século XX, a exposição ao Pb oriundo da gasolina continuou ocorrendo por conta da persistência do metal no ambiente (LOVEI, 1998; DE CAPITANI et al., 2009).

O uso de Pb em tintas também contribuiu para grande contaminação da área urbana, sobretudo em poeiras domésticas, e desencadeou o interesse de diversos grupos de pesquisa dos Estados Unidos pelos efeitos tóxicos do metal. O país proibiu a fabricação de tintas contendo Pb em 1978 enquanto, no Brasil, a Lei 11.762/2008 estabelece um limite de 0,06% em peso de Pb metálico em tintas imobiliárias, de uso infantil e escolar, vernizes e materiais similares de revestimento de superfícies (ATSDR, 2019; JACOBS et al., 2012; BRASIL, 2008). O Pb também é

empregado como componente na manufatura da borracha, constituinte de vitrificados, esmaltes, cerâmicas, soldas, munições e, particularmente, muito utilizado em fábricas de baterias automotivas Pb-ácidas; entre outros (PAOLIELLO; DE CAPITANI, 2003; ATSDR; 2019).

Os dados mais recentes mostram que a produção mundial de minério concentrado de Pb alcançou 4,8 milhões de toneladas em 2016 (incluindo reciclagem), o que representa um pequeno decréscimo de 1,0% em relação a 2015. No mesmo ano, a produção brasileira de concentrado de Pb alcançou 8 mil toneladas, (ANM, 2017).

Desta maneira, a exposição humana ao Pb pode ocorrer de forma ambiental e/ou ocupacional, dependendo do contexto em que o indivíduo está inserido. A ingestão de alimentos e água contaminados e inalação de partículas presentes na atmosfera são os principais exemplos de exposição ambiental, enquanto a exposição ocupacional é aquela que acontece durante a utilização do metal em alguma etapa do processo de trabalho (ATSDR, 2019; HIPKINS et al., 1998).

1.2. Exposição ocupacional ao Pb no Brasil

Apesar das medidas que visam a diminuição da utilização do Pb em diversos setores, muitos trabalhadores ainda são expostos a este toxicante no Brasil, atualmente. A principal fonte de exposição ocupacional são as fábricas de baterias automotivas, seguida das indústrias de pigmento e o setor eletro-eletrônico (soldas e ligas) (DE CAPITANI et al., 2009; ANM, 2017). As indústrias de baterias automotivas são as responsáveis por 82,1% do consumo nacional de Pb metálico, com uma produção aproximada de 19 milhões de unidades todos os anos, sendo que 68% do metal é proveniente da reciclagem (CASTRO et al., 2013; ANM, 2017).

O Ministério do Trabalho e Emprego do Governo Federal do Brasil instituiu diferentes Normas Regulamentadoras (NRs) que objetivam minimizar os efeitos prejudiciais que podem ser causados pela exposição ao Pb no ambiente de trabalho. A NR-15 (Portaria nº 3.214, de 08 de junho de 1978; Anexo nº 11) estabeleceu os limites de tolerância em relação à sua concentração máxima no ambiente de trabalho, fixado em 100 $\mu g/m^3$ de ar (para jornadas de 48 horas semanais). Ainda, de acordo com a NR-15, a exposição ao Pb em fábricas de baterias é classificada como “insalubridade de grau máximo” (BRASIL, 1978).

Já a NR-7 (Portaria n.º 3.214, de 08 de junho de 1978, modificada pela Portaria SSST n.º 24, de 29 de dezembro de 1994) estabeleceu os bioindicadores de exposição e efeito, para monitoramento biológico dos trabalhadores expostos, e são eles: concentrações de Pb no sangue (Pb-s) e do ácido delta-aminolevulínico urinário (ALA-U), respectivamente. Alternativamente, a determinação da zincoprotoporfirina no sangue (ZPP) também pode ser utilizada como um indicador biológico de efeito. Além disso, a NR-7 estabeleceu os Índices Biológicos Máximos Permitidos (IBMPs) em trabalhadores expostos ao metal, ou seja, as concentrações máximas permitidas de Pb-s (60 µg/dL), ALA-U (10 mg/g de creatinina) e ZPP (100 µg/dL). Ainda, a NR-7 apresenta os valores considerados como referência, levando em conta dados obtidos de populações não-expostas ocupacionalmente ao Pb: até 40 µg/dL de Pb-s, até 4,5 mg de ALA-U/g creatinina e até 40 µg/dL de ZPP (BRASIL, 1994). Por outro lado, o Programa Nacional de Toxicologia dos Estados Unidos (NTP, EUA), publicou, em 2012, uma série de monografias demonstrando que há evidências de efeitos adversos à saúde em adultos com concentrações sanguíneas de Pb menores que 10 µg/dL (tais como aumento da pressão arterial e tremor) e em crianças com concentrações menores que 5,0 µg/dL (efeitos renais e de desenvolvimento) (NTP, 2012).

Para efeitos de comparação, a Administração de Segurança e Saúde Ocupacional dos Estados Unidos (OSHA, EUA) e a Conferência Americana de Higienistas Industriais Governamentais (ACGIH, EUA) determinam que o Pb no ambiente de trabalho não deve exceder a concentração de 50 µg/m^3 de ar, sendo que o nível de ação (concentração onde medidas de segurança devem ser tomadas) é de 30 µg/m^3 (40 horas semanais) (OSHA, 2005; ACGIH, 2012). Já em relação ao Pb-s, as concentrações não devem ultrapassar 40 µg/dL, de acordo com a OSHA, e 30 µg/dL de acordo com a ACGIH. Nas regulamentações americanas não são estabelecidos limites para concentrações de ALA-U e ZPP. Comparando-se as legislações, um enorme contraste é observado em relação aos limites das concentrações de Pb no ambiente: como mencionado, a legislação brasileira estabelece a concentração de 100 µg de Pb/m^3 de ar como limite; esta mesma concentração, de acordo com o Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional (NIOSH, EUA), é caracterizada como “concentrações imediatamente perigosas à vida ou à saúde” (NIOSH, 2017). A discrepância entre estes dados

demonstra a necessidade de uma revisão da legislação brasileira, que se encontra defasada.

Ao longo dos anos, estudos realizados em diferentes cidades brasileiras já revelaram casos importantes de exposição ocupacional ao Pb no país, sendo que a maioria diz respeito a fábricas de baterias automotivas. Uma avaliação de 23 trabalhadores de uma empresa deste ramo mostrou concentrações de Pb-s de até 90 µg/dL (média = 50 ± 4,0 µg/dL) (CONTERATO et al., 2013). Resultados ainda mais preocupantes foram descritos por Minozzo e colaboradores (2008), onde a média de Pb-s em 53 indivíduos foi de 59 µg/dL. Mais recentemente, em outro estudo realizado por nosso grupo (MARTINS et al., 2015) com 257 trabalhadores no estado do Paraná, a média de Pb-s foi de 24 ± 14 µg/dL, com valor máximo de 68 µg/dL, considerado acima do limite estabelecido pela lei vigente.

Apesar de escassos, alguns trabalhos também investigam a exposição ocupacional ao Pb em outros setores industriais. Moro e colaboradores (2010) relataram uma média de Pb-s de 14 ± 2,1 µg/dL em 48 trabalhadores expostos a tintas industriais. As indústrias de fundição também são importantes fontes de exposição, como demonstrado por Santos et al. (2016) em pesquisa que apontou Pb-s médio de 30 ± 1,7 µg/dL nos funcionários envolvidos com a produção de peças metálicas. Rocha e colaboradores (2014) investigaram o aumento das concentrações sanguíneas de Pb em policiais após treinamento em local fechado, com armas de fogo. A média de Pb-s saltou de 3,3 ± 1,5 µg/dL para 18 ± 1,1 µg/dL após três dias de atividades.

1.3. Toxicodinâmica

O Pb não desempenha nenhum papel fisiológico conhecido no organismo e, desta maneira, a exposição ao metal pode causar efeitos adversos em vários sistemas, tais como nervoso, renal, gastrointestinal, reprodutor, endócrino, cardiovascular e hematopoiético (FLORA et al., 2012; MITRA et al., 2017). Os sinais e sintomas ocasionados nas intoxicações por Pb são inespecíficos. Ainda que incomuns, as intoxicações agudas (com concentração de Pb-s na faixa de 100 a 120 µg/dL) podem ocasionar náuseas, dores abdominais, vômitos (os quais podem ter aspecto leitoso), sensação adstringente pronunciada na boca e gosto metálico. As fezes podem apresentar coloração negra em virtude da reação do Pb com

compostos sulfurados existentes nos gases intestinais. A intoxicação crônica, por outro lado, é mais comum e ocorre quando as concentrações do metal no sangue aproximam-se da faixa de 40-60 µg/dL, sendo caracterizada por vômito persistente, encefalopatia, letargia, delírio, convulsões e coma (FLORA et al., 2006; 2012; PEARCE, 2007; MITRA et al., 2017).

Os efeitos no sistema nervoso ocorrem tanto a nível periférico quanto central e são responsáveis, principalmente, pelo prejuízo de funções cognitivas como memória, raciocínio, percepções sensoriais e concentração, o que pode acontecer quando as concentrações de Pb-s atingem cerca de 30 µg/dL (MASON et al., 2014; ATSDR, 2019). Já em exposições muito elevadas, onde a concentração de Pb-s ultrapassa os 100 µg/dL em adultos ou 70 µg/dL em crianças, os indivíduos podem apresentar encefalopatia grave, com sintomas que vão desde irritabilidade, vômitos e convulsões até evolução para coma e morte (ATSDR, 2019; FLORA et al., 2012). Enquanto o sistema nervoso periférico é mais afetado em adultos, crianças são mais propensas a sofrerem danos no sistema nervoso central, pois o encéfalo em desenvolvimento é mais vulnerável aos efeitos neurotóxicos do Pb (LIDSKY; SCHNEIDER, 2003; SANDERS et al., 2009; MITRA et al., 2017).

Quanto à nefrotoxicidade induzida pelo metal, estudos mostram que mesmo em indivíduos cujos valores de Pb-s são inferiores a 10 µg/dL já é possível que haja deficiência na filtração glomerular, que pode evoluir para lesões e perda de função renal com o aumento ou persistência da exposição (MUNTNER et al., 2003; WEAVER et al., 2005; ATSDR, 2019). Neste mesmo contexto, a exposição ao Pb também provoca efeitos nocivos sobre o sistema cardiovascular, agindo, especialmente, como um fator de risco para o aumento da pressão arterial. O mecanismo pelo qual o Pb age nestes casos ainda é incerto, mas a hipótese é que a hipertensão seja uma consequência da nefropatia induzida pelo metal, que prejudica o controle do volume plasmático realizado pelos rins (NAVAS-ACIEN et al., 2007; SHARMA; PUROHIT, 2014; LOPES et al., 2017).

O Pb ainda afeta o funcionamento do sistema gastrointestinal, o que se manifesta através de cólicas abdominais, náuseas, vômitos, constipação e perda de peso. Estes sintomas podem surgir com concentrações de Pb-s a partir de 10 µg/dL, sendo mais comuns em indivíduos que apresentam Pb-s acima de 30 µg/dL (ROSENMAN et al., 2003; MITRA et al., 2017; ATSDR, 2019).

O sistemas reprodutores masculino e feminino também são comprometidos pelo Pb. Em homens, há diminuição do volume espermático, redução da motilidade e alterações morfológicas dos espermatozoides, incluindo danos cromossômicos nos gametas (FLORA et al., 2011; 2012; PANT et al., 2015). Os efeitos em mulheres geralmente são mais severos, pois o Pb afeta o processo de gestação causando aborto espontâneo, nascimento prematuro, pré-eclâmpsia e ruptura de placenta, além de ocasionar problemas no desenvolvimento neurológico do feto, que podem se prolongar até a vida adulta (SALEH et al., 2009; TAYLOR et al., 2015).

A toxicidade observada no sistema reprodutor está, em partes, relacionada à desregulação endócrina possivelmente causada pelo Pb. Foi observado que a testosterona, o hormônio luteinizante (LH) e o folículo estimulante (FSH) apresentam elevação em suas concentrações séricas em indivíduos cujo valor de Pb-s é de pelo menos 10 µg/dL (KRESOVICH et al., 2015; ATSDR, 2019). Diversos estudos realizados em modelos animais e em populações expostas sugerem que o Pb também pode desregular o hormônio do crescimento (GH), hormônios tiroxina (T_4), triiodotironina (T_3), estimulante da tireoide (TSH), cortisol, ente outros (DOUMOUCHTSIS et al., 2009; NIE et al., 2017).

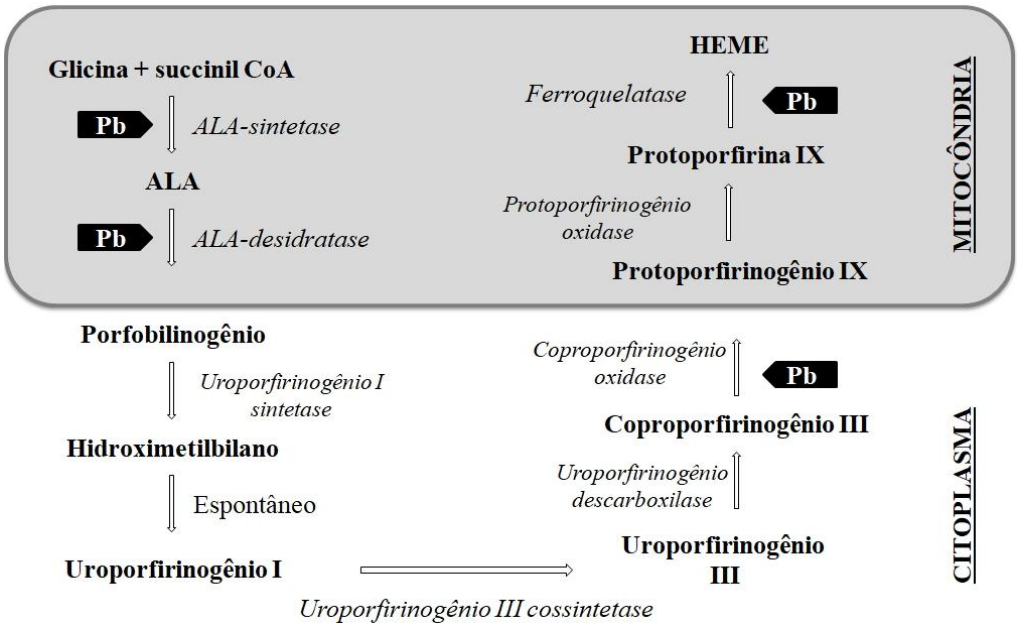
Um dos efeitos mais conhecidos e bem descritos causados pelo Pb é sua capacidade de interferir sobre a hematopoiese ao inibir a síntese do grupamento heme, constituinte da hemoglobina (esquematizada na Figura 1). Resumidamente, a formação do heme se inicia na matriz mitocondrial com a conjugação entre glicina e succinil Co-A, originando o ácido delta-aminolevulínico (ALA), em uma reação catalisada pela ALA-sintestase (ALA-S).

Em seguida, no citoplasma, a enzima ALA-desidratase (ALAD) catalisa a síntese de porfobilinogênio a partir de duas moléculas de ALA; este é convertido a uroporfibilinogênio e então a coproporfirinogênio III. Esta última molécula é oxidada a protoporfirinogênio IX (coproporfirinogênio oxidase - CPO), que posteriormente origina a protoporfirina. De volta à matriz mitocondrial, a enzima ferroquelatase introduz íon ferroso (Fe^{2+}) à protoporfirina, resultando na formação do grupo heme (ONUKI et al., 2002; LAYER et al., 2010; FLORA et al., 2012).

O Pb atua de forma dose-dependente na inibição das enzimas ALAD, ALA-S, CPO e ferroquelatase. Dentre estas, a interação com a ALAD parece ser a mais proeminente, ocorrendo devido à afinidade do Pb com grupamentos sulfidrila (-SH) da enzima (GONICK et al., 2011). Somada à inibição da enzima ALA-S, o resultado

é o acúmulo de ALA no plasma e urina, que pode atuar como um pró-oxidante e causar danos em tecidos (PATRICK, 2006; LAAFI et al., 2014).

Figura 1 – Via biossintética do grupamento heme



Fonte: Onuki et al. (2002). Adaptado.

O ALA é altamente reativo e instável em pH fisiológico, sofrendo reações de oxidação que culminam na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Ainda, o produto final da oxidação do ALA é o ácido 4,5-dioxovalérico, um eficiente agente alquilante do DNA, levando à formação de adutos (GADOTH; GÖBEL, 2011; LAAFI et al., 2014). A inibição da enzima CPO culmina em um aumento de coproporfirina, que pode ser detectada na urina (ONALAJA; CLAUDIO, 2000; RAMANATHAN et al., 2017). Como consequência da inibição da ferroquelatase, há também um aumento de protoporfirina nos eritrócitos, além da formação de ZPP, já que ocorre a incorporação de zinco, ao invés de Fe^{2+} para formar a porfirina (JANGID et al., 2012).

Assim, o prejuízo sobre a biossíntese do heme pode levar ao desenvolvimento de anemia, além de haver uma diminuição da meia-vida dos eritrócitos quando há exposição ao Pb. Em consequência da redução da formação de hemoglobina, as hemácias adquirem aspecto hipocrômico, podendo ser microcíticas, e há também presença de reticulocitose, ou seja, aumento de eritrócitos jovens circulantes (ATSDR, 2019).

A toxicidade do Pb resulta, principalmente, de sua interferência no funcionamento das membranas celulares e enzimas, formando complexos estáveis com ligantes contendo enxofre, fósforo, nitrogênio ou oxigênio (ATSDR, 2019; SARYAN; ZENZ, 1994). As interações bioquímicas do Pb com grupamentos -SH são consideradas de grande significado toxicológico, visto que o metal pode se ligar a diversos antioxidantes endógenos como, por exemplo, o tripeptídeo glutationa (GSH), as enzimas glutationa peroxidase (GPx) superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa S-transferase (GST), dentre outras, ocasionando um desequilíbrio do estado redox celular e elevando as concentrações de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e radicais livres, tais como superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($OH^{\bullet}$) e oxigênio singlete ($^1O_2$) (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1989; SUGAWARA et al., 1991; GURER et al., 2004).

Este desequilíbrio entre as defesas antioxidantes celulares e as espécies oxidantes gera um estado pró-oxidante, ou também conhecido como estresse oxidativo, levando a danos em proteínas, lipídeos e DNA (VALKO et al., 2005; JOMOVA; VALKO, 2011). Os danos oxidativos aos ácidos nucleicos podem ser avaliados através da quantificação da guanosina oxidada, ou 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG). Esta molécula é formada quando um radical $OH^{\bullet}$ reage com um nucleotídeo de guanina e prejudica a duplicação do DNA. Através da ação de endonucleases, a base oxidada é clivada e excretada na urina, onde pode ser quantificada (COOKE et al., 2006; VALAVANIDIS et al., 2009, OLINSKI et al., 2006).

1.4. Toxicocinética

O Pb é absorvido principalmente através dos tratos respiratório e gastrointestinal; no caso das exposições ocupacionais a via respiratória constitui-se na mais importante (BAIRD, 2002; MOREIRA; MOREIRA, 2004; ATSDR, 2019) e cerca de 95% do Pb inalado atinge a corrente sanguínea (ATSDR, 2019). Uma vez absorvido, 99% todo o Pb-s liga-se aos eritrócitos e sua meia-vida no sangue é de 30 dias. O metal livre no plasma (1%) é então distribuído para os tecidos moles, como fígado, rins, cérebro, pulmões e baço, onde sua meia-vida é de 40 dias. Embora apenas 1% do Pb esteja no plasma, esta é a fração do sangue em que o

metal está mais biodisponível e, assim, pode atingir estruturas biológicas e exercer efeitos tóxicos (BECKETT et al., 2007; MITRA et al., 2017).

O metal também é distribuído para os tecidos calcificados, onde a meia-vida é de cerca de 30 anos (LIU; GOYER, 2010). Este fenômeno se deve ao fato de que o Pb possui a capacidade de substituir cátions divalentes, como zinco e cálcio, sendo este último encontrado em grande quantidade no tecido ósseo; deste modo, o Pb compete com o cálcio e pode, então, ser incorporado aos ossos (BRONNER, 1992; GODWIN, 2001; ATSDR, 2019). Portanto, os ossos (e em menor escala, os dentes) são os principais sítios de armazenamento do metal, chegando a constituir 90% de todo o Pb presente no organismo (GODWIN, 2001; FLORA et al., 2006; 2012; MITRA et al., 2017). Sendo assim, mesmo após anos do término da exposição, o Pb pode ser deslocado do tecido ósseo para a corrente sanguínea, tanto por mecanismos fisiológicos, tais como a gravidez e a menopausa, quanto por patologias, como a osteoporose (MANTON et al., 2003; SCHNAAS et al., 2006; MENDOLA et al., 2013; MANOCHA et al., 2017).

Os mecanismos de biotransformação do Pb seguem o mesmo padrão geralmente descrito para outros metais, centrados na complexação dos íons metálicos com grupamentos -SH, amino ($-NH_2$) e carboxílicos (-COOH), dentre outros ligantes presentes, principalmente, em proteínas e peptídeos como albumina e GSH, respectivamente (O'FLAHERTY, 1998; ATSDR, 2019). Em relação à excreção, cerca de 2/3 do Pb absorvido é eliminado pela urina e o restante pelas fezes. O metal pode sofrer reabsorção em ambas as vias de eliminação, através dos túbulos renais distais e do ciclo entero-hepático. O Pb também é eliminado através do cabelo, suor, saliva e unhas, mas a taxa de eliminação por estas vias é muito baixa, quando comparada aos sistemas urinário e digestivo (GOYER; CLARKSON, 2001).

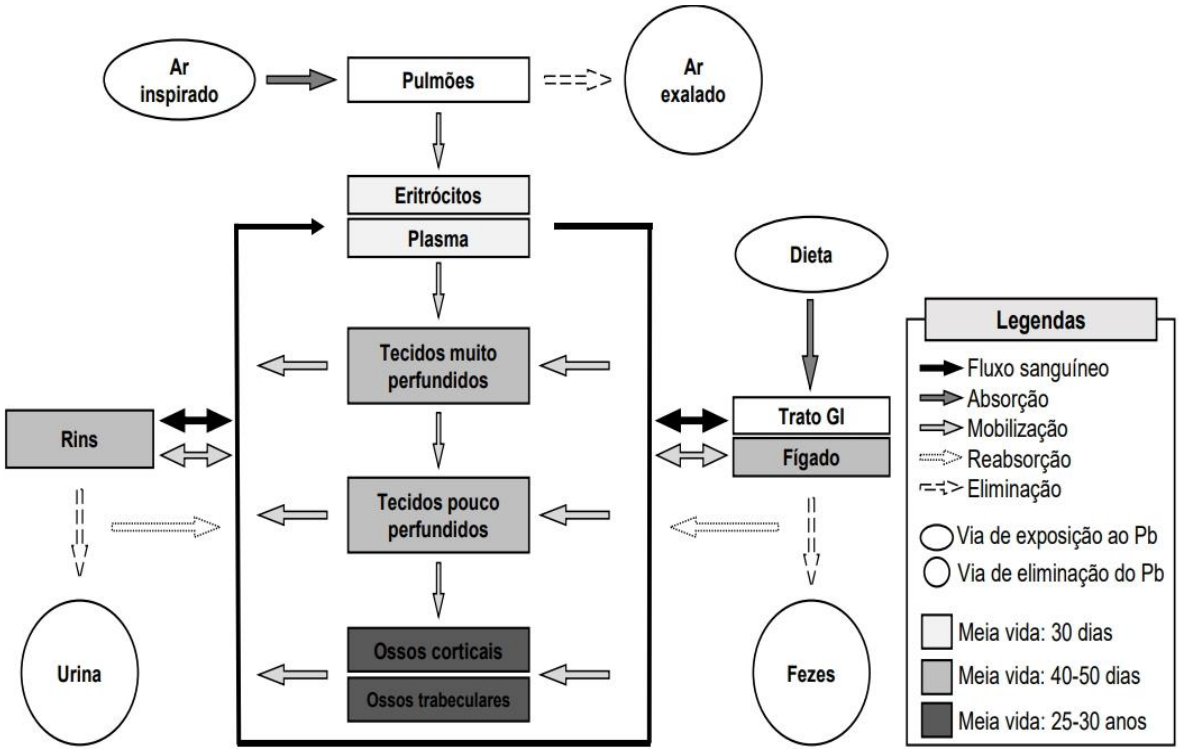
1.5. Efeitos genéticos sobre a toxicocinética e toxicidade induzida pelo Pb

A Figura 2 ilustra a cinética do Pb no organismo. Com base neste esquema, pode-se presumir que alterações em um ou mais eventos relacionados à absorção, distribuição, biotransformação e excreção do Pb podem alterar a relação entre a

exposição e as concentrações do metal no sangue, plasma, urina e/ou fezes e, assim, modular os efeitos adversos causados pelo elemento.

Neste contexto, variações genéticas podem exercer influência sobre a toxicocinética e sobre a toxicidade induzida pelo metal. A variação do tipo Polimorfismo de Nucleotídeo Único, ou SNP (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*), é a mais comum no genoma humano, sendo também um dos tipos mais estudados. Um SNP é caracterizado pela alteração de um único nucleotídeo em uma sequência de DNA, podendo levar a uma substituição de aminoácidos na proteína codificada pelo gene polimórfico. Cada SNP é identificado por um código único, identificado pela sigla “rs” (*Reference SNP*, ou Referência do SNP), seguido de uma sequência numérica (COLLINS; MCKUSICK; 2001; DAIGER et al., 2013).

Figura 2 – Toxicocinética do Pb



Fonte: O’Flaherty (1998). Adaptado.

Diversos estudos mostram interações entre os SNPs e a toxicidade de outros elementos tóxicos como mercúrio, cádmio e arsênio (ENGSTRÖM et al., 2011; 2016; RENTSCHLER et al., 2014; GRAU-PEREZ et al., 2017; DAS et al., 2016; CHEN et

al., 2017), mas pouco se sabe a respeito do impacto de variações genéticas sobre cinética e os efeitos adversos induzidos pelo Pb.

No presente estudo, foram escolhidos SNPs em genes que codificam proteínas e enzimas relacionadas, direta ou indiretamente, à toxicocinética do Pb no organismo (Quadro 1).

Quadro 1 – Genes e polimorfismos envolvidos no presente estudo

Gene	Localização	SNP[j]	Função da proteína
ALAD[a]	9q34	rs1800435; G>C	Síntese do heme
GPx1[b]	3p21.3	rs11549655; G>C	Redução de peróxidos
GSR[c]	8p21.1	rs8190955; C>T	Redução da glutationa oxidada
GSS[d]	20q11.2	rs121909307; G>A rs28936396; C>T	Síntese de GSH
GSTP1[e]	11q13	rs1695; A>G rs1138272; C>T	Conjugação de xenobióticos à GSH
HFE[f]	6p22.2	rs1799945; C>G rs1800562; G>A	Absorção de ferro
SLC11A1[g]	2q35	rs17235409; G> A	Transporte de cátions
SLC11A2[h]	12q13	rs11169654; C>T rs149411; C>T	Transporte de cátions
VDR[i]	12q13.11	rs1544410; G>A rs2228570; G>A	Receptor de vitamina D

[a]Ácido delta-aminolevulinico desidratase; [b]Glutationa peroxidase; [c]Glutationa redutase; [d]Glutationa sintetase; [e]Glutationa S-transferase P; [f]Gene da hemocromatose; [g]Carreador de Soluto Família 11 Membro 1; [h]Carreador de Soluto Família 11 Membro 2; [i]Receptor de vitamina D; [j]*Single nucleotide polymorphism* (polimorfismo de nucleotídeo único).
Fonte: dbSNP <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>.

A enzima ALAD, codificada pelo gene homônimo, é a principal estrutura ligante do Pb e, por estar presente nos eritrócitos, atua como transportador do metal no sangue, influenciando diretamente sua biodisponibilidade e distribuição para os tecidos (BERGDAHL et al., 1997a; GONICK, 2011; WANI et al., 2015). As enzimas antioxidantes GPx, GSR e GST (genes *GPX1, GSR, GSTP1,* respectivamente) e o tripeptídeo GSH (*GSS*) são importantes para a manutenção do equilíbrio do estado redox, uma vez que o Pb pode agir como pró-oxidante. A GSH também se conjuga ao Pb, em reação catalisada pela GST, facilitando a excreção biliar do metal (O'FLAHERTY, 1998; ATSDR, 2019).

O gene da hemocromatose, *HFE,* codifica uma proteína homônima, cuja função é a regulação da absorção de ferro. Estudos sugerem que a absorção do Pb

ocorre principalmente através de transportadores de ferro e cálcio, sendo, portanto, influenciada pela HFE (HOPKINS et al., 2008; FAN et al., 2014).

O *VDR,* codificante do receptor de vitamina D, regula a produção de proteínas ligantes de cálcio, além de estar envolvido na manutenção da homeostase cálcica e absorção do elemento. Devido à capacidade do Pb em mimetizar o cálcio, é compreensível que o VDR esteja relacionado à cinética do metal, tanto a nível de absorção quanto distribuição para os tecidos calcificados (REZENDE et al., 2010; JHUN et al., 2015; ATSDR, 2019).

Os carreadores de soluto (SLCs), representados no presente trabalho por dois genes, *SLC11A1 e SLC11A2*, são transportadores de íons divalentes, como cálcio, ferro e Pb. A captação do Pb pelos eritrócitos é possivelmente influenciada pela ação dos SLCs, que também podem atuar na absorção e distribuição do metal para outros órgãos (BANNON et al., 2002; WHITFIELD et al., 2010).

Atualmente, as variantes alélicas da enzima ALAD, do receptor VDR e do gene *HFE* são as principais estudadas em populações expostas ao Pb (GUNDACKER et al., 2010; WARRINGTON et al., 2015; JHUN et al., 2015; KAYAALTI et al., 2015; KIM et al., 2017). Mesmo que a associação entre estes genes e a exposição ao metal já esteja bem estabelecida, apenas as variações em *ALAD* e *VDR* foram estudadas em populações brasileiras, porém em poucos trabalhos (MARTINS JR et al., 2015; REZENDE et al., 2008; 2010). Já é conhecido que diferenças nos processos de detoxificação de xenobióticos estão associadas com variações genéticas populações-específicas (POLIMANTI et al., 2011; 2013).

Ainda, alguns trabalhos sugerem que variações em outros genes, tais como os codificantes de SLCs (WHITFIELD et al., 2007; 2010) e metalotioneína 2A (*MT2A*) (KAYAALTI et al., 2011; FERNANDES et al., 2016) também possam modular a toxicocinética e efeitos adversos relacionados ao metal.

Os trabalhos de Whitfield e colaboradores (2007; 2010) incluíram análises de haplótipos e os resultados encontrados indicaram que variações em *SLC11A1* e *SLC11A2* afetam o transporte do Pb. Os estudos de Kayaalti et al. (2011) e Fernandes et al. (2016) demonstraram que determinados polimorfismos na proteína de transporte MT2A (rs28366003 e rs10636, respectivamente) podem alterar a distribuição de Pb em indivíduos expostos ao metal, de modo que a presença do polimorfismo rs28366003 foi associada a maiores concentrações de Pb-s; o oposto foi observado para o SNP rs10636.

Outra abordagem incipiente nos estudos que investigam polimorfismos genéticos diz respeito à avaliação da influência dos SNPs sobre biomarcadores de estresse oxidativo. Atualmente, existe um pequeno número de trabalhos publicados sobre este tópico, sendo que a maior parte descreve os efeitos de SNPs em genes como *GSTP1, GSTM* e *GPx1.* Em trabalho realizado por Doukali et al. (2017), indivíduos portadores do polimorfismo *GSTP1* rs1695 apresentaram aumento da atividade de SOD e CAT. Os polimorfismos do tipo nulo (deleção) em *GSTT1* e *GSTM1* mostraram a mesma correlação com as duas enzimas. Este mesmo polimorfismo em *GSTP1* também já foi associado de forma consistente à diminuição da atividade da enzima GST (LECOMTE et al., 2006; ZHONG et al., 2006; DENG et al., 2015; CHIELLE et al., 2016).

O principal SNP estudado em *GPx1,* rs1050450 (c.461C>T), foi associado a alterações na atividade enzimática de GPx. Diferentes trabalhos indicam que os genótipos polimórficos CT e TT apresentam diminuição da atividade enzimática, quando comparados ao genótipo selvagem (RAVN-HAREN et al., 2005; HONG et al., 2013; JABLONSKA et al., 2009; 2015) .

Como demonstrado, além de haver poucos estudos relacionados aos efeitos genéticos sobre a exposição ao Pb e sobre os biomarcadores de estresse oxidativo, os trabalhos foram realizados, em sua maioria, em outros países, que não refletem o *background* genético da população brasileira. Deste modo, fica clara a necessidade da realização de estudos para o entendimento dos efeitos genéticos sobre a toxicocinética e a toxicidade induzida pela exposição ao Pb.

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

- Analisar os efeitos de polimorfismos nos genes *ALAD, GPx1*, *GSR, GSS, GSTP1, HFE, SLC11A1, SLC11A2* e *VDR*, sobre as concentrações de Pb-s, Pb-p e Pb-u, bem como sobre biomarcadores de estresse oxidativo (GSH, CAT, GPx, GST e 8-OHdG urinária).

2.2. Específicos

- Determinar os níveis de exposição ao Pb em trabalhadores de fábricas de baterias automotivas e em indivíduos não-expostos ocupacionalmente ao metal;
- Avaliar o impacto da exposição crônica ao Pb sobre as concentrações de GSH e 8-OHdG urinária, e sobre a atividade enzimática de CAT, GPx e GST;
- Realizar as genotipagens dos participantes do grupo exposto para os polimorfismos selecionados e determinar a porcentagem de distribuição dos genótipos para a população.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Seleção dos voluntários e coleta das amostras

Foram utilizadas amostras de sangue, plasma, urina de 236 trabalhadores de fábricas de baterias automotivas no estado do Paraná, coletadas previamente em estudo anterior, do mesmo grupo de pesquisa (Anexo A). Adicionalmente, para o presente trabalho, foram coletadas outras 40 amostras de indivíduos não-expostos ocupacionalmente ao metal, recrutados na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo. Todas as coletas foram realizadas após esclarecimento detalhado sobre o projeto e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Foram incluídos no estudo indivíduos com idade entre 18 a 69 anos, do sexo masculino e que declararam não possuir doenças conhecidas no momento da coleta. O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FCFRP-USP) (007/2018 e 008/2019; Anexos B e C) e realizado de acordo com os princípios éticos da Declaração de Helsinki (AMM, 2008).

Após o esclarecimento do TCLE, aos participantes também foi distribuído um questionário sobre variáveis de idade, altura, peso, dieta, uso de medicamentos, histórico médico, informações sobre tabagismo e ingestão de bebidas alcoólicas, função ocupacional e, para o grupo exposto, tempo de exposição na função (Apêndice A).

O sangue (cerca de 10 mL) foi colhido em tubos livres de metais, com anticoagulante EDTA (Vacutainer, BD, São Paulo, Brasil). As amostras de sangue

do grupo não-exposto não foram utilizadas para extração de DNA, sendo destinadas somente às quantificações de Pb e parâmetros bioquímicos associados ao estado redox celular. O plasma foi coletado em tubos preparadores de plasma com gel separador (PPT, Vacutainer, BD, São Paulo, Brasil) e utilizado para a quantificação de Pb plasmático (Pb-p). A urina foi colhida em frascos coletores e utilizada para a determinação do Pb na urina (Pb-u), creatinina e 8-OHdG. Todas as amostras foram armazenadas em freezer -80 ºC. Ainda, a fim de evitar degradação de macromoléculas das amostras, durante todo o período que corresponde à coleta e transporte ao laboratório, as amostras foram armazenadas em gelo seco.

3.2. Determinação de Pb no sangue, plasma e urina

As determinações de Pb foram realizadas por espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) (ELAN DRCII Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA), de acordo com Batista et al. (2009a; 2009b). Para as análises de Pb-s, as amostras foram diluídas em 50 vezes, nas seguintes condições: 0,20 mL de sangue total + 9,8 mL de diluente contendo Triton X-100 a 0,010% m/v e HNO_3 14 M sub-destilado a 0,50% v/v. A amostra diluída foi injetada diretamente no ICP-MS; a curva de calibração foi preparada utilizando-se o método de ajuste de matriz, com a adição de amostras de sangue controle preparadas com o mesmo diluente utilizado para as amostras em teste. Para as análises de Pb-p e Pb-u, as amostras foram diluídas em 20 vezes, nas seguintes condições: 0,50 mL de urina ou plasma + 9,5 mL de diluente contendo Triton X-100 a 0,0050% m/v e HNO_3 14 M sub-destilado a 0,50% v/v. A curva de calibração também foi preparada utilizando-se o método de ajuste de matriz, com a adição de amostras de plasma e urina controles preparadas com o mesmo diluente utilizado para as amostras em teste. A cada 20 amostras de sangue, plasma ou urina injetadas no ICP-MS, uma amostra em branco (apenas diluente) foi analisada. O isótopo determinado foi o Pb^{208}.

Os materiais de referência utilizados para Pb-s e Pb-p foram obtidos do Departamento de Saúde do Estado de Nova Iorque (NYSDH, EUA). Para o controle de Pb-u, foram utilizados materiais de referência do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST, EUA) e do Instituto Nacional de Saúde Pública de Québec (INSP, Canadá); todas as análises estavam de acordo com os valores de referência estabelecidos para os padrões.

Concentrações de creatinina urinária foram determinadas por uso de kit comercial fornecido pela ByoSystems S/A (Barcelona, Espanha) em um analisador para bioquímica clínica (Mindray, modelo BS-200, Shenzhen, China), de acordo com as recomendações do fabricante.

Os resultados foram expressos em µg/dL para Pb-s e Pb-p e µg/g creatinina para Pb-u (µg/g creat).

3.3. Determinação dos parâmetros relacionados ao estado redox

3.3.1. Tiois totais (GSH)

As concentrações de tiois totais (expressas no presente estudo como GSH) foram determinadas em sangue total através da adição de 5-5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), como descrito por Ellman (1959). O DTNB reage com tiois livres para formar ácido dissulfureto e ácido 2-nitro-5-tiobenzoico. O último produto da reação pode ser quantificado pela sua absorbância a 412 nm, em espectrofotometria ultravioleta/visível (UV/VIS). Os resultados foram expressos em µmol/ml de sangue.

As análises de GSH, GPx e CAT foram realizadas em colaboração com a Profª. Dra. Denise Grotto (Universidade de Sorocaba).

3.3.2. Atividade da glutationa peroxidase (GPx)

A atividade de GPx foi determinada por espectrofotometria UV/VIS, como descrito por Paglia e Valentine (1967). Este método baseia-se na oxidação de NADPH a 25ºC, na presença de GSH reduzida, GSH redutase, azida sódica, H_2O_2 e sangue diluído, resultando em um decaimento da absorbância a 340 nm. A atividade enzimática é proporcional ao consumo de NADPH (fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina), medido pelo decaimento da absorbância. Os resultados foram corrigidos pela concentração de hemoglobina (Hb) e expressos em nmol NADPH/min/g Hb.

Um kit comercial (Bioclin, São Paulo, Brasil) foi usado para determinar as concentrações de Hb de acordo com as instruções do fabricante.

3.3.3. Atividade da catalase (CAT)

A atividade da enzima CAT foi medida em sangue periférico como descrito por Aebi (1984). Este método baseia-se no decaimento da absorbância a 240 nm devido à decomposição de H_2O_2 em uma reação dependente da CAT presente na amostra. Os resultados foram expressos em κ/g Hb/min, onde κ representa a constante de velocidade da reação catalítica (AEBI, 1984; ROBINSON, 2015).

3.3.4. Atividade da glutationa S-transferase (GST)

A atividade da enzima GST foi determinada em sangue total pela adição de 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e GSH, como descrito por Mannervik (1985). O CDNB atua como substrato da enzima GST, que o conjuga à GSH formando um cromóforo detectável em 340 nm. O aumento da absorbância foi monitorado por cinco minutos em espectrofotômetro UV/VIS. Os resultados foram expressos em µmol/min/mL de sangue.

3.3.5. Concentrações de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina urinária (8-OHdG)

As concentrações urinárias de 8-OHdG foram determinadas através do método descrito por Asimakopoulos et al. (2016), em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS).

Um volume de 100 µL de urina foi misturado a 10 ng de padrão interno ($^{15}N_5$-8-OHdG), com posterior diluição em 0,50 mL de água ultrapura e injeção em LC-MS/MS (volume de injeção – 10 µL). A corrida cromatográfica foi conduzida em uma coluna Zorbax SB-Aq (150 mm x 2,1 mm; partículas de 3,5 µm; Santa Clara, CA, EUA), conectada a uma coluna guarda Javelin (Betasil C18, 2,1 mm x 20 mm; partículas de 5 mm; Thermo Electron Corp.). A fase móvel foi composta de acetonitrila:água em diversas proporções, com 0,10% de ácido acético. A eluição ocorreu em um fluxo de 300 µL/min, iniciando-se com 80% de água, por 2 minutos. A proporção foi reduzida ao longo de 2 minutos para 25% de água, mantida por mais 3 minutos, e então para 5% ao longo de 3 minutos, mantida por 7 minutos. Em seguida, reverteu-se para 80% em meio minuto, mantendo-se por 2,5 minutos. O tempo total da corrida foi de 20 minutos. Uma curva de calibração para 8-OHdG foi

construída variando-se a concentração de 0,10 a 100 ng/mL, em água. Os resultados foram expressos em µg/g creat.

Estas análises foram realizadas em colaboração com o Prof. Kurunthachalam Kannan, *Department of Health, Wadsworth Center*, Nova Iorque, EUA.

3.4. Extração do DNA sanguíneo

O DNA genômico das amostras do grupo exposto foi extraído a partir do sangue total utilizando-se o kit *PureLink DNA Genomic Kit* (Invitrogen, Califórnia, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Após o procedimento de extração, o DNA foi eluído em água destilada. A qualidade da extração foi verificada através das razões 260/280 e 260/230 obtidas por espectrofotometria (Nanodrop 2000, ThermoScientific, Sugar Land, TX, EUA) e as amostras de DNA foram quantificadas utilizando-se o kit *Qubit dsDNA BR Assay Kit*, por fluorimetria (Qubit 3.0, Invitrogen, Califórnia, CA, EUA). As amostras foram armazenadas em freezer -20 ºC até as genotipagens.

3.5. Genotipagens

Ensaios Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) foram utilizados para a determinação das variantes genéticas em termocicladores 7500 *Fast Real-Time PCR System* e *StepOne Plus System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Parte das genotipagens foi realizada no Laboratório de Nutrigenômica, coordenado pela Prof[a] Dra. Lusânia Maria Greggi Antunes, na FCFRP-USP.

3.6. Análise estatística

Ao final das genotipagens, o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) das frequências alélicas dos polimorfismos foi analisado por teste de Chi-quadrado (χ^2) convencional.

Idade, tempo de trabalho, concentrações de Pb-s, Pb-u e Pb-p foram categorizadas como variáveis contínuas; sexo, função ocupacional, consumo de álcool e tabagismo foram classificadas como variáveis categóricas. Foram considerados como consumidores de álcool os indivíduos que bebem, pelo menos, cinco doses por semana e, como fumantes, indivíduos que fumaram mais de cinco

cigarros por dia nos últimos cinco anos. Análises de correlações também foram conduzidas para avaliação das associações entre idade, sexo, concentrações de Pb-s, Pb-u e Pb-p, álcool, tabagismo e demais variáveis que possam influenciar sobre as concentrações do metal. A comparação dos dados entre os grupos exposto e não-exposto foi feita através de teste-*t* de Student e regressões logísticas multinomiais.

Modelos gerais lineares multivariados foram utilizados com o objetivo de ajustar outras variáveis, que não as variações genéticas, que possam influenciar as concentrações de Pb, tais como, idade, sexo, função e tempo de trabalho. As análises multivariadas também foram utilizadas para a determinação dos fatores de influência sobre os biomarcadores de estresse oxidativo. Para as análises de regressão linear, todos os dados cuja distribuição não apresentou normalidade foram transformados.

Todas as análises foram realizadas no programa SPSS® 20 *Statistics* (IBM; Armonk, NY, EUA) e os resultados foram considerados significativos para um valor de $p \leq 0{,}050$.

4. RESULTADOS

4.1. Características gerais, parâmetros bioquímicos e concentrações de Pb

Foram incluídos 276 voluntários ao estudo, sendo 236 homens expostos ocupacionalmente ao Pb e 40 não-expostos. As características gerais de ambos os grupos estão apresentadas na Tabela 1. A homogeneidade das duas populações é evidente quanto à idade, índice de massa corporal (IMC), ingestão de bebida alcoólica e tabagismo, fatores que poderiam influenciar os diversos parâmetros bioquímicos avaliados no presente estudo.

Em relação aos indivíduos expostos, a idade média ± desvio padrão (DP) foi de 38 ± 10 anos, variando de 18 a 69 anos. Um total de 16% se declarou fumante e 34% dos voluntários alegaram que ingerem ao menos cinco doses de bebidas alcoólicas por semana. O IMC médio foi de 27 ± 3,9 kg/m^2, abrangendo valores de 18 a 39 kg/m^2. O tempo de trabalho nas fábricas de baterias variou de 01 mês a até 27 anos, sendo a média de 3,1 ± 3,8 anos.

A média de idade do grupo não-exposto foi de 39 ± 13 anos, com um intervalo de 18 a 68 anos. Os fumantes somaram 10% do total, enquanto 35% afirmaram consumir álcool com a mesma frequência supracitada. Quanto ao IMC, a média foi de 27 ± 4,3 kg/m^2, variando de 20 a 43 kg/m^2. O tempo de trabalho não foi considerado para esta população, por se tratar de indivíduos com profissões não relacionadas entre si.

Tabela 1 – Características gerais dos grupos estudados

	Exposto (n[b] = 236)			**Não-exposto (n = 40)**		
	%	**X[c] ± DP[d]**	**Variação**	**%**	**X ± DP**	**Variação**
Idade	-	38 ± 10	18 – 69	-	39 ± 13	18 – 68
Tempo de trabalho (anos)	-	3,1 ± 3,8	0,083 – 27	-	-	-
Fumantes	16%	-	-	10%	-	-
Ingerem álcool	34%	-	-	35%	-	-
IMC[a]	-	27 ± 3,9	18 – 39	-	27 ± 4,3	20 – 43

[a]Índice de massa corporal (kg/m^3); [b]Número amostral; [c]Média aritmética; [d]Desvio padrão.

A Tabela 2 exibe as concentrações de Pb, GSH e 8-OHdG urinária e os valores das atividades enzimáticas de CAT, GPx e GST. Com exceção de GST, todos os demais parâmetros apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos estudados (teste-*t*, $p < 0,0010$). A média e desvio padrão de Pb-s do grupo exposto foi de 21 ± 12 µg/dL, com valores máximos atingindo 52 µg/dL. No plasma, as concentrações encontradas variaram de 0,010 a 6,1 µg/dL (média de 0,60 ± 0,71 µg/dL), enquanto os valores médios de Pb-u foram de 37 ± 42 µg/g creat. Quanto ao grupo não-exposto, as médias de Pb-s, Pb-p e Pb-u foram de 1,2 ± 1,2 µg/dL, 0,048 ± 0,053 µg/dL e 0,52 ± 0,48 µg/g creat, respectivamente, sendo que, nas três matrizes, houve amostras onde o metal não foi detectado.

A concentração de GSH e atividade de GPx foram significativamente maiores no grupo exposto ($p < 0,0010$); a atividade enzimática de CAT foi maior no grupo não-exposto, assim como a concentração média de 8-OHdG urinária ($p < 0,0010$). A atividade de GST não apresentou diferença significativa entre os dois grupos ($p = 0,45$).

Tabela 2 – Concentrações de Pb e biomarcadores de estresse oxidativo

	Exposto (n[i] = 236)		Não-exposto (n = 40)		Teste *t*[l]
	X[j] ± DP[k]	Variação	X ± DP	Variação	*p*
Pb-s[a]	21 ± 12	1,8 – 52	1,2 ± 1,2	ND – 5,9	< 0,0010
Pb-p[b]	0,60 ± 0,71	0,010 – 6,1	0,048 ± 0,053	ND – 0,27	< 0,0010
Pb-u[c]	37 ± 42	0,35 – 318	0,52 ± 0,48	ND – 2,32	< 0,0010
GSH[d]	0,44 ± 0,14	0,0080 – 1,0	0,24 ± 0,060	0,12 – 0,37	< 0,0010
CAT[e]	124 ± 59	9,0 – 486	154 ± 42	23 – 242	< 0,0010
GPx[f]	6,5 ± 3,0	0,96 – 14	3,6 ± 4,2	0,59 – 19	< 0,0010
GST[g]	36 ± 14	11 – 82	34 ± 14	12 – 61	0,45
8-OHdG[h]	4,0 ± 2,4	0,69 – 24	5,2 ± 2,9	2,2 – 15	< 0,0010

[a]Chumbo no sangue (µg/dL); [b]Chumbo no plasma (µg/dL); [c]Chumbo na urina (µg/g creat); [d]Glutationa reduzida (µmol/ml de sangue); [e]Catalase (κ/g Hb/min); [f]Glutationa peroxidase (nmol NADPH/min/g Hb); [g]Glutationa S-transferase (µmol/min/mL); [h]8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (µg/g creat); [i]Número amostral; [j]Média aritmética; [k]Desvio padrão; [l]Teste-*t* de Student para comparação entre médias.

Apesar de a comparação das médias pelo teste-*t* de Student ser um método comumente utilizado, existem limitações que não podem ser desconsideradas, como a necessidade de se utilizar dados normalmente distribuídos e um amplo número amostral. Ademais, a simples comparação entre as médias não leva em conta outros fatores que possam influenciar as variáveis testadas (USMAN, 2016). Uma vez que os valores de CAT, GPx, GST, 8-OHdG e dos três biomarcadores de Pb não apresentaram distribuição normal e o número amostral entre as duas populações estudadas é diferente, outro método estatístico, a regressão linear multinomial, foi empregada para a comparação dos grupos. Os resultados da regressão estão descritos na Tabela 3. O modelo estatístico utilizado incluiu as seguintes variáveis: idade, consumo de álcool, tabagismo e IMC; o grupo exposto foi usado como referência.

Como pode ser observado, as regressões multinomiais geraram resultados compatíveis com os obtidos com o teste-*t* de Student. Os valores do coeficiente β foram positivos para CAT e 8-OHdG, indicando que, mesmo considerando as demais variáveis do modelo estatístico, estes dois parâmetros são significativamente maiores no grupo não-exposto ($p < 0,0010$). Todos os demais parâmetros foram significativamente menores no grupo não-exposto ($p < 0,0010$), com exceção de GST, cuja diferença não foi significativa ($p = 0,37$).

Tabela 3 – Regressões logísticas para comparação entre grupos

Regressão logística multinomial				
	β	**OR[i]**	**IC [95%][j]**	***p***
Pb-s[a]	-4,9	0,0080	0,0010 – 0,101	< 0,0010
Pb-p[b]	-3,9	0,019	0,0050 – 0,069	< 0,0010
Pb-u[c]	-8,2	0,00	0,0030 – 0,025	< 0,0010
GSH[d]	-4,5	0,011	0,0030 – 0,43	< 0,0010
CAT[e]	0,28	1,3	1,1 – 1,5	< 0,0010
GPx[f]	-2,7	0,066	0,028 – 0,15	< 0,0010
GST[g]	-0,37	0,069	0,30 – 1,6	0,37
8-OHdG[h]	1,2	3,2	1,5 – 6,8	< 0,0010

[a]Chumbo no sangue (µg/dL); [b]Chumbo no plasma (µg/dL); [c]Chumbo na urina (µg/g creat); [d]Glutationa reduzida (µmol/ml de sangue); [e]Catalase (κ/g Hb/min); [f]Glutationa peroxidase (nmol NADPH/min/g Hb); [g]Glutationa S-transferase (µmol/min/mL); [h]8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (µg/g creat); [i]*Odds ratio* (razão de chances); [j]Intervalo de confiança de 95% para *odds ratio*.
Modelo: Grupos (expostos e não-expostos) = α + β1×idade + β2×consumo de álcool + β3×tabagismo + β4×IMC
O grupo exposto foi usado como referência.

4.2. Correlações Spearman

A Tabela 4 mostra as correlações Spearman encontradas entre os marcadores de estresse oxidativo, tempo de trabalho e as concentrações de Pb-s, Pb-p e Pb-u, para o grupo exposto.

Como esperado, os três biomarcadores de Pb se correlacionaram entre si (p < 0,010). O tempo de trabalho também se correlacionou com Pb-s (r_s = 0,26; p < 0,010), Pb-p (r_s = 0,24; p < 0,010) e Pb-u (r_s = 0,18; p = 0,0060). Em relação aos marcadores de estresse, houve correlação negativa entre GSH e tempo de trabalho (r_s = -0,16; p = 0,014).

Por outro lado, as concentrações de 8-OHdG na urina se mostraram correlacionadas positivamente a Pb-s (r_s = 0,20; p = 0,0020) e Pb-p (r_s = 0,28; p < 0,010), sugerindo danos oxidativos ao DNA causados pela presença do metal no organismo.

Tabela 4 – Correlações Spearman entre marcadores de estresse oxidativo, tempo de trabalho, IMC, idade e concentrações de Pb

	Pb-s	**Pb-p**	**Pb-u**	**GSH**	**CAT**	**GPx**	**GST**	**8-OHdG**	**Tempo de trabalho**	**IMC**
Pb-p[b]	0,85**	-								
Pb-u[c]	0,69**	0,72**	-							
GSH[d]	-0,10	-0,098	-0,10	-						
CAT[e]	0,000	-0,046	-0,11	-0,15*	-					
GPx[f]	-0,0040	0,031	0,046	-0,24**	0,077	-				
GST[g]	0,11	0,12	0,10	-0,036	0,083	0,17*	-			
8-OHdG[h]	0,20**	0,28**	0,12	0,0070	0,017	0,061	0,11	-		
Tempo de trabalho	0,26**	0,24**	0,18**	-0,16*	0,0060	-0,083	-0,0080	0,057	-	
IMC[i]	-0,16*	-0,17**	-0,21**	0,014	0,083	0,001	-0,0030	-0,087	-0,0040	-
Idade	0,042	0,040	0,052	0,029	0,016	-0,016	0,051	0,0060	0,24**	0,22**

[a]Chumbo no sangue (µg/dL); [b]Chumbo no plasma (µg/dL); [c]Chumbo na urina (µg/ g creat); [d]Glutationa reduzida (µmol/ml de sangue); [e]Catalase (κ/g Hb/min); [f]Glutationa peroxidase (nmol NADPH/min/g Hb); [g]Glutationa S-transferase (µmol/min/mL); [h]8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (µg/g creat); [i]Índice de massa corporal (kg/m^3).

*$p \leq 0{,}050$; **$p \leq 0{,}010$

4.3. Potenciais fatores de influência sobre parâmetros de estresse oxidativo

Análises de regressão linear multivariadas foram empregadas com o objetivo de se determinar quais variáveis poderiam exercer influência sobre as atividades enzimáticas de CAT, GPx e GST e sobre as concentrações GSH no sangue e 8-OHdG na urina. A Tabela 5 apresenta os resultados das análises para CAT, GPx, GSH e GST, para ambos os grupos de estudo. Três modelos estatísticos foram utilizados, de forma que, em cada um deles, apenas um biomarcador de Pb foi incluído afim de se evitar a sobreposição de dados.

Tabela 5 – Regressões multivariadas para associações entre Pb e biomarcadores do sistema antioxidante endógeno

	Exposto (n[e] = 236)				**Não-exposto (n = 40)**			
	CAT[f]	**GPx[g]**	**GSH[h]**	**GST[i]**	**CAT**	**GPx**	**GSH**	**GST**
Variáveis								
Modelo A (Pb-s)[a]	**Coeficiente de β[j]**				**Coeficiente de β**			
Idade	0,0010	-0,0030	0,00	0,0010	-0,0050	-0,0020	0,00	-0,0030
Álcool	**-0,056***	-0,041	0,014	-0,0010	0,15	-0,030	0,027	0,098
Tabagismo	0,012	0,047	0,032	0,047	0,020	0,045	-0,020	-0,43
IMC[b]	0,051	-0,0010	-0,0020	-0,0010	0,13	0,0040	0,077	-0,61
Exercícios	0,015	-0,053	0,0080	0,012	-0,063	-0,030	0,018	-0,049
Pb-s	0,0030	0,0040	-0,0040	**0,012***	0,047	0,013	0,0040	-0,16
Modelo B (Pb-p)[c]								
Idade	0,0010	-0,0030	0,00	0,0010	-0,0050	0,014	-0,0010	-0,0040
Álcool	**-0,055***	-0,040	0,013	0,0010	0,058	0,10	0,026	0,16
Tabagismo	0,011	0,043	0,034	0,042	-0,15	0,85	-0,0040	-0,24
IMC	0,051	0,0020	-0,0020	1,00	-0,41	0,028	0,11	0,85
Exercícios	0,016	-0,054	0,0080	0,012	-0,090	-0,061	-0,0030	-0,014
Pb-p	0,022	0,057	-0,032	0,10	0,27	0,42	-0,025	0,16
Modelo C (Pb-u)[d]								
Idade	0,0010	-0,0030	0,00	0,0010	-0,0040	0,016	0,00	-0,0090
Álcool	**-0,057***	-0,031	0,0090	0,010	0,14	0,061	0,027	0,11
Tabagismo	0,013	0,052	0,029	0,059	0,031	0,52	-0,021	-0,52
IMC	0,043	0,012	-0,0080	0,0040	0,15	-0,52	0,071	-0,66
Exercícios	0,018	-0,059	0,011	0,0070	-0,035	-0,28	0,021	-0,088
Pb-u	-0,019	0,089	**-0,049***	0,092	0,036	-0,45	0,0030	0,10

[a]Chumbo no sangue (µg/dL); [b]Índice de massa corporal (kg/m^3); [c]Chumbo no plasma (µg/dL); [d]Chumbo na urina (µg/g creat); [e]Número amostral; [f]Catalase (κ/g Hb/min); [g]Glutationa peroxidase (nmol NADPH/min/g Hb); [h]Glutationa reduzida (µmol/ml de sangue); [i]Glutationa S-transferase (µmol/min/mL); [j]Regressão linear multivariada.

*$p \leq 0,050$.

Em relação ao grupo exposto, o consumo de álcool foi associado à diminuição da atividade de CAT em função de Pb-s, Pb-p e Pb-u (β = -0,056, -0,055 e -0,057 respectivamente; $p \leq 0,050$). Pb-s se mostrou positivamente associado à atividade de GST (β = 0,012; $p \leq 0,050$), enquanto Pb-u foi significativamente correlacionado a uma diminuição das concentrações do tripeptídeo GSH (β = -0,049; $p \leq 0,050$). Não houve associações significativas para o grupo não-exposto.

As regressões multivariadas para 8-OHdG foram realizadas de maneira distinta, uma vez que este parâmetro não participa do sistema de defesa antioxidante, porém é influenciado pelo mesmo, por ser um biomarcador de dano oxidativo causado ao material genético. Desta forma, os modelos estatísticos incluíram as variáveis idade, consumo de álcool, tabagismo, IMC, prática de exercícios físicos, CAT, GPx, GSH e GST. Pb-s, Pb-p e Pb-u foram incluídos nos modelos A, B e C, respectivamente.

A Tabela 6 mostra os resultados das regressões para os grupos exposto e não-exposto. Houve uma associação significativa entre a prática de exercícios físicos e o aumento na concentração de 8-OHdG na urina dos participantes não-expostos, em todos os modelos testados ($p \leq 0,050$). Tal correlação não foi observada nos indivíduos expostos.

Entretanto, este último grupo apresentou associação entre Pb-p e 8-OHdG (β = 0,17; $p \leq 0,050$), corroborando com o que foi previamente apontado nas correlações Spearman (Tabela 4), sugerindo que o aumento do metal na fração plasmática contribui para o aumento da oxidação do material genético e sua posterior eliminação.

Tabela 6 – Regressões multivariadas para associações entre Pb e 8-OHdG

8-OHdG urinária[a]		
	Exposto (n[j] = 236)	**Não-exposto (n = 40)**
Variáveis	**Coeficiente de β[k]**	
Modelo A (Pb-s)[b]		
Idade	0,0020	0,00
Álcool	-0,0020	0,022
Tabagismo	0,0045	-0,20
IMC[c]	-0,046	-0,27
Exercícios	0,10	**0,39***
CAT[d]	0,037	0,49
GPx[e]	0,066	0,0040
GSH[f]	0,019	-0,27
GST[g]	0,042	0,088
Pb-s	0,057	0,11
Modelo B (Pb-p)[h]		
Idade	0,0020	0,016
Álcool	-0,0060	0,069
Tabagismo	0,030	-0,058
IMC	0,0030	-1,0
Exercícios	0,0099	**0,57***
CAT	0,033	0,91
GPx	0,061	0,050
GSH	0,047	0,086
GST	0,036	0,29
Pb-p	**0,17***	-0,41
Modelo C (Pb-u)[i]		
Idade	0,0020	0,0050
Álcool	0,0010	-0,027
Tabagismo	0,055	-0,23
IMC	-0,049	-0,52
Exercícios	0,097	**0,41***
CAT	0,042	0,51
GPx	0,062	-0,029
GSH	0,00	-0,34
GST	0,056	-0,022
Pb-u	0,034	-0,085

[a]8-hidroxi-2'-deoxiguanosina urinária (µg/g creat); [b]Chumbo no sangue (µg/dL); [c]Índice de massa corporal (kg/m^3); [d]Catalase (κ/g Hb/min); [e]Glutationa peroxidase (nmol NADPH/min/g Hb); [f]Glutationa reduzida (µmol/ml de sangue); [g]Glutationa S-transferase (µmol/min/mL); [h]Chumbo no plasma (µg/dL); [i]Chumbo na urina (µg/g creat); [j]Número amostral; [k]Regressão linear multivariada.

*$p \leq 0,050$.

4.4. Genotipagens e associação entre genótipos, concentrações de Pb e parâmetros de estresse oxidativo do grupo exposto

As frequências genotípicas dos SNPs analisados estão expressas na Tabela 7. Os genes *GPx1* (rs11549655) e *GSS* (rs28936396; rs121909307) resultaram em 100% de indivíduos homozigotos selvagens. Não houve homozigotos polimórficos para *HFE* (rs1800562), *VDR* (rs1544410), *GSTP1* (rs1138272), *ALAD* (rs1800435) e *GSR* (rs8190955).

Tabela 7 – Frequências dos genótipos avaliados no estudo - grupo exposto

Polimorfismo	Genótipos			EHW[k] (χ^2)
ALAD[a] **G>C (rs1800435)**	**GG**	**GC**	**CC**	
Frequência	84%	16%	-	1,65
GPx1[b] **G>C (rs11549655)**	**GG**	**GC**	**CC**	
Frequência	100%	-	-	-
GSR[c] **C>T (rs8190955)**	**CC**	**CT**	**TT**	
Frequência	97%	3,0%	-	0,055
GSS[d] **C>T (rs28936396)**	**CC**	**CT**	**TT**	
Frequência	100%	-	-	-
GSS **G>A (rs121909307)**	**GG**	**GA**	**AA**	
Frequência	100%	-	-	-
GSTP1[e] **A>G (rs1695)**	**AA**	**AG**	**GG**	
Frequência	42%	44%	14%	0,26
GSTP1 **C>T (rs1138272)**	**CC**	**CT**	**TT**	
Frequência	91%	9,0%	-	0,54
HFE[f] **C>G (rs1799945)**	**CC**	**CG**	**GG**	
Frequência	80%	19%	1,0%	0,044
HFE **G>A (rs1800562)**	**GG**	**GA**	**AA**	
Frequência	96%	4,0%	-	0,072
SLC11A1[g] **G>A (rs17235409)**	**GG**	**GA**	**AA**	
Frequência	90%	6,0%	4,0%	60,1
SLC11A2[h] **C>T (rs149411)**	**CC**	**CT**	**TT**	
Frequência	35%	42%	23%	5,06
SLC11A2 **C>T (rs11169654)**	**CC**	**CT**	**TT**	
Frequência	76%	23%	1,0%	0,15
VDR[i] **G>A (rs1544410)**	**GG**	**GA**	**AA**	
Frequência	40%	60%	-	41,9
VDR **G>A (rs2228570)**	**GG**	**GA**	**AA**	
Frequência	49%	41%	10%	0,18

[a]Ácido delta-aminolevulínico desidratase; [b]Glutationa peroxidase; [c]Glutationa redutase; [d]Glutationa sintetase; [e]Glutationa S-transferase P; [f]Gene da hemocromatose; [g]Carreador de soluto Família 11 Membro 1; [h]Carreador de soluto Família 11 Membro 2; [i]Receptor de vitamina D; [j]Número de indivíduos; [k]Equilíbrio de Hardy-Weinberg, chi-quadrado (χ^2 tabelado = 3,84; p = 0,050). É considerado em equilíbrio o SNP que apresenta $\chi^2 \leq 3,84$.

O EHW não foi calculado para os SNPs de *GPx1* (rs11549655) e *GSS* (rs28936396; rs121909307), por não haver variação genotípica. Como pode ser observado, os SNPs em *SLC11A1* (rs17235409), *SLC11A2* (rs149411) e *VDR* (rs1544410) não estão em equilíbrio, pois seus valores calculados de χ^2 foram superiores a 3,84 (χ^2 tabelado).

A influência dos genótipos sobre as concentrações de Pb e sobre os parâmetros de estresse oxidativo dos indivíduos expostos ao metal foi avaliada através de análises de regressão multivariada. Os SNPs dos genes *GPx1* (rs11549655) e *GSS* (rs28936396; rs121909307) não foram incluídos nas análises. Ainda, para os polimorfismos em *HFE* (rs1799945), *SLC11A1* (rs17235409) e *SLC11A2* (rs11169654), os indivíduos foram agrupados em polimórficos (pelo menos um alelo mutante) e não-polimórficos (homozigotos selvagens), devido à baixa ocorrência de homozigotos polimórficos. Já o SNP em *VDR* (rs2228570) foi analisado com os indivíduos agrupados e não agrupados, por apresentar razoável distribuição dos genótipos.

A Tabela 8 traz os resultados referentes às análises do impacto dos genótipos sobre as concentrações de Pb. Como pode ser observado, apenas o SNP em *HFE* (rs1799945) foi associado positivamente a Pb-p (β = 0,15; p = 0,050), indicando que a presença de pelo menos um alelo polimórfico G pode estar associada a maiores concentrações plasmáticas do metal.

Tabela 8 – Regressões multivariadas para as associações entre genótipos e concentrações de Pb-s, Pb-p e Pb-u

Regressões lineares multivariadas						
Genótipo	**Pb-s[h]**		**Pb-p[i]**		**Pb-u[j]**	
	β[k]	***p***	**β**	***p***	**β**	***p***
***ALAD*[a] (rs1800435)**						
GG	-	-	-	-	-	-
GC	0,74	0,34	0,059	0,49	0,019	0,81
***GSR*[b] (rs8190955)**						
CC	-	-	-	-	-	-
CT	-0,43	0,79	-0,18	0,32	-0,21	0,20
***GSTP1*[c] (rs1695)**						
AA	-	-	-	-	-	-
AG	-0,35	0,57	-0,045	0,51	-0,10	0,12
GG	-0,28	0,75	-0,059	0,55	-0,074	0,41
***GSTP1* (rs1138272)**						
CC	-	-	-	-	-	-
CT	1,3	0,19	-0,048	0,45	-0,094	0,11

Continua.

Tabela 8 – Continuação.

Regressões lineares multivariadas

Genótipo	Pb-s		Pb-p		Pb-u	
	β	*p*	β	*p*	β	*p*
***HFE*[d] (rs1799945)**						
CC	-	-	-	-	-	-
CG + GG	1,0	0,16	**0,15**	**0,050**	0,088	0,22
***HFE* (rs1800562)**						
GG	-	-	-	-	-	-
GA	-1,8	0,28	-0,14	0,44	0,094	0,57
***SLC11A1*[e] (rs17235409)**						
GG	-	-	-	-	-	-
GA + AA	-0,95	0,31	-0,13	0,19	-0,048	0,62
***SLC11A2*[f] (rs149411)**						
CC	-	-	-	-	-	-
CT	0,72	0,26	0,079	0,27	0,058	0,38
TT	-0,010	0,99	0,033	0,69	0,092	0,23
***SLC11A2* (rs11169654)**						
CC	-	-	-	-	-	-
CT + TT	0,59	0,38	0,074	0,32	0,054	0,43
***VDR*[g] (rs1544410)**						
GG	-	-	-	-	-	-
GA	0,91	0,12	0,11	0,083	0,033	0,58
***VDR* (rs2228570)**						
GG	-	-	-	-	-	-
GA	-0,78	0,19	-0,092	0,16	-0,021	0,73
AA	-0,62	0,53	-0,094	0,39	0,080	0,43
***VDR* (rs2228570)**						
GG	-	-	-	-	-	-
GA + AA	-0,75	0,19	-0,093	0,13	-0,0020	0,97

[a]Ácido delta-aminolevulínico desidratase; [b]Glutationa redutase; [c] Glutationa S-transferase P; [d]Gene da hemocromatose; [e]Carreador de soluto Família 11 Membro 1; [f]Carreador de soluto Família 11 Membro 2; [g]Receptor de vitamina D; [h]Chumbo no sangue; [i]Chumbo no plasma; [j]Chumbo na urina; [k]O valor de β corresponde ao genótipo. Modelos: Pb-s, Pb-p ou Pb-u = α + β1×genótipo + β2×IMC + β3×tempo de trabalho + β4×uso de EPI.

A capacidade de modulação do sistema antioxidante endógeno pelos genótipos também foi testada, considerando os três modelos estatísticos em função de Pb-s, Pb-p ou Pb-u. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 9, 10 e 11.

Como demonstrado, as enzimas GPx e GST e o tripeptídeo GSH foram impactados por pelo menos um SNP, seja em função de Pb-s, Pb-p ou Pb-u. O polimorfismo rs1695 (c.313A>G), em *GSTP1,* foi associado à diminuição da atividade da enzima GST. A presença do polimorfismo em homozigose leva à maior

redução (β = -0,51; *p* < 0,0010), porém mesmo em heterozigotos a atividade de GST é significativamente menor do que no genótipo selvagem (β = -0,21; *p* < 0,0010).

O SNP rs1800562 (c.845G>A), em *HFE*, se mostrou correlacionado tanto a GPx quanto a GSH. A presença de pelo menos um alelo polimórfico foi positivamente associada à atividade de GPx (β = 0,63; *p* = 0,0020, em função de Pb-s e Pb-p; β = 0,62; *p* = 0,0030, em função de Pb-u). Quanto à GSH, a associação foi negativa, indicando que a presença do alelo polimórfico pode estar relacionada à redução da concentração do tripeptídeo (β = -0,11, *p* = 0,034; β = -0,10, *p* = 0,039; β = -0,098; *p* = 0,049, em função de Pb-s, Pb-p e Pb-u, respectivamente).

A enzima GPx ainda foi modulada por um dos polimorfismos em *VDR,* rs2228570 (c.2G>A), havendo diminuição da atividade enzimática na presença do alelo polimórfico A, em função dos três biomarcadores de Pb.

Tabela 9 – Regressões multivariadas para associações entre genótipos e biomarcadores do sistema antioxidante, em função de Pb-s

Regressões lineares multivariadas								
Genótipo	**CAT[h]**		**GPx[i]**		**GSH[j]**		**GST[k]**	
	β[l]	***p***	**β**	***p***	**β**	***p***	**β**	***p***
***ALAD[a]* (rs1800435)**								
GG	-	-	-	-	-	-	-	-
GC	-0,039	0,25	0,175	0,11	0,012	0,64	-0,0020	0,98
***GSR[b]* (rs8190955)**								
CC	-	-	-	-	-	-	-	-
CT	-0,062	0,38	-0,20	0,37	0,079	0,14	-0,018	0,91
***GSTP1[c]* (rs1695)**								
AA	-	-	-	-	-	-	-	-
AG	0,0080	0,77	0,051	0,54	-0,035	0,081	**-0,21**	**< 0,0010**
GG	0,0060	0,87	-0,012	0,92	0,0040	0,89	**-0,51**	**< 0,0010**
***GSTP1* (rs1138272)**								
CC	-	-	-	-	-	-	-	-
CT	0,014	0,74	-0,15	0,24	-0,043	0,17	-0,14	0,16
***HFE[d]* (rs1799945)**								
CC	-	-	-	-	-	-	-	-
CG + GG	0,0050	0,86	0,067	0,48	0,018	0,44	-0,0060	0,93
***HFE* (rs1800562)**								
GG	-	-	-	-	-	-	-	-
GA	0,016	0,81	**0,63**	**0,0020**	**-0,11**	**0,034**	0,037	0,80

Continua.

Tabela 9 – Continuação.

Regressões lineares multivariadas								
Genótipo	**CAT**		**GPx**		**GSH**		**GST**	
	β	***p***	**β**	***p***	**β**	***p***	**β**	***p***
***SLC11A1*[e] (rs17235409)**								
GG	-	-	-	-	-	-	-	-
GA + AA	0,016	0,68	0,021	0,87	0,018	0,56	-0,015	0,87
***SLC11A2*[f] (rs149411)**								
CC	-	-	-	-	-	-	-	-
CT	0,0060	0,83	-0,0050	0,96	0,00	0,99	0,020	0,74
TT	-0,019	0,56	0,16	0,12	-0,029	0,24	-0,053	0,47
***SLC11A2* (rs11169654)**								
CC	-	-	-	-	-	-	-	-
CT + TT	-0,019	0,51	-0,067	0,47	0,016	0,47	-0,11	0,097
***VDR*[g] (rs1544410)**								
GG	-	-	-	-	-	-	-	-
GA	0,0050	0,84	0,051	0,52	-0,030	0,12	-0,038	0,50
***VDR* (rs2228570)**								
GG	-	-	-	-	-	-	-	-
GA	0,032	0,22	**-0,18**	**0,030**	-0,0070	0,74	0,011	0,85
AA	-0,031	0,46	-0,13	0,34	0,027	0,40	0,15	0,10
***VDR* (rs2228570)**								
GG	-	-	-	-	-	-	-	-
GA + AA	0,020	0,42	**-0,17**	**0,030**	0,00	0,99	0,039	0,48

[a]Ácido delta-aminolevulínico desidratase; [b]Glutationa redutase; [c] Glutationa S-transferase P; [d]Gene da hemocromatose; [e]Carreador de soluto Família 11 Membro 1; [f]Carreador de soluto Família 11 Membro 2; [g]Receptor de vitamina D; [h]Catalase (κ/g Hb/min); [i]Glutationa peroxidase (nmol NADPH/min/g Hb); [j]Glutationa reduzida (µmol/ml de sangue); [k]Glutationa S-transferase (µmol/min/mL); [l]O valor de β corresponde ao genótipo. Modelos: CAT, GPx, GSH ou GST = α + β1×genótipo + β2×IMC + β3×tempo de trabalho + β4×idade + β5×tabagismo + β6×consumo de álcool + β7×Pb-s.

Tabela 10 – Regressões multivariadas para associações entre genótipos e biomarcadores do sistema antioxidante, em função de Pb-p

Regressões lineares multivariadas								
Genótipo	**CAT[h]**		**GPx[i]**		**GSH[j]**		**GST[k]**	
	β[l]	***p***	**β**	***p***	**β**	***p***	**β**	***p***
***ALAD[a]* (rs1800435)**								
GG	-	-	-	-	-	-	-	-
GC	-0,038	0,26	0,17	0,11	0,012	0,66	0,0020	0,98
***GSR[b]* (rs8190955)**								
CC	-	-	-	-	-	-	-	-
CT	-0,061	0,38	-0,20	0,39	0,076	0,16	-0,0020	0,99
***GSTP1[c]* (rs1695)**								
AA	-	-	-	-	-	-	-	-
AG	0,0070	0,78	0,052	0,54	-0,035	0,083	**-0,21**	**< 0,0010**
GG	0,0060	0,87	-0,011	0,93	0,0030	0,90	**-0,51**	**< 0,0010**
***GSTP1* (rs1138272)**								
CC	-	-	-	-	-	-	-	-
CT	0,015	0,72	-0,16	0,23	-0,044	0,17	-0,14	0,17
***HFE[d]* (rs1799945)**								
CC	-	-	-	-	-	-	-	-
CG + GG	0,0060	0,85	0,062	0,51	0,019	0,41	-0,011	0,87
***HFE* (rs1800562)**								
GG	-	-	-	-	-	-	-	-
GA	0,014	0,83	**0,63**	**0,0020**	**-0,10**	**0,039**	0,027	0,85
***SLC11A1[e]* (rs17235409)**								
GG	-	-	-	-	-	-	-	-
GA + AA	0,016	0,69	0,023	0,86	0,018	0,57	-0,013	0,89
***SLC11A2[f]* (rs149411)**								
CC	-	-	-	-	-	-	-	-
CT	0,0070	0,81	-0,0070	0,93	0,0010	0,98	0,018	0,77
TT	-0,019	0,55	0,16	0,13	-0,028	0,26	-0,059	0,42
***SLC11A2* (rs11169654)**								
CC	-	-	-	-	-	-	-	-
CT + TT	-0,019	0,52	-0,070	0,45	0,016	0,46	-0,11	0,091
***VDR[g]* (rs1544410)**								
GG	-	-	-	-	-	-	-	-
GA	0,0060	0,82	0,050	0,53	-0,030	0,12	-0,039	0,50

Continua.

Tabela 10 – Continuação.

Regressões lineares multivariadas								
Genótipo	**CAT**		**GPx**		**GSH**		**GST**	
	β	***p***	**β**	***p***	**β**	***p***	**β**	***p***
***VDR* (rs2228570)**								
GG	-	-	-	-	-	-	-	-
GA	0,031	0,23	**-0,17**	**0,032**	-0,0060	0,75	0,012	0,84
AA	-0,032	0,44	-0,12	0,35	0,027	0,40	0,15	0,096
***VDR* (rs2228570)**								
GG	-	-	-	-	-	-	-	-
GA + AA	0,019	0,44	**-0,16**	**0,033**	1,0	1,0	0,039	0,47

[a]Ácido delta-aminolevulínico desidratase; [b]Glutationa redutase; [c] Glutationa S-transferase P; [d]Gene da hemocromatose; [e]Carreador de soluto Família 11 Membro 1; [f]Carreador de soluto Família 11 Membro 2; [g]Receptor de vitamina D; [h]Catalase (κ/g Hb/min); [i]Glutationa peroxidase (nmol NADPH/min/g Hb); [j]Glutationa reduzida (µmol/ml de sangue); [k]Glutationa S-transferase (µmol/min/mL); [l]O valor de β corresponde ao genótipo. Modelos: CAT, GPx, GSH ou GST = α + β1×genótipo + β2×IMC + β3×tempo de trabalho + β4×idade + β5×tabagismo + β6×consumo de álcool + β7×Pb-p.

Tabela 11– Regressões multivariadas para associações entre genótipos e biomarcadores do sistema antioxidante, em função de Pb-u

Regressões lineares multivariadas								
Genótipo	**CAT[h]**		**GPx[i]**		**GSH[j]**		**GST[k]**	
	β[l]	***p***	**β**	***p***	**β**	***p***	**β**	***p***
***ALAD[a]* (rs1800435)**								
GG	-	-	-	-	-	-	-	-
GC	-0,036	0,29	0,17	0,11	0,011	0,68	0,0060	0,93
***GSR[b]* (rs8190955)**								
CC	-	-	-	-	-	-	-	-
CT	-0,073	0,30	-0,19	0,40	0,073	0,18	0,0020	0,99
***GSTP1[c]* (rs1695)**								
AA	-	-	-	-	-	-	-	-
AG	0,0040	0,088	0,055	0,51	-0,036	0,068	**-0,21**	**< 0,0010**
GG	0,0050	0,90	-0,011	0,92	0,0040	0,90	**-0,51**	**< 0,0010**
***GSTP1* (rs1138272)**								
CC	-	-	-	-	-	-	-	-
CT	0,018	0,67	-0,15	0,24	-0,045	0,15	-0,13	0,19
***HFE[d]* (rs1799945)**								
CC	-	-	-	-	-	-	-	-
CG + GG	0,011	0,72	0,062	0,51	0,019	0,40	0,0030	0,96

Continua.

Tabela 11 – Continuação.

Regressões lineares multivariadas								
Genótipo	**CAT**		**GPx**		**GSH**		**GST**	
	β	***p***	**β**	***p***	**β**	***p***	**β**	***p***
***HFE* (rs1800562)**								
GG	-	-	-	-	-	-	-	-
GA	0,015	0,81	**0,62**	**0,0030**	**-0,098**	**0,049**	0,010	0,94
***SLC11A1*[e] (rs17235409)**								
GG	-	-	-	-	-	-	-	-
GA + AA	0,015	0,70	0,019	0,88	0,019	0,53	-0,019	0,83
***SLC11A2*[f] (rs149411)**								
CC	-	-	-	-	-	-	-	-
CT	0,010	0,72	0,0080	0,93	0,0010	0,96	0,020	0,75
TT	-0,016	0,62	0,15	0,14	-0,026	0,29	-0,066	0,37
***SLC11A2* (rs11169654)**								
CC	-	-	-	-	-	-	-	-
CT + TT	-0,016	0,58	-0,069	0,45	0,016	0,46	-0,11	0,10
***VDR*[g] (rs1544410)**								
GG	-	-	-	-	-	-	-	-
GA	0,0070	0,78	0,052	0,52	-0,031	0,11	-0,032	0,58
***VDR* (rs2228570)**								
GG	-	-	-	-	-	-	-	-
GA	0,030	0,23	**-0,18**	**0,028**	-0,0050	0,82	0,0020	0,97
AA	-0,033	0,44	-0,13	0,33	0,030	0,34	0,14	0,14
***VDR* (rs2228570)**								
GG	-	-	-	-	-	-	-	-
GA + AA	0,018	0,45	**-0,17**	**0,028**	0,0020	0,90	0,028	0,60

[a]Ácido delta-aminolevulínico desidratase; [b]Glutationa redutase; [c] Glutationa S-transferase P; [d]Gene da hemocromatose; [e]Carreador de soluto Família 11 Membro 1; [f]Carreador de soluto Família 11 Membro 2; [g]Receptor de vitamina D; [h]Catalase (κ/g Hb/min); [i]Glutationa peroxidase (nmol NADPH/min/g Hb); [j]Glutationa reduzida (µmol/ml de sangue); [k]Glutationa S-transferase (µmol/min/mL); [l]O valor de β corresponde ao genótipo. Modelos: CAT, GPx, GSH ou GST = α + β1×genótipo + β2×IMC + β3×tempo de trabalho + β4×idade + β5×tabagismo + β6×consumo de álcool + β7×Pb-u.

A influência dos genótipos sobre 8-OHdG urinária foi testada individualmente, e os resultados demonstrados na Tabela 12. Nenhum gene apresentou efeitos sobre o biomarcador, sugerindo que tais polimorfismos não são capazes de modular as reações de oxidação do material genético nas condições estudadas.

Tabela 12 – Regressões multivariadas para associações entre genótipos e 8-OHdG

8-OHdG urinária						
Genótipo	**Modelo A (Pb-s)[h]**		**Modelo B (Pb-p)[i]**		**Modelo C (Pb-u)[j]**	
	β[k]	***p***	**β**	***p***	**β**	***p***
***ALAD*[a] (rs1800435)**						
GG	-	-	-	-	-	-
GC	-0,055	0,16	-0,056	0,15	-0,050	0,21
***GSR*[b] (rs8190955)**						
CC	-	-	-	-	-	-
CT	-0,15	0,079	-0,14	0,11	-0,15	0,081
***GSTP1*[c] (rs1695)**						
AA	-	-	-	-	-	-
AG	0,010	0,75	0,013	0,70	0,010	0,77
GG	0,00	0,99	-0,030	0,96	-0,0010	0,98
***GSTP1* (rs1138272)**						
CC	-	-	-	-	-	-
CT	0,0060	0,91	0,0090	0,88	0,010	0,87
***HFE*[d] (rs1799945)**						
CC	-	-	-	-	-	-
CG + GG	0,056	0,12	0,048	0,19	0,058	0,11
***HFE* (rs1800562)**						
GG	-	-	-	-	-	-
GA	0,13	0,94	0,14	0,079	0,13	0,11
***SLC11A1*[e] (rs17235409)**						
GG	-	-	-	-	-	-
GA + AA	0,027	0,56	0,033	0,47	0,024	0,59
***SLC11A2*[f] (rs149411)**						
CC	-	-	-	-	-	-
CT	0,014	0,67	0,010	0,77	0,015	0,65
TT	0,021	0,60	0,016	0,68	0,019	0,64
***SLC11A2* (rs11169654)**						
CC	-	-	-	-	-	-
CT + TT	0,036	0,31	0,031	0,37	0,037	0,30
***VDR*[g] (rs1544410)**						
GG	-	-	-	-	-	-
GA	-0,012	0,70	-0,016	0,59	-0,0090	0,78
***VDR* (rs2228570)**						
GG	-	-	-	-	-	-
GA	0,0012	0,69	0,017	0,58	0,0090	0,77
AA	-0,0050	0,92	0,00	0,99	-0,010	0,84
***VDR* (rs2228570)**						
GG	-	-	-	-	-	-
GA + AA	0,0090	0,76	0,014	0,63	0,0060	0,85

[a]Ácido delta-aminolevulínico desidratase; [b]Glutationa redutase; [c] Glutationa S-transferase P; [d]Gene da hemocromatose; [e]Carreador de soluto Família 11 Membro 1; [f]Carreador de soluto Família 11 Membro 2; [g]Receptor de vitamina D; [h]Chumbo no sangue (µg/dL); [i]Chumbo no plasma (µg/dL); [j]Chumbo na urina(µg/g creat); [k]O valor de β corresponde ao genótipo. Modelo: 8-OHdG = α + β1×genótipo + β2×IMC + β3×idade + β4×tabagismo + β5×consumo de álcool + β6×CAT + β7×GPx + β8×GSH + β9×GST + β10×(Pb-s, Pb-p ou Pb-u).

5. DISCUSSÃO

A indústria de baterias do tipo Pb-ácidas faz parte de um setor em constante crescimento em todo o mundo, uma vez que as baterias deste modelo possuem vantagens como o baixo custo de produção, longa vida útil e altas taxas de reaproveitamento e reciclagem (MAY et al., 2018; LUO et al., 2015). Por conseguinte, a exposição ao Pb permanece sendo um problema importante no âmbito ocupacional, como evidenciado em diversos estudos publicados em diferentes países.

No presente trabalho, a concentração média de Pb-s nos trabalhadores expostos foi de 21 ± 12 µg/dL, valor que se encontra de acordo com a legislação vigente (IBMP = 60 µg/dL), porém é quase dezoito vezes maior que a média encontrada para o grupo não-exposto ocupacionalmente (1,2 ± 1,2 µg/dL). Dados da literatura apontam concentrações ainda maiores em outras populações, como foi demonstrado em pesquisa realizada por Mani e colaboradores (2018) com trabalhadores de fábricas de baterias localizadas na Índia, onde o Pb-s médio foi de 51 ± 23 µg/dL no grupo exposto, enquanto os indivíduos da população geral apresentaram média de 3,1 ± 2,3 µg/dL. Estudos conduzidos na Polônia e em Bangladesh corroboram para um cenário similar, por descreverem concentrações médias de Pb-s de 37 ± 8,9 µg/dL e 65 ± 27 µg/dL, respectivamente, nos funcionários das indústrias (MACHÓN-GRECKA et al., 2018; AHMAD et al., 2014). Não há publicações recentes de estudos brasileiros sobre o tópico, porém é possível citar o trabalho de Conterato e colaboradores (2013), realizado no estado do Rio Grande do Sul, cuja média descrita para Pb-s dos funcionários de indústrias de baterias foi de 50 ± 4,0 µg/dL. Um grupo controle também foi incluído, e apresentou média de 1,5 ± 0,1 µg/dL para Pb-s, valor próximo do encontrado no presente estudo.

O estresse oxidativo é um dos efeitos tóxicos mais relevantes atribuídos ao Pb e a outras substâncias químicas tóxicas, e a análise de parâmetros bioquímicos relacionados a este evento é um método recorrente em estudos toxicológicos de populações expostas a diversos metais, como níquel, cádmio e mercúrio, além do próprio Pb (TSAO et al., 2016; PAN et al., 2017; VACCHI-SUZZI et al., 2017). Neste trabalho, a análise de moléculas e enzimas do sistema antioxidante endógeno revelou diferenças significativas entre as duas populações estudadas. A

concentração média de GSH, assim como a média da atividade enzimática de GPx, se mostraram elevadas na população exposta ao Pb ($p < 0,010$). Por outro lado, o inverso foi observado quanto à enzima CAT, cuja atividade é menor nos trabalhadores das indústrias de baterias.

Tais alterações destes parâmetros, frente a exposições crônicas ao Pb, já foram descritas previamente. O aumento de GPx foi evidenciado em diferentes estudos (ERGURHAN-ILHAN et al., 2008; KASPERCZYK et al., 2012; CONTERATO et al., 2013), assim como a elevação de GSH (GURER-ORHAN et al., 2004; CONTERATO et al. 2013; CHINDE et al., 2014).

Dentre os biomarcadores de estresse oxidativo estudados em populações expostas ao Pb e a outros toxicantes, a GSH é provavelmente o parâmetro utilizado com maior frequência (LOPES et al., 2016). Este tripeptídeo atua reagindo diretamente com as EROs, ou de forma indireta como cofator de reações enzimáticas oxirredutoras, sendo oxidada a GSSG (BIRBEN et al., 2012). A variação das concentrações sanguíneas de GSH não é vista de maneira consistente entre os estudos presentes na literatura, havendo trabalhos que mostram menores concentrações da molécula em indivíduos expostos ao Pb (AHAMED et al., 2011; AGUILAR-DORADO et al., 2014). Em uma abordagem distinta, Dobrakowski e colaboradores (2016) testaram os efeitos da exposição subcrônica ao Pb sobre biomarcadores de oxidação. A média de Pb-s no grupo estudado, prévia à exposição, era de 11 ± 7,7 µg/dL e, após 40 dias de trabalho em uma indústria de fundição, a concentração de Pb-s saltou para 49 ± 14 µg/dL. Concomitantemente, a concentração de GSH, sofreu uma diminuição de 5,6 ± 0,96 mM/g Hb para 4,6 ± 0,51 mM/g Hb ($p < 0,010$), representando uma redução de 16%. No estudo de Conterato e colaboradores (2013), dois grupos de indivíduos expostos foram comparados a um grupo controle. O primeiro grupo, composto por trabalhadores do setor de pigmentos, possuía baixas concentrações de Pb-s (5,4 ± 0,4 µg/dL) e elevação de GSH em relação ao grupo não-exposto. Os trabalhadores do segundo grupo, provenientes de fábricas de baterias, apresentaram altas concentrações de Pb-s (50 ± 4,0 µg/dL) e diminuição de GSH, em comparação ao grupo controle (Pb-s = 1,5 ± 0,1 µg/dL).

Uma possível explicação para tais discrepâncias pode ser baseada nas condições de exposição e concentrações de Pb-s encontradas nos diferentes estudos. A síntese de GSH é sabidamente aumentada como mecanismo regulatório

durante processos de oxidação celular (LOPES et al., 2016). Assim, em indivíduos cujas concentrações de Pb-s são baixas ou moderadas, sobretudo em exposição crônica, como no presente trabalho, é possível observar o aumento relativo da molécula em relação aos controles. No entanto, quando a concentração de Pb é muito elevada, a síntese de GSH se torna incapaz de compensar a oxidação a GSSG, e os níveis de GSH diminuem (SCHAFER; BUETTNER, 2001).

Assim como ocorre com GSH, a relação entre a exposição ao Pb e a alteração na atividade enzimática de GPx é discutível, e também pode depender de diversos fatores intrínsecos e extrínsecos como idade, hábitos alimentares, contato com poluentes atmosféricos, além da exposição a baixos ou elevados níveis de Pb e outros toxicantes (HAN et al, 2005; KASPERCZYK et al., 2009; LOPES et al., 2016). A GPx é uma enzima dependente de selênio (Se) que utiliza a GSH como agente redutor de peróxidos, sendo, portanto, fundamental para o sistema antioxidante endógeno. O Pb pode formar complexos insolúveis com o Se (seleneto de Pb), prejudicando a incorporação do mineral à estrutura da GPx (MATÉS et al., 1999; LOPES et al., 2016). A diminuição da atividade enzimática foi relatada em alguns estudos conduzidos com populações expostas ocupacionalmente ao Pb. No trabalho de Wasowicz e colaboradores (2001), a média da atividade de GPx, no plasma e em eritrócitos, foi menor em trabalhadores de indústrias de baterias automotivas em comparação a indivíduos não-expostos (Pb-s = 50 ± 9,2 µg/dL e 6,2 ± 2,5 µg/dL, respectivamente). O mesmo padrão também foi descrito por Kasperczyk et al. (2009) (Pb-s do grupo exposto = 42 ± 5,6 µg/dL; Pb-s do grupo controle = 7,7 ± 1,7 µg/dL) e Grover et al. (2010) (Pb-s do grupo exposto = 30 ± 2,1 µg/dL; Pb-s do grupo controle = 3,2 ± 2,6 µg/dL), em indivíduos provenientes de diversos setores industriais, sugerindo que a exposição crônica ao Pb poderia causar efeitos negativos sobre a funcionalidade da GPx.

Em contrapartida, o presente trabalho apontou um aumento da atividade de GPx frente à exposição ao Pb, e este resultado é igualmente descrito por outros autores. Em estudo realizado com dois grupos de trabalhadores expostos ao Pb (Pb-s = 43 ± 10 µg/dL e 48 ± 7,1 µg/dL), em diferentes indústrias não especificadas, Kasperczyk e colaboradores (2012) relataram maior atividade da enzima em comparação ao grupo controle não-exposto (Pb-s = 5,7 ± 2,0 µg/dL). O mesmo efeito sobre GPx foi descrito por Ergurhan-Ilhan et al. (2008), em um cenário de baixa exposição ocupacional, em funcionários de uma oficina de reparos automotivos (Pb-

s do grupo exposto = 7,9 ± 5,2 µg/dL; Pb-s do grupo controle = 2,6 ± 2,0 µg/dL). Somando-se a estes estudos, outros autores não encontraram diferenças significativas na atividade enzimática de GPx entre os grupos estudados (GARÇON et al,. 2007; RENDON-RAMIREZ et al., 2014).

Em relação à enzima CAT, os dados são mais consistentes quanto à diminuição da atividade enzimática, como apontado por diversos grupos de pesquisa (GROVER et al., 2010; MALEKIRAD et al., 2010; CHINDE et al., 2014; GHANWAT et al., 2016), o que condiz com os achados deste trabalho. Cabe ressaltar que esta enzima possui um grupamento heme em sua composição, cuja biossíntese é sabidamente prejudicada na presença do Pb (NEHRU; KANWAR, 2004; FLORA et al., 2012). A maior atividade em GPx também poderia ser um fator de contribuição para a regulação negativa de CAT, uma vez que ambas as enzimas atuam sobre os compostos H_2O_2. As regressões multivariadas mostraram associações inversas entre a atividade de CAT e o consumo de álcool, no grupo exposto. De fato, é bem estabelecido que a CAT seja importante na neutralização dos compostos H_2O_2 formados durante o ciclo de biotransformação do álcool (ZAKHARI, 2006; HARRISON-FINDIK; LU; 2015). Presume-se, então, que o consumo moderado, porém frequente, de bebidas alcoólicas esteja envolvido na diminuição da atividade da enzima no sangue, possivelmente devido ao excesso de EROs geradas e à consequente depleção de CAT neste compartimento (DAS; VASUDEVAN; 2005; MIRUNALINI et al., 2010). Em outros tecidos, como fígado, e encéfalo, a atividade de CAT tende a aumentar com o consumo de álcool, como sugerem estudos realizados com animais (DAS; VASUDEVAN; 2005; OJEDA et al., 2012).

A comparação entre grupo exposto e não-exposto não revelou diferença significativa entre as atividades de GST, cujas médias encontradas foram 36 ± 14 µmol/min/mL e 34 ± 14 µmol/min/mL, respectivamente (p = 0,37; regressão multinomial). Contudo, Pb-s foi positivamente associado à enzima nas análises de regressão multivariadas (β = 0,012, $p \leq 0,050$), indicando que o metal tem papel importante na modulação da atividade enzimática no grupo exposto. A superfamília de GSTs é composta por enzimas multifuncionais, localizadas no citoplasma, microssoma e mitocôndrias celulares, cuja principal função é catalisar a conjugação de xenobióticos à GSH, sobretudo metais e substâncias hidrofóbicas, facilitando a eliminação dos mesmos (SALINAS; WONG; 1999; ALLOCATI et al., 2018). O Pb e outros metais, incluindo cádmio e mercúrio, estimulam a expressão de GST em

diferentes tecidos, como fígado, rins e cérebro (WRIGHT et al., 1998; BRAMBILA et al., 2002; CASALINO et al., 2006). A correlação entre Pb-s e o aumento GST já foi descrita em outros estudos envolvendo exposição ocupacional ao Pb (CONTERATO et al., 2013; DOBRAKOWSKI et al., 2016)

Um dos alvos das EROs são os ácidos nucleicos e, por este motivo, os ensaios que avaliam a oxidação de DNA através de 8-OHdG urinária têm sido empregados como ferramentas úteis em estudos de exposição a xenobióticos (CHANG et al., 2011; PRASAD et al., 2013; LI et al., 2014). O interesse crescente na dosagem deste biomarcador se deve à conhecida relação entre a oxidação de DNA e os processos de envelhecimento (SIOMEK et al., 2007; RADAK; BOLDOGH, 2010) e carcinogênese (PYLVÄS et al., 2011; TABUR et al., 2015).

Em 2006, a Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) classificou os compostos de Pb inorgânicos como “provavelmente carcinogênicos para humanos (Grupo 2A)”, o que significa que há evidências limitadas em humanos e evidências suficientes em animais que sugerem o efeito carcinogênico destas substâncias (IARC, 2006). A hidroxilação da guanina, identificada através da dosagem de 8-OHdG, está diretamente relacionada ao desenvolvimento de câncer, além de ser uma das lesões com maior capacidade mutagênica no DNA nuclear (WU et al., 2004; VALKO et al., 2006).

No presente estudo, foram estabelecidas correlações positivas entre 8-OHdG urinária e Pb-s e também Pb-p, indicando um possível efeito de oxidação dos ácidos nucleicos causado pela exposição ao metal (Spearman, r_s = 0,20; r_s = 0,28, respectivamente; $p \leq 0{,}010$). Nas regressões multivariadas, onde outras variáveis foram incluídas como possíveis influências sobre a concentração de 8-OHdG, Pb-p se manteve positivamente associado ao biomarcador de oxidação no grupo exposto ($\beta = 0{,}17$, $p \leq 0{,}050$, vide Tabela 06). Quanto ao grupo não-exposto, a prática de exercícios físicos se mostrou um importante fator para o aumento de 8-OHdG na urina ($p \leq 0{,}050$). Dados presentes na literatura demonstram que as concentrações de 8-OHdG são geralmente mais elevadas em indivíduos praticantes de atividades físicas regulares, principalmente aquelas que requerem maior esforço (PAIK et al., 2009; VILLAÑO et al., 2015). A vantagem, neste caso, seria o aumento da capacidade endógena de reparo do DNA e excisão das bases oxidadas, conferindo maior tolerância contra danos oxidativos em comparação a indivíduos sedentários (SOARES et al., 2015; AGIRBAS, 2019).

Poucos grupos investigaram as concentrações urinárias de 8-OHdG em exposições ocupacionais ao Pb. Kim et al. (2004) relataram um aumento do biomarcador em amostras colhidas de trabalhadores após cinco dias de exposição a material particulado contendo Pb e outros xenobióticos, como níquel e crômio (8-OHdG = 13 ± 1,0 µg/g creat pré-exposição e 15 ± 0,99 µg/g creat pós-exposição; p = 0,020). Já Pawlas et al. (2017) observaram correlação positiva entre 8-OHdG, Pb-s e Pb-p em funcionários de uma indústria de baterias automotivas (8-OHdG do grupo exposto = 4,1 ± 3,7 µg/g creat; Pb-s e Pb-p do grupo exposto = 39 ± 10 µg/dL e 0,15 ± 0,66 µg/dL, respectivamente; 8-OHdG do gupo controle = 2,5 ± 2,9 µg/g creat; Pb-s e Pb-p do grupo controle = 3,0 ± 2,9 µg/dL e 0,080 ± 0,11 µg/dL, respectivamente). Em contrapartida, Malekirad e colaboradores (2010) relatam correlações inversas entre Pb-s e 8-OHdG na urina dos trabalhadores, enquanto outros estudos não encontraram nenhuma correlação entre os dois parâmetros (PAWLAS et al., 2016; GARÇON et al., 2017).

No presente estudo, as concentrações de 8-OHdG foram significativamente maiores no grupo não-exposto ao Pb, apesar das correlações encontradas entre o biomarcador e o metal no sangue e plasma dos trabalhadores. Dentre os possíveis fatores que podem ter contribuído para esta diferença, pode-se citar: estilo de vida (incluso prática de exercícios físicos intensos, consumo de bebidas alcoólicas, tabagismo), dieta, aspectos geográficos (os grupos não pertencem à mesma localidade) e diferença de número amostral.

Em relação aos polimorfismos genéticos analisados, cabe destacar que os alelos polimórficos dos SNPs em *GPx1* (rs11549655) e *GSS* (rs28936396; rs121909307) não foram encontrados nos indivíduos pesquisados neste trabalho. Em relação ao SNP citado para *GPx1*, não existem dados na literatura sobre a frequência do alelo polimórfico na população e, até o momento, não há nenhum estudo publicado que inclua a pesquisa deste polimorfismo. Já os SNPs rs28936396 (c.373C>T; p.Arg125Cys) e rs121909307 (c.491G>A; p.Arg164Gln) em *GSS* estão relacionados à deficiência de glutationa sintetase, uma doença metabólica rara e de caráter recessivo, ligada ao ciclo da GSH, descrita em pouco mais de 70 famílias em todo o mundo e sem dados para a população brasileira (RISTOFF; LARSSON, 2001). A enzima funcional é a responsável por catalisar a ligação do aminoácido glicina à γ-glutamilcisteína e, assim, formar a molécula de GSH. No entanto, na ausência da enzima, a síntese de GSH é prejudicada, ocasionando um desequilíbrio

no estado redox. A interrupção do ciclo resulta em acúmulo de γ-glutamilcisteína, que é então convertida a 5-oxoprolina, um composto capaz de causar acidose metabólica (RISTOFF; LARSSON, 2001; YUDKOFF, 2012; ABKUR et al., 2014). A baixa prevalência da doença pode explicar a ausência do alelo polimórfico no presente estudo.

As análises estatísticas não evidenciaram a influência das variações genéticas sobre as concentrações de Pb, com exceção do SNP em *HFE,* rs1799945 (c.187C>G; p.His63Asp), que se mostrou associado a maiores concentrações de Pb-p. Cabe destacar que esta interação representa uma importante modulação da toxicocinética do metal, visto que a fração plasmática é a porção mais biodisponível dos toxicantes (O'FLAHERTY, 1998; BECKETT et al., 2007). Desta forma, o Pb-p estaria mais suscetível a ser distribuído aos tecidos e causar efeitos adversos.

O polimorfismo *HFE* rs1799945, também citado como H63D em referência à troca do aminoácido histidina pelo aspartato na posição 63 do transcrito, é conhecido por causar uma forma branda da hemocromatose hereditária, doença em que há uma desregulação na absorção de ferro, que ocorre de forma aumentada, e resulta em sobrecarga do metal no organismo (BACON et al., 2011). A hipótese é que a proteína HFE, responsável pela regulação da absorção do ferro, também esteja relacionada à absorção de outros metais, como o Pb. Neste sentido, mutações no gene codificante da proteína também poderiam alterar a captação do metal tóxico pelo organismo (HOPKINS et al., 2008).

A prevalência do alelo variante deste SNP, em nosso estudo, foi compatível com a encontrada por outros autores no Brasil e no exterior (SANTOS et al., 2010; BATSCHAUER et al., 2011; LIAN et al., 2013; SZYMANSKA-CHABOWSKA et al., 2015), porém o impacto do polimorfismo sobre as concentrações de Pb ainda não está muito bem estabelecido. Em determinados estudos, os valores de Pb-s são mais elevados nos indivíduos portadores do alelo variante G, como o que foi descrito por Fan et al. (2014) e Szymanska-Chabowska et al. (2015), que investigaram os efeitos de diversos polimorfismos no gene *HFE* sobre a toxicocinética do Pb em trabalhadores de diferentes setores industriais ligados à utilização do metal (Pb-p não avaliado). Entretanto, o efeito oposto também foi relatado, onde os indivíduos polimórficos apresentaram menores concentrações de Pb-s e Pb na tíbia em comparação aos homozigotos selvagens (WRIGHT et al., 2004). Por outro lado, em nosso estudo, a associação se manteve restrita ao Pb-p, não havendo nenhuma

correlação significativa com Pb-s e Pb-u. Assim, é possível inferir que outros fatores podem modular esta interação, como a presença de outros polimorfismos no gene *HFE* em um mesmo indivíduo e concentração de Pb.

Um dos polimorfismos genéticos mais utilizados em estudos relacionados ao Pb é o que ocorre no gene *ALAD* (rs1800435; c.177G>C, p.Lys59Asn), pesquisado neste trabalho. Já está bem estabelecido que o Pb apresenta grande afinidade com o grupamento -SH da ALAD e, por isso, esta enzima tem sido muito utilizada para monitorar a exposição e os efeitos tóxicos causados pelo Pb, seja em exposições ambientais ou, principalmente, como indicador biológico de exposições ocupacionais (LI et al., 2011). Apesar disso, os trabalhos que relacionaram as variantes alélicas da ALAD a diferenças na toxicocinética do metal apresentaram resultados divergentes. Por exemplo, nos estudos realizados por Süzen et al. (2003) e Wan et al. (2014), com trabalhadores expostos ocupacionalmente ao metal, demonstrou-se que o genótipo *ALAD* 1/1 (homozigoto selvagem GG) se relacionava a maiores concentrações de Pb-s quando comparado a indivíduos portadores do alelo polimórfico (indivíduos *ALAD* 1/2 e *ALAD* 2/2).

Em contrapartida, indivíduos *ALAD* 1/1 apresentaram menores concentrações de Pb-s nos estudos de Gao et al. (2010) e Zheng et al. (2011), também em exposições ocupacionais. Mais recentemente, Kayaalti et al. (2016) pesquisaram as possíveis interações entre esse SNP e as concentrações de Pb na placenta de 97 gestantes expostas de forma ambiental e/ou ocupacional. Os resultados mostraram que a presença do alelo polimórfico estava associada a maiores concentrações de Pb na placenta; neste estudo não se avaliou Pb-s. Entretanto, no presente trabalho, não foram encontradas associações entre o SNP *ALAD* rs1800453 e a cinética do Pb, o que também já foi descrito na literatura (LEROYER et al., 2013; MARTINS et al., 2015).

Assim como ocorre com o *ALAD,* os polimorfismos do gene *VDR* também são frequentemente utilizados em estudos de interações genéticas com o Pb. Da mesma forma, os resultados não são conclusivos. O aumento das concentrações de Pb-s e Pb-tíbia já foi associado à presença dos alelos polimórficos *VDR* rs1544410 (SCHWARTZ et al., 2000; WEAVER et al., 2005; PAWLAS et al., 2015) e *VDR* rs2228570 (PAWLAS et al., 2015). Contudo, estes mesmos polimorfismos já foram relacionados a menores concentrações sanguíneas de Pb (HAYNES et al., 2003; GARCÍA-LESTÓN et al., 2012), além de haver estudos onde nenhuma associação

significativa foi observada, de forma semelhante ao relatado em nosso trabalho (PAWLAS et al., 2014; KAMEL et al., 2003).

Em relação aos demais SNPs incluídos no presente estudo, apenas o que ocorre no gene *GSTP1* (rs1695) já foi descrito como possível modulador da toxicocinética do Pb, em um único trabalho. Khansakorn et al. (2011) encontraram maiores concentrações de Pb-s em indivíduos portadores do alelo polimórfico na população geral da Tailândia, exposta ambientalmente a baixas concentrações do metal. Desta maneira, é evidente que a procura por polimorfismos capazes de alterar a toxicidade e/ou cinética do Pb ainda é um campo de estudo relevante dentro da toxicologia de metais, uma vez que os dados atuais ainda são divergentes para alguns genes e inexistentes para outros.

As análises da influência dos polimorfismos genéticos sobre os biomarcadores de estresse oxidativo indicaram que polimorfismos nos genes *GSTP1, HFE* e *VDR* podem modular a atividade enzimática de GPx e GST, além de influenciar as concentrações sanguíneas de GSH. O SNP rs1695, em *GSTP1,* foi associado à diminuição da atividade de GST, sendo que a redução foi maior nos indivíduos homozigotos para o polimorfismo. Este SNP consiste na troca de uma base adenina por uma guanina no nucleotídeo 313, resultando na troca do aminoácido isoleucina por uma valina na posição 105 da proteína (c.313A>G; p.Ile105Val) (SOYA et al., 2007). Esta substituição ocorre no sítio de ação da enzima, levando a uma diminuição da afinidade com o substrato e consequente redução da atividade enzimática (WATSON et al., 1998; LECOMTE et al., 2006). Em trabalho realizado com indivíduos saudáveis e não expostos ocupacionalmente a xenobióticos, Zhong e colaboradores (2006) encontraram o mesmo padrão de redução da atividade de GST em eritrócitos de indivíduos polimórficos para rs1695. A média da atividade de GST foi 45% menor nos homozigotos polimórficos em comparação com a obtida entre os portadores do genótipo selvagem.

O gene *HFE*, além de ter sido sugerido como modulador das concentrações de Pb-p, foi também associado a GSH e GPx. Entretanto, os SNPs envolvidos nestas correlações são diferentes. Enquanto Pb-p foi associado ao SNP rs1799945, o SNP rs1800562 (c.845G>A; p.Cys282Tyr) se mostrou um possível modulador dos biomarcadores do sistema antioxidante. Este polimorfismo é o responsável por até 85% dos casos de hemocromatose hereditária, sendo muitas vezes referido pela sigla C282Y, que indica a troca do aminoácido cisteína por tirosina na posição 282

da proteína HFE (PREEDY, 2014). No presente trabalho, a presença do alelo polimórfico, em heterozigose, foi associada a valores mais baixos de GSH e a um aumento na atividade de GPx. Poucos estudos publicados investigaram a interação entre esta variante alélica e parâmetros de estresse. Em trabalho realizado com indivíduos diagnosticados com hemocromatose e carreadores tanto da mutação C282Y quanto da H63D, a concentração média de GSH foi menor em comparação com a observada no grupo controle saudável (GAEZNER, et al., 2002). O aumento na atividade de GPx também foi associado aos SNPs C282Y e H63D em estudo de Souza e colaboradores (2015). No mesmo trabalho, a enzima SOD se mostrou igualmente alterada em portadores dos polimorfismos. Todavia, os voluntários de ambos os estudos eram clinicamente afetados pela sobrecarga de ferro, o que deve ser considerado como fator importante para a alteração no sistema antioxidante. Não existem dados descritos que mostrem alterações de biomarcadores de estresse em populações heterozigotas para C282Y, sem manifestação de hemocromatose.

Uma hipótese levantada para a justificativa destes resultados pode ser baseada no fato de que a proteína HFE polimórfica está ligada a uma maior absorção de ferro e outros metais, que são capazes de alterar o equilíbrio do sistema antioxidante endógeno (BACON et al., 2011; PREEDY, 2014). A mutação C282Y (rs1800562) está geralmente associada a quadros mais severos de hemocromatose, por causar maior absorção de ferro do que a mutação H63D (rs1799945); e este pode ser um fator que contribui para a correlação de GSH e GPx com apenas um dos SNPs em *HFE* (BEUTLER, et al., 2002; CROWNOVER; COVEY, 2013). É importante ressaltar a baixa frequência de indivíduos polimórficos para o SNP rs18004562 neste trabalho (4,0% de indivíduos heterozigotos), o que é um fator limitante para conclusões sobre os dados encontrados. Para futuros estudos deste polimorfismo, o aumento no número amostral se faz necessário.

A atividade da enzima GPx ainda foi negativamente correlacionada ao polimorfismo rs2228570 em *VDR*, gene codificante do receptor de vitamina D. Este SNP, também chamado de Fok1, é caracterizado pela troca c.2G>A (p.Met1Thr), originando uma proteína truncada de atividade aumentada com 424 aminoácidos, ao invés dos 427 encontrados na proteína normal, cujas principais funções são a captação da vitamina D para o meio intracelular e a absorção de cálcio no trato gastrointestinal (WHITFIELD et al., 2001; DZIK; KACZOR., 2019). Nenhum trabalho estudou a associação deste polimorfismo com a enzima GPx. Todavia, Soroush e

colaboradores (2017), em um estudo com pacientes diabéticos, demonstraram que o genótipo polimórfico de Fok1 foi associado a menores concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um importante biomarcador de estresse oxidativo. Este resultado corrobora com o que foi encontrado no presente trabalho, visto que a modulação negativa da atividade de GPx sugere que o polimorfismo em *VDR* possa estar associado a alterações no equilíbrio do sistema antioxidante, em uma condição de exposição crônica a um toxicante.

Os resultados apresentados reforçam a importância de se investigar as associações entre variações genéticas e a toxicidade induzida pela exposição ao Pb e a outros xenobióticos.

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente trabalho permitem concluir que os trabalhadores de fábricas de baterias automotivas do tipo Pb-ácidas possuem concentrações sanguíneas, plasmáticas e urinárias de Pb em quantidades significativamente maiores do que indivíduos não-expostos ocupacionalmente ao metal. Ademais, o grupo exposto apresentou alterações em quase todos os biomarcadores de estresse oxidativo avaliados na pesquisa. O parâmetro 8-OHdG urinário, importante biomarcador de oxidação de DNA, foi correlacionado ao Pb-s e Pb-p, indicando possível dano ao material genético causado pela exposição ao metal. Entretanto, este resultado deve ser interpretado com cautela, visto que a concentração média de 8-OHdG se mostrou maior nos indivíduos do grupo não-exposto.

Houve associações entre polimorfismos genéticos e os biomarcadores de Pb e estresse oxidativo. O SNP em *HFE,* rs1799945, foi positivamente associado a Pb-p, o que sugere maiores concentrações plasmáticas do metal em portadores do alelo polimórfico. Outro SNP em *HFE,* rs1800562, se mostrou correlacionado ao aumento de GPx e à diminuição de GSH. A enzima GPx ainda foi modulada por outro SNP, no gene *VDR* (rs2228570), onde o alelo variante foi associado negativamente à atividade enzimática. Ainda, o polimorfismo rs1695, em *GSTP1*, foi negativamente associado à atividade de GST, indo de acordo com dados previamente descritos na literatura e contribuindo para maior entendimento das interações entre as variações genéticas e a toxicidade induzida pelo Pb.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABKUR, T.M. et al. Acetaminophen-induced anion gap metabolic acidosis secondary to 5-oxoproline: a case report. **J Med Case Rep**. v. 8, n. 409; 2014.

ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists). 2012 TLVs® and BEIs®. American Conference of Governmental Industrial Hygienists; Cincinnati, OH: 2012.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Method. Enzymol.** v. 105, p. 121-126; 1984.

AGIRBAS, O. Effects of Different Types Strength Exercises with Thera-Band® on Oxidative Stress and DNA Damage. **Journal of Education and Training Studies.** v. 7, n. 3, doi:10.11114/jets.v7i3.3899; 2019.

AGUILAR-DORADO, I.C.; HERNÁNDEZ, G.; QUINTANAR-ESCORZA, M.A.; MALDONADO-VEGA, M.; ROSAS-FLORES, M.; CALDERÓN-SALINAS, J.V. Eryptosis in lead-exposed workers. **Toxicol Appl Farmacol.** v. 281, n. 2, p. 195–202; 2014.

AHAMED, M.; AKHTAR, M.J.; VERMA, S.; KUMAR, A.; SIDDIQUI, M.K.J. Environmental lead exposure as a risk for childhood aplastic anemia. **Biosci Trends.** v. 5, p. 38–43; 2011.

AHMAD, S.A. et al. Blood lead levels and health problems of lead acid battery workers in Bangladesh. **ScientificWorldJournal**. v. 25, 2014:974104; 2014.

ALLOCATI, N.; MASULLI, M.; DI ILIO, C.; FEDERICI, L. Glutathione transferases: substrates, inihibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. Oncogenesis. v. 7, n. 8. doi: 10.1038/s41389-017-0025-3; 2018.

ANM. Agência Nacional de Mineração. **Sumário Mineral Brasileiro 2017: Chumbo**. Disponível em: <http://www.anm.gov.br/dnpm/publicacoes/serie-estatisticas-e-economia-mineral/sumario-mineral/sumario-brasileiro-mineral-2017/chumbo_sm_2017>. Acesso em 20/05/2019.

AMM. Associação Médica Mundial. **Declaração de Helsinki**. 59ª Assembleia Geral, Seul. Associação Médica Mundial; 2008.

ASIMAKOPOULOS, A.G. et al. Urinary biomarkers of exposure to 57 xenobiotics and its association with oxidative stress in a population in Jeddah, Saudi Arabia. **Environ Res.** v. 150, p. 573-581; 2016.

ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological profile for lead: draft for public comment**. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 2019.

BACON, B.R. et al. Diagnosis and management of hemochromatosis: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**. v. 54, p. 328-343; 2011.

BAIRD, C. Metais pesados tóxicos. In: **Química Ambiental** 2ª. ed. São Paulo: Bookman: 403-439, 2002.

BANNON, D.I.; et al. Uptake of lead and iron by divalent metal transporter 1 in yeast and mammalian cells. Biochem. Biophys. **Res. Commun**. v. 298, p. 978–984; 2002.

BATISTA, B.L. et.al. Exploiting dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) for sequential determination of trace elements in blood using a dilute-and-shoot procedure. **Anal. Chim. Acta.** v. 639, p.13-18; 2009a.

BATISTA, B.L. et al. Reference concentrations for trace elements in urine for the Brazilian population based on q-ICP-MS with a simple dilute-and-shoot procedure. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 20, p. 1406-1413; 2009b.

BATSCHAUER, A.P. et al. HFE, MTHFR, and FGFR4 genes polymorphisms and breast cancer in Brazilian women. **Mol Cell Biochem**. v. 357, n. 1-2, p. 247-253; 2011.

BECKETT, W.S.; NORDBERG, G.F.; CLARKSON, T.W. Routes of exposure, dose, and metabolism of metals. In: NORDBERG, G.F.; FOWLER, B.; NORDBERG, M.; FRIBERG, L.T. (Eds) **Handbook on the toxicology of metals**,. 3ª ed. pp. 39-64. Academic Press: San Diego. 2007.

BERGDAHL, I.A. et al. Lead binding to delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) in human erythrocytes. **Pharmacol Toxicol**. v. 81, n. 4, p. 153-158; 1997.

BEUTLER, E.; FELITTI, V.J.; KOZIOL, J.A.; HO, N.J.; GELBART, T. Penetrance of 845G--> A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA. **Lancet**. v. 359, n. 9302, p. 211-218; 2002.

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

BRAMBILA, E.; LIU, J.; MORGAN, D.L.; BELILES, R.P.; WAALKES, M.P. Effect of mercury vapor exposure on metallothionein and glutathione s-transferase gene expression in the kidney of nonpregnant, pregnant, and neonatal rats. **J Toxicol Environ Health A**. v. 65, n. 17, p. 1273-1288; 2002.

BRASIL. LEI Nº 11.762 DE 1º DE AGOSTO DE 2008. Brasília, 2008. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11762.htm>. Acesso em 10/05/2019.

BRASIL. PORTARIA N.º 24, DE 29 DE DEZEMBRO DE 1994. Brasília, 1994. Disponível em: < http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/st/st13.pdf>. Acesso em 11/05/2019.

BRASIL. PORTARIA Nº 3.214, DE 08 DE JUNHO DE 1978. Brasília, 1978. Disponível em: < http://www.camara.gov.br/sileg/integras/839945.pdf>. Acesso em 11/05/2019.

BRONNER, F. Bone and calcium homeostasis. **Neurotoxicol.** v. 13, p. 775-782; 1992.

CASALINO, E.; SBLANO, C.; CALZARETTI, G.; LANDRISCINA, C. Acute cadmium intoxication induces alpha-class glutathione S-transferase protein synthesis and enzyme activity in rat liver. **Toxicology**. v. 217, n. 2-3, p. 240-245; 2006.

CASTRO, B.H.R.; BARROS, D.C.; VEIGA, S.G. Baterias automotivas: panorama da indústria no Brasil, as novas tecnologias e como os veículos elétricos podem transformar o mercado global. **BNDES Setorial Automotivo**. n. 37, p. 443-496; 2013.

CHANG, F.K.; MAO, I.F.; CHEN, M.L.; CHENG, S.F. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in workers exposed to ethylbenzene. **Ann Occup Hyg**. v. 55, n. 5, p.519-525; 2011.

CHEN, X. et al. Interactive Influence of N6AMT1 and As3MT Genetic Variations on Arsenic Metabolism in the Population of Inner Mongolia, China. **Toxicol Sci**. v. 155, p. 124-134; 2017.

CHIELLE, E.O.; FORTUNA, P.C.; MAZIERO, J.S. Association between the glutathione S-transferase P1 (GSTP1) Ile105Val gene polymorphism in obese and overweight patients over 60 years. **J Bras Patol Med Lab.** v. 52, n. 4, p. 211-216; 2016.

CHINDE, S. et al. Assessment of genotoxic effects of lead in occupationally exposed workers. **Environ Sci Pollut Res Int**. v. 21, n. 19, p.11469-11480; 2014.

COLLINS, F.S.; MCKUSICK, V.A. Implications of the human genome project for medical science. **JAMA**.v. 285, p. 540-544; 2001.

CONTERATO, G.M. et al. Blood thioredoxin reductase activity, oxidative stress and hematological parameters in painters and battery workers: relationship with lead and cadmium levels in blood. **J Appl Toxicol**. v. 33, n. 2, p. 142-50; 2013.

COOKE, M.S.; OLINSKI, R.; EVANS, M.D. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? **Clin Chim Acta.** v. 365, n. 1-2, p.30-49; 2006.

CORDEIRO, R.; LIMA-FILHO, E.C. A inadequação dos valores dos limites de tolerância biológica para a prevenção da intoxicação profissional pelo chumbo no Brasil. **Cad. de Saude Publica.** v. 11, p. 177-186; 1995.

CROWNOVER, B.K.; COVEY, C.J. Hereditary Hemochromatosis. **Am Fam Physician**. v. 87, n. 3, p. 183-190; 2013.

DAIGER, S.P.; SULLIVAN, L.S.; BOWNE, S.J. Genetic Mechanisms of Retinal Disease. Retina, **Genetics.** v.1, p. 624–634; 2013.

DAS, S.K.; VASUDEVAN, D.M. Effect of ethanol in liver antioxidant defense systems. A dose dependent study. **Indian J Clin Biochem**. v. 20, p. 80-84; 2005.

DAS, N.; GIRI, A.; CHAKRABORTY, S.; BHATTACHARJEE, P. Association of single nucleotide polymorphism with arsenic-induced skin lesions and genetic damage in exposed population of West Bengal, India. **Mutat Res**. v. 809, p. 50-56; 2016.

dbSNP. **Single Nucleotide Polymorphism Database**. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>. Acesso em 20/05/2019.

DE CAPITANI, E.M.; PAOLIELLO, M.M.B; DE ALMEIDA, G.R.C. Fontes de exposição humana a chumbo no Brasil. **Medicina.** v. 42, p. 311-318; 2009.

DENG, X. et al. GSTP1 and GSTO1 single nucleotide polymorphisms and the response of bladder cancer patients to intravesical chemotherapy. **Sci Rep**. v. 5:14000, doi: 10.1038/srep14000; 2015.

DOBRAKOWSKI, M. et al. Glutathione, glutathione-related enzymes, and oxidative stress in individuals with subacute occupational exposure to lead. **Environ Toxicol Pharmacol**. v. 45, p. 235–240; 2016.

DOUKALI, H. et al. Oxidative stress and GSTs genetic polymorphisms in medical staff professionally exposed to ionizing radiation. **Int J Radiat Biol**. v. 93, n. 7, p. 697-704; 2017.

DOUMOUCHTSIS, K.K.; DOUMOUCHTSIS, S.K.; DOUMOUCHTSIS, E.K.; PERREA, D.N. The effect of lead intoxication on endocrine functions. **J Endocrinol Invest.** v. 32, n. 2, p. 175-183; 2009.

DZIK, K.P.; KACZOR, J.J. Mechanisms of vitamin D on skeletal muscle function: oxidative stress, energy metabolism and anabolic state. **Eur J Appl Physiol**. v. 119, n. 4, p. 825-839; 2019.

ELLMAN, G.L. **Tissue sulfhydryl groups. Arch Biochem Biophys.** v. 82, n. 1, p. 70-7; 1959.

EMSLEY, J. **Nature's Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements**. 2ª ed., p. 286. Oxford: Oxford University Press. 2011.

ENGSTRÖM, K. et al. Polymorphisms in ATP-binding cassette transporters associated with maternal methylmercury disposition and infant neurodevelopment in mother-infant pairs in the Seychelles Child Development Study. **Environ Int**. v. 94, p. 224-229; 2016.

ENGSTRÖM, K.S. et al. Evaluation of the impact of genetic polymorphisms in glutathione-related genes on the association between methylmercury or n-3

polyunsaturated long chain fatty acids and risk of myocardial infarction: a case-control study. **Environ. Health.** v. 19, p. 10-33; 2011.

ERGURHAN-ILHAN, I.; CADIR, B.; KOYUNCU-ARSLAN, M.; ARSLAN, C.; GULTEPE, F.M.; OZKAN, G. Level of oxidative stress and damage in erythrocytes in apprentices indirectly exposed to lead. **Pediatr Int.** v. 50, p. 45-50; 2008.

FAN, G. et al. The effect of the hemochromatosis (HFE) genotype on lead load and iron metabolism among lead smelter workers. **PlosOne**. v. 9, n. 7:e101537; 2014.

FERNANDES, K.C. et al. Polymorphism of metallothionein 2A modifies lead body burden in workers chronically exposed to the metal. **Public Health Genomics**. v. 19, p. 47-52; 2016.

FLORA, G.; GUPTA, D.; TIWARI, A. Toxicity of lead: a review with recent updates. **Interdiscip. Toxicol.** v. 5, p. 47–58; 2012.

FLORA, S.J.S. et al. Environmental occurrence, health effects and management of lead poisoning. In: José SC, José S (Eds). **Lead**. Elsevier Science: Amsterdam. pp. 158-228, 2006.

FLORA, S.J.S.; PACHAURI, V.; SAXENA, G. Arsenic, cadmium and lead. In: GUPTA, R.C. (ed). **Reproductive and developmental toxicology.** v. 33, pp. 415–438. Academic: New York, 2011.

GAEZNER, H. et al. Association Between Increased Iron Stores and Impaired Endothelial Function in Patients With Hereditary Hemochromatosis. v. 40, n. 2, p. 2189-2194; 2002.

GAO, A.; LU, X.T.; LI, Q.Y.; TIAN, L. Effect of the delta-aminolevulinic acid dehydratase gene polymorphism on renal and neurobehavioral function in workers exposed to lead in China. **Sci Total Environ**. v. 408, p. 4052–4055; 2010.

GARÇON, G. et al. Biomonitoring of the adverse effects induced by the chronic exposure to lead and cadmium on kidney function: Usefulness of alpha-glutathione S -transferase. **Sci Total Environ.** v. 377, p. 165–172; 2007.

GHANWAT, G.H.; PATIL, A.J.; PATIL, J.A.; KSHIRSAGAR, M.S.; SONTAKKE, A.; AYACHIT, R.K. Biochemical effects of lead exposure on oxidative stress and

antioxidant status of battery manufacturing workers of Western Maharashtra, India. **J Basic Clin Pharmacol**. v. 27, n. 2, p. 141-146 (2016).

GODWIN, H.A. The biological chemistry of lead. **Curr Opin Chem Biol**. v. 5, p. 223-227; 2001.

GONICK, H.C. Lead-Binding Proteins: A Review. **J Toxicol**. v. 2011, e:686050; 2011.

GOYER, R.A.; CLARKSON, T.W. **Toxic effects of metals**. In: KLAASEN, C.D. (Ed.), Casarett and Doullis Toxicology: The Basic Science of Poisons. 6th ed., pp. 811-867. New York: Mc-Graw-Hil. 2001.

GRAU-PEREZ, M. et al. Urine cadmium levels and albuminuria in a general population from Spain: A gene-environment interaction analysis. **Environ Int**. v. 106, p. 27-36; 2017.

GROVER, P.; REKHADEVI, P.V.; DANADEVI, K.; VUYYURI, S.B.; MAHBOOB, M.; RAHMAN, M.F. Genotoxicity evaluation in workers occupationally exposed to lead**.** **Int J Hyg Environ Health**. v. 213, p. 99–106; 2010.

GUNDACKER, C.; GENCIK, M., HENGSTSCHLÄGER M. The relevance of the individual genetic background for the toxicokinetics of two significant neurodevelopmental toxicants: mercury and lead. **Mutat. Res.** 705: 130-140; 2010.

GURER, H. SABIR, H.U.; OZGÜNEŞ, H. Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. **Toxicology.** v. 195, p. 147-154; 2004.

GURER-ORHAN, H.; SABIR, H.U.; OZGUNES, H. Correlation between clinical biomarkers of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. **Toxicology.** v. 195, p. 147–154; 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radical in Biology and Medicine**. Clarendon Press: Oxford. p. 86–123, 1989.

HAN, S.G.; KIM, Y.; KASHON, M.L.; PACK, D.L.; CASTRANOVA, V.; VALLYATHAN, V.Correlates of oxidative stress and free-radical activity in serum from asymptomatic shipyard welders. **Am J Respir Crit Care Med**. v. 172, p. 1541–1548; 2005.

HARRISON-FINDIK, D.D.; LU, S. The effect of alcohol and hydrogen peroxide on liver hepcidin gene expression in mice lacking antioxidant enzymes, glutathione peroxidase-1 or catalase. **Biomolecules.** v. 5, n. 2,p. 793-807; 2015.

HAYNES, E.N. et al. Vitamin D receptor Fok1 polymorphism and blood lead concentration in children. **Environ Health Perspect.** v. 111, n. 13, p.1665-1669; 2003.

HIPKINS, K.L. et al. Medical surveillance of the lead exposed worker. Current Guidelines. **AAOHN** 46: 330-339; 1998.

HONG, Z.; TIAN, C.; ZHANG, X. GPX1 gene Pro200Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, and cancer risk. **Mol Biol Rep**. v. 40, n. 2, p. 1801-1812; 2013.

HOPKINS, M. et al.,. Variants in iron metabolism genes predict higher blood lead levels in young children. **Environ. Health Perspect**. v. 116, p. 1261–1266; 2008.

IARC. International Agency for Research on Cancer. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Inorganic and Organic Lead Compounds**. World Health Organization, v. 87. 2006.

JABLONSKA, E. et al. Association between GPx1 Pro198Leu polymorphism, GPx1 activity and plasma selenium concentration in humans. **Eur J Nutr**. v. 48, n. 6, p. 383-386; 2009.

JABLONSKA, E. et al. Lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity relationship in breast cancer depends on functional polymorphism of GPX1. **BMC Cancer**. v. 15:657, doi: 10.1186/s12885-015-1680-4; 2015.

JACOBS, D.E.; CLICKNER, R.P.; ZHOU, J.Y.; VIET, S.M.; MARKER, D.A.; ROGERS, J.W.; ZELDIN, D.C.; BROENE, P.; FRIEDMAN, W. The prevalence of lead-based paint hazards in U.S. housing. **Environ Health Perspect.** v. 110, n. 110, p. 599-606; 2002.

JANGID, A.P.; JOHN, P.J.; YADAV, D.; MISHRA, S.; SHARMA, P. Impact of chronic lead exposure on selected biological markers. **Indian J Clin Biochem**. v. 27, p. 83–89; 2012.

JHUN, M.A. et al. Effect modification by vitamin D receptor genetic polymorphisms in the association between cumulative lead exposure and pulse pressure: a longitudinal study. **Environ Health**. v. 14, p. 1-9; 2015.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology.** v. 283, p. 65-87; 2011.

KAMEL, F. et al. Amyotrophic lateral sclerosis, lead, and genetic susceptibility: polymorphisms in the delta-aminolevulinic acid dehydratase and vitamin D receptor genes. **Environ Health Perspect.** v. 111, n. 10, p. 1335-1339; 2003.

KASPERCZYK S. et al. The role of the antioxidant enzymes in erythrocytes in the development of arterial hypertension among humans exposed to lead. **Biol Trace Elem Res** v. 130, p. 95–106; 2009.

KASPERCZYK, A.; MACHNIK, G.; DOBRAKOWSKI, M.; SYPNIEWSKI, D.; BIRKNER, E.; KASPERCZYK, S. Gene expression and activity of antioxidant enzymes in the blood cells of workers who were occupationally exposed to lead. **Toxicology.** v. 301, p. 79–84; 2012.

KAYAALTI, Z. et al. The potential effect of metallothionein 2A -5A/G single nucleotide polymorphism on blood cadmium, lead, zinc and copper levels. **Toxicol Appl Pharmacol.** v. 256, p. 1-7; 2011.

KAYAALTI, Z.; KAYA-AKYÜZLÜ, D.; SÖYLEMEZ, E.; SÖYLEMEZOĞLU, T. Maternal hemochromatosis gene H63D single-nucleotide polymorphism and lead levels of placental tissue, maternal and umbilical cord blood. **Environ Res**. v. 140, p. 456-461; 2015.

KAYAALTI, Z.; SERT, S.; KAYA-AKYÜZLÜ, D.; SÖYLEMEZ, E.; SÖYLEMEZOĞLU T. Association between delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism and placental lead levels. **Environ Toxicol Pharmacol**. v. 41, p. 147-151; 2016.

KHANSAKORN, N. et al. Impact of GSTM1, GSTT1, GSTP1 polymorphism and environmental lead exposure on oxidative stress biomarkers. **Sci. Res. Essays.** v. 6, n. 31, p. 6540-6547; 2011.

KIM, J.Y.; MUKHERJEE, S.; NGO, L.C.; CHRISTIANI, D.C. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in workers exposed to fine particulates. **Environ Health Perspect**. v. 112, n. 6, p. 666-671; 2004.

KIM, K.N.; LEE, M.R.; LIM, Y.H.; HONG, Y.C. Blood lead levels, iron metabolism gene polymorphisms and homocysteine: a gene-environment interaction study. **Occup Environ Med**. v. 74, n. 12, p. 899-904; 2017.

KRESOVICH, J.K.; ARGOS, M.; TURYK, M.E. Associations of lead and cadmium with sex hormones in adult males. **Environ Res**. v. 142, p. 25-33; 2015.

LAAFI, J. et al. Pro-oxidant effect of ALA is implicated in mitochondrial dysfunction of HepG2 cells. **Biochimie**. v. 106, p. 157-166; 2014.

LAYER, G.; REICHELT, J.; JAHN, D.; HEINZ, D.W. Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. **Protein Sci.** v. 19, n. 6, p. 1137-1161; 2010.

LECOMTE, T.; LANDI, B.; BEAUNE, P.; LAURENT-PUIG, P.; LORIOT, M.A. Glutathione S-Transferase P1 Polymorphism (Ile105Val) Predicts Cumulative Neuropathy in Patients Receiving Oxaliplatin-Based Chemotherapy. **Clin Cancer Res**. v. 12, n. 10, p. 3050-3056; 2006.

LEROYER, A.; LELEU, B.; DEHON, B.; FRIMAT, P.; BROLY, F.; NISSE, C. Influence of delta-aminolevulinic acid dehydratase gene polymorphism on selected lead exposure biomarkers in a cohort of ex-smelter workers. **J Toxicol Environ Health A**. v. 76, n. 15, p. 895-906; 2013.

LI C, et al. Lead exposure suppressed ALAD transcription by increasing methylation level of the promoter CpG islands. **Toxicol. Lett**. v. 30, p. 48-53; 2011.

LI, P.; GU, Y.; YU, S.; LI, Y.; YANG, J.; JIA, G. Assessing the suitability of 8-OHdG and micronuclei as genotoxic biomarkers in chromate-exposed workers: a cross-sectional study. **BMJ Open**. v. 4, n. 10:e005979; 2014.

LIAN, J. et al. Meta-analyses of HFE variants in coronary heart disease. **Gene.** v. 527, p. 167-173; 2013.
LIDSKY, T.I.; SCHNEIDER, J.S. Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates. **Brain**. v. 126, p. 5-19; 2003.

LIU, J.; GOYER, R.A. Toxic effects of metals. In: KLASSEN, C.D. **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons.** McGraw-Hill: 1309, 2010.

LOPES, A.A.; PEIXE, T.S.; MESAS, A.E.; PAOLIELLO, M.M.B. Lead Exposure and Oxidative Stress: A Systematic Review. **Rev Environ Contam T**. v. 236, p. 193–238; 2016.

LOPES, A.A.; SILBERGELD, E.K.; NAVAS-ACIEN, A.; ZAMOISKI, R.; MARTINS, A.D.C. JR.; CAMARGO, A.E.I.; URBANO, M.R.; MESAS, A.E.; PAOLIELLO, M.M.B. Association between blood lead and blood pressure: a population-based study in Brazilian adults. **Environ Health**. p. 16-27; 2017.

LOVEI, M. **Phasing out Lead from gasoline: worldwide experiences and policy implications**. pp. 15-19. Washington: World Bank Technical Paper. 1998.

LUO, X.; WANG, J.; DOONER, M.; CLARKE, J. Overview of current development in electrical energy storage technologies and the application potential in power system operation. **J. App. Energy.** v. 137, p. 511-536; 2015.

MACHOŃ-GRECKA, A.; DOBRAKOWSKI, M.; KASPERCZYK, A.; BIRKNER, E.; KORZONEK-SZLACHETA, I.; KASPERCZYK, S. The association between occupational lead exposure and serum levels of selected soluble receptors. **Toxicol Ind Health**. v. 34, n. 8, p. 555–562; 2018.

MALEKIRAD, A.A. et al. Study on clinical and biochemical toxicity biomarkers in a zinc-lead mine workers. **Toxicol Ind Health.** v. 26, n. 6, p. 331-337; 2010.

MANI, M.S.; KUNNATHULLY, V.; RAO, C.; KABEKKODU, S.P.; JOSHI, M. B.; D'SOUZA, H. S. Modifying effects of δ -Aminolevulinate dehydratase polymorphism on blood lead levels and ALAD activity. **Toxicol Lett.** v. 295, p.351–356; 2018.

MANNERVIK, B. The isozymes of Glutatione Transferase. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.** v. 57, p. 357-417; 1985.

MANOCHA, A.; SRIVASTAVA, L.M.; BHARGAVA, S. Lead as a Risk Factor for Osteoporosis in Post-menopausal Women. **Indian J Clin Biochem**. v.32, n. 3, p. 261-265; 2017.

MANTON, W.I. et al. Release of lead from bone in pregnancy and lactation. **Environ. Res.** v. 92, p. 139–15; 2003.

MARTINS JR., A.C. et al. Effects of lead exposure and genetic polymorphisms on ALAD and GPx activities in brazilian battery workers. **Toxicol Environ Health A**. v. 78, n. 16, p. 1073-1081; 2015.

MASON, L.H.; HARP, J.P.; HAN, D.Y. Pb Neurotoxicity: Neuropsychological Effects of Lead Toxicity. **Biomed. Res. Int**. v. 2014, p. 1-8; 2014.

MATÉS, J.; PEREZ-GOMEZ, C.; NUNEZ DE CASTRO, I. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin Biochem.** v. 32, p. 595–603; 1999.

MAY, G. J.; DAVIDSON, A.; MONAHOV, B. Lead batteries for utility energy storage: A review. **J. Energy Storage**. v. 15, p. 145–157; 2018.

MENDOLA, P.; BRETT, K.; DIBARI, J.N.; POLLACK, A.Z.; TANDON, R.; SHENASSA, E.D. Menopause and lead body burden among US women aged 45-55, NHANES 1999-2010. **Environ Res**. v. 121, p. 110-113; 2013.

MENEZES FILHO, J.A.; CARVALHO, W.A.; SPINOLA, A.G. Avaliação da exposição ocupacional ao chumbo em uma metalúrgica um estudo transversal. **Rev. bras. saúde ocup.** v. 28, n. 105-106, p. 63-72; 2003.

MINOZZO, R.; MINOZZO, E.L; DEIMLING, L.I.; SANTOS-MELLO, R. Plumbemia em trabalhadores da indústria de reciclagem de baterias automotivas da Grande Porto Alegre, RS. **J Bras Patol Med Lab**. v. 44, n. 6, p. 407-412; 2008.

MIRUNALINI, S.; ARULMOZHI, V.; ARULMOZHI, T. Curative Effect of Garlic on Alcoholic Liver Diseased Patients. **Jordan J Biol Sci**. v. 3, n. 4, p. 147-152; 2010.

MITRA, P.; SHARMA, S.; PUROHIT, P.; SHARMA, P. Clinical and molecular aspects of lead toxicity: An update. **Crit Rev Clin Lab Sci**. v. 54, n. 7-8, p. 506–528; 2017.

MOREIRA, F.R.; MOREIRA, J.C.A. Cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. **Ciência e Saúde Coletiva** v. 1, p. 167-181; 2004.

MORO, A.M. et al. Effects of low-level exposure to xenobiotics present in paints on oxidative stress in workers. **Sci Total Environ**. v. 408, n. 20, p. 4461-4467; 2010.

MUNTNER, P.; HE, J.; VUPPUTURI, S.; CORESH, J.; BATUMAN, V. Blood lead and chronic kidney disease in the general United States population: results from NHANES III. **Kidney Int.** v. 63, n. 3, pp. 1044-1050; 2003.

MUSHAK, P. **Lead and Public Health: Science, risk and regulation**. v. 10, pp. 73-90. Oxford: Elsevier, 2011.

NAVAS-ACIEN, A.; GUALLAR, E.; SILBERGELD, E.K.; ROTHENBERG, S.J. Lead exposure and cardiovascular disease--a systematic review. **Environ Health Perspect.** v. 115, n. 3, p. 472-482; 2007.

NEHRU, B.; KANWAR, S.S. N-acetylcysteine exposure on lead-induced lipid peroxidative damage and oxidative defense system in brain regions of rats. **Biol Trace Elem Res**. v. 101, p. 257–264; 2004.
NIE, X. et al. Lead and cadmium exposure, higher thyroid antibodies and thyroid dysfunction in Chinese women. **Environ Pollut**. v. 230, p. 320-328; 2017.

NIOSH. National Institute for Occupational Safety and Health**. Immediately Dangerous To Life or Health (IDLH) Values.** NIOSH, 2017. Disponível em: < https://www.cdc.gov/niosh/idlh/intridl4.html>. Acesso em 11/05/2019.

NTP. National Toxicology Program: **NTP Monograph on health effects of low-level lead**. 2012.

O'FLAHERTY, E.J. Physiologically based models of metal kinetics. **Crit Rev Toxicol**. v. 28, p. 271–317; 1998.

OJEDA, M.L.; BARRERO, M.J.; NOGALES, F.; MURILLO, M.L.; CARRERAS, O. Oxidative effects of chronic ethanol consumption on the functions of heart and kidney: folic acid supplementation. **Alcohol Alcohol.** v. 47, n. 4, p. 404-412; 2012.

OLINSKI, R. et al. Urinary measurement of 8-OxodG, 8-OxoGua, and 5HMUra: a noninvasive assessment of oxidative damage to DNA. **Antioxid. Redox Signal.** v. 8, p. 1011-1019; 2006.

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Childhood lead poisoning**. WHO, Geneva. 2010.

ONALAJA, A.O.; CLAUDIO, L. Genetic susceptibility to lead poisoning. **Environ Health Perspect.** v. 108 Suppl 1, p. 23-28; 2000.

ONUKI, J.; TEIXEIRA, P.C.; MEDEIROS, M.H.G.; DI MASCIO, P. Danos ao DNA promovidos por ácido 5-aminolevulínico: possível associação com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em portadores de porfiria aguda Intermitente. **Quim. Nova**. v. 25, n. 4, p. 594-608; 2002.

OSHA. Occupational Safety and Health Administration. **Toxic and Hazardous Substances: Occupational safety and health standards**. Washington, DC: OSHA, Code of Federal Regulations. 29 CFR 1910.1025. Disponível em <https://www.osha.gov/pls/oshaweb/owadisp.show_document?p_table=STANDARDS&p_id=10030>. Acesso em 20/05/2019.

PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J. Lab. Clin. Med.** v. 70, p. 158-169; 1967.

PAIK, I.Y. et al. Effects of the NADPH oxidase p22phox C242T polymorphism on endurance exercise performance and oxidative DNA damage in response to aerobic exercise training. **Molecules and cells**, v. 27, n. 5, p. 557-562; 2009.

PAN, J. et al. Zinc protects against cadmium-induced toxicity by regulating oxidative stress, ions homeostasis and protein synthesis. **Chemosphere**. v. 188, p. 265-273; 2017.

PANT, N.; KUMAR, G.; UPADHYAY, A.D.; GUPTA, Y.K.; CHATURVEDI, P.K. Correlation between lead and cadmium concentration and semen quality. **Andrologia**. v. 47, n. 8, p. 887-891; 2015.

PAOLIELLO, M.M.B.; DE CAPITANI ,E.M. **Chumbo**. In: Metais: gerenciamento da toxicidade. São Paulo, Atheneu: 353-398, 2003.

PATRICK, L. Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. **Altern. Med. Rev.** v. 11, p. 114–127; 2006.

PAWLAS, N.; BROBERG, K.; SKERFVING, S.; PAWLAS, K. Disturbance of posture in children with very low lead exposure, and modification by VDR FokI genotype. **Ann Agric Environ Med**. v. 21, n. 4, p. 739-744; 2014.

PAWLAS, N. et al. Genetic modification of ALAD and VDR on lead-induced impairment of hearing in children. **Environ Toxicol Pharmacol**. v. 39, n. 3, p. 1091-1098; 2015.

PAWLAS, N. et al. Telomere length, telomerase expression, and oxidative stress in lead smelters. **Toxicol Ind Health**. v. 32, n. 12, p. 1961–1970; 2016.

PAWLAS, N. et al. Oxidative damage of DNA in subjects occupationally exposed to lead. **Adv Clin Exp Med**. v. 26, n. 6, p. 939-945; 2017.

PEARCE, J.M. Burton's line in lead poisoning. **Eur. Neurol.** v. 57, p. 118–119; 2007.
PISCHIK ,E.; KAUPPINEN, R. Potential role of oxidative damage in neurological manifestations of acute intermittent porphyria. In: GADOTH, N.; GOEBEL, H.H. (Eds.). **Oxidative Stress and Free Radical Damage in Neurology**. pp. 293-322. New York: Humana Press; 2011.

POLIMANTI, R. et al. Genetic variability of glutathione S-transferase enzymes in human populations: functional inter-ethnic differences in detoxification systems. **Gene.** v. 512, p. 102-107; 2013.

POLIMANTI, R.; PIACENTINI, S.; FUCIARELLI, M. HapMap-based study of human soluble glutathione S-transferase enzymes: the role of natural selection in shaping the single nucleotide polymorphism diversity of xenobiotic-metabolizing genes. **Pharmacogenet. Genomics.** v. 21, p. 665-672; 2011.

PRASAD, S.B. et al. Association of gene polymorphism in detoxification enzymes and urinary 8-OHdG levels in traffic policemen exposed to vehicular exhaust. **Inhal Toxicol**. v. 25, p. 1-8; 2013.

PREEDY, V. Diabetes: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants. San Diego, CA, USA: **Academic Press**; 2014.

PYLVÄS, M.; PUISTOLA, U.; LAATIO, L.; KAUPPILA, S.; KARIHTALA, P. Elevated serum 8-OHdG is associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer. **Anticancer Res**. v. 31, n. 4, p.1411-1415; 2011.

RADAK, Z.; BOLDOGH, I. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine: links to gene expression, aging, and defense against oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med**. v. 49, p. 587–596; 2010.

RAMANATHAN, R.; KING-AHMAD, A.J.; HOLLIMAN, C.L.; RODRIGUES, A.D. A highly selective and sensitive LC-MS/HRMS assay for quantifying coproporphyrins as organic anion-transporting peptide biomarkers. **Bioanalysis**. v. 9, n. 22, p. 1787-1806; 2017.

RAVN-HAREN, G. et al. Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. **Carcinogenesis**. v. 27, n. 4, p. 820-825; 2006.

RENDON-RAMIREZ, A.L., et al. Effect of vitamin E and C supplementation on oxidative damage and total antioxidant capacity in lead-exposed workers. **Environ Toxicol Pharmacol.** v. 37, p. 45–54; 2014.

RENTSCHLER, G. et al. Cadmium concentrations in human blood and urine are associated with polymorphisms in zinc transporter genes. **Metallomics**. v. 6, n. 4, p. 885-891; 2014.

REUTER, M.A. et al.. The Metrics of Material and Metal Ecology: Harmonizing the Resource, Technology and Environmental Cycles (Developments in Mineral Processing). pp. 127-129. Hong Kong: Elsevier, 2005.

REZENDE, V.B. et al. Haplotypes of vitamin D receptor modulate the circulating levels of lead in exposed subjects. **Arch Toxicol.** v. 82, p. 29-36; 2008.

REZENDE, V.B. et al. Vitamin D receptor haplotypes affect lead levels during pregnancy. **Sci Total Environ**. v. 408, n. 21, p. 4955-4960; 2010.

RISTOFF, E.; LARSSON, A. Disorders of the gamma-glutamyl cycle. In: BLAU, N. et al. **Physician's Guide to the Treatment and Follow-Up of Metabolic Diseases.** Springer Science & Business Media; 2005.

ROBINSON, P.K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays Biochem**. v. 59, p. 1–41; 2015.

ROCHA, E.D.; SARKIS, J.E.S.; CARVALHO, M.F.H.; SANTOS, G.V.; CANESSO, C. Occupational exposure to airborne lead in Brazilian police officers. **Int J Hyg Environ Health**. v. 217, n. 6, p. 702–704;2014.

ROSENMAN, K.D.; SIMS, A.; LUO, Z.; GARDINER, J. Occurrence of lead-related symptoms below the current Occupational Safety and Health Act allowable blood lead levels. **J Occup Environ Med**. v. 45, n. 5, p. 546-555; 2003.

SALEH, H.A.; EL-AZIZ, G.A.; EL-FARK, M.M.; EL-GOHARY, M. Effect of maternal lead exposure on craniofacial ossification in rat fetuses and the role of antioxidant therapy. **Anat Histol Embryol**. v. 38, n. 5, p. 392-399; 2009.

SALINAS, A.E.; WONG, M.G. Glutathione S-transferases: a review. **Curr Med Chem**. v. 6, n. 4, p. 279-309; 1999.

SANDERS, T.; LIU, Y.; BUCHNER, V.; TCHOUNWOU, P.B. Neurotoxic Effects and Biomarkers of Lead Exposure: A Review. **Rev Environ Health.** v. 24, p. 15-45; 2009.
SANTOS, P.C.J.L. et al. HFE gene mutations and iron status of Brazilian blood donors. **Braz J Med Biol Res**. v. 43, p. 107-114; 2010.

SANTOS, C.R.; DA SILVA, C.S.; NASCIMENTO, E.S. Assessment of exposure to cadmium, lead, manganese, and nickel in workers from foundries. **Toxicol Ind Health**. v. 32, n. 10, p. 1784–1790; 2016.

SARYAN, L.A.; ZENZ, C. Lead and its compounds. In: ZENZ, O.C. et al. (Eds). **Occupational medicine**. 3ª ed. Mosby-Year Book: St. Louis. pp. 506–541, 1994.

SCHAFER, F.Q.; BUETTNER, G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfi de/glutathione couple. **Free Radic Biol Med.** v. 30, n. 11, p. 1191–1212; 2001.

SCHNAAS, L. et al. Reduced intellectual development in children with prenatal lead exposure. **Environ. Health Perspect.** v. 114, p. 791-799; 2006.

SCHWARTZ, B.S. et al. Associations of blood lead, dimercaptosuccinic acid-chelatable lead, and tibia lead with polymorphisms in the vitamin D receptor and [delta]-aminolevulinic acid dehydratase genes. **Environ Health Perspect**. v. 108, n. 10, p. 949-954; 2000.

SHARMA, P.; PUROHIT, P. Lead exposure exacerbates cardiovascular risk. **Indian J Clin Biochem**. v. 29, n. 2, p. 117-118; 2014.

SIOMEK, A. et al. Higher leukocyte 8-oxo-7, 8-dihydro-2′-deoxyguanosine and lower plasma ascorbate in aging humans. **Antioxid. Redox Signal**. v. 9, p.143–150; 2007.

SOARES, J.P.; SILVA, A,M.; OLIVEIRA, M.M.; PEIXOTO, F.; GAIVÃO, I.; MOTA, M.P. Effects of combined physical exercise training on DNA damage and repair capacity: role of oxidative stress changes. **Age (Dordr)**. v. 37, n. 3:9799; 2015.

SOROUSH, N. Vitamin D receptor gene FokI variant in diabetic foot ulcer and its relation with oxidative stress. **Gene**. v. 599, p. 87-91; 2017.

SOYA, S.S.; VINOD, T.; REDDY, K.S.; GOPALAKRISHNAN, S.; ADITHAN, C. Genetic polymorphisms of glutathione-S-transferase genes (GSTM1, GSTT1 and GSTP1) and upper aerodigestive tract cancer risk among smokers, tobacco chewers and alcoholics in an Indian population. **Eur J Cancer**. v. 43, p. 2698-2706; 2007.

SUGAWARA, E. et al. Lipid peroxidation and concentration of glutathione in erythrocytes from workers exposed to lead. **Br. J. Ind. Med.** v. 48, p. 239-42; 1991.
SZYMAŃSKA-CHABOWSKA, A. et al. The relationship between selected VDR, HFE and ALAD gene polymorphisms and several basic toxicological parameters among persons occupationally exposed to lead. **Toxicology**. v. 334, p. 12-21; 2015.

TABUR, S.; AKSOY, Ş.N.; KORKMAZ, H.; OZKAYA, M.; AKSOY, N.; AKARSU, E. Investigation of the role of 8-OHdG and oxidative stress in papillary thyroid carcinoma. **Tumour Biol**. v. 36, n. 4, p. 2667-267; 2015.

TAYLOR, C.M.; GOLDING, J.; EMOND, A.M. Adverse effects of maternal lead levels on birth outcomes in the ALSPAC study: a prospective birth cohort study. **BJOG**. v. 122, n. 3, p. 322-328; 2015.

TCHOUNWOU, P.B.; YEDJOU, C.G.; PATLOLLA, A.K.; SUTTON, D.J. Heavy metal toxicity and the environment. **EXS**. v. 101, p. 133-164; 2012.

TSAO, Y. C.; GU, P. W.; LIU, S. H.; TZENG, I. S.; CHEN, J. Y.; LUO, J. C. J. Nickel exposure and plasma levels of biomarkers for assessing oxidative stress in nickel electroplating workers. **Biomarkers**, v. 22, n. 5, p. 455–460; 2016.

USMAN, M. On Consistency and Limitation of Independent t-test Kolmogorov Smirnov Test and Mann Whitney U test. **J. Math.** v. 12, n. 4, p. 22-27; 2016.

VACCHI-SUZZI, C.; VIENS, L.; HARRINGTON, J.M.; LEVINE, K.; KARIMI, R.; MELIKER, J.R. Low levels of lead and glutathione markers of redox status in human blood. **Environ Geochem Health**. doi: 10.1007/s10653-017-0034-3 [Epub]. 2017.

VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, T.; FIOTAKIS, C. 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. **J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.** v. 27, n. 2, p. 120-139; 2009.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M.T. Metals, toxicity and oxidative stress. **Curr. Med. Chem.** v. 12, p. 1161-1208; 2005.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact**. v. 160, p. 1-40; 2006.

VILLAÑO, D. et al. Effect of elite physical exercise by triathletes on seven catabolites of DNA oxidation. **Free Radic Res**. v. 49, n. 8, p.:973-983; 2015.

WAN, H.; WU, J.; SUN, P.; YANG, Y. Investigation of delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism affecting hematopoietic, hepatic and renal toxicity from lead in Han subjects of southwestern China. **Acta Physiologica Hungarica**. v. 101, p. 59–66; 2014.

WANI, A.L.; ARA, A.; USMANI, J.A. Lead toxicity: a review**. Interdiscip Toxicol**. v. 8, n. 2, p. 55–64; 2015.

WARRINGTON, N.M. et al. Genome-wide association study of blood lead shows multiple associations near ALAD. **Hum Mol Genet**. v. 24, n. 13, p. 3871-3879; 2015.

WASOWICZ, W.; GROMADZIŃSKA, J.; RYDZYŃSKI, K. Blood concentration of essential trace elements and heavy metals in workers exposed to lead and cadmium. **Int J Occup Environ Health.** v. 14, n. 3, p. 223–229; 2001.

WATSON, M.A.; STEWART, R.K.; SMITH, G.B.; MASSEY, T.E.; BELL, D.A; Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. **Carcinogenesis**. v. 19, p. 275 - 280; 1998.

WEAVER, V.M. et al. Associations of Uric Acid with Polymorphisms in the δ-Aminolevulinic Acid Dehydratase, Vitamin D Receptor, and Nitric Oxide Synthase Genes in Korean Lead Workers. **Environ Health Perspect.** v. 113, n. 11, p. 1509–1515; 2005.

WEAVER, V.M.; JAAR, B.G.; SCHWARTZ, B.S.; TODD, A.C.; AHN, K.D.; LEE, S.S.; WEN, J.; PARSONS, P.J.; LEE, B.K. Associations among lead dose biomarkers, uric acid, and renal function in Korean lead workers. **Environ Health Perspect**. v. 113, p. 36-42; 2005.

WHITFIELD, J.B. et al. Evidence of genetic effects on blood lead concentration. **Environ. Health Perspect.** v. 115, p. 1224–1230; 2007.

WHITFIELD, J.B. et al. Genetic effects on toxic and essential elements in humans: arsenic, cadmium, copper, lead, mercury, selenium, and zinc in erythrocytes. **Environ. Health Perspect.** v. 118, p. 776-782; 2010.

WHITFIELD, G.K. et al. Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. **Mol Cell Endocrinol**. v. 177, n. 1–2, p. 145–159; 2001.

WRIGHT, L.S.; KORNGUTH, S.E.; OBERLEY, T.D.; SIEGEL, F.L. Effects of lead on glutathione S-transferase expression in rat kidney: a dose-response study. **Toxicol Sci**. v. 46, n. 2, p. 254-259; 1998.

WRIGHT, R.O. et al. Association between hemochromatosis genotype and lead exposure among elderly men: the normative aging study. **Environ Health Perspect**. v. 112, n. 6, p. 746–750; 2004.

WU, L.L.; CHIOU, C.C.; CHANG, P.Y.; WU, J.T. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. **Clin Chim Acta**. v. 339, n. 1-2, p.1-9; 2004.

WU, Y.; LIU, Y.; NI, N.; BAO, B.; ZHANG, C.; LU, L. High lead exposure is associated with telomere length shortening in Chinese battery manufacturing plant workers. **Occup Environ Med.** v. 69, n 8, p. 557-563; 2012.

YUDKOFF, M. Disorders of Amino Acid Metabolism. In: BRADY, S et al. (Eds). Basic neurochemistry: Principles of molecular, cellular and medical neurobiology. 8th Ed. Academic Press; 2012.

ZAKHARI, S. Overview: How Is Alcohol Metabolized by the Body? **Alcohol Res. Health.** v. 29, p. 245–255; 2006.

ZHENG, G. et al. δ-Aminolevulinic acid dehydratase genotype predicts toxic effects of lead on workers' peripheral nervous system. **Neurotoxicology**. v. 32, n. 4, p. 374-382; 2011.

ZHONG, S.L. et al. Relationship between genotype and enzyme activity of glutathione S-transferases M1 and P1 in Chinese. **Eur J Pharm Sci**. v. 28, p. 77-85; 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Questionário aplicado aos participantes da pesquisa

Questionário

"Integração de ferramentas ômicas para o estudo de modelos multivariados nas interações gene-ambiente em população expostas a metais tóxicos''

Nome:_____ no. cadastro_____

Data de Nascimento:____/____/____ Idade:_____ Etnia (raça): _____

Sexo: ( ) Feminino ( )Masculino Peso: _____ kg Altura: _____ m

Pressão arterial: _____ mm Hg

Escolaridade (até quando estudou?): _____

Função ocupacional nesta empresa: _____

Quanto tempo exerce esta função? _____

Tempo de trabalho nesta empresa: _____

Trabalhou anteriormente em algum outro trabalho envolvendo chumbo?
( )Não ( )Sim Por quanto tempo?_____

Quais os equipamentos de proteção individual você usa diariamente?
_____

Costuma lavar as mãos antes das refeições, nos dias de trabalho? ( ) não ( ) sim

É fumante? ( ) não ( ) sim: quantos cigarros por dia? _____Há quanto tempo fuma?_____

Já fumou? ( ) não ( ) sim: quantos cigarros por dia? _____ Há quanto tempo parou de fumar?_____

SE FUMANTE:

Fuma durante o expediente? ( )Não ( )Sim

Há local específico para fumar na empresa? ( )Não ( )Sim

Lava as mãos antes de fumar? ( )Não ( )Sim

Bebe? ( ) Não ( ) Sim Quantas doses por dia?_____

Consome leite e outros derivados do leite (iogurte, queijos etc)?
( ) não ( )1-2 x por semana ( ) 3-4 x por semana ( ) mais de 5 x por semanas

Consome frutas e legumes (considere 2 porções por dia)?
( ) não ( )1-2 x por semana ( ) 3-4 x por semana ( ) mais de 5 x por semanas

Consome carne vermelha?
( ) não ( )1-2 x por semana ( ) 3-4 x por semana ( ) mais de 5 x por semanas

Consome carne de frango?
( ) não ( )1-2 x por semana ( ) 3-4 x por semana ( ) mais de 5 x por semanas

Consome peixes e frutos do mar?
( ) não ( )1-2 x por semana ( ) 3-4 x por semana ( ) mais de 5 x por semanas

Possui algum problema de saúde?
( ) diabetes ( ) hipertensão ( ) dor crônica ( ) outros: _____

Possui dores de cabeça frequentes? ( )Não ( )Sim

Você considera sua memória: ( ) péssima ( ) ruim ( ) boa ( ) excelente

Teve casos de câncer na família? ( ) não ( ) sim: qual tipo? _____ Parentesco: _____

Possui parentes (1º. e 2º. grau) com hipertensão? ( ) não ( ) sim: parentesco: _____

Toma polivitamínicos (como Centrum etc)? ( ) não ( ) sim: qual? _____

Faz uso de medicamentos? ( ) não ( ) sim: qual(is)? _____

Faz atividades físicas? ( ) não ( ) sim: qual (is)? _____

SE MULHER:

Toma anticoncepcional? ( ) não ( ) sim: qual e a quanto tempo? _____

Toma suplemento de cálcio ou vitamina D? ( ) não ( ) sim: qual e a quanto tempo? _____

Já esteve grávida? ( ) não ( ) sim: quantas vezes? _____

Já abortou alguma vez? ( ) não ( ) sim: quantas vezes? _____

Está na menopausa? ( ) não ( ) sim: há quanto tempo? _____

ANEXOS

ANEXO A – Resumo de projeto de pesquisa vinculado ao presente trabalho

Projeto de Pesquisa – Jovem Pesquisador FAPESP

Processo 2013/06033-8

Vigência: 01/01/2015 a 31/12/2018

"Integração de ferramentas ômicas para o estudo de modelos multivariados nas interações gene-ambiente em população expostas a metais tóxicos"

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Gustavo Rafael Mazzaron Barcelos

Instituição Sede: Instituto de Saúde e Sociedade, Universidade Federal de São Paulo – Baixada Santista

Resumo

Há uma grande variação nas concentrações dos biomarcadores de exposição, efeito e susceptibilidade associados à exposição a metais tóxicos, apesar de níveis semelhantes de exposição e isto é hipoteticamente relacionado à modulação gênica nos processos de cinética e dinâmica destes metais. Entretanto, muito pouco se sabe a respeito da modulação gênica sobre o metabolismo e toxicidade induzida pela exposição ao chumbo (Pb) e suas diversas interfaces. Sendo assim, o presente projeto tem por objetivo avaliar as interações genoma-metal em indivíduos expostos. Para tal, concentrações do metal serão determinadas em sangue, plasma e urina por espectrometria de massas (ICP-MS) e determinações de diversos parâmetros bioquímicos relacionados à toxicidade do metal também serão conduzidas. Avaliação dos polimorfismos, expressão gênica e padrões de metilação das regiões promotoras de genes associados à cinética e dinâmica do metal serão realizados a fim de avaliar os possíveis efeitos da modulação gênica sobre as concentrações e toxicidade induzida pelo metal, através de estudos de modelos multivariados. Sendo assim, espera-se que os resultados obtidos auxiliem para uma melhor compreensão das interações entre o metal e estas variantes genéticas, uma linha de pesquisa ainda incipiente no país, porém muito promissora denominada de "interações genoma-ambiente".

Palavras-chave: ferramentas ômicas, interações genoma-ambiente, metais tóxicos, metabolismo, modelos dinâmicos.

ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 007/2018
kms

Ribeirão Preto, 27 de abril de 2018.

Aos pesquisadores
Dr. Gustavo Rafael Mazzaron Barcelos - UNIFESP e
Willian Robert Gomes – FCFRP/USP

Prezados Pesquisadores,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP analisou e aprovou, em 20/12/2017, a solicitação de emenda ao projeto de pesquisa intitulado "INTEGRAÇÃO DE FERRAMENTAS ÔMICAS PARA O ESTUDO DE MODELOS MULTIVARIADOS NAS INTERAÇÕES GENE-AMBIENTE EM POPULAÇÃO EXPOSTAS A METAIS TÓXICOS" (CAAE: 14890713.0.0000.5403), para inclusão do projeto de Mestrado intitulado "**Avaliação do impacto de polimorfismos genéticos associados ao metabolismo do chumbo (Pb) sobre as concentrações do metal no sangue, plasma e urina em trabalhadores expostos**", sob responsabilidade do pesquisador **Willian Robert Gomes,** conforme parecer consubstanciado nº 2.450.389.

Lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP/FCFRP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

PROFª. DRª. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO
Coordenadora do CEP/FCFRP

Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP
Comitê de Ética em Pesquisa – cep@fcfrp.usp.br
Fone: (16) 3315-4213 ou 3315-4216 – Fax: (16) 3315-4892

ANEXO C – Aprovação de emenda pelo Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 008/2019
kms

Ribeirão Preto, 24 de maio de 2019.

Aos pesquisadores
Dr. Gustavo Rafael Mazzaron Barcelos - UNIFESP e
Willian Robert Gomes – FCFRP/USP

Prezados Pesquisadores,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP analisou e aprovou, em sua 185º reunião ordinária, realizada em 20/03/2019, a emenda ao protocolo de pesquisa intitulado "INTEGRAÇÃO DE FERRAMENTAS ÔMICAS PARA O ESTUDO DE MODELOS MULTIVARIADOS NAS INTERAÇÕES GENE-AMBIENTE EM POPULAÇÃO EXPOSTAS A METAIS TÓXICOS" (CAAE: 14890713.0.0000.5403), para, dentre outros assuntos, a alteração do título do projeto de Mestrado intitulado "Avaliação do impacto de polimorfismos genéticos associados ao metabolismo do chumbo (Pb) sobre as concentrações do metal no sangue, plasma e urina em trabalhadores expostos" para **"Exposição ocupacional ao chumbo (Pb): efeitos sobre o estado redox celular e a influência de polimorfismos genéticos sobre a toxicocinética do metal",** sob responsabilidade do pesquisador **Willian Robert Gomes,** conforme Parecer Consubstanciado nº 3.209.783.

Lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP/FCFRP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

PROFª. DRª. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO
Coordenadora do CEP/FCFRP

Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP
Comitê de Ética em Pesquisa – cep@fcfrp.usp.br
Fone: (16) 3315-4213 ou 3315-4216 – Fax: (16) 3315-4892