

**Joana Ferreira da Silva Roma Torres**

**Exposição profissional ao Chumbo.  
Análise da indução de efeitos genotóxicos**

**Tese de Doutoramento em Saúde Pública na especialidade de  
Saúde Ambiental e Ocupacional**

Lisboa, 2011

Escola Nacional de Saúde Pública, Universidade Nova de Lisboa

# **Joana Ferreira da Silva Roma Torres**

**Tese de candidatura ao grau de Doutor em Saúde Pública na  
especialidade de Saúde Ambiental e Ocupacional pela Escola Nacional  
de Saúde Pública da Universidade Nova de Lisboa.**

## **Orientação:**

Professor Doutor João Manuel Machado Prista e Silva  
Professor Associado  
Escola Nacional de Saúde Pública da Universidade de Lisboa

## **Comissão tutorial:**

Professor Doutor João Manuel Machado Prista e Silva  
Professor Associado  
Escola Nacional de Saúde Pública da Universidade de Lisboa

Professor Doutor António Neves Pires Souva Uva  
Professor Catedrático  
Escola Nacional de Saúde Pública da Universidade de Lisboa

## **AGRADECIMENTOS**

Num momento tão marcante para mim como é a conclusão desta tese, não posso deixar de prestar homenagem a todos aqueles que tiveram parte determinante no sucesso desta travessia. Foram muitos e, todos, elementos muito importantes na minha vida nestes últimos anos.

Devo salientar o Professor Doutor João Prista pela sua disponibilidade e pela orientação douda e hábil assim como pela grande capacidade de me incentivar com conselhos e palavras de apoio quando eu mais deles precisei; e a Professora Doutora Olga Mayan por motivos semelhantes, ao longo de um percurso profissional de cerca de 10 anos na área da Toxicologia Ambiental em que me impulsionou a avançar para este doutoramento.

Um agradecimento também muito especial à Dra. Manuela Abreu e à Dra. Teresa Dias, Especialistas em Medicina do Trabalho da SO – Intervenção em Saúde Ocupacional –, bem como aos trabalhadores envolvidos nas colheitas de sangue, por terem tornado as mesmas não apenas possíveis como também uma experiência proveitosa e agradável, sem a participação dos quais a boa persecução deste trabalho teria ficado comprometida.

A muito outros, amigos e colegas, agradeço a disponibilidade, os conhecimentos que me souberam transmitir, o tempo que tantas vezes me dispensaram e a simpatia incansável com que atenderam aos meus “chamados”. Neste sentido, um obrigado muito especial: ao Professor Doutor Luís Cunha e ao Professor Doutor Patrício Costa; à Professora Doutora Carla Nunes; aos colegas de laboratório e de anos de trabalho no INSA; à Arminda Vilares; à Dra. Blanca Laffon e à Dra. Júlia Lestón.

A algumas pessoas próximas devo agradecer o incentivo e a força de que tantas vezes precisei em momentos difíceis que pontuaram este percurso. Entre eles: meus pais, minha irmã, Alexandrina Vale, Ana Barata, Ana Macedo, Andrea Begonha, Celeste Tomé, Elsa Rocha, Filipe Areia, Maria João Amorim, Mená, Miguel Ferreira da Silva, Natália Ferreira, Neusa Oliveira, Paula Neves, Raquel Barbosa, Susana Leite, Susana Viegas, Tuxa S. Silva e outros amigos especiais a quem a lembrança me possa estar a falhar no momento em que escrevo...

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (PDCT/SAU-OBS/59821/2004) e por uma Bolsa do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (BIC 02/2003-I).

## INDICE GERAL

<b>INDICE GERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>INDICE DE TABELAS</b> .....	<b>4</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>5</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>7</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>10</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>13</b>
<b>RESUMÉ</b> .....	<b>16</b>
<b>NOTA PRÉVIA</b> .....	<b>19</b>
<b>I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>20</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>2. EXPOSIÇÃO HUMANA AO CHUMBO</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1. PROPRIEDADES DO CHUMBO</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2. UTILIZAÇÃO E EXPOSIÇÃO A CHUMBO</b> .....	<b>24</b>
<b>2.3. TOXICIDADE</b> .....	<b>31</b>
<b>2.4. TOXICOCINÉTICA</b> .....	<b>32</b>
2.4.1. ABSORÇÃO PELO ORGANISMO .....	32
2.4.2. DISTRIBUIÇÃO E FIXAÇÃO NO ORGANISMO .....	34
2.4.3. BIOTRANSFORMAÇÃO E ELIMINAÇÃO DO ORGANISMO .....	35
<b>2.5. TOXICODINÂMICA</b> .....	<b>37</b>
2.5.1. INTERACÇÃO COM DOMÍNIOS DE LIGAÇÃO A METAIS BIVALENTES .....	39
2.5.2. INTERACÇÃO COM DOMÍNIOS RICOS EM RESÍDUOS DE CISTEÍNA .....	39
2.5.3. INTERACÇÕES COM MECANISMOS DEPENDENTES DO CÁLCIO .....	44
<i>INTERACÇÃO COM PROTEÍNAS</i> .....	44
<i>INTERACÇÃO COM CANAIS DE CÁLCIO</i> .....	47
2.5.5. PRODUÇÃO DE RADICAIS LIVRES .....	48
2.5.6. EFEITOS EM CADEIA .....	49
<b>2.6. EFEITOS PARA A SAÚDE HUMANA</b> .....	<b>50</b>
2.6.1. ÓRGÃOS E SISTEMAS .....	51
2.6.2. CARCINOGENESE E GENOTOXICIDADE .....	56
<b>2.7. DIFERENÇAS DE SUSCEPTIBILIDADE</b> .....	<b>72</b>
2.7.1. POLIMORFISMOS GENÉTICOS .....	72
2.7.2. OUTRAS “SUSCEPTIBILIDADES” .....	73

<b>3. VIGILÂNCIA DA SAÚDE .....</b>	<b>75</b>
<b>3.1. INDICADORES DE EXPOSIÇÃO A CHUMBO.....</b>	<b>79</b>
<b>3.2. BIOMARCADORES DE DOSE INTERNA .....</b>	<b>79</b>
3.2.1. CONCENTRAÇÃO DE CHUMBO NO SANGUE (PLUMBÉMIA) .....	79
3.2.2. CONCENTRAÇÃO DE CHUMBO NO PLASMA.....	80
3.2.3. CHUMBO EXCRETADO NA URINA (PLUMBÚRIA) .....	81
3.2.4. CONTEÚDO DE CHUMBO ÓSSEO .....	82
3.2.5. CONCENTRAÇÃO DE CHUMBO NOUTROS TECIDOS.....	82
<b>3.3. BIOMARCADORES DE EFEITO.....</b>	<b>83</b>
3.3.1. ACTIVIDADE ERITROCITÁRIA DA ALAD .....	83
3.3.2. PROTOPORFIRINA ERITROCITÁRIA (LIVRE OU LIGADA AO ZINCO).....	84
3.3.2. DETERMINAÇÃO URINÁRIA DE ALA (ALA-U) E COPROPORFIRINA III (COPRO-U).....	85
3.3.4. ACTIVIDADE DA PIRIMIDINA 5'-NUCLEOTIDASE (P5N) .....	85
<b>3.4. BIOMARCADORES DE SUSCEPTIBILIDADE .....</b>	<b>86</b>
3.4.1. POLIMORFISMOS GENÉTICOS (BIOMARCADORES DE SUSCEPTIBILIDADE).....	86
3.4.1.1. Polimorfismos do gene ALAD.....	86
3.4.1.2. Polimorfismos do gene VDR.....	88
3.4.1.3. Polimorfismos do gene da Hemocromatose.....	89
<b>3.5. VALORES DE REFERÊNCIA.....</b>	<b>91</b>
<b>II. ESTUDO PRESENTE .....</b>	<b>93</b>
<b>1. OBJECTIVO DO ESTUDO .....</b>	<b>93</b>
<b>2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>94</b>
<b>2. 1. AMOSTRA DE ESTUDO .....</b>	<b>94</b>
<b>2.2. COLHEITA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....</b>	<b>95</b>
<b>2.3. ENSAIOS ANALÍTICOS .....</b>	<b>96</b>
2.3.1. DOSEAMENTO DE CHUMBO NO SANGUE POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA ELECTROTÉRMICA .....	96
2.3.2. DOSEAMENTO DA PROTOPORFIRINA-ZINCO (PPZ) .....	98
2.3.3. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DA ENZIMA DESIDRATASE DO ÁCIDO $\delta$ -AMINOLEVULÍNICO (ACTALAD) .....	99
2.3.4. TESTE DO COMETA OU ELECTROFORESE EM MICROGEL (SCGE) .....	100
2.3.5. ENSAIO DE MUTAÇÃO NO RECEPTOR DO ANTIGÉNIO DE LINFÓCITOS T (TCR) POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	103
2.3.6. DETERMINAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS .....	107
2.3.6.1. GENÓTIPO DA ALAD .....	108

---

2.3.6.2. Genótipo do receptor da vitamina D (VDR) .....	109
<b>2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>110</b>
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>113</b>
<b>3.1. CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA EM ESTUDO.....</b>	<b>113</b>
3.1.1. CARACTERÍSTICAS ETÁRIAS .....	113
3.1.2. HÁBITOS TABÁGICOS .....	115
3.1.3. TEMPO DE EXPOSIÇÃO .....	116
3.1.4. EXPOSIÇÃO A CHUMBO .....	116
3.1.5. CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS .....	119
3.1.6. ESTUDO DE NORMALIDADE .....	120
<b>3.2. ANÁLISE DOS RESULTADOS.....</b>	<b>121</b>
3.2.1. PROTOPORFIRINA-ZINCO (PPZ) .....	121
3.2.2. ACTIVIDADE DA ENZIMA DESIDRATASE DO ÁCIDO $\delta$ -AMINOLEVULÍNICO (ACTALAD).....	124
3.2.3. ENSAIO DO COMETA OU ELECTROFORESE EM MICROGEL (SCGE) .....	126
3.2.4. ENSAIO DE MUTAÇÃO NO RECEPTOR DO ANTIGÉNIO DE LINFÓCITOS T (TCR-MF) .....	129
<b>3.3. EFEITOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES (IDADE, HÁBITOS TABÁGICOS E TEMPO DE EXPOSIÇÃO) NOS PARÂMETROS ESTUDADOS.....</b>	<b>131</b>
3.3.1. PLUMBÉMIA (PB-S).....	131
3.3.2. PROTOPORFIRINA-ZINCO (PPZ) .....	137
3.3.3. ACTIVIDADE DA ENZIMA DESIDRATASE DO ÁCIDO $\delta$ -AMINOLEVULÍNICO (ACTALAD).....	139
3.3.4. ENSAIO DO COMETA OU ELECTROFORESE EM MICROGEL (SCGE) .....	143
3.3.5. ENSAIO DE MUTAÇÃO NO RECEPTOR DO ANTIGÉNIO DE LINFÓCITOS T (TCR-MF) .....	145
<b>3.4. APLICAÇÃO DO MODELO DE REGRESSÃO LINEAR MÚLTIPLA (MRLM).....</b>	<b>148</b>
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>151</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>170</b>
<b>III. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>172</b>
<b>IV. ANEXOS.....</b>	<b>192</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>192</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>196</b>

**INDICE DE TABELAS**

TABELA 1 – Produção de chumbo refinado e consumo total mundial entre 2003 e 2008 .....	28
TABELA 2 – Efeitos observáveis da exposição a chumbo e valores de Pb-S relacionados .....	55
TABELA 3 – Resultados de estudos de genotoxicidade em populações expostas em contexto ocupacional (desde 1997): frequência de micronúcleos (MN), trocas de cromátides irmãs (SCE), aberrações cromossômicas (AC) e Comet assay (SCGE). .....	64
TABELA 4 – Programa de forno utilizado no método de análise em EAA. ....	97
TABELA 5 – Características etárias da amostra. ....	113
TABELA 6 – Hábitos tabágicos da amostra em função da origem dos indivíduos. ....	115
TABELA 7 – Características etárias dos grupos criados com base no tempo de exposição.....	116
TABELA 8 – Caracterização da exposição a chumbo em função da origem dos indivíduos da amostra. .	117
TABELA 9 – Tempo de exposição profissional ao chumbo da amostra estudada.....	119
TABELA 10 – Valores médios de protoporfirina zinco (PPZ) nos intervalos de plumbémia. ....	122
TABELA 11 – Efeito da plumbémia na actividade da ALAD. ....	125
TABELA 12 – Efeito da plumbémia nos parâmetros do Teste do Cometa.....	128
TABELA 13 – Efeito da plumbémia na frequência de mutação do receptor do antigénio de linfócitos T130	
TABELA 14 – Efeito da idade nos valores de plumbémia, Pb-S. ....	132
TABELA 15 – Efeito dos hábitos tabágicos nos valores de plumbémia, Pb-S. ....	133
TABELA 16 – Efeito do tempo de exposição nos valores de plumbémia, Pb-S.....	135
TABELA 17 – Efeito do tempo de exposição nos valores de protoporfirina zinco, PPZ.....	137
TABELA 18 – Efeito da idade na actividade da enzima ALAD. ....	140
TABELA 19 – Efeito do tempo de exposição na actividade da enzima ALAD.....	141
TABELA 20 – Efeito da idade nos parâmetros do Teste do Cometa .....	143
TABELA 21 – Efeito do tempo de exposição nos valores dos parâmetros do Teste do Cometa .....	144
TABELA 22 – Efeito da idade na frequência de mutação do receptor do antigénio de linfócitos T.....	146
TABELA 23 – Efeito do tempo de exposição nos valores de TCR–mf .....	147
TABELA 24 – Quadro de operacionalização das variáveis usadas no MRLM.....	149
TABELA 25 – Valores para os modelos de regressão linear múltipla. ....	150

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – Representação esquemática da toxicocinética do chumbo no organismo humano. ....	36
FIGURA 2 – Estrutura química da cisteína. ....	40
FIGURA 3 – Representação da ligação de coordenação do chumbo a grupos sulfidrilo (estrutura piramidal).....	41
FIGURA 4 – Efeitos do chumbo na biossíntese do grupo heme. ....	42
FIGURA 5 – Representação simbólica do domínio EF-hand. As hélices são representadas pelos dedos (indicador e polegar) de uma mão direita .....	45
FIGURA 6 – Estrutura química das moléculas ALA e GABA. ....	50
FIGURA 7 – Tratamento de imagem de uma célula com ADN intacto (a) e de uma célula com ADN danificado (b) através do programa Leica QWIN Comet. As circunferências indicam a área da cabeça e as linhas horizontais o comprimento da cauda (ADN danificado). ....	102
FIGURA 8 – Histograma de células normais do sangue periférico, obtido em função da presença de CD <sub>45</sub> lida no detector SSC.....	104
FIGURA 9 – Gráfico da fluorescência FL1 (CD3-FITC) versus a fluorescência FL2 (CD4-PE) realçando a janela CD3-CD4+ onde estarão situados os mutantes TCR $\alpha\beta$ .....	107
FIGURA 10 – Exemplo de um gel de agarose a 2 % submetido a uma voltagem de 70V durante 1 hora. As amostras pertencem a indivíduos homozigóticos ALAD1-1 (2, 3, 4, 5, 6), heterozigóticos ALAD1-2 (1 e 7) e homozigóticos ALAD-2 (8). Foram utilizados dois marcadores com diferentes pesos moleculares (M1 e M2). ....	109
FIGURA 11 – Distribuição da amostra por faixas etárias.....	114
FIGURA 12 – Distribuição de fumadores e não fumadores em função da origem dos indivíduos da amostra.....	115
FIGURA 13 – Distribuição da amostra por intervalos de plumbémia. ....	118
FIGURA 14 – Efeito dos polimorfismos de VDR na plumbémia. ....	120
FIGURA 15 – Variação dos valores de protoporfirina zinco (PPZ) com os valores de plumbémia. ....	121
FIGURA 16 – Efeito dos valores de plumbémia nos valores de PPZ.....	123
FIGURA 17 – Distribuição dos valores de actividade de ALAD e sua linha de tendência. ....	124
FIGURA 18 – Efeito da plumbémia na actividade da ALAD. ....	125
FIGURA 19 – Exemplo de observação de dois cometas: o primeiro com dano genético (comprimento da cauda e percentagem de ADN na cauda) e o segundo com a cabeça intacta, sem dano genético. ....	126
FIGURA 20 – Variação dos valores do momento da cauda do cometa com a plumbémia e respectiva linha de tendência. ....	127
FIGURA 21 – Variação dos valores do comprimento da cauda do cometa com a plumbémia e respectiva linha de tendência. ....	127
FIGURA 22 – Variação dos valores de frequência de mutação do receptor do antígeno de linfócitos T (TCR) com linha de tendência. ....	129
FIGURA 23 – Efeito da plumbémia na frequência de mutação do receptor do antígeno de linfócitos T (TCR). ....	130



FIGURA 24 – Variação dos valores de plumbémias, Pb-S, com a idade e respectiva linha de tendência. 131

FIGURA 25 – Efeito da idade no valor de plumbémia, Pb-S. .... 133

FIGURA 26 – Distribuição dos valores de plumbémia, Pb-S, em função dos hábitos tabágicos. .... 134

FIGURA 27 – Efeito do tempo de exposição no valor de plumbémia, Pb-S. .... 136

FIGURA 28 – Efeito do tempo de exposição nos valores de protoporfirina zinco, PPZ. .... 138

FIGURA 29 – Variação dos valores de actividade da enzima ALAD com a idade e respectiva linha de tendência. .... 139

FIGURA 30 – Efeito da idade na actividade da ALAD. .... 140

FIGURA 31 – Efeito do tempo de exposição na actividade da enzima ALAD. .... 142

FIGURA 32 – Variação dos valores da frequência de mutação do receptor do antígeno de linfócitos T (TCR-mf ) com a idade. .... 145

FIGURA 33 – Efeito do tempo de exposição na frequência de mutação do receptor do antígeno de linfócitos T, TCR-mf. .... 146

FIGURA 34 – Efeito do tempo de exposição nos valores de TCR-mf. .... 148

## ABREVIATURAS

- ACGIH – do inglês *American Conference of Industrial Hygienists*
- ADN – Ácido desoxirribonucleico
- ALA – Ácido  $\delta$ -aminolevulínico
- ALAD – Desidratase do ácido  $\delta$ -aminolevulínico (enzima)
- ALAS – Sintetase do ácido  $\delta$ -aminolevulínico
- ALA- U – Ácido  $\delta$ -aminolevulínico urinária
- AMP – Adenosina monofosfato
- ARN – Ácido ribonucleico
- ATSDR – do inglês *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*
- BEI – do inglês *Biological Exposure Indices*
- BLV – do inglês *Biological Limit Value* /valor limite biológico
- BM – Biomarcador
- CA – Aberrações cromossómicas
- CD – do inglês *Cluster of Differentiation*
- col. – colaboradores / co-autores
- COPRO-O – Coproporfirinogénio oxidase
- COPRO-U – Coproporfirina urinária
- CSAO – Centro de Saúde Ambiental e Ocupacional, INSA, I.P.
- dNTP – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
- DSA – Departamento de Saúde Ambiental, INSA, I.P
- EAA – Espectrometria de Absorção Atómica
- ENSP – Escola Nacional de Saúde Pública, UNL
- EU – União Europeia
- FITC – Isocianato de fluoresceína (do inglês *fluorescein isothiocyanate*)
- FRX – Fluorescência de raios X
- FSC – do inglês *Forward Scatter*
- GABA – Ácido gama aminobutírico
- GSH – Glutathiona
- IARC – do inglês *International Agency for Research on Cancer*
- I.C. – intervalo de confiança

ICP-MS – do inglês *Inductively coupled plasma mass spectroscopy*

ILZSG – do inglês *International Lead and Zinc Study Group*

INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

IPAC – Instituto Português de Acreditação

IUPAC – do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*

L - Litro

Linfócitos Tc – Linfócitos citotóxicos

Linfócitos Th – Linfócitos auxiliares (do inglês *helper*)

LOAL – do inglês *Lowest Observable Effect Level*

LTA – Laboratório de Toxicologia Ambiental, INSA

min – Minuto

mL – Mililitro

MN – Micronúcleo

μL – Microlitro

μm – Micrómetro

NIOSH – do inglês *National Institute for Occupational Safety and Health*

NK – do inglês *Natural Killer*

NMDA – N-metil-D-aspartato (canais NMDA)

nm – Nanómetro

OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico

OEL – do inglês *Occupational Exposure Limits*

OMS – Organização Mundial de Saúde

pb – Par de base

Pb – Chumbo

PBG – Porfobilinogénio

Pb-P – Concentração de chumbo no plasma

Pb-S – Plumbémia, concentração de chumbo no sangue

PBS – Solução salina de tampão fosfato

Pb-U – Concentração de chumbo na urina

PC5 – Ficoeritrina cianina 5 (do inglês *phycoerythrin – cyanine 5*)

PCR – Reacção em Cadeia de Polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

PE – Ficoeritrina (do inglês *phycoerythrin*)

P5N – Pirimidina 5'-nucleotidase  
PP-IX – Protoporfirina IX  
PPE – Protoporfirina eritrocitária  
PPZ – Protoporfirina de zinco  
QI – Quociente de Inteligência  
RFLP – do inglês *Restriction Fragment Length Polymorfisms*  
seg – Segundo  
SCE – Troca de cromátides irmãs  
SCGE – Electroforese em microgel *Single Cell Gel Electrophoresis* (Teste do Cometa)  
SCOEL – do inglês *Scientific Committee for Occupational Exposure Limits*  
SNC – Sistema Nervoso Central  
SSC – do inglês *Side Scatter*  
Taq – do inglês *Thermus Aquaticus*  
TBE – Solução tampão de Tris/Borato/EDTA  
TCR – Receptor do antígeno de linfócitos T  
TCR-mf – Frequência de mutação do receptor do antígeno de linfócitos T  
TLV – do inglês *Threshold Limit Values*  
TLV-C – do inglês *Threshold Limit Values – ceiling*  
TLV-STEL – do inglês *Threshold Limit Values – short-term exposure level*  
TLV-TWA – do inglês *Threshold Limit Values – time-weighted average*  
UASO – Unidade do Ar e Saúde Ocupacional, INSA  
UE – Unidades Europeias  
UNL – Universidade Nova de Lisboa  
UV – Radiação Ultravioleta  
VDR – Receptor da Vitamina D  
VLB – Valor Limite Biológico  
VLE – Valores Limite de Exposição  
VLE-CM – Valores Limite de Exposição – concentração máxima  
VLE-MP – Valores Limite de Exposição – média ponderada

## RESUMO

A exposição contínua a substâncias químicas tem consequências para a saúde humana, algumas das quais não estão ainda totalmente estabelecidas. A toxicologia ocupacional é uma área interdisciplinar que envolve conhecimentos de higiene e de medicina ocupacional, de epidemiologia e de toxicologia e que tem por principal objectivo prevenir a ocorrência de efeitos adversos decorrentes do ambiente ocupacional sendo um dos seus principais papéis fornecer o máximo de dados que possam contribuir para o conhecimento dos potenciais efeitos na saúde.

O chumbo é um tóxico de características cumulativas que provoca na saúde efeitos principalmente sistémicos, ou seja, o efeito tóxico manifesta-se em locais afastados do contacto inicial que resultam essencialmente de exposições crónicas, resultantes de períodos de exposição mais ou menos longos ao metal (entre meses e anos). Pode interagir com diferentes órgãos e tecidos, ligando-se a moléculas e constituintes celulares. Uma vez que não possui qualquer função fisiológica, a presença do chumbo no organismo humano resulta numa série de efeitos prejudiciais que afectam diversos órgãos e sistemas. A toxicidade do chumbo manifesta-se em diversos órgãos e tecidos, nomeadamente no sistema hematopoiético, no sistema nervoso, no rim, no aparelho reprodutor, no sistema cardiovascular, no sistema endócrino e no sistema imunitário.

Da interferência do chumbo com o funcionamento de alguns sistemas biológicos resultam um conjunto de alterações fundamentais ao nível dos processos de transporte através das membranas, da integridade estrutural e funcional das enzimas e de várias vias metabólicas, em especial da fosforilação oxidativa e da síntese do heme sendo os primeiros efeitos bioquímicos do chumbo detectados a partir de valores de plumbémia inferiores a 10 µg/dL.

As medidas de higiene e segurança actualmente em vigor nos países desenvolvidos asseguram que os casos de intoxicação grave são cada vez menos frequentes. No entanto, o risco de exposição a nível ocupacional existe em todas as actividades que envolvem materiais que o contenham como as explorações mineiras, as fundições primária e secundária, a produção de baterias de chumbo ácido, a produção de vidro com pigmentos de chumbo, as soldaduras de reparação automóvel e a instrução de tiro.

Desde 2006 o chumbo é considerado pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) uma substância carcinogénica do grupo 2A (provável carcinogénio para o ser humano). Considera-se, assim, que o chumbo tem, inequivocamente, capacidade de induzir cancro em animais experimentais mas que, embora haja fortes indícios de que os mecanismos que medeiam a carcinogénese desses compostos ocorrem no ser humano, os dados disponíveis ainda não podem assegurar essa relação.

Com este estudo pretendeu-se contribuir para o conhecimento da toxicidade do chumbo através do estudo da exposição ao chumbo e da influência da susceptibilidade individual (em indústrias sem co-exposição significativa a outros agentes conhecidos ou suspeitos de serem carcinogénicos). Pretendeu-se estudar o caso através de uma abordagem múltipla que permitisse relacionar diferentes tipos de marcadores biológicos uma vez que a monitorização biológica integra todas as possíveis vias de entrada no organismo (para além da via respiratória), eventuais exposições fora do contexto estritamente profissional assim como uma série de factores intrínsecos individuais (relacionados com modos de via, de natureza fisiológica e comportamentais).

Sendo a co-exposição a outros compostos com propriedades genotóxicas e carcinogénicas uma questão difícil de torpear quando se quer avaliar o potencial genotóxico do chumbo em populações expostas, ocupacional ou ambientalmente este estudo tem a vantagem de ter sido efectuado em populações sem co-exposição conhecida a outras substâncias deste tipo, permitindo concluir sobre os efeitos resultantes apenas da exposição a chumbo na população humana, contribuindo para explicar algumas das aparentes inconsistências e contradições entre diferentes estudos sobre este tema.

Os indicadores de exposição usados foram: indicadores de dose interna (doseamento de chumbo e de PPZ no sangue), indicadores de efeitos adversos no heme e genotóxicos (actividade da ALAD, teste do cometa e mutação em TCR) e indicadores de susceptibilidade (polimorfismos genéticos de ALAD e VDR) através de uma abordagem estatística de comparação directa de sub-grupos previamente definidos na população e da aplicação de um modelo de regressão múltipla.

Este estudo revelou que os níveis de plumbémia na população portuguesa baixaram significativamente nos últimos 10 anos, tanto na população ocupacionalmente exposta como

na população em geral e que a presença do genótipo B-B (do gene VDR) é preditiva das variações de plumbémia, quando comparada com o genótipo mais frequente na população, B-b; ao contrário, o genótipo b-b não aparenta ter influência em nenhum dos marcadores estudados.

No que diz respeito a efeitos genotóxicos concluiu-se que estes não se manifestaram na população estudada, levando a concluir que nos níveis de exposição estudados, o chumbo não tem capacidade de induzir este tipo de efeitos *per si* levando ao reforço da hipótese, já levantada por outros autores, de que o mecanismo de genotoxicidade do chumbo seja essencialmente de promoção de processos de genotoxicidade desencadeados por outros agentes.

A realização de estudos de efeitos genotóxicos e de stress oxidativo desenhados de forma a comparar grupos de trabalhadores expostos apenas a chumbo com grupos de trabalhadores com o mesmo nível de exposição a chumbo, mas com co-exposição a outros agentes reconhecidamente carcinogénicos poderá ajudar a aumentar o conhecimento deste efeito do chumbo na saúde humana.

## ABSTRACT

Continuous exposure to chemical substances affects human health, and some of those effects haven't been totally established yet. Occupational toxicology is an interdisciplinary area involving knowledge concerning occupational hygiene and medicine, epidemiology and toxicology. This area main goal is to prevent the occurrence of adverse effects derived from the occupational environment, being one of its primary roles to provide the maximum amount of data that may contribute to get to know the potential effects on health.

Lead is a toxic of cumulative characteristics whose effects on health are mainly systemic. This means that the toxic effect appears in spots far from the initial contact which essentially derive from chronic exposures, resulting from more or less long periods of exposure to the metal (months or years). It may interact with different organs and tissues, binding itself to molecules and cellular constituents. As it doesn't have any physiological function, lead in the human body results in a series of harmful effects that affect several organs and systems. Lead toxicity builds up in various organs and tissues, namely in the hematopoietic system, in the nervous system, in the kidneys, in the reproductive system, in the cardiovascular system, in the endocrinal system and in the immunitary system.

When lead interferes with some biological systems operation there is a set of fundamental changes in membrane transportation processes, in the enzyme and several metabolic pathways structural and functional integrity, especially in the oxidative phosphorylation and in heme synthesis, being the first lead biochemical effects detected through blood lead values up to 10 µg/dL.

Present hygiene and safety measures in the developed countries assure serious intoxication cases to be less and less frequent. Nevertheless, there is a risk of exposure at an occupational level in all those activities involving materials with lead, such as mining, primary and secondary foundries, the production of acid lead batteries, the production of lead-pigmented glass, welding for car repairing and fire arms training.

Since 2006 the *International Agency for Research on Cancer* (IARC) has considered lead to be a carcinogenic substance from group 2A (probable carcinogenic for the human being). Therefore, lead is considered to have, undeniably, the capability to induce cancer in laboratory



animals; however, despite the strong evidence that the mechanisms involved in the carcinogenesis of those compounds occur in the human being, the available data is not enough to ensure that relation.

This study is intended to be a contribution to lead toxicity knowledge by studying the exposure to lead and the influence of individual susceptibility (in industries without a significant co-exposure to other agents either known or suspect of being carcinogenic). It was intended to study the case by using a multiple approach that would allow relating different types of biological markers. This because biological monitoring integrates all the possible entry pathways in the body (besides the breathing pathway), eventual exposure out of the strictly professional context as well as a series of inherent individual factors (related with physiological and behavioural living habits).

Being co-exposure to other compounds with genotoxic and carcinogenic properties a difficult issue to be ignored when evaluating lead genotoxic potential in exposed populations, either occupationally or environmentally, this study has the advantage of having been performed in populations that have not been exposed to other substances of this kind. This fact has enabled to conclude over the effects that have resulted only from human population exposure to lead, contributing to explain some of the apparent inconsistencies and contradictions between different studies about the same theme.

The used exposure indicators were internal dose indicators (lead and PPZ blood levels), heme and genotoxic adverse effects indicators (ALAD activity, comet test and mutation in TCR) and susceptibility indicators (ALAD and VDR genetic polymorphisms) by a direct comparison statistical approach of pre-defined sub-groups in the population and by the appliance of a multiple regression model.

This study revealed that the blood lead levels in the Portuguese population significantly decreased in the last 10 years both in the occupationally exposed population and in the general population, and that the presence of B-B genotype (from VDR gene) predicts blood lead variations when compared to the most frequent genotype in the population, B-b; on the contrary, the b-b genotype doesn't seem to have influence on any of the studied markers.

As far as genotoxic effects are concerned, it was concluded that these did not appear in the studied population. This led to the conclusion that in the studied exposure levels the lead is not capable of inducing this type of effects *per se*, thus emphasising the hypothesis, which was already raised by other authors, that lead genotoxicity mechanism is essentially the promotion of genotoxicity processes triggered by other agents.

Developing genotoxic effects and oxidative stress studies drawn to compare groups of workers exposed only to lead with groups of workers with the same level of lead exposure, but with co-exposure to other recognised carcinogenic agents, may help to enlarge the knowledge about this lead effect on human health.

## RÉSUMÉ

Une exposition continue à des substances chimiques a des conséquences sur la santé humaine. Certaines d'entre elles ne sont pas encore totalement établies. La toxicologie occupationnelle relève d'un domaine interdisciplinaire qui regroupe les connaissances d'hygiène et de médecine occupationnelles, d'épidémiologie et de toxicologie. Elle a comme principal objectif de prévenir l'apparition d'effets adverses provenant de l'environnement occupationnel; l'un de ses principaux rôles est de fournir un maximum de données pouvant contribuer à la connaissance d'éventuelles répercussions sur la santé.

Le plomb est un toxique aux caractéristiques cumulatives qui provoque des effets particulièrement systémiques sur la santé. Ainsi, l'effet toxique se manifeste dans des espaces distants du contact initial et se doit particulièrement à des expositions chroniques et à des périodes d'exposition au métal plus ou moins longues (durant des mois ou des années). Il peut interagir avec divers organes et tissus et se lier à des molécules et constituants cellulaires. Dépourvue de toute fonction physiologique, la présence du plomb dans l'organisme humain résulte d'une série d'effets nocifs qui affectent divers organes et systèmes. La toxicité du plomb se manifeste dans divers organes et tissus, notamment dans le système hématopoïétique, dans le système nerveux, dans la fonction rénale, dans l'appareil reproducteur, dans le système cardiovasculaire, dans le système endocrinien et dans le système immunitaire.

L'interférence du plomb dans le fonctionnement de certains systèmes biologiques provoque d'importantes altérations au niveau des mécanismes de transport à travers les membranes, l'intégrité structurale et fonctionnelle des enzymes et diverses voies métaboliques, en particulier la phosphorylation oxydative et la synthèse de l'hème. Ce sont les premiers effets biochimiques du plomb détectés à partir de taux de plombémie dans le sang inférieurs à 10 µg/dL.

Les mesures d'hygiène et de sécurité actuellement en vigueur dans les pays développés contribuent à la réduction de cas d'intoxication grave. Cependant, le risque d'exposition au niveau occupationnel existe dans toutes les activités en contact avec des matériaux contenant du plomb, comme les explorations minières, les fonderies primaire et secondaire, la

production de batteries en plomb acide, la fabrication du verre avec des pigments de plomb, la soudure en réparation automobile et l'instruction au tir.

Depuis 2006 le plomb est considéré par l'*International Agency for Research on Cancer* (IARC) comme une substance carcinogénique du groupe 2A (éventuel carcinogène pour l'être vivant). On considère ainsi que le plomb peut provoquer le cancer sur les animaux expérimentaux. Bien qu'il y ait de forts indices pour que les mécanismes qui mesurent la carcinogénèse de ces composés surviennent chez l'être humain, les données disponibles ne peuvent toutefois pas encore prouver cette relation.

A travers cette étude, nous avons cherché à contribuer à la connaissance de la toxicité du plomb à partir de l'analyse de l'exposition au plomb et de l'influence de la susceptibilité individuelle (en industries sans co-exposition significative à d'autres agents connus ou susceptibles d'être carcinogènes). Nous avons voulu étudier le cas à travers une approche multiple à fin de mettre en relation divers types de marqueurs biologiques sachant que la monitorisation biologique intègre toutes les voies possibles de l'entrée dans l'organisme (en plus de la voie respiratoire), d'éventuelles expositions en dehors du contexte strictement professionnel ainsi qu'un ensemble de facteurs intrinsèques individuels (en rapport avec des modes de vie, de nature physiologique et comportemental).

La co-exposition à d'autres composés aux propriétés génotoxiques est une question difficile à délimiter quand on cherche à évaluer le potentiel génotoxique du plomb sur des populations exposées, de façon occupationnelle ou environnementale. Aussi, cette étude a-t-elle l'avantage d'avoir été réalisée sur des populations sans co-exposition connue à d'autres substances de ce type, nous permettant de conclure sur les effets résultants à peine de l'exposition au plomb dans la population humaine, contribuant à l'explication de certaines inconsistances et contradictions apparentes que nous rencontrons dans diverses études sur ce thème.

Les indicateurs d'exposition utilisés ont été les indicateurs de dose interne (taux de plomb et de PPZ dans le sang), les indicateurs d'effets adverses sur l'hème et génotoxiques (activité de l'ALAD, test de la comète et mutation en TCR) et les indicateurs de susceptibilité (polymorphismes génétiques d'ALAD et VDR) à travers une approche statistique de

comparaison directe de sous-groupes définis par avance dans la population et de l'application d'un modèle de régression multiple.

Cette étude a révélé que les niveaux de plombémie dans la population portugaise ont fortement baissé durant les dix dernières années, aussi bien dans la population avec une exposition occupationnelle que dans la population en général et que la présence du génotype B-B (du gène VDR) dépend des variations de plombémie, quand elle est comparée au génotype le plus fréquent dans la population, B-b; en revanche, le génotype b-b ne semble influencer aucun des marqueurs étudiés.

En ce qui concerne les effets génotoxiques, nous avons observé que ces derniers ne se sont pas manifestés dans la population étudiée, ce qui nous a amené à conclure que dans les niveaux d'exposition étudiés, le plomb n'a pas la capacité d'induire ce type d'effets *en soi* ce qui nous a conduit à renforcer l'hypothèse, déjà soulevée par d'autres auteurs, selon laquelle le mécanisme de génotoxité du plomb est essentiellement une promotion de processus de génotoxité provoqués par d'autres agents.

La réalisation d'études sur les effets génotoxiques et le stress oxydatif établies de manière à comparer des groupes de travailleurs exposés uniquement au plomb avec des groupes de travailleurs exposés à un même taux de plomb mais avec une co-exposition à d'autres agents reconnus carcinogéniques pourra contribuer à approfondir la connaissance de l'effet du plomb sur la santé humaine.

---

## NOTA PRÉVIA

Ao longo da história das civilizações o Homem tem vindo a utilizar os metais de variadas formas. Com o desenvolvimento industrial, tanto a extracção de metais como a sua utilização sofreram um incremento considerável que conduziu à poluição generalizada do meio ambiente e, conseqüentemente, ao aumento dos riscos associados à exposição humana que pode ocorrer em diversas situações e por diferentes vias, no ambiente geral ou no ambiente profissional, através do ar, água e solo, tanto por inalação, como por ingestão ou contacto com a pele.

Os metais estão largamente disseminados no ambiente e são naturalmente redistribuídos tanto por ciclos geológicos e biológicos como por actividades antropogénicas. São definidos quimicamente como “elementos que conduzem electricidade, têm um brilho metálico, são maleáveis e dúcteis, formam catiões e óxidos básicos”. Com base nesta definição a maioria dos elementos pode ser descrita como metal (Goyer e Clarkson 2001; são cerca de oitenta os que pertencem à tabela periódica dos elementos químicos e se enquadram nesta definição.

Tendo em consideração a sua capacidade para formar iões positivos (perder electrões), distinguem-se os “metais comuns”, que oxidam facilmente (por exemplo, metais alcalinos e alcalino-terrosos) e os “metais nobres”, muito resistentes à oxidação (como o ouro, a prata ou a platina). Outra classificação que tem sido amplamente utilizada ao longo dos anos é a que considera dois grupos: ‘metais leves’ e ‘metais pesados’.

Num relatório técnico da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) foi publicada uma revisão extensiva de todos esses termos e das suas utilizações para concluir que o termo ‘metal pesado’ tem sido usado de forma inconsistente e nem sempre muito correcta do ponto de vista científico, sendo difícil estabelecer uma definição inequívoca (Duffus 2002). Neste sentido, o termo ‘metal pesado’ vai ser evitado ao longo deste trabalho e o chumbo será sempre referido apenas como metal.

## I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. INTRODUÇÃO

Antes do século XIX pouco se sabia sobre como controlar as doenças e pouco era feito nesse sentido, apesar de já se terem acumulado algumas noções empíricas importantes sobre higiene, saneamento, contágio e controlo de epidemias. A Revolução Industrial no século XVIII resultou em profundas transformações socioeconómicas quer na Europa, quer na América e alterou profundamente as condições de vida nas sociedades, originando um deslocamento intensivo da população rural para as cidades com o conseqüente crescimento desordenado das populações urbanas. Na sequência dessas alterações sociais que estiveram na origem de condições de miséria e de exploração dos mais pobres e vulneráveis, vieram a surgir movimentos de reforma com conseqüências directas na melhoria das condições de saúde e sociais das populações, desde logo com o progresso do saneamento e de distribuição de água canalizada nas cidades industriais (Last 1926). Finalmente, o século XX trouxe novas abordagens ao controlo da doença e melhoramento das condições de saúde.

A saúde pública surge, neste contexto, como “a arte de prevenir a doença, prolongar a vida, promover a saúde e a aptidão física através de esforços coordenados da comunidade, para o saneamento do meio, o controlo das infecções na população, a educação do indivíduo para os princípios da higiene pessoal, a organização dos serviços médicos e de enfermagem para o diagnóstico precoce e o tratamento preventivo das patologias, o desenvolvimento de dispositivos sociais que assegurem a cada um nível de vida adequado à conservação da sua saúde”, numa das mais célebres e citadas definições, apresentada por Charles-Edward Winslow em 1920<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> Citação traduzida do francês, página 9-10 de Fassin (Fassin 2008).

Desde meados do século XX a saúde pública tem estado cada vez mais em destaque e, em 1981, a Organização Mundial de Saúde (OMS) lançou a estratégia de “Health For All by the Year 2000” (HFA 2000) reconhecendo que o desenvolvimento da saúde pública e da promoção da saúde depende da participação real das comunidades e da colaboração entre diferentes sectores e agências sendo que a saúde, a sua protecção e promoção, não diz unicamente respeito ao sector da saúde, mas que constitui uma colaboração intersectorial (Ashton e Seymor 2000). A saúde ambiental e a saúde ocupacional surgiram, assim, como ramos da saúde pública intimamente ligados aos sistemas de promoção de saúde, que se ocupam de todos os factores e condições do ambiente que rodeia os seres humanos e que podem influenciar e alterar o estado de saúde e de bem-estar destes (Last 1926).

Desde então tem havido preocupação com as condições de higiene e com a saúde pública em geral, assim como com a dos trabalhadores no seu local de trabalho. Apesar dos desenvolvimentos e melhorias a que se tem vindo a assistir, os riscos considerados aceitáveis são avaliados continuamente, numa sociedade que reconhece a existência de uma relação causal entre exposição contínua e o aparecimento de doenças crónicas ou com longo tempo de latência (Thorne 2001).

A exposição contínua a substâncias químicas tem consequências para a saúde humana, algumas das quais não estão ainda totalmente estabelecidas. A toxicologia ocupacional é uma área interdisciplinar que envolve conhecimentos de higiene e de medicina ocupacional, de epidemiologia e de toxicologia e que tem por principal objectivo prevenir a ocorrência de efeitos adversos decorrentes do ambiente ocupacional sendo um dos seus principais papéis fornecer o máximo de dados que possam contribuir para o conhecimento dos efeitos potenciais na saúde.

A partir da década de 1970 a investigação com base em monitorização biológica adquiriu grande importância e tem contribuído para o processo de estabelecimento de limites máximos de exposição (Pivetta *et al.* 1990; Thorne 2001). Em 1996 o *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) estabeleceu os métodos de pesquisa em cancro ocupacional como uma das suas áreas prioritárias de intervenção com base no reconhecimento de que os factores ocupacionais têm um grande peso no



número de cancros desenvolvidos nas sociedades industrializadas, resultando em números importantes de mortalidade e morbilidade (NORA 2003).

Nos casos em que se confirma o potencial efeito genotóxico de um composto, deixa de ser possível determinar com certeza qual o limiar de aceitabilidade para a exposição humana sem a ocorrência de efeitos carcinogénicos. Estando os progressos nesta área extremamente dependentes da interdisciplinaridade das investigações, o que envolve diversas áreas de especialização, estudos como o desta tese visam contribuir para a obtenção de dados que irão alargar o conhecimento sobre as substâncias classificadas pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como pertencendo aos grupos 2A e 2B, respectivamente, substâncias prováveis e possíveis carcinogénicos para o homem.

## 2. EXPOSIÇÃO HUMANA AO CHUMBO

Os metais são xenobióticos largamente conhecidos pelo Homem. A maioria dos organismos vivos necessita apenas de alguns metais e, mesmo esses, em doses muito baixas, os denominados ‘micronutrientes’ ou ‘metais essenciais’ como é o caso do sódio, potássio, cálcio, ferro, zinco, cobre, níquel, magnésio e manganês. No entanto qualquer destes metais, como qualquer substância, pode tornar-se tóxico para os sistemas biológicos e para a saúde humana quando ultrapassa determinadas concentrações, consideradas limite. De forma diferente, o chumbo, o mercúrio, o cádmio, o crómio e o arsénio são metais que não estão naturalmente presentes em nenhum organismo vivo e para os quais não se conhecem funções nutricionais nem bioquímicas. Assim, a presença destes metais, nomeadamente do chumbo, em organismos vivos é nocivo qualquer que seja a concentração.

### 2.1. Propriedades do chumbo

O chumbo é um metal abundante na crosta terrestre que se encontra em quase todos os sistemas do meio ambiente. O símbolo químico que o representa é Pb, como abreviatura do nome latino *plumbum* (que significa “prata líquida”). Pertence ao grupo 14 da classificação periódica dos elementos químicos, tem número atómico 82, peso atómico 207.19, ponto de fusão 327,5°C e apresenta dois estados de oxidação  $Pb^{2+}$  e  $Pb^{4+}$ . A forma  $Pb^{2+}$  é a mais abundante no ambiente uma vez que, embora o chumbo tenha quatro electrões na sua camada de valência, apenas dois deles se ionizam facilmente (Moreira e Moreira 2004c). Na forma elementar é constituído por uma mistura de quatro isótopos estáveis que são, por ordem decrescente de abundância:  $^{208}Pb$  (51-53 %),  $^{206}Pb$  (23.5-27 %),  $^{207}Pb$  (20.5-23 %) e  $^{204}Pb$  (1.35-1.5 %) (ATSDR 2007). É um metal denso (densidade relativa de 11.3 a 16°C) e entra em ebulição ao atingir cerca de 1740°C. Tem coloração branca azulada mas torna-se acinzentada quando exposto ao ar. Na forma elementar é muito macio e maleável (pode ser cortado com uma faca) mas raramente ocorre nesta forma na natureza. Em conjunto com outros compostos (como antimónio, arsénio, cobre ou zinco) forma minérios muito duros.

É um metal altamente resistente a ácidos fortes (como o ácido sulfúrico e o ácido clorídrico) e à corrosão (por formação de uma cobertura de carbonato que adere à sua superfície e o protege de mais alterações) mas é facilmente atacado por ácidos fracos (como o ácido acético e o ácido nítrico). Apesar de ser um mau condutor de electricidade, é um bom isolador de ondas sonoras e de radiações ionizantes.

Em associação com outros elementos dá origem a diversos compostos. A galena (PbS), a cerusita (PbCO<sub>3</sub>) e a anglesita (PbSO<sub>4</sub>) são os minérios mais abundantes. Outros minérios são o litargírio (PbO), o zarcão (vermelho, Pb<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), o arsenato de chumbo (PbHAsO<sub>4</sub>), alvaiade (branco de chumbo – PbCO<sub>3</sub>.Pb(OH)<sub>2</sub>). A galena é o minério mais abundante deste metal (~87 %) (ATSDR 2007).

## 2.2. Utilização e Exposição a Chumbo

Devido a algumas características especiais, como o baixo ponto de fusão, a ductilidade e a facilidade de formar ligas metálicas, o chumbo foi um dos primeiros metais a ser manipulado pelo homem e era considerado pelos alquimistas o ‘metal mais antigo’. A utilização do chumbo observou-se em todos os períodos da história do homem, acompanhando as diferentes civilizações.

Existindo relatos da sua utilização desde a Antiguidade (4000 a.C.) no fabrico de utensílios domésticos, armas e adornos, o seu uso adquiriu particular importância durante o Império Romano (Cordeiro e Lima-Filho 1995; Hernberg 2000; Thornton *et al.* 2001). A tecnologia utilizada pelos romanos para o abastecimento de água através de uma vasta rede de aquedutos e de cisternas baseava-se na utilização de folhas de chumbo, que eram também amplamente utilizadas no fabrico de utensílios domésticos como potes, vasos, taças e pratos. Outra aplicação importante era a preparação de um tipo particular de bebida, chamada sapa, que consistia num licor altamente doce preparado a partir da fervura do vinho em recipientes manufacturados em chumbo. O acetato de chumbo, Pb(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (curiosamente denominado de chumbo doce ou açúcar de Saturno (Hernberg 2000)), possui um aroma doce que contrabalançava o

sabor adstringente dos taninos das uvas, para além de inibir a actividade enzimática que degradava a bebida, tornando-a agradável e muito consumida pela classe alta do Império Romano. Lessler (Lessler 1988) refere uma experiência levada a cabo pelo alemão K. B. Hofmann, em 1883 que o levou a concluir que o vinho assim tratado e conservado chegava a conter entre 20 e 30 mg/L (ou até mais) de chumbo. Marqués (Marqués 1993) afirma que o consumo médio de vinho na Roma Antiga se situava entre 1 e 5 litros por pessoa, por dia. Acredita-se que a utilização alargada do chumbo tenha contribuído para a intoxicação de muitas pessoas da aristocracia romana e alguns autores associaram-na a um aumento quer de infertilidade quer de psicoses assim como a uma diminuição do QI, que terão contribuído para a queda do Império (Lessler 1988; Needleman 2004).

No século XV, Guttenberg deu uma nova utilização a este metal ao usar ligas de chumbo para obter os caracteres de impressão utilizados desde então nos processos de tipografia (Gonçalves 1997).

Com a Revolução Industrial, a utilização de chumbo aumentou significativamente, no que foi acompanhada por um crescimento exponencial das emissões de chumbo para o meio ambiente assim como, em consequência, por um aumento significativo das concentrações desse metal no sangue da população em geral (Moreira e Moreira 2004b, 2004a).

Em 1859, Planté descobriu um importante processo de produção de energia eléctrica que resultou na criação dos acumuladores de chumbo, ou de Planté, feitos com placas de chumbo mergulhadas numa solução diluída de ácido sulfúrico. A aplicação de uma corrente eléctrica inicial resulta na ocorrência de reacções de oxidação-redução em que as placas funcionam como pólos, negativo e positivo, gerando energia (Partington 1950 citado por Gonçalves (1997)). Após algumas alterações e adaptações introduzidas ao longo dos anos esta descoberta deu origem às actuais baterias dos automóveis.

Em 1921, Thomas Midgley, Jr and Thomas A. Boyd, no Laboratório de Investigação da General Motors, desenvolveram uma nova aplicação do chumbo, na forma de compostos orgânicos, como aditivo para gasolina (Lovei 1997). A adição destes

compostos aumenta o valor de octano das gasolinas e, simultaneamente, funciona como lubrificante das válvulas de exaustão resultando num importante contributo para o melhor rendimento dos motores automóveis melhorando o seu desempenho ao evitar a ocorrência da auto-ignição, ‘knock’ - propriedade antidetonante. Estas características permitiram à indústria automóvel a produção de motores mais potentes, tornando-se esta, rapidamente, na maior utilização do chumbo no século XX e acabando por ser a forma mais significativa de disseminação (em larga escala) deste metal no meio ambiente global.

Nos anos 1970 a produção mundial de chumbo atingiu valores acima de 3 milhões de toneladas por ano (USGS 2007). Nessa altura a maioria das gasolinas utilizadas em todo o mundo continha chumbo em concentrações frequentemente superiores a 0,84 g/L, altura em que começaram a ser tomadas medidas para diminuir os teores de chumbo na gasolina. Simultaneamente promoveram-se grandes reduções na utilização deste metal nos países desenvolvidos. Disso são exemplos a eliminação do chumbo como aditivo das gasolinas e como pigmentos em tintas, assim como a diminuição da incorporação de chumbo em embalagens de estanho e cerâmica<sup>2</sup>.

A partir de 1990 os países pertencentes à Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE)<sup>3</sup> optaram pela eliminação total do conteúdo desse metal nas gasolinas. Em 2001 já quarenta e cinco países tinham banido a adição de chumbo às gasolinas e a tendência permanece para que os países em vias de desenvolvimento sigam o exemplo dos mais ricos nesse objectivo, continuando diminuição a que já se vem assistindo nesses países também. Em Portugal, a diminuição

---

<sup>2</sup>Directiva Europeia 84/500/CEE transposta para a Legislação Nacional pelo Decreto-Lei (DL) n° 193/88 de 30 de Maio (n°1 do artigo 10°) e as Normas Portuguesas NP 2089: 1986 e NP 1099: 1988; Directiva Europeia 2005/31/CE (primeira alteração à directiva anterior, não transposta para Legislação Nacional).

<sup>3</sup> Países Membros da OCDE: Alemanha, Austrália, Áustria, Bélgica, Canadá, Coreia, Dinamarca, Espanha, Estados Unidos da América, Finlândia, França, Grécia, Holanda, Hungria, Irlanda, Islândia, Itália, Japão, Luxemburgo, México, Noruega, Nova Zelândia, Polónia, Portugal, Reino Unido, República Checa, República Eslovaca, Suécia, Suíça e Turquia.

do conteúdo de chumbo na gasolina foi iniciada na década de 90 tendo a eliminação total ocorrido em 1999<sup>4</sup> (Hilton 2006).

No entanto e apesar e todas estas importantes medidas, continuam a existir múltiplas fontes de contaminação ambiental pelo chumbo.

O chumbo pode ter origem mineira (produção primária) ou ser obtido por reciclagem (produção secundária). Recentemente foi publicado um trabalho sobre os ciclos antropogénicos mundiais do chumbo por Mao e col. (Mao *et al.* 2008) em que os autores estudaram dados do ano 2000 relativos à produção, fabrico de produtos, usos, reciclagem e produção de resíduos de chumbo de 52 países que consideraram representativos a nível global. Segundo eles, nesse ano cerca de 6930 milhares de toneladas de chumbo foram consumidas mundialmente, das quais aproximadamente 57 % terá sido proveniente de fontes secundárias. Cerca de 3100 milhares de toneladas terão sido desperdiçados sob diversas formas (o que representa perto de 80 % da quantidade extraída por produção primária nesse ano). De acordo com esse mesmo estudo, na Europa, a extracção primária de chumbo é pouco significativa, enquanto que a produção secundária e a importação de produtos que contêm chumbo têm grande peso no ciclo de utilização do chumbo neste continente (Mao, *et al.* 2008).

Segundo dados do *International Lead and Zinc Study Group* (ILZSG) a produção mundial de chumbo mantém-se nesses valores elevados e a tendência é para continuar a crescer – TABELA 1 (ILZSG 2007). A explicação reside na dificuldade de substituição deste metal por outros compostos sem prejuízo para a qualidade e características dos produtos finais.

Actualmente os principais produtores mundiais de chumbo de origem primária são a China, os Estados Unidos da América e a Austrália, seguidos do Perú, Canadá e

---

<sup>4</sup> DL N° 186/99 de 31 de Maio: proíbe a comercialização de gasolina com chumbo a partir de 1 de Julho de 1999.

México. Estes seis países são responsáveis em conjunto por cerca de 82 % da produção primária anual de chumbo (ATSDR 2007).

TABELA 1 – Produção de chumbo refinado e consumo total mundial entre 2003 e 2008, adaptado de ILZSG (ILZSG 2010).

Chumbo (milhares de toneladas)	Volume anual mundial					
	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Produção mineira	3122	3130	3422	3525	3626	3896
Produção total	6787	7005	7624	7935	8126	8653
Consumo	6844	7297	7786	8063	8182	8649

O chumbo e os seus compostos são actualmente utilizados em diversas indústrias. O principal uso do chumbo (~85 %) reside no fabrico de acumuladores de energia (baterias de chumbo ácido) (Wilburn e Buckingham 2006; ILZSG 2007). Nestas, uma pasta de óxido de chumbo é aplicada em grelhas de chumbo que são mergulhadas em ácido sulfúrico, passando a constituir o material activo da reacção electroquímica (cerca de 70 % do peso de uma bateria deve-se ao conteúdo em chumbo). Baterias deste tipo são usadas em veículos motorizados e eléctricos, assim como em geradores estáticos que funcionam como reserva de energia a utilizar quando há falhas no fornecimento eléctrico (Thornton, *et al.* 2001).

O chumbo é ainda utilizado em ligas metálicas e, em menor extensão, no fabrico de munições, em indústrias de vidro, cristalaria e plástico, na construção civil, na manutenção e reparação automóvel e naval, no restauro de edifícios e de pinturas antigas, na indústria electrónica (protecção em monitores de televisões e computadores), em fundição e soldadura (Thornton, *et al.* 2001; Mao, *et al.* 2008). Várias tentativas têm sido feitas no sentido de encontrar alternativas à sua utilização em todas estas aplicações, mas elas não se têm mostrado suficientemente eficientes.

Em qualquer fase dos processos de obtenção mineira, utilização e reciclagem de chumbo, este metal é libertado para o ambiente (IARC 2006a). Para além dessas fontes

há quantidades enormes de resíduos que contêm chumbo a serem depositadas em aterros e encaminhadas para incineradoras, contribuindo para a sua libertação para o ambiente (Tong *et al.* 2000). A utilização generalizada desde metal através dos tempos, aliada ao facto do chumbo não ser biodegradável, levou a uma alteração profunda do seu ciclo natural e resultou na poluição generalizada de todos os ecossistemas. Uma vez que não sofre biodegradação, o chumbo libertado para o ambiente acumula-se ao já aí existente, persiste e reentra em circulação, sendo transportado até locais longínquos de fontes de contaminação (COWI 2003; Marcy *et al.* 2004; McConnell e Edwards 2008).

A utilização de gasolinas com chumbo e a consequente libertação do chumbo através da exaustão dos motores automóvel foi identificada como um risco ambiental para áreas urbanas. Como consequência das medidas tomadas a partir da década de 1970 no sentido de eliminar o chumbo nas gasolinas, as emissões de chumbo para o ar e a água têm vindo a ser reduzidas. Nos países em que foram implementadas, essas medidas tiveram como resultado uma diminuição considerável das concentrações de chumbo no ar e no sangue da população geral (SCOEL 2002; Hilton 2006).

Nos dias de hoje e nos países mais desenvolvidos, entre os quais se inclui Portugal, ainda são identificados alguns factores demográficos e socio-económicos que aumentam o risco de exposição ao metal, nomeadamente (1) a residência em habitações construídas antes de 1950-70, uma vez que as canalizações e a tinta usada nessa época continham chumbo<sup>5</sup> (Kelada *et al.* 2001; Mayan *et al.* 2001; Roma-Torres *et al.* 2007), (2) a residência nas imediações de indústrias onde se utilizem ou produzam compostos com chumbo (as emissões ambientais resultam em exposição cumulativa a ar, água e solos contaminados), bem como (3) a existência na família de trabalhadores de indústrias em que se manuseie chumbo, uma vez que estes podem trazer para casa

---

<sup>5</sup> Nos Estados Unidos da América, as tintas com altos teores de chumbo deixaram de ser utilizadas na década de 1950 e, na Europa, apenas na década de 1970.



roupas e sapatos contaminados (Goyer e Clarkson 2001; Kelada, *et al.* 2001; ATSDR 2007).

Também resultam em exposição ao chumbo o fumo de tabaco (Garza *et al.* 2006), a utilização de utensílios de cerâmica envidraçada, o consumo de bebidas e de alimentos contaminados (por pesticidas ou pelos recipientes onde são armazenados) e a prática de tiro e caça já que as munições ainda podem conter concentrações elevadas de chumbo (IARC 2006a).

Há outros produtos importados de países onde não está proibida a utilização de chumbo que podem constituir fontes de chumbo para quem os utiliza. Estão aqui incluídos alguns produtos utilizados em tratamentos de medicina tradicional indiana (em que o chumbo não aparece em concentrações residuais mas sim, frequentemente, como ingrediente principal) e produtos de cosmética, como tintas para cabelo e pinturas produzidos localmente ou provenientes da China e da Índia (Ernst 2002; IARC 2006a; Kales *et al.* 2007).

Na população adulta, a exposição é geralmente mais elevada para aqueles que mantêm contacto próximo com o metal durante os processos de produção. Desta forma a exposição que resulta de ambientes ocupacionais é de grande importância já que os trabalhadores ficam sujeitos a este tipo de exposição por períodos longos de tempo (muitas horas de trabalho diário e, em muitos casos, ao longo de toda a vida activa).

As medidas de higiene e segurança actualmente em vigor nos países desenvolvidos asseguram que os casos de intoxicação grave são cada vez menos frequentes (IARC 2006a). No entanto, o risco de exposição a nível ocupacional existe em todas as actividades que envolvem materiais que o contenham. E essas actividades são, actualmente, nos países desenvolvidos, as explorações mineiras, as fundições primária e secundária, a produção de baterias de chumbo ácido, a produção de vidro com pigmentos de chumbo, as soldaduras de reparação automóvel e a instrução de tiro. Nos países onde ainda se utiliza gasolina com chumbo há ainda a ter em conta a exposição dos motoristas, sinalizadores de trânsito, mecânicos automóveis e todos os profissionais de actividades em que haja exposição aos escapes automóveis. Há ainda a considerar

uma série de actividades como o artesanato em que se utiliza prata e outros metais, tintas não controladas, cerâmica vidrada e soldadura de chumbo, que também contribuem para a exposição ocupacional a este metal (IARC 2006a).

### **2.3. Toxicidade**

As primeiras identificações dos efeitos do chumbo sobre a saúde humana são ancestrais, havendo dela referências designadamente de Nicandro (poeta e médico grego do século II a.C.) e Hipócrates (460-375 a.C.) (Marqués (1993) e Landrigan 1991 citados por Prista (2002)).

O organismo humano é um sistema biológico organizado em diversos níveis (desde moléculas a até aparelhos e sistemas) que se encontra em equilíbrio dinâmico, através de numerosas reacções bioquímicas, com o ambiente em que se encontra (FUNASA 2002). O aumento dos níveis de poluição ambiental, devido ao crescimento industrial do mundo moderno, tem tido como resultado a degradação do meio ambiente e a alteração desse equilíbrio (Gonçalves 1997; FUNASA 2002).

A forma como o organismo humano absorve os diferentes metais depende de algumas das suas características físicas e químicas, como a solubilidade, o grau de ionização, o tamanho das partículas, a especiação química (no caso dos sais metálicos) e a forma bioquímica. À capacidade que as substâncias absorvidas pelo organismo têm de produzir efeitos nocivos quando interagem com o organismo chama-se toxicidade (FUNASA 2002). No caso dos metais, de uma forma geral, o aumento da electropositividade faz aumentar o risco de toxicidade que o metal apresenta. Cada metal apresenta características toxicológicas específicas. No entanto, de um modo geral, são particularmente nocivos para o sistema nervoso central e os rins (FUNASA 2002).

O chumbo pode interagir com diferentes órgãos e tecidos, ligando-se a moléculas e constituintes celulares. Uma vez que não possui qualquer função fisiológica, a presença do chumbo no organismo humano resulta numa série de efeitos prejudiciais que afectam

diversos órgãos e sistemas (COWI 2003). O conhecimento da cinética e dinâmica do chumbo no organismo humano é, portanto, da maior importância para uma melhor compreensão da sua toxicidade e dos riscos consequentes.

## 2.4. Toxicocinética

A toxicocinética tem como objectivo principal estudar o comportamento dos xenobióticos no organismo pelo conhecimento das fases de interacção com este, nomeadamente a absorção, a distribuição, o armazenamento, a metabolização e a eliminação (FUNASA 2002), e permite estimar a quantidade de moléculas de um agente químico que efectivamente atinge os órgãos-alvo depois de penetrar e antes de ser eliminado. Esta área do conhecimento levanta questões da seguinte ordem: “como é que o chumbo entra no organismo?”, “quanto tempo aí permanece?”, “onde é armazenado?” e “como e quando é eliminado?” (Rabinowitz 1991).

### 2.4.1. Absorção pelo organismo

A exposição ao chumbo pode ser directa – contacto directo com chumbo e com produtos químicos que o contenham – ou indirecta, através do ar, água e alimentos contaminados. A absorção do chumbo pelo organismo humano é influenciada pela via de exposição, pela especiação química e pelas características físico-químicas do composto. Ocorre essencialmente por inalação e, de modo menos extenso, por ingestão. Além destes factores, também a idade, o estado fisiológico dos indivíduos e diversos aspectos nutricionais influenciam a extensão da absorção (ATSDR 1992).

A absorção pulmonar (resultante da penetração por via respiratória) é a mais importante do ponto de vista da exposição ocupacional e é influenciada principalmente pelo tamanho das partículas. O volume respiratório, a individualidade fisiológica e as características físico-químicas do composto são factores com menos influência. Geralmente, as partículas de chumbo no ar (como fumos e vapores) apresentam

diâmetro inferior a 1 µm e são depositadas principalmente na região alveolar do pulmão onde cerca de 90 % são absorvidas. A taxa de absorção do chumbo retido nos alvéolos depende dos factores já referidos e da solubilidade das espécies químicas em questão, mas é, de forma geral, bastante eficiente e completa (Goyer e Clarkson 2001).

A absorção gastrointestinal ocorre após deglutição de partículas retidas nas secreções traqueo-brônquicas (no que está intimamente relacionada com a penetração por via respiratória) ou devido a maus hábitos de higiene (em que partículas de chumbo são trazidas à boca através das mãos, de cigarros, ferramentas de trabalho e outros utensílios contaminados). Depende do estado fisiológico do indivíduo exposto (idade, jejum, gravidez, etc.) bem como de aspectos físico-químicos das partículas ingeridas (tamanho das partículas, composição, solubilidade e a natureza orgânica ou inorgânica do composto) (Goyer e Clarkson 2001). Alguns estudos referem factores nutricionais que influenciam a absorção de chumbo - a taxa de absorção aumenta em jejum, com dietas pobres em ferro e em cálcio ou com o consumo de bebidas alcoólicas e diminui com suplementos de zinco e cálcio (Mahaffey 1990; Goyer e Clarkson 2001). A taxa de absorção pela via digestiva, em adultos, situa-se entre 5 e 15 % do chumbo ingerido, apenas ficando retidos cerca de 5 % deste (Goyer e Clarkson 2001). Apenas em condições de baixa higiene, desnutrição, deficiência em ferro, cálcio ou proteínas poderá a absorção elevar-se até 45 %. Nas crianças a absorção de chumbo ocorre na ordem dos 40 %, do qual cerca de 32 % é retido (Goyer e Clarkson 2001).

A absorção do chumbo inorgânico através da pele intacta é mínima e só em caso de contacto com tecido lesionado tende a ser maior. Ao contrário, os compostos orgânicos de chumbo (como o tetraetilo, o tetrametilo e o acetato de chumbo) são prontamente absorvidos devido à elevada lipossolubilidade (Staudinger e Roth 1998).

#### 2.4.2. Distribuição e fixação no organismo

Para caracterizar a distribuição do chumbo no organismo humano foram propostos vários modelos farmacocinéticos mas, de uma forma geral, podem considerar-se três compartimentos principais: sangue, tecidos moles e ossos.

Uma vez absorvido pelo organismo, o chumbo não é distribuído de forma homogénea, dependendo a taxa de libertação do metal para os diversos órgãos, das características metabólicas e da vascularização dos tecidos (Garza, *et al.* 2006) assim como da afinidade do metal para moléculas e tecidos (Bergdahl *et al.* 1999). Uma vez dentro do organismo, a concentração plasmática entra rapidamente em equilíbrio com o fluído extracelular e, após alguns minutos, o chumbo é transferido para os eritrócitos. Esta distribuição não é homogénea, encontrando-se nos eritrócitos uma grande parte do chumbo sanguíneo (mais de 90 %) quer associado à membrana quer ligado à hemoglobina e a outros componentes celulares (Bergdahl, *et al.* 1999; Barton e Conrad 2001).

A relação entre as concentrações de chumbo nos eritrócitos e no plasma não é de fácil determinação (Goyer 2001). A velocidade de crescimento da fracção plasmática é maior do que a da concentração de chumbo no sangue o que pode ser explicado pela saturação dos locais de ligação do chumbo nos eritrócitos (Barton e Conrad 2001). Devido à acumulação do chumbo nos eritrócitos supõe-se que a concentração de chumbo no plasma (Pb-P) terá um maior peso na distribuição do chumbo para os órgãos alvo (Bergdahl *et al.* 1998; Bergdahl, *et al.* 1999). A fracção plasmática de chumbo livre é distribuída pelos tecidos moles (fígado, músculo esquelético, tecido conjuntivo liso e outros) e no tecido ósseo (ossos e dentes), atingindo neste último as concentrações mais elevadas, entre 80-90 % do chumbo total absorvido (SCOEL 2002; ATSDR 2007).

O chumbo total no organismo pode então ser considerado como tendo dois pólos cinéticos, esqueleto e tecidos moles, com diferentes velocidades de absorção e de libertação. O tecido ósseo representa o pólo maior e cineticamente mais lento (tempo de semi-vida entre 20 e 30 anos). Em contrapartida, os tecidos moles constituem um pólo

mais instável (tempo de semi-vida de cerca de 40 dias), bem como o sangue onde tem um tempo de semi-vida de 35 dias (Klaassen 2001; SCOEL 2002).

O chumbo armazenado no tecido ósseo é distribuído entre o osso trabecular (camada mais interna do osso, esponjosa) e o osso cortical (camada externa, mais dura e compacta), apresentando também diferentes cinéticas metabólicas (O'Flaherty 1998). O armazenamento crónico e contínuo do chumbo no osso confere um efeito protector aos restantes órgãos mas, em contrapartida, resulta numa fonte do metal para a corrente sanguínea (até cerca de 50 % deste) após cessação da exposição, num processo que se denomina por contaminação endógena, e durante condições específicas da vida humana em que ocorre descalcificação: fisiológicas como na gravidez, aleitamento, menopausa, ou patológicas como na osteoporose (Rabinowitz 1991; Staudinger e Roth 1998; Klaassen 2001; Barbosa *et al.* 2005). De acordo com Gerhardsson e col. (2005) o conteúdo ósseo em chumbo em pessoas que tenham sofrido exposição prolongada ao metal pode exceder 1 g.

#### 2.4.3. Biotransformação e eliminação do organismo

O chumbo inorgânico não sofre qualquer processo de biotransformação no organismo humano. Forma no entanto complexos com diversas moléculas, com consequências para funções fisiológicas importantes.

Os compostos orgânicos de chumbo são metabolizados no fígado por desalquilação oxidativa catalisada pelo citocromo P-450. Contudo, se a exposição for elevada, este processo é pouco eficaz (Marqués 1993). Na medida em que o chumbo orgânico assim metabolizado dá origem à formação de chumbo iónico, este comporta-se no organismo como o chumbo inorgânico.

O chumbo é essencialmente excretado por via renal através da filtração glomerular (cerca de 75-80 % do total excretado). A excreção gastrointestinal (fezes) ocorre em menor escala (~15 %) e corresponde a toda a porção que não foi absorvida a nível intestinal, incluindo o chumbo proveniente do ar que foi deglutido e não absorvido. A

porção (<8 %) que é eliminada pelas secreções (suor, saliva e leite materno) e faneras (unhas, cabelos) tem pouca importância quando comparada com as duas vias já referidas. A eliminação pelo leite materno, embora tenha pouco significado como via de eliminação do chumbo pelo organismo, pode representar um risco sério para o lactente, já que existe uma correlação entre a concentração de chumbo no sangue e no leite materno (Moreira e Moreira 2004a) (FIGURA 1).

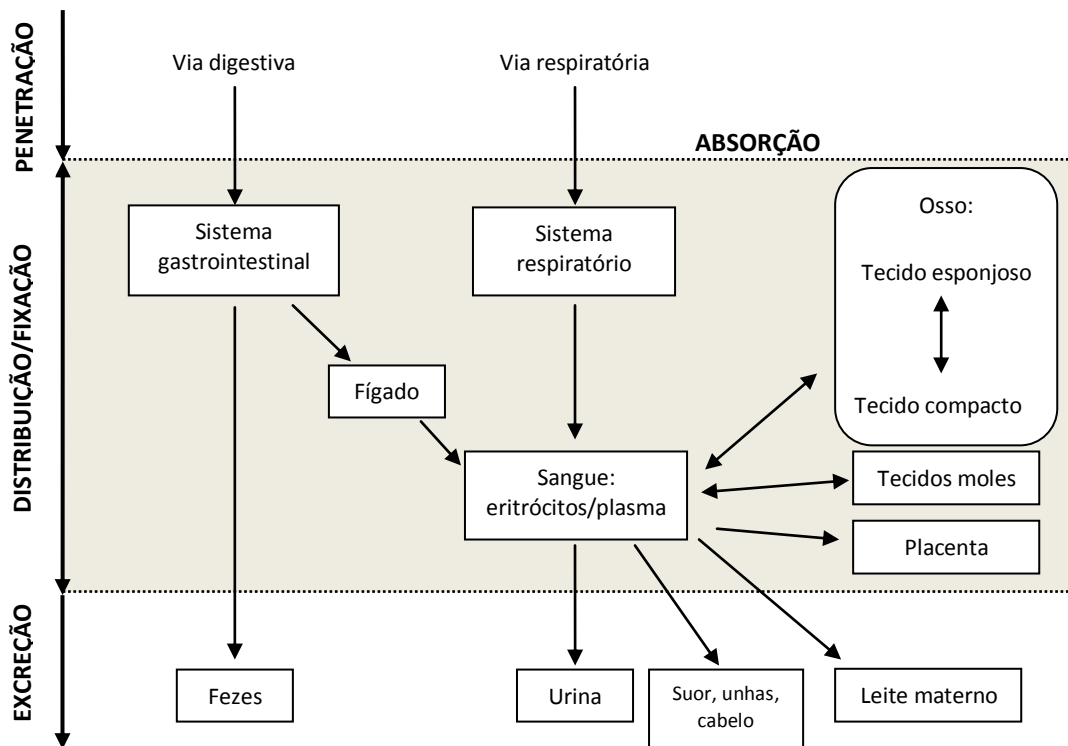


FIGURA 1 – Representação esquemática da toxicocinética do chumbo no organismo humano (adaptado de (ATSDR 2007) e (Prista 2002)).

## 2.5. Toxicodinâmica

A toxicodinâmica pode ser definida como o estudo da natureza da acção tóxica exercida pelos xenobióticos sobre o sistema biológico e dos seus mecanismos de acção, tanto do ponto de vista molecular como bioquímico (FUNASA 2002). Concretamente no caso do chumbo, trata das questões relacionadas com a forma como este se fixa e interage com os locais alvo e os mecanismos através dos quais induz efeitos tóxicos (Lauwerys 1999).

Embora o conhecimento dos efeitos tóxicos do chumbo para o organismo humano seja antigo, havendo registos com mais de 2000 anos (Last 1926; Gonçalves 1997; Staudinger e Roth 1998; Prista 2002), os mecanismos moleculares que estão na base dessa toxicidade não estão totalmente explicados devido à inacessibilidade dos tecidos alvo (como cérebro, rins, fígado, etc.) e à necessidade de utilizar tecidos secundários, o que dificulta a compreensão das associações entre a exposição e os efeitos no organismo (Hwang *et al.* 2001).

O chumbo é um tóxico de características cumulativas que provoca na saúde efeitos principalmente sistémicos, ou seja, o efeito tóxico manifesta-se em locais afastados do contacto inicial que resultam essencialmente de exposições crónicas, resultantes de períodos de exposição mais ou menos longos ao metal (entre meses e anos) (Lauwerys 1999). Os efeitos de intoxicação pelo chumbo são denominados, de uma forma geral, pelo termo Saturnismo que deriva do nome do deus Saturno<sup>6</sup> e estão extensamente descritos (Goyer 1990; ATSDR 1992; Lauwerys 1999; Goyer e Clarkson 2001; Thornton, *et al.* 2001; Prista 2002; COWI 2003; ATSDR 2007).

---

<sup>6</sup> Os Romanos acreditavam que o chumbo lhes tinha sido ofertado por Saturno, Deus idolatrado na Roma Antiga (Bechara 2004). De acordo com Gonçalves, citando Meyer e Ollmer 1954, tal associação dever-se-á ao facto do chumbo ter sido o primeiro metal descoberto no processo de refinação e ao seu poder de “absorver outros metais” o que é associado ao deus Saturno que devorava os seu filhos (Gonçalves 1997).



Alguns efeitos tóxicos são desencadeados directamente pela interacção do metal com os componentes celulares; outros são provocados indirectamente através de processos mais complexos, como alterações da regulação genética, da síntese proteica ou de metabolismos energéticos (Garza, *et al.* 2006) mas, de uma forma geral, o chumbo interfere com os processos de transporte transmembranar, com a integridade estrutural e funcional de diversas enzimas e, em consequência, com diversas vias metabólicas, com especial efeito na fosforilação oxidativa e na síntese do grupo heme (Marqués 1993).

Diversos estudos apontam para que os mecanismos de toxicidade do chumbo sejam essencialmente enzimáticos, formando complexos estáveis com proteínas através de ligantes dadores de electrões que contêm fósforo, enxofre, azoto e oxigénio (grupos como  $-H_2PO_3$ ,  $-SH$ ,  $-NH_2$ ,  $-OH$ ) ou pela substituição de catiões polivalentes com consequências significativas ao nível de diversas funções celulares essenciais (Marqués 1993; Markowitz 2000)).

O efeito crítico da toxicidade do chumbo ocorre no sistema hematológico, afectando-o de duas formas distintas. Por um lado, o chumbo inibe a biossíntese do heme e, conseqüentemente, da hemoglobina e, por outro, afecta a morfologia dos eritrócitos levando à diminuição do seu tempo de vida (WHO 2001). Mas o chumbo tem também uma variedade de efeitos ao nível do sistema nervoso central e periférico, induz respostas características de inflamação e altera o normal funcionamento do sistema imune, bem como altera a expressão celular normal, podendo contribuir para o desenvolvimento de cancro.

A informação relativa aos mecanismos de acção do chumbo a nível molecular e celular encontra-se ainda muito dispersa e é difícil organizá-la mas, uma vez que se reconhece que esses mecanismos são muito importantes na forma como o chumbo exerce a sua toxicidade, torna-se relevante a tentativa de articular os diversos conhecimentos obtidos.

Avanços recentes nas áreas da biofísica e da biologia molecular trouxeram algumas ferramentas essenciais à compreensão da bioquímica do chumbo nos organismos biológicos.

### 2.5.1. Interação com domínios de ligação a metais bivalentes

Vários íons metálicos, nomeadamente  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ag^+$ ,  $Cs^+$ , estão envolvidos em importantes funções biológicas, tais como a cadeia de transporte de electrões, a canalização de reacções enzimáticas e como elementos estruturais essenciais às conformações proteicas, manterem o balanço osmótico no organismo, entre outros (e são por isso denominados de metais essenciais).

O cálcio e o zinco são componentes estruturais de muitas proteínas que participam em cascatas de eventos de sinalização enzimática. Constituem portanto elementos essenciais para a correcta actividade proteica. Ao contrário desses dois metais, em que as cargas eléctricas se ligam a outros grupos produzindo uma distribuição regular, o chumbo possui uma nuvem electrónica inerte que, forçando as ligações, estabelece a irregularidade na distribuição induzindo alterações na conformação proteica (Garza, *et al.* 2006).

As proteínas dependentes da ligação a íons específicos, como o cálcio ou o zinco, possuem mecanismos de selectividade para se ligarem apenas a esses catiões específicos e não a outros quaisquer. De acordo com Garza e col. esses mecanismos terão sido desenvolvidos como forma de defesa do organismo de íons metálicos normalmente presentes no meio envolvente. Mas esse não é o caso do chumbo (e de outros metais não essenciais, como o cádmio, o arsénio, etc.) pelo que as células humanas não tiveram capacidade de criar defesas para eles. E essa capacidade que os metais não essenciais (muitas vezes nocivos) têm de interagir com os locais de ligação dos metais essenciais acaba por ter, muitas vezes, efeitos devastadores ao interromper funções bioquímicas e fisiológicas normais e vitais do organismo humano (Garza, *et al.* 2006).

### 2.5.2. Interação com domínios ricos em resíduos de cisteína

As cisteínas, aminoácidos contêm um grupo sulfidrílo ( $-SH$ ), são extremamente reactivos com metais electrofílicos (FIGURA 2). As proteínas que os possuem constituem, como tal, alvos sensíveis a íons metálicos, incluindo o chumbo, que

apresenta especial afinidade para se ligar a esses grupos (Hanas *et al.* 1999). Proteínas que contêm domínios ricos em resíduos de cisteína são mais sensíveis a este metal uma vez que a estabilidade das ligações do chumbo aumenta com o número crescente de sítios ligantes e com espaçamentos ótimos (Moreira e Moreira 2004b).

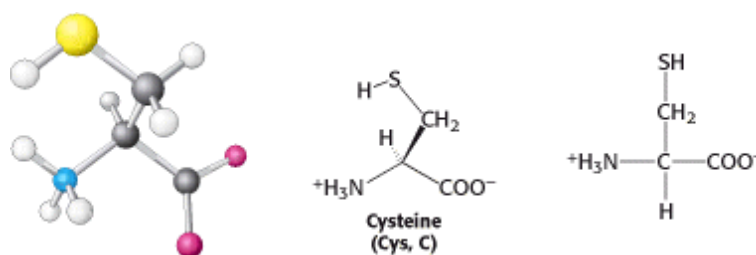


FIGURA 2 – Estrutura química da cisteína. Imagem de Berg e col. (2001).

Diversas proteínas têm as suas funções dependentes da presença de metais que ligam a domínios deste tipo. O zinco liga-se ao centro catalítico das enzimas, como por exemplo no caso das hidrolases dependentes do zinco, utilizando três aminoácidos, duas histidinas e um ácido glutâmico. Contudo a ligação estrutural, que acontece por exemplo em factores de transcrição, ocorre por coordenação tetraédrica a grupos sulfidrilo (-SH) presentes em cisteínas e/ou grupo imidazólico em histidinas. Esta coordenação é essencial para a correcta organização da estrutura tridimensional dessas proteínas bem como para a sua actividade enzimática. O chumbo, mesmo quando em concentrações muito baixas, compete com o zinco na ligação a metaloproteínas. Contudo, ao ligar-se, dado as suas características físico-químicas diferentes (como o tamanho), altera a conformação da proteína relativamente à sua conformação quando coordenada com o zinco. Um exemplo é o que acontece com proteínas com domínios do tipo “zinc finger” ricas em cisteínas. Neste caso, quando o chumbo ( $Pb^{2+}$ ) substitui o zinco ( $Zn^{2+}$ ) continua a ligar-se aos grupos sulfidrilo, embora tenha preferência por ligações apenas com número de coordenação triplo. Ou seja, quando o chumbo substitui

o zinco neste tipo de ligação, fá-lo com uma coordenação trigonal, com conseqüente alteração da conformação tridimensional da estrutura proteica, o que afecta a actividade da enzima (FIGURA 3).

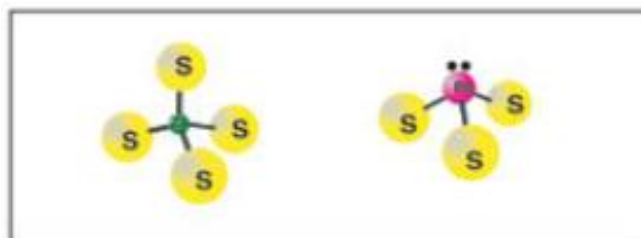


FIGURA 3 – Representação da ligação de coordenação do chumbo a grupos sulfidrilo (estrutura piramidal). Imagem de Magyar e col. (2005).

Analisando em detalhe os efeitos do chumbo no organismo, o efeito mais nocivo, tal como mencionado anteriormente, ocorre a nível do sistema hematológico.

A enzima dependente de zinco cuja actividade é mais sensível ao chumbo é a desidratase do ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALAD), enzima fundamental na biossíntese do grupo heme (FIGURA 4) que catalisa a formação de porfobilinogénio (PGB) por condensação de duas moléculas de ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA). A explicação para isso parece ser o facto de a enzima ser formada por oito subunidades idênticas e possuir oito locais de ligação a iões zinco ( $Zn^{2+}$ ) em locais ricos em grupos sulfidrilo (cisteínas) (Campagna *et al.* 1999). O chumbo substitui o zinco nesses locais de ligação e, apesar da estrutura da proteína não ser muito alterada pela ligação ao chumbo, a incorporação desse metal inibe o local de ligação ao substrato, o ALA, o que resulta na inibição da enzima ALAD e afecta negativamente a continuidade da biossíntese de diversas hemoproteínas, entre as quais a hemoglobina, provavelmente a de maior significado e importância (Godwin 2001). Outros sistemas enzimáticos hemoproteicos afectados são os citocromos P450 (com conseqüências negativas na disponibilidade de citocromos para a cadeia respiratória) e o citocromo C muscular (Papanikolaou *et al.* 2005; IARC 2006a).

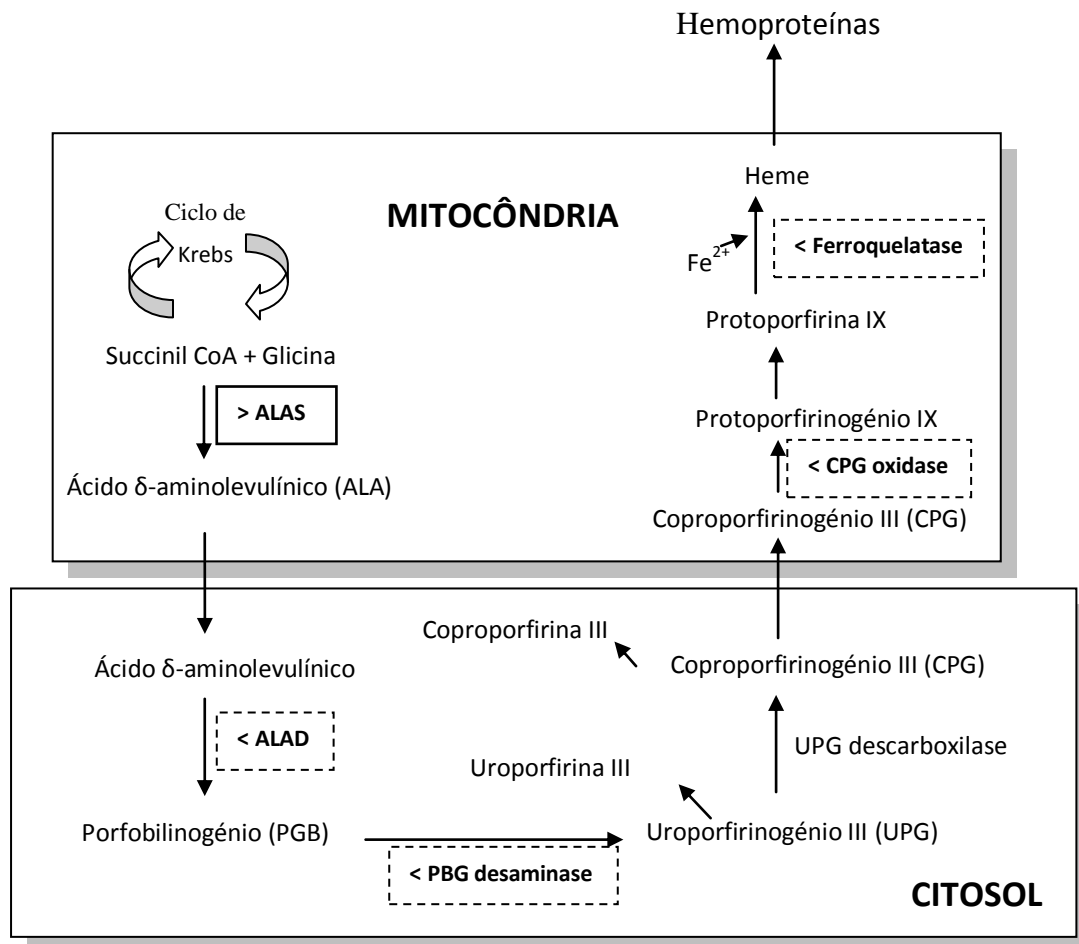


FIGURA 4 – Efeitos do chumbo na biossíntese do grupo heme (<, diminuição; >, aumento da actividade das enzimas). Adaptação de Prista (2002) e Gurer e Ercal (2000).

O chumbo tem a capacidade de inibir outra enzima desta biossíntese, a ferroquelatase, que catalisa o último passo da biossíntese do heme por incorporação do ião ferro ( $Fe^{2+}$ ) na protoporfirina IX (Dailey *et al.* 2000; Wu *et al.* 2001; Dailey e Dailey 2002; Shepherd *et al.* 2006; Hunter *et al.* 2008). Esta enzima, associada à membrana, mitocondrial é um homodímero (proteína composta por duas subunidades idênticas) com grupos [2Fe-2S] ligados a cisteínas (Dailey, *et al.* 2000). O mecanismo de actuação da enzima é sequencial: liga primeiro ao metal, ao que se segue a alteração da conformação e a ligação à porfirina. Uma hipótese levantada para a inibição pelo chumbo (e por outros metais divalentes que não o ferro) é que a ligação a esse metal

resulta em diferenças conformacionais que afectam a actividade da enzima (Sellers *et al.* 2001; Ferreira *et al.* 2002; Medlock *et al.* 2007). Outra hipótese é que o chumbo interfira com o metabolismo energético mitocondrial, em que se dá a redução do ferro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), forma em que o ferro é inserido no anel porfirínico (Mahaffey 1990).

A inibição destas duas enzimas resulta na diminuição da produção do grupo heme. Por sua vez, esta falta de heme estimula a expressão da enzima ALA sintetase (ALAS), a primeira enzima envolvida na biossíntese do heme, numa tentativa do organismo para repor a normalidade. Mas como, nesta situação, as moléculas de ALA não estão a ser eficientemente condensadas a porfobilinogénio, a estimulação da actividade da ALAS resulta num agravamento da situação, traduzido por uma maior acumulação de ALA no organismo com conseqüente toxicidade adicional, nomeadamente a nível do sistema nervoso central (SNC) e do dano oxidativo (IPCS 1995; Goyer e Clarkson 2001; ATSDR 2007).

Por outro lado, os domínios de ligação a zinco são frequentemente encontrados em factores de transcrição, em proteínas envolvidas na expressão genética e em proteínas protectoras do ADN (ácido desoxirribonucleico), como histonas e protaminas (Godwin 2001). Nessas proteínas o domínio de ligação ao zinco é a parte da proteína que liga directamente ao ADN, pelo que a incorrecta organização desse domínio reduz a capacidade dessas proteínas para reconhecerem o seu local de ligação e, conseqüentemente, se ligarem correctamente para exercerem a actividade normal (Magyar, *et al.* 2005). É o que acontece quando o chumbo substitui o zinco, e resulta numa maior vulnerabilidade do material genético. Protaminas e histonas, por exemplo, têm uma função importante na ligação ao ADN para o proteger de ataques externos. Se não estiverem capazes de reconhecer o seu local de ligação, então deixarão de estar capazes de proteger eficientemente o ADN, deixando este vulnerável a esses ataques. Da mesma forma, alterações nas funções dos genes reguladores da transcrição irão ter conseqüências na expressão genética. Pelo contrário, factores de transcrição que não contêm locais de ligação a zinco não são afectados pelo chumbo (Hanas, *et al.* 1999; Landrigan *et al.* 2000).

A proteína supressora de tumores p53 também é uma proteína que liga a zinco. A sua função no organismo está relacionada com a preservação da integridade do código genético em cada célula, ao interromper o processo de formação de tumores. Similarmente ao já descrito atrás, a substituição do zinco por chumbo dá origem a uma alteração conformacional que resulta numa forma disfuncional da proteína, com consequências semelhantes às de uma mutação no gene supressor de tumor p53 - um indivíduo que apenas possua uma cópia funcional do gene p53 tem maior predisposição para contrair cancro, sendo grande a probabilidade de desenvolver diferentes tipos de tumores em tecidos distintos (Ross 1998b; Silbergeld 2003). Os efeitos do chumbo nestes grupos de proteínas são considerados mecanismos facilitadores de dano genético (Silbergeld 2003).

A enzima pirimidina 5'-nucleotidase (P5N) é uma fosfatase dependente de metais bivalentes que actua sobre os nucleótidos pirimidínicos, facilitando a libertação de fósforo inorgânico. Embora a sua estrutura tridimensional não esteja totalmente identificada, sabe-se que a P5N contém um domínio rico em cisteínas, supondo-se que este domínio desempenhe um papel importante na actividade da enzima e seja o local de ligação do chumbo (IARC 2006a). Baixas concentrações de chumbo inibem essa enzima, contribuindo com isso para a acumulação de nucleótidos nos eritrócitos que, juntamente com os átomos de ferro que não foram incorporados na protoporfirina, dão origem a pontuados basófilos que contribuem para alterações morfológicas nos eritrócitos, tendo esses efeitos como consequência a redução do tempo de vida dos eritrócitos circulantes (Marqués 1993; Amici *et al.* 1994).

### 2.5.3. Interações com mecanismos dependentes do cálcio

#### *Interação com proteínas*

O cálcio é um dos metais mais importantes nos organismos vivos, onde desempenha uma série de funções essenciais à manutenção da vida celular. Controla processos vitais, desde a mineralização óssea à sinalização celular e interage com um grande número de

proteínas (Lewit-Bentley e Rety 2000). Os locais proteicos de ligação ao cálcio são, na sua maioria, formados por grupos com resíduos carregados negativamente (especialmente aspartato e glutamato) localizados de forma a estabelecerem interações ótimas com o cálcio, nas quais átomos de oxigénio de grupos carboxilo ajudam a formar uma esfera de coordenação à volta do cálcio, “prendendo-o”. As configurações de locais de ligação a cálcio são muito limitadas, havendo dois tipos de domínios de ligação que podem ser encontrados nas proteínas dependentes de cálcio: domínio EF-hand e domínio C2. No domínio EF-hand, a ligação do cálcio modifica a conformação da proteína, enquanto que no domínio C2 as alterações conformacionais são secundárias pois o cálcio induz alterações essencialmente eléctricas (Garza, *et al.* 2006). O domínio EF-hand é o mais comum e foi denominado dessa forma por a estrutura (hélice-loop-hélice) fazer lembrar a estrutura da mão humana entre o dedo indicador e o polegar de uma mão (FIGURA 5). Quando o cálcio se liga, a hélice representada pelo polegar altera a conformação fechada (apoproteína, a cinzento mais claro) para conformação aberta (holoproteína, a cinzento escuro). Essa alteração na conformação deixa expostas regiões hidrofóbicas que ligam a outras moléculas.



FIGURA 5 – Representação simbólica do domínio EF-hand. As hélices são representadas pelos dedos (indicador e polegar) de uma mão direita (Lewit-Bentley e Rety 2000).

A transmissão de sinais é mediada por proteínas cuja conformação é alterada desta forma aquando da ligação do cálcio, como é o caso da parvalbumina na fibra muscular e da calmodulina no citosol (Lewit-Bentley e Rety 2000; Garza, *et al.* 2006).



A calmodulina é um mensageiro secundário que actua em diversas vias de sinalização celular. O complexo cálcio-calmodulina liga-se a sequências específicas localizadas em proteínas alvo, entre elas, factores de transcrição, proteínas cinases e proteínas fosfatases, modulando a sua actividade. Possui quatro domínios em EF-hand na sua estrutura e constitui um dos sensores celulares principais do cálcio. Ao mimetizar o cálcio, o chumbo coopera com este na activação da calmodulina, activando a proteína em concentrações metálicas inferiores às que seriam necessárias apenas de cálcio - nestas circunstâncias pode dizer-se que a calmodulina fica hiperactiva. A activação da calmodulina desencadeia uma série de processos dependentes, desde numerosos processos de fosforilação e desfosforilação, ou a alteração do equilíbrio entre formação e degradação de proteínas sinalizadoras tais como o cAMP (AMP cíclico) ou o óxido nítrico. Também participa na modulação de diversos canais iónicos, incluindo os receptores NMDA (ácido N-metil-D-aspartico, receptor ionotrópico activado pelo ácido glutamato), os canais de cálcio e os canais de potássio activados pelo cálcio (Toscano e Guilarte 2005; Garza, *et al.* 2006).

O domínio C2 forma uma estrutura em sanduíche com vários locais de ligação a iões de cálcio e depende da ligação ao cálcio para ser capaz de ligar a fosfolípidos (Godwin 2001) e participar dessa forma na associação directa a membranas biológicas e a proteínas na sua vizinhança. As izoformas da proteína cinase C (PKC – *protein kinase C*) possuem este tipo de domínio de ligação ao cálcio. Ao substituir o cálcio na PKC, promovendo a ligação a fosfolípidos em concentrações muito inferiores às que são necessárias de cálcio (na ordem dos picomolares, contra as da ordem de micromolares de cálcio), o chumbo induz a expressão de novos genes por um mecanismo dependente da actividade dessa proteína (Bressler *et al.* 1999). As PKC participam em inúmeras funções celulares importantes, entre as quais se incluem funções de proliferação e diferenciação celulares, apoptose e na transdução na sinalização celular ou transmissão sináptica (Deng e Poretz 2002; IARC 2006a). A ligação ao chumbo desencadeia uma série de efeitos relacionados com a sua função, entre os quais se conta a dificuldade de aprendizagem que é dependente de transmissões sinápticas (IARC 2006a). Algumas isoformas têm também funções supressivas de tumores e de regulação de sistemas de reparação do ADN (Wang *et al.* 2008).

### *Interação com canais de cálcio*

Muitos dos processos de toxicidade do chumbo estão também relacionados com a propriedade de 2º mensageiro citoplasmático do  $\text{Ca}^{2+}$ . O  $\text{Pb}^{2+}$  interage com os canais de entrada de cálcio para a mitocôndria alterando a homeostasia intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  que resulta em apoptose (morte celular).

Os canais iónicos estão implicados na modulação da excitabilidade, sendo responsáveis pela rápida sinalização eléctrica em células excitáveis (Vijverberg *et al.* 1994; Garza, *et al.* 2006). O cálcio entra nas células através dos canais iónicos. Aqui também o chumbo ocupa os locais de ligação do cálcio, com dois efeitos simultâneos: impede a entrada dos iões de cálcio ao bloquear os canais, ao mesmo tempo que invade o interior celular. Dessa maneira, o chumbo é distribuído no interior celular acedendo aos diversos organelos, como a mitocôndria e o retículo endoplasmático. No primeiro, reduz o metabolismo energético e favorece a formação de radicais livres; no segundo inibe o funcionamento das ATPases de cálcio. O impedimento da entrada de cálcio nas células altera a excitabilidade celular e a homeostasia de cálcio o que pode resultar na morte celular (Lidsky e Scheider 2003; Garcia-Lestón 2007).

A capacidade do chumbo de atravessar a barreira cerebral deve-se essencialmente a esta característica de interferir com o funcionamento de bombas de cálcio dependentes de ATP (Lidsky e Scheider 2003).

Paralelamente a estes efeitos, ao interagir com os grupos sulfidrido, amino, carboxilo e fosfato nas membranas celulares, o chumbo afecta a integridade mecânica da membrana eritrocitária provocando a inibição do transporte activo e aumentando a permeabilidade passiva da membrana. A explicação bioquímica para esse efeito não está totalmente compreendida mas sabe-se que é acompanhado de inibição de ATPases dependentes de sódio e potássio (Na-K-ATPases) presentes na membrana do eritrócito (Goyer e Clarkson 2001), dando origem a perda de potássio intracelular, a uma consequente diminuição da pressão osmótica e a uma elevação do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (ATSDR 2007).

### 2.5.5. Produção de radicais livres

Outro mecanismo importante de produção de dano celular pelo chumbo é comum a todos os metais tóxicos e reside na produção de radicais livres. Estes formam-se no decurso de diversas reacções bioquímicas e funções celulares frequentes e normais (como o metabolismo mitocondrial), mas são geralmente mantidos em equilíbrio com os mecanismos celulares de antioxição.

Os radicais livres são moléculas instáveis e altamente reactivas. A sua formação e efeito em moléculas e nas funções celulares são geralmente denominados de stress oxidativo e ocorre quando a produção de espécies reactivas de oxigénio (EROs) supera o poder antioxidante celular, alterando o equilíbrio celular. As EROs são moléculas altamente reactivas por possuírem electrões desemparelhados, com capacidade para induzir danos significativos no ADN, em proteínas e em enzimas. Diversos processos patológicos quebram esse equilíbrio ao desencadarem um aumento descontrolado de radicais livres que reagem com diversos componentes celulares, como proteínas, lípidos e ADN, oxidando-os e danificando o ADN, as mitocôndrias e as membranas celulares o que pode resultar em apoptose.

O papel do chumbo na produção de radicais livres está associado a diversos processos (Ahamed e Siddiqui 2007). Por um lado, o ALA acumulado nos eritrócitos sofre processos de enolização e auto-oxidação dando origem à formação de EROs, como o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e os iões superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) (Bechara *et al.* 1993; Costa *et al.* 1997; Gurer e Ercal 2000). Por outro lado, o chumbo interage com os ácidos gordos membranares e altera a sua composição, com consequências para a integridade, permeabilidade e função membranares e aumentando a susceptibilidade destas a reacções de peroxidação lipídica (Bechara, *et al.* 1993; Costa, *et al.* 1997; Gurer e Ercal 2000).

Paralelamente, o chumbo altera os sistemas de defesa antioxidantes celulares ao interagir com proteínas antioxidantes como a glutatona (GSH). O papel da GSH (tripéptido que contém cisteína) é proteger as células contra as reacções de stress oxidativo, por mecanismos enzimáticos de detoxificação de EROs ou actuando como

co-factor ou co-enzima. O chumbo liga-se ao grupo –SH da cisteína, o que tem como consequência a diminuição dos níveis celulares de GSH e, logo, a diminuição da sua capacidade celular para neutralizar as EROs (Gurer e Ercal 2000; Ahamed e Siddiqui 2007).

Outras moléculas antioxidantes (metaloproteínas) dependem da ligação a metais essenciais (zinco, manganês) para exercerem as suas funções de destoxificação, como é o caso da CAT (catalase) e da SOD (superóxido dismutase). Essa dependência da ligação a metais faz delas também alvos potenciais para a toxicidade pelo chumbo (Ahamed e Siddiqui 2007).

A combinação de todos efeitos contribui para o stress oxidativo celular e, conseqüentemente, para o aumento de danos oxidativos celulares.

#### 2.5.6. Efeitos em cadeia

A inibição da biossíntese do heme resulta, então, numa diminuição da produção do grupo heme e na acumulação de ALA no organismo. A falta de disponibilidade do grupo heme impede que as proteínas, que têm o heme como grupo prostético, o integrem, o que resulta, por sua vez, na redução da disponibilidade dessas proteínas, como é o caso da hemoglobina e de diversos sistemas enzimáticos, entre os quais o citocromo P450 (CYP450). As enzimas do CYP450 desempenham diversos papéis importantes no organismo, entre os quais se incluem o metabolismo oxidativo, a síntese hormonal e o metabolismo de xenobióticos e da vitamina D. A redução da sua produção tem como consequência uma menor eficiência das reacções em que interfere, como parece ser o caso da conversão da vitamina D em 1,25-dihidroxitamina D.

O ALA, por sua vez, actua como agonista dos receptores de um neurotransmissor inibidor da transmissão pré-sináptica, o ácido gama aminobutírico (GABA). A similaridade estrutural entre o ALA e o GABA (FIGURA 6) faz com que o primeiro vá competir pelos receptores do segundo nas membranas de células nervosas, estimulando-

-os, no que se supõe ser um dos principais mecanismos de neurotoxicidade induzida pelo chumbo (Bechara 2004; Adhikari *et al.* 2006; Ahamed e Siddiqui 2007).

Os mecanismos através dos quais o chumbo interfere com os sistemas biológicos resultam numa grande variedade de alterações de gravidade variável para a saúde humana. Dito de outra forma, a exposição a chumbo afecta quase todos os equilíbrios celulares, mesmo aqueles que dependem de proteínas e sistemas que não são estruturalmente susceptíveis à sua acção.

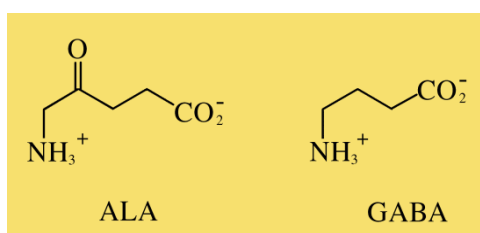


FIGURA 6 – Estrutura química das moléculas ALA e GABA (Bechara 2004).

## 2.6. Efeitos para a Saúde Humana

A toxicidade do chumbo manifesta-se em diversos órgãos e tecidos, nomeadamente no sistema hematopoiético, no sistema nervoso, no rim, no aparelho reprodutor, no sistema cardiovascular, no sistema endócrino e no sistema imunitário (Prista 2002).

Na generalidade assume-se que da interferência do chumbo com o funcionamento de alguns sistemas biológicos resultam um conjunto de alterações ao nível dos processos de transporte através das membranas, da integridade estrutural e funcional das enzimas e de várias vias metabólicas, em especial da fosforilação oxidativa e da síntese do heme (Marqués 1993).

Os primeiros efeitos bioquímicos do chumbo são detectados a partir de valores de plumbémia inferiores a 10 µg/dL. As manifestações clínicas mais precoces evidenciam-se só quando os níveis sanguíneos de chumbo ultrapassam os 30 µg/dL (Marqués 1993; Lauwerys 1999; ATSDR 2005, 2007). Enquanto entidade nosológica de origem

profissional, a intoxicação por chumbo e seus sais (saturnismo) é reconhecida em Portugal como doença profissional (grupo 1 - Doenças Provocadas por Agentes Químicos, código 11.01, da Lista das Doenças Profissionais), de acordo com o Decreto-Regulamentar nº 76/2007 de 5 de Maio.

Os sinais e sintomas da intoxicação saturnínica, nomeadamente nas fases iniciais, são vagos, difusos e de grande inespecificidade, tornado difícil a sua distinção de muitas outras entidades clínicas. Regra geral predominam, inicialmente, os sintomas de natureza gastrointestinal, com dor abdominal do tipo cólica, que não cede aos analgésicos ou aos anti-espasmódicos e é quase sempre acompanhada de obstipação, sabor metálico na boca e náuseas matinais, geralmente sem vômitos. Por vezes o quadro sugere e simula, mesmo, uma síndrome obstrutiva intestinal. Outros sintomas e sinais da intoxicação incluem, ainda, perda de apetite, palidez, mal-estar, fadiga, insónias, cefaleias, irritabilidade, mialgias e artralguas, tremores finos, é défice da memória de curto prazo e da capacidade de concentração (Davidson 1994; Prista 2002). No entanto a ocorrência dos sintomas e sinais das formas clínicas integrantes do saturnismo são, hoje em dia, cada vez menos frequentes, face ao desenvolvimento de medidas de prevenção, nomeadamente no que respeita à diminuição da exposição e ao incremento qualitativo da vigilância médica. É, contudo, preocupação constante, a pesquisa daquilo que resulta da exposição contínua a baixas concentrações de chumbo (como é característico da exposição ocupacional) – os efeitos adversos que daí possam advir, os mecanismos pelos quais ocorrem e a expressão dessas alterações.

### 2.6.1. Órgãos e sistemas

O efeito crítico da acção do chumbo situa-se no sistema hematopoiético ao nível da cadeia de síntese da hemoglobina (Lauwerys 1999; Papanikolaou, *et al.* 2005). O défice de produção de heme nos eritroblastos por virtude das inibições enzimáticas provocadas pelo chumbo (ALA-D, ferroquelatase, CPG oxidase e, em menor extensão, PBG desaminase) e a redução do tempo de vida dos eritrócitos (na sequência da inibição da enzima P5N), resultam na redução nos níveis circulantes de hemoglobina e na inibição

de metabolismos dependentes do citocromo P450 (Sakai *et al.* 1988; Marqués 1993; Amici, *et al.* 1994; Goyer e Clarkson 2001). Alguns destes efeitos são detectáveis, a nível bioquímico, a concentrações de chumbo inferiores a 10 µg/dL. Mas a diminuição dos níveis de hemoglobina só se regista a valores de plumbémia da ordem dos 50 µg/dL e um quadro de anemia só é identificável para valores superiores a 80 µg/dL (Prista 2002; SCOEL 2002).

A intoxicação crónica pelo chumbo pode reflectir-se ao nível dos sistemas nervoso central e periférico (CSD 1999; Prista 2002). Por um lado, o chumbo interfere com o metabolismo de neurotransmissores como a acetilcolina e as catecolaminas (CSD 1999; Prista 2002); por outro, e pela semelhança estrutural com o neurotransmissor GABA (FIGURA 6), a acumulação de ALA induzida pelo chumbo actua como antagonista do GABA, danifica os seus receptores e estimula a libertação de glutamato, podendo mesmo estar envolvida na morte de células nervosas (estudos de Demasi e col. 1996, Choi 1994 e Brennan e Cantrill 1979 citados por Adhikari e col. (2006)). Em indivíduos com plumbémia na ordem de 40 µg/dL e superiores, têm sido registadas alterações no desempenho de testes neuropsicológicos (SCOEL 2002).

O quadro mais dramático da encefalopatia saturnínica é, hoje em dia, uma situação rara no trabalhador exposto, já que os níveis de exposição crónica e as medidas de prevenção, designadamente no âmbito da vigilância médica, tornaram esta situação apenas referencial (Lauwerys 1999; Hu 2002; Prista 2002). Os efeitos da acção neurotóxica central evidenciam-se por alterações ao nível cognitivo, somático e afectivo e podem manifestar-se por diminuição das capacidades intelectuais, perturbações da memória e do sono, ansiedade, perda de memória, dificuldade de concentração fadiga, irritabilidade, cefaleias, alterações da personalidade e do humor, surdez, afasia transitória, hemianópsia e amaurose (OSHA 1993; Duc *et al.* 1994; Lauwerys 1999; Prista 2002).

Ao nível do sistema nervoso periférico a acção tóxica do chumbo repercute-se por degenerescência axonal e desmielinização segmentar com particular incidência sobre os neurónios motores. São detectáveis alterações na velocidade de condução destes nervos a níveis sanguíneos de chumbo na ordem dos 30 a 40 µg/dL (Landrigan e Todd 1994;

Goyer 2001). Mantendo-se a exposição, o quadro facilmente evolui, manifestando-se por parestesias, fraqueza muscular, mialgias e câibras e, embora pouco frequente hoje em dia, podendo determinar uma polinevrite motora com paralisia, primeiro, classicamente ao nível dos membros superiores mas podendo comprometer igualmente os membros inferiores (Marqués 1993; Duc, *et al.* 1994; Lauwerys 1999; Goyer e Clarkson 2001; Prista 2002).

Ao nível do rim a acção do chumbo determina dois tipos de alterações patológicas: uma alteração tubular aguda, reversível, e uma nefropatia crónica intersticial (Prista 2002). Na fase inicial é característica a presença de corpos de inclusão nuclear nas células tubulares que se devem a uma ligação entre o chumbo e grupos carboxilo de aminoácidos. Estes corpos desaparecem progressivamente à medida que a atrofia tubular progride e se desenvolve tecido fibroso peritubular e intersticial (Khalil-Manesh *et al.* 1992a; Goyer 2001). É uma nefropatia hiperuricémica e que, em cerca de metade dos casos, é acompanhada de episódios de artrite gotosa (gota saturnínica), no que contrasta com as insuficiências renais de outra etiologia (Yu e Brenner 2002 e Duc, Kaminsky e Klein 1994 citados por Prista (Prista 2002)).

Embora alguns estudos tenham indiciado sinais de disfunção renal associados a plumbémia a partir de 40 µg/dL (Osterloh e col. 1989; Batuman e col. 1981, Campbell e col. 1977, e Khalil-Manesh (1992b) citados por Prista (2002)), não há dados suficientemente claros que permitam assumir que alterações significativas da função renal, associadas a exposição a chumbo, sejam detectáveis a níveis de plumbémia inferiores a 60 ou 70 µg/dL (Lauwerys 1999; SCOEL 2002).

No que respeita a efeitos sobre os órgãos reprodutores, diversos estudos laboratoriais e epidemiológicos vêm concluindo, em síntese, pela existência de uma associação entre um decréscimo do número, volume, motilidade e alterações morfológicas dos espermatozóides, com concentrações sanguíneas de chumbo superiores a 40 µg/dL. Não está contudo esclarecido se tal se relaciona com uma acção directa do chumbo sobre os órgãos reprodutores, no controlo endócrino da reprodução ou em ambos, bem como qual a importância do depósito de chumbo nos tubos seminíferos ou nos próprios



espermatozóides (Marqués 1993; Alexander *et al.* 1998b; Apostoli *et al.* 1998; Telisman *et al.* 2000; Prista 2002; SCOEL 2002; IARC 2006a).

Mulheres expostas a chumbo apresentam maior frequência de infertilidade e abortos espontâneos e diversos estudos epidemiológicos vêm dando consistência a esta constatação, desconhecendo-se o mecanismo de acção que a determina (IPCS 1995; Borja-Aburto *et al.* 1999; Torres-Sanchez *et al.* 1999; Apostoli *et al.* 2000). Trata-se, contudo, de resultados obtidos em estudos sobre situações de exposição ocupacional a elevadas concentrações de chumbo, pelo que os riscos de exposição de baixa intensidade não estão bem elucidados (Marqués 1993; Gonçalves 1997; Prista 2002; IARC 2006a).

Para além desses efeitos, o chumbo atravessa a placenta e é transferido de mãe para filho durante a gravidez, ficando este exposto a concentrações equivalentes às que a mãe está exposta, com consequências para o seu desenvolvimento cognitivo (Gonçalves 1997; CSD 1999; SCOEL 2002).

Também o sistema imunitário é alvo da toxicidade induzida pelo chumbo. Diversos estudos realizados sobre trabalhadores expostos permitiram verificar que a exposição a chumbo afecta a resposta imune, sendo referenciadas alterações na função linfocitária, na produção de citocinas e nos níveis de imunoglobulinas (Fischbein *et al.* 1993a; Fischbein *et al.* 1993b; Undeger *et al.* 1996; Sata *et al.* 1997; Boscolo *et al.* 1999; Basaran e Undeger 2000). Tal responderia, por exemplo, pela maior susceptibilidade a infecções, identificada há mais de vinte anos por Ewers e col. em trabalhadores expostos a chumbo (IPCS 1995).

Permanece envolta em elevada controvérsia a acção do chumbo sobre o sistema cardiovascular e a sua eventual responsabilidade em quadros clínicos correspondentes. A investigação dos últimos vinte anos vem indiciando que a exposição a chumbo, mesmo a doses relativamente baixas, poderá estar associada a uma elevação significativa da tensão arterial (Goyer (2001) e EPA 1989 citados por Prista (2002)). Diversas explicações têm sido sugeridas para justificar a relação - os efeitos do chumbo ao nível renal e uma acção tóxica directa sobre o tecido muscular liso dos vasos sanguíneos

(Pirkle *et al.* 1985; Landrigan 1989), um decréscimo da actividade das bombas de sódio e potássio ligadas à ATPase conduzindo à estimulação das trocas entre cálcio e sódio com aumento do cálcio intracelular (Duc, *et al.* 1994; IPCS 1995; Goyer 2001), um aumento da actividade plasmática da renina, da angiotensina e da enzima conversora da angiotensina (Campbell, 1985 citado por Lauwerys (1999)).

Não obstante os estudos que vêm indiciando a associação da exposição a chumbo com a elevação da pressão arterial ou outras doenças cardio-vasculares, a falta de robustez dessa associação em vários dos casos (ou mesmo a sua inexistência) desaconselha uma conclusão definitiva. Uma relação causa-efeito entre a plumbémia e a tensão arterial, ou outros efeitos no sistema cardiovascular e os mecanismos eventualmente envolvidos são, assim, ainda assumidos como questão por esclarecer (IPCS, 1995). A tabela 2 resume os efeitos da exposição a chumbo observáveis no ser humano.

TABELA 2 – Efeitos observáveis da exposição a chumbo e valores de Pb-S relacionados (adaptado de IARC (2006a), ATSDR (2005) e SCOEL (2002)).

LOAL Pb-S (µg/dL)	Efeitos			
	Hematológicos	Neurológicos	Renais e Cardiovasculares	Reprodutores
≥ 100		Encefalopatia	Nefropatia crónica	
80	Anemia			
60				Efeitos sistema reprodutor feminino
50	< produção de hemoglobina			
40	> ALA e COPRO urinárias	SNP: < condução neuronal;  SNC: alterações neurocomportamentais	Sinais precoces mau funcionamento renal	< fertilidade

LOAL Pb-S (µg/dL)	Efeito			
	Hematológicos	Neurológicos	Renais e Cardiovasculares	Reprodutores
30				Disfunção testicular
25-30	> PPZ (homens)		< tensão arterial	
15-20	> PPZ (mulheres)			
< 10	< actividade da ALAD < actividade P5N			

>, aumento; <, diminuição; ALAD, desidratase do ácido δ-aminolevulínico; ALA, ácido δ-aminolevulínico; COPRO, coproporfirina ;PPZ, protoporfirina de zinco; P5N, pirimidina 5'-nucleotidase; SNC, sistema nervoso central; SNP, sistema nervoso periférico; LOAL, *Lowest Observable Effect Level*

### 2.6.2. Carcinogénese e genotoxicidade

O chumbo é, desde 2006, considerado pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) uma substância carcinogénica do grupo 2A (provável carcinogénio para o ser humano). Considera-se, assim, que o chumbo tem, inequivocamente, capacidade de induzir cancro em animais experimentais mas que, embora haja fortes indícios de que os mecanismos que medeiam a carcinogénese desses compostos ocorrem no ser humano, os dados disponíveis ainda não podem assegurar essa relação (IARC 2006a).

A carcinogénese, entendida como o processo de transformação de células normais em malignas, em que a acumulação sequencial de mutações resulta no aparecimento de células capazes de crescerem autonomamente e de invadirem outros tecidos (neoplasia), envolve diversos passos que, genericamente, compreendem a iniciação, a promoção, a progressão e a metastização (Leonard e Bernard 1993; Ross 1998b; Bertram 2001; Wang e Shi 2001).

O passo crítico, a iniciação, envolve a indução de uma alteração genética, geralmente a ocorrência de mutações em proto-oncogenes com a consequente activação de oncogenes

(genes que estimulam a proliferação celular ou que conferem protecção contra a morte celular) em genes supressores de tumores responsáveis pela regulação/inibição da proliferação celular (resultando na sua inactivação). Nas células normais, os proto-oncogenes promovem o crescimento celular, numa acção equilibrada com genes supressores de tumores que actuam como inibidores do crescimento celular. Mutações nestes genes resultam na perda do controlo dos processos de crescimento e morte celulares (Venitt e Phillips 1995; Ross 1998b; Bertram 2001; Preston e Hoffmann 2001). Outras ocorrências que não requerem necessariamente dano genético, como a activação da transcrição, recombinação e/ou amplificação de oncogenes, também podem resultar na iniciação do processo de carcinogénese (Wang e Shi 2001).

Após esta transformação inicial a célula pré-neoplásica pode permanecer em dormência até que a proliferação seja facilitada por um agente promotor. Este segundo estágio da carcinogénese (a promoção da divisão celular) envolve a proliferação celular de linhas celulares já mutadas. É um processo reversível, caracterizado por alterações da expressão genética e de sinalização celular com conseqüente crescimento de um clone a partir de uma célula iniciada na primeira fase e que resulta no crescimento de células neoplásicas (Ross 1998b; Preston e Hoffmann 2001; Wang e Shi 2001).

A desregulação da proliferação celular acaba por resultar no aumento da taxa de mutações nas células descendentes (clonais). À medida que a taxa de mitose aumenta, cresce a probabilidade de ocorrência de danos genéticos, assim como a probabilidade de falharem os mecanismos de reparação. A acumulação destas mutações num processo de continuação da proliferação celular constitui a fase de progressão. Resulta no aumento de instabilidade genética, na desregulação total do crescimento celular e em alterações fenotípicas no número e/ou no rearranjo dos cromossomas de forma irreversível. As células neoplásicas dão então origem a um tumor maligno. Como resultado há um aumento da taxa de crescimento celular, a invasão de tecidos saudáveis e a formação de metástases (Ross 1998b; Bertram 2001; Preston e Hoffmann 2001)

O processo de transformação duma célula normal em neoplásica envolve, portanto, diversas lesões genéticas que se acumulam ao longo da vida celular, e requer a ocorrência de divisão celular. Podem passar-se muitos anos (décadas) até que esta

transformação celular seja clinicamente detectável e reconhecida como tumor (Bertram 2001; Wogan *et al.* 2004).

Os agentes mutagénicos contribuem para a carcinogénese como iniciadores, embora o seu papel não tenha que se cingir a essa fase, uma vez que podem também contribuir para as diversas alterações genéticas que caracterizam as fases seguintes do processo carcinogénico. Mas há outros agentes que podem contribuir para a carcinogénese, como promotores, sem serem no entanto mutagénicos (Preston e Hoffmann 2001).

Wogan e col. (2004) distinguem os agentes capazes de induzir lesões genéticas (ou dano genético) em dois grupos, nomeadamente, os que resultam de agentes exógenos como substâncias químicas, vírus e radiações e, por outro lado, as moléculas reactivas resultantes de processos celulares normais (espécies reactivas de oxigénio (EROs) e de azoto, assim como as que resultam dos processos de alquilação, depurinação e desaminação). Os tipos de dano produzido pelos primeiros são diversos, desde quebras nas cadeias de ADN (simples ou duplas), cruzamentos (cross-links) entre bases de ADN ou destas com proteínas e adição de substâncias químicas a bases de ADN (aductos) (Preston e Hoffmann 2001).

Os agentes químicos podem induzir dano genético por diversos mecanismos e, apesar de, por si só, o dano genético não constituir um evento mutagénico, ele pode dar origem, se não for reparado, a uma mutação durante o processo de replicação do ADN. Assim, os agentes químicos são considerados (1) mutagénicos, quando o dano genético resulta em mutações pontuais (alterações em bases na sequência de ADN: duplicações, inserções, inversões e translocações), ou (2) genotóxicos, quando dão origem a alterações numéricas e/ou estruturais dos cromossomas, interferindo com os processos normais de divisão celular, de metilação do ADN ou de síntese e reparação do ADN (Wogan, *et al.* 2004).

Muitos metais carcinogénicos para o homem actuam por mecanismos que envolvem mais do que uma das fases de desenvolvimento do cancro, ou mesmo todas elas. Os metais têm mecanismos moleculares de carcinogénese próprios que variam muito de metal para metal, estando muitos deles ainda por identificar e compreender (Wang e Shi

2001; Beyersmann 2002). A carcinogénese metálica envolve frequentemente a acção conjunta de mais do que um composto: um, mutagénico, que actua como agente iniciador e outro, ou outros, que actuam como agentes promotores, ao estimularem a divisão genética, alterarem a expressão celular e/ou a sinalização celular (Ross 1998b; Wang e Shi 2001; Beyersmann 2002). Diversos autores têm vindo também a referir a provável participação de EROs e a interacção com os processos de reparação do ADN em todos os mecanismos de carcinogénese por metais (Wang e Shi 2001; Hartwig e Schwerdtle 2002; Bower *et al.* 2005; IARC 2006a).

A maior parte dos dados sobre os efeitos carcinogénicos de metais é obtida em estudos realizados em modelos animais. No entanto, são os estudos epidemiológicos que constituem a principal ferramenta para compreender os efeitos no ser humano, assim como a relação entre exposição e carcinogénese (Magos 1991; Bower, *et al.* 2005). O potencial efeito genotóxico do chumbo no ser humano, por exemplo, tem sido estudado essencialmente em trabalhadores expostos em diferentes indústrias e na população em geral, embora haja trabalhos, como o de Shaik e col., que incidem sobre os efeitos em culturas *in vitro* de linhas celulares como as de linfócitos de sangue periférico humano (Shaik *et al.* 2006).

A indução de proliferação celular pelo chumbo foi observada, em laboratório, ao nível do rim, do fígado e de células embrionárias, podendo ocorrer por mecanismos envolvendo a síntese ou a reparação do ADN (IPCS 1995; Goyer 2001; SCOEL 2002).

No que se refere aos dados em humanos, duas meta-análises sugerem a existência de um risco acrescido de ocorrência de cancro no pulmão, bexiga e estômago em populações expostas ocupacionalmente a chumbo inorgânico (Fu e Boffetta 1995; Steenland e Boffetta 2000). Grande parte dos estudos incluídos nestas revisões apresenta porém alguns factores (considerados confundentes) que impedem que seja tirada a conclusão de que estes cancros se devem apenas à exposição a chumbo. Nomeadamente, muitos deles referem a existência de co-exposição a agentes reconhecidamente carcinogénicos como o arsénio e o crómio e são omissos ou pouco esclarecedores no que se refere a hábitos tabágicos (factor que se sabe ter influência nestes tipos de cancro), assim como quanto a dados quantitativos de dose-resposta.

Num documento recente de revisão elaborado e publicado pela *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR), é evidenciado que os resultados de trabalhos publicados em que se avaliou a capacidade do chumbo para induzir aberrações cromossômicas (CA), micronúcleos (MN) e trocas de cromátides irmãs (SCE) em linfócitos humanos, indiciam que o chumbo é um agente clastogénico por ser capaz de causar este tipo de alterações nos cromossomas humanos, embora se saliente que os dados analisados não são sempre consistentes (ATSDR 2007).

Na TABELA 3 são apresentados (e resumidos o essencial dos resultados e conclusões) os principais artigos publicados, desde 1997, com o intuito de avaliar o potencial genotóxico do chumbo, com base em diversos biomarcadores, em populações expostas ocupacionalmente a esse metal. De uma forma geral, os resultados destes estudos indiciam haver alterações nos diversos biomarcadores de genotoxicidade, no sentido de aumento na indução de efeitos genotóxicos nos grupos expostos quando comparados com grupos não expostos, em linfócitos de sangue periférico.

Os dados obtidos pelo teste do Cometa ou electroforese em microgel (SCGE) são indicativos da existência de dano genético, pela presença de quebras da cadeia de ADN e/ou de locais alcali-lábeis (Tice 1995; Collins *et al.* 1997; Kassie *et al.* 2000). Os estudos que avaliaram o dano no ADN com base no teste do Cometa deram origem, de uma forma geral, a aumentos significativos nos parâmetros avaliados – percentagem de células com cauda, valores do comprimento da cauda (TL), percentagem de ADN na cauda (TD) e do momento da cauda (TM) – este último é calculado pelo quociente dos dois anteriores,  $TM = TL \times TD$  (Ye *et al.* 1999; de Restrepo *et al.* 2000; Fracasso *et al.* 2002; Danadevi *et al.* 2003; Marthino-Roth *et al.* 2003; Palus *et al.* 2003; Steinmetz-Beck *et al.* 2005; Chen *et al.* 2006). Adicionalmente, Fracasso e col. e Ye e col. avaliaram parâmetros indicativos de stress oxidativo e os dados que obtiveram (associação entre estes e o dano no ADN) indicam poder ser esse um dos mecanismos através dos quais o chumbo causa dano genético (Ye, *et al.* 1999; Fracasso, *et al.* 2002).

Marthino-Roth e col. também encontraram valores aumentados de dano genético (MN e teste do Cometa) num grupo de trabalhadores de uma indústria de produção de baterias e em pintores de automóveis. Neste estudo, no entanto, não podem ser tiradas

conclusões sobre se os efeitos se devem ao chumbo, uma vez que os compostos a que os trabalhadores estão expostos não são especificados (Marthino-Roth, *et al.* 2003).

Shaik e Jamil referem ter encontrado efeitos da exposição ao chumbo na frequência de dano de genético (teste do cometa) e de CA (Shaik e Jamil 2009). Mas também não especificam a existência ou não de co-exposição a outros agentes na indústria estudada.

Os estudos que avaliaram diversos parâmetros citogenéticos, como a indução de MN e de SCE, verificaram haver um aumento da frequência dos mesmos nos grupos expostos a chumbo em indústrias diversas (Vaglenov *et al.* 1997; Vaglenov *et al.* 1998; Duydu *et al.* 2001; Vaglenov *et al.* 2001; Wu *et al.* 2002; Duydu e Süzen 2003; Palus, *et al.* 2003; Chen, *et al.* 2006). No entanto, no trabalho onde foram avaliadas CA, não se verificaram diferenças nas frequências no grupo exposto e no grupo não exposto, apesar de o valor médio de plumbémia no grupo exposto ser consideravelmente elevado (72,66 µg/dL) e significativamente superior ao valor encontrado no grupo não exposto (4,41 µg/dL). Há que notar que estes autores observaram, sim, ocorrer uma redução na capacidade de reparação do ADN nos indivíduos expostos a chumbo, redução que, no entanto, não é estatisticamente significativa (Karakaya *et al.* 2005).

Wu e col. avaliaram também a relação entre a quantidade de cruzamentos entre ADN e proteínas (cross-links) e a plumbémia em trabalhadores de indústrias de fabrico de baterias, tendo concluído haver um aumento significativo desse parâmetro quando comparados com um grupo não exposto (Wu, *et al.* 2002).

Chen e col. (2006) não encontraram diferenças estatisticamente significativas na frequência de mutações no ensaio de mutação no receptor de TCR (TCR) entre o grupo de trabalhadores exposto e trabalhadores não expostos. No entanto, é o único trabalho que utiliza este ensaio para avaliar em trabalhadores expostos a chumbo.

No trabalho publicado por Hengstler e col. o parâmetro analisado, o ensaio de eluição alcalina, foi usado para avaliar a quantidade de quebras simples de ADN em trabalhadores de dez tipos diferentes de indústrias com exposição a chumbo e a outros compostos. Apesar de não ter sido detectada qualquer associação entre os valores deste



parâmetro com os valores da plumbémia dos trabalhadores ou mesmo com os valores de chumbo no ar, verificou-se a existência de uma boa correlação entre este parâmetro e as concentrações de cádmio e de cobalto no ar. Estes autores sublinham, entretanto, haver um reforço da genotoxicidade nos casos em que se verificou co-exposição aos três metais, sugerindo a ocorrência de interacção entre eles na indução de genotoxicidade (Hengstler *et al.* 2003).

A co-exposição a outros compostos com propriedades genotóxicas e carcinogénicas é, aliás, uma questão difícil de torrear quando se quer avaliar o potencial genotóxico do chumbo em populações expostas, ocupacional ou ambientalmente. Os estudos humanos de genotoxicidade do chumbo deparam recorrentemente com a dificuldade de identificar e controlar todas as variáveis confundentes, principalmente no que respeita a co-exposição, o que pode contribuir para o facto de diversos estudos efectuados em populações humanas com exposição ao chumbo resultarem em dados e conclusões contraditórios o que poderá, muitas vezes, explicar algumas das aparentes inconsistências e contradições entre diferentes estudos (IARC 2006b).

Silbergeld (2003) propõe que os resultados obtidos nesses estudos sejam observados sob uma perspectiva diferente, nomeadamente, procurando evidências de que ocorram interacções entre o chumbo e outros compostos para estudar se é possível que a acção do chumbo seja a de facilitar o mecanismo de carcinogénese, quando em conjunto com outros compostos carcinogénicos, e não a de o provocar por si só. Ou seja, embora dos estudos efectuados não tenham resultado na obtenção de dados suficientemente claros que indiquem que o chumbo tem, por si só, propriedades carcinogénicas, estes sugerem que a exposição simultânea a chumbo e a outros compostos genotóxicos e/ou carcinogénicos (tão variados como arsénio, cádmio, fumo de tabaco e fumos de escapes automóveis) pode aumentar o risco de ocorrência de cancro, em comparação com a exposição aos mesmo compostos na ausência de co-exposição a chumbo (Anttila *et al.* 1995; Lundström *et al.* 1997; Englyst *et al.* 2001). Por outro lado, acresce que os casos de cancro encontrados em trabalhadores expostos a chumbo ocorrem em órgãos normalmente associados a esses outros compostos, como os sistemas respiratório e gastrointestinal (Goyer e Clarkson 2001; Silbergeld 2003).

Adicionalmente, dados obtidos em grupos não expostos ocupacionalmente a chumbo, como crianças a viverem nas imediações industriais e elementos da população geral voluntários para ingerir acetato de chumbo, a determinação de SCE, CA e dano oxidativo originaram resultados negativos (IARC 2006a).

Ou seja, em concentrações elevadas, o chumbo parece ligar-se ao ADN mudando a sua conformação e causando genotoxicidade por acção directa (Silbergeld 2003). Mas há, por outro lado, dados que apontam para a hipótese de o chumbo, a concentrações não citotóxicas, geralmente as encontradas nos estudos de genotoxicidade, não interagir directamente com o ADN (Silbergeld 2003; IARC 2006b). Há também estudos que obtiveram resultados positivos para parâmetros de avaliação de danos oxidativos associados à exposição a chumbo que apontam para que os danos oxidativos ao ADN constituam um mecanismo envolvido na toxicidade genética do chumbo (Vaglenov, *et al.* 2001; Fracasso, *et al.* 2002).

Este conjunto de dados parece indiciar que o papel do chumbo no processo de carcinogénese não é um papel de danificar directamente o ADN, mas será mais um papel facilitativo da ocorrência de carcinogénese, ao reduzir a capacidade celular de reparação do ADN, danificado por outros agentes (Silbergeld *et al.* 2000; IARC 2006a).

TABELA 3 – Resultados de estudos de genotoxicidade em populações expostas em contexto ocupacional (desde 1997): frequência de micronúcleos (MN), trocas de cromátides irmãs (SCE), aberrações cromossômicas (AC) e Comet assay (SCGE).

Ref.	País e Indústria	Grupo(s) Estudado(s) OE/NOE	Notas e Principais Conclusões	Biomarcadores Estudados	Resultados
(Vaglenov, et al. 1997) (resumo)	Bulgária Produção de baterias automóveis	73/23  (homens)	<p><u>Grupo OE dividido em 4 grupos profissionais diferentes</u> (Pb no ar):</p> <p>Moagem (n = 23) – 0,7 mg/m<sup>3</sup></p> <p>Linha de montagem (n = 21) – 0,384 mg/m<sup>3</sup></p> <p>Empilhamento de placas (n = 20) – 0,233 mg/m<sup>3</sup></p> <p>Montagem final (n = 9) – 0,193 mg/m<sup>3</sup></p> <p>NOE – 0,06 mg/m<sup>3</sup></p> <p><u>Os autores não apresentam conclusões no resumo.</u></p>	<b>Pb-S</b>	Resultados não apresentados no resumo.
				<b>MN</b>	<p>Média MN grupo OE: moagem: 51,1±18,0; Linha de montagem: 46,5±21,7; empilhamento de placas: 37,3±14,8; montagem final: 35,2±15,3.</p> <p>Média MN grupo NOE: 20,1±9,0.</p> <p>Dependência linear: MN = 33,2+8,21 por µmol/L Pb, coeficiente de correlação r=0.869</p> <p>Hábitos tabágicos: Sem efeito no grupo OE; grupo NOE: frequências MN <u>Sig. maiores</u> em fumadores do que em não fumadores (p &lt; 0.05).</p>
(Vaglenov, et al. 1998)	Bulgária Produção de baterias automóveis	22/38  (homens)	<p><u>Objectivo:</u> avaliar o efeito genotóxico do chumbo através do ensaio do MN e pela avaliação dos efeitos anti-mutagénicos do tratamento com uma polivitamina (PV) – tratamento durante 4 meses.</p> <p><u>NOE:</u> 19 (controlo interno / pessoal administrativo da mesma empresa) e 19 (controlo externo / pessoal administrativo de fora da empresa).</p> <p>Média Pb ar (OE) = 0,444 ± 0,052 mg/m<sup>3</sup></p> <p><u>Os trabalhadores desta indústria não estão expostos a outros agentes potencialmente genotóxicos. Os autores concluem que o chumbo é genotóxico quando a exposição é elevada. Os efeitos genotóxicos podem ser reduzidos com 1 tratamento com suplemento polivitamínico de 4 meses.</u></p>	<b>Pb-S</b>	<p>Média NOE interno (1,33 µmol/L) maior que média NOE externo (0,88 µmol/L).</p> <p>Média OE = 2,94 ± 0,15 µmol/L.</p>
				<b>MN/BNMN</b>	<p>Média BNMN no grupo OE <u>Sig. maior</u> (p &lt; 0.001) do que BNMN no grupo NOE.</p> <p>BNMN no grupo NOE interno maior que BNMN no grupo NOE externo.</p> <p><u>Diminuição Sig.</u> (p &lt; 0.001) de MN e BNMN após tratamento com PV no grupo OE (~4 vezes).</p> <p>Sem corr. Sig. de BNMN com idade, hábitos tabágicos, anos de trabalho, concentração de Pb no ar nem com PB-S.</p>
(Ye, et al. 1999)	China Fundição secundária	66/28  (homens e mulheres)	<p><u>Objectivo:</u> avaliar o stress oxidativo induzido pelo chumbo</p> <p>Os autores não referem a existência ou não de co-exposição a outros agentes carcinogénicos.</p> <p><u>Valores de Pb-S:</u></p>	<b>Pb-S</b>	---
				<b>MDA</b>	<p>Sem efeito de hábitos tabágicos ou de consumo de bebidas alcoólicas.</p> <p>Efeito de PB-S: <u>correlação sig positiva</u> de MDA com PB-S .</p>

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA  
2. Exposição humana ao chumbo

Ref.	País e Indústria	Grupo(s) Estudado(s) OE/NOE	Notas e Principais Conclusões	Biomarcadores Estudados	Resultados
			<p>1 : Pb-S <math>\leq</math> 13 <math>\mu\text{g}/\text{dL}</math>            2 : <math>13 &lt; \text{Pb-S} &lt; 27 \mu\text{g}/\text{dL}</math>            3 : <math>27 &lt; \text{Pb-S} &lt; 37 \mu\text{g}/\text{dL}</math>            4 : Pb-S <math>&gt;</math> 37 <math>\mu\text{g}/\text{dL}</math></p> <p><u>Quantificação do dano do ADN em 5 níveis com base na % de ADN na cauda do cometa: nível 0: <math>&lt; 5\%</math>; nível 1: 5-19%; nível 2: 20-39%; nível 3: 40-95%; nível 4: <math>&gt; 95\%</math>.</u></p> <p><u>Os autores concluem que o stress oxidativo pode ter um papel importante na indução do cancro relacionado com a exposição a chumbo.</u></p>	<p><b>Actividade SOD</b></p> <p>Sem efeito do consumo de tabaco ou de álcool. Valores dos grupos 2, 3 e 4 <u>sig. maiores</u> que os do grupo 1.</p>	
				<p><b>SCGE</b> (classificação visual)</p> <p>Efeito Pb-S: Dano no ADN <u>aumenta</u> com o aumento de Pb-S. <u>Corr. Positiva</u> entre MDA e o dano no ADN.</p>	
(de Restrepo, et al. 2000)	Colômbia Produção de baterias automóveis	43/13  (homens)	<p><u>Objectivo:</u> avaliar o efeito do chumbo nos processos de reparação do ADN por determinação da taxa de reparação de quebras induzidas de cadeia simples (SSB).</p> <p>Dano do ADN (migração) avaliada antes e depois da exposição <i>in vitro</i> a raios X (300 cGy) com o objectivo de estudar o dano ao ADN basal e a eficiência de reparação de SSB induzidas por irradiação (tempo 0); incubação a 37°C durante 30, 60 e 120 min.</p> <p>Determinações hematológicas: anemia em 5,9 % e ponteados basófilos em 58,8 % do grupo OE.</p> <p><u>Valores PB-S:</u> 1 (normais) : <math>\text{PB-S} &lt; 40 \mu\text{g}/\text{dL}</math> (n = 13)            2 (aceitáveis): <math>40 \leq \text{PB-S} \leq 80 \mu\text{g}/\text{dL}</math> (n = 13)            3 (excessivos): <math>80 \leq \text{PB-S} \leq 120 \mu\text{g}/\text{dL}</math> (n = 22)            4 (perigosos): <math>\text{PB-S} &gt; 120 \mu\text{g}/\text{dL}</math> (n = 8)</p> <p><u>Os autores consideram que o efeito da existência de outras exposições é mínimo, não sendo importante tê-las em consideração.</u></p>	<p><b>PB-S</b></p> <p>Média grupo OE (98,5<math>\pm</math>25,3 <math>\mu\text{g}/\text{dL}</math>) <u>sig. maior</u> do que média grupo NOE (5,4 <math>\pm</math>3,6 <math>\mu\text{g}/\text{dL}</math>). ~70 % grupo OE com valores de Pb-S considerados excessivos ou perigosos (grupos 3 e 4).</p>	
				<p><b>SCGE</b> <b>(TL)</b></p> <p>Antes do tratamento por irradiação o grupo 4 apresentava valores de TL <u>sig. Maiores</u> do que o grupo 1 (p &lt; 0.05). Não se verificou efeito dos hábitos tabágicos (apenas 9 % da população estudada era fumadora).</p> <p>Depois da irradiação: imediatamente após (tempo 0): <u>diferenças sig.</u> encontradas na maioria das classes de PB-S (p &lt; 0.05).</p> <p>Sem diferenças sig. após vários tempos de incubação.</p> <p><u>PB-S aparece como o factor principal a provocar o aumento de dano no ADN após irradiação</u> (por comparação com idade, anos de exposição e dano do ADN inicial).</p>	
(Vaglenov, et al. 2001)	Bulgária Produção de baterias automóveis	103/78  (homens)	<p><u>Objectivo:</u> avaliar os efeitos genotóxicos do chumbo com base no ensaio do MN</p> <p>3 períodos independentes de colheita de amostras.</p> <p>NOE: 43 (grupo interno) e 35 (grupo externo)</p> <p>Indivíduos expostos a outros agentes genotóxicos não foram</p>	<p><b>PB-S</b></p> <p>Média grupo OE (2,7<math>\pm</math>0,10 <math>\mu\text{M}/\text{L}</math>) 3 vezes mais elevada que a média grupo NOE (0,91<math>\pm</math>0,04 <math>\mu\text{M}/\text{L}</math>).</p>	
				<p><b>MN/BNMN</b></p> <p>Efeito de PB-S: aumento BNMN está <u>sig. correlacionado</u> com PB-S (total n = 181): (r=0.49669; p &lt; 0.001).</p>	

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA  
2. Exposição humana ao chumbo

Ref.	País e Indústria	Grupo(s) Estudado(s) OE/NOE	Notas e Principais Conclusões	Biomarcadores Estudados	Resultados										
			<p>incluídos no estudo.</p> <p><b>Grupos PB-S:</b>  “muito baixo” : PB-S &lt; 1,20 µM/L (n = 71)  “moderado”: 1,20 ≤ PB-S ≤ 1,91 µM/L (n = 32)  “alto”: 1,92 ≤ PB-S ≤ 2,88 µM/L (n = 29)  “muito alto”: PB-S &gt; 2,88 µM/L (n = 49)</p> <p><u>Os autores afirmam não haver suspeita de exposição a outros agentes genotóxicos e concluem que os resultados evidenciam claramente a ocorrência de dano genético com base no ensaio do MN em associação com a exposição ao chumbo, em linfócitos de sangue periférico, sendo este efeito relacionado com PB-S</u></p>		<p><u>Diferenças Sig.</u> entre os grupos de PB-S “muito baixo” e “moderado” (p = 0.05) assim como entre os grupos “moderado” e “alto” (p = 0.02). Diferenças não sig. entre os grupos com exposição “alta” e “muito alta” (p = 0.16).</p>										
(Duydu, et al. 2001)	Turquia  Produção de baterias automóveis	31/20  (homens)	<p><b>Objectivo:</b> estudar a relação entre a frequência de SCE e alguns indicadores de exposição a chumbo</p> <p><b>Grupos PB-S:</b>  A: PB-S &lt; 40 µg/dL (n = 21)  B: 40 ≤ PB-S ≤ 50 µg/dL (n = 8)  C: PB-S &gt; 50 µg/dL (n = 2)</p> <p>Unidades da actividade da ALAD: U = µmol ALA/min/L RBC</p> <p><u>Os autores concluem que a frequência de SCE aumenta para valores de PB-S inferiores a 40 µg/dL (propõem que o valor NOEL passe a ser de 30 µg/dL).</u></p>	<b>PB-S</b>	Média grupo OE: 36,31 µg/dL [22,2-52,5] <u>sig maior</u> (p < 0.05) que grupo NOE: [8,1-14,7] µg/dL Média PB-S dos grupos A, B e C <u>sig. maior</u> que grupo NOE (p < 0.05).										
				<b>ALA-U</b>	Corrigida com valores de creatinina; excluídos indivíduos com valores de creatinina < 0,5 ou > 3 g/L. Média grupo OE <u>sig. maior</u> que média grupo NOE (p < 0.05). Efeito de PB-S: ALA-U com <u>correlação positiva</u> (aumento) com aumento de PB-S.										
				<b>Actividade ALAD</b>	Média grupo OE <u>sig. maior</u> que média grupo NOE (p < 0.05). Efeito PB-S: actividade ALAD <u>correlacionada negativamente</u> (diminuição) com o aumento de PB-S <u>Os autores sugerem o envolvimento do ALA no mecanismo de toxicidade pelo chumbo (actividade pró-oxidante do ALA originando dano oxidativo celular).</u>										
				<b>SCE</b>	Média grupo OE <u>sig. maior</u> que média grupo NOE (p < 0.05). Grupos A, B e C <u>sig. maiores</u> que grupo NOE (p < 0.05). Valores mais altos no grupo B que no grupo A (sem significado estatístico). Aumento exponencial da frequência de SCE com a diminuição da actividade do ALAD.										
(Wu, et al. 2002)	Taiwan  Produção de	58/30  (homens e	<p><b>Objectivo:</b> avaliar o efeito genotóxico do chumbo com base na frequência de SCE, HFCs e DPCs (DNA-protein cross-links).</p> <p><b>grupos OE PB-S:</b></p>		<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 25%;"></th> <th style="width: 25%; text-align: center;">Grupo OE PB-S Alto</th> <th style="width: 25%; text-align: center;">Grupo OE PB-S Baixo</th> <th style="width: 25%; text-align: center;">Grupo NOE</th> <th style="width: 25%; text-align: center;">p</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>PB-S</b></td> <td style="text-align: center;">32,5±14,5 µg/dL</td> <td style="text-align: center;">9,3±2,9 µg/dL</td> <td style="text-align: center;">4,2±1,4 µg/dL</td> <td style="text-align: center;">&lt;0.001</td> </tr> </tbody> </table>		Grupo OE PB-S Alto	Grupo OE PB-S Baixo	Grupo NOE	p	<b>PB-S</b>	32,5±14,5 µg/dL	9,3±2,9 µg/dL	4,2±1,4 µg/dL	<0.001
	Grupo OE PB-S Alto	Grupo OE PB-S Baixo	Grupo NOE	p											
<b>PB-S</b>	32,5±14,5 µg/dL	9,3±2,9 µg/dL	4,2±1,4 µg/dL	<0.001											

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA  
2. Exposição humana ao chumbo

Ref.	País e Indústria	Grupo(s) Estudado(s) OE/NOE	Notas e Principais Conclusões	Biomarcadores Estudados	Resultados
	baterias automóveis	mulheres)	Alto-PB-S: > 15 µg/dL (n = 23) Baixo-PB-S: < 15 µg/dL (n = 34) PB-S: 3 OE excederam 40 µg/dL; todos os NOE <15 µg/dL Tendência semelhante para fumadores e não fumadores <u>Os autores concluem que o chumbo pode causar danos citogenéticos e DPCs nas concentrações de exposição consideradas (32,5 µg/dL).</u>	<b>ZPP</b>	111,4±101,2 µg/dL -- 19,4±5,2 µg/dL <0.001 -- 36,6±14,6 µg/dL 19,4±5,2 µg/dL <0.01
				<b>SCE</b>	6,1±0,7 -- 5,2±0,5 <0.05
				<b>HFCs</b>	47,8 % -- 10,0 % <0.05
				<b>DPCs</b>	1,5±0,6 % -- 1,0±0,3 % <0.05
(Fracasso, et al. 2002)	Itália Produção de baterias automóveis	37/29 (homens e mulheres)	<u>Objectivo:</u> avaliar o dano ao ADN provocado pelo chumbo e quais os mecanismos responsáveis.  Isoenzimas PKC (α: dependente de Ca e ξ; independente de Ca) GSH expresso como intensidade de fluorescência relativa/10 <sup>6</sup> células. ROS expresso como intensidade de fluorescência relativa/10 <sup>5</sup> células.  <u>Os autores concluem que a exposição ao chumbo induz o aumento das quebras de ADN e uma redução da regulação da PKC α, sugerindo que actua como um promotor de tumor.</u>	<b>PB-S</b>	Média grupo OE (39,63 ± 7,56 µg/dL) sig. maior que média grupo NOE (4,4 ± 1,7 µg/dL).
				<b>GSH</b>	Níveis de GSH no grupo OE (7,51) sig. menores que níveis de GSH no grupo NOE (14,95), p < 0.00001. Efeito de PB-S: associação sig. negativa com o aumento de PB-S (p = 0.006).
				<b>ROS</b>	Produção de ROS sig. maior no grupo OE do que no grupo NOE (p < 0.009).
				<b>SCGE (TD, TL, TM)</b>	TM: grupo OE = 68,99 sig. maior grupo NOE=45,50 (p < 0.00001). TD: grupo OE = 58,42 sig. maior grupo NOE=40,94 (p < 0.00001). TL: não se verifica diferença sig.; sem efeito de hábitos tabágicos, de consumo de bebidas alcoólicas nem da idade (apenas para maiores de 35 anos em TL, mas não significativo). Sem aumento sig. de nenhum dos parâmetros com os anos de exposição. No grupo OE: <u>Corr. sig. negativa.</u> entre GSH e TD (r=-0,496;P = 0.0018) <u>Corr. sig. negativa.</u> entre GSH e ROS (r=-0,450;P = 0.005) <u>Corr.sig. positiva.</u> entre ROS e TD (r=0,473;P = 0.003)
(Palus, et al. 2003)	Polónia Produção de baterias automóveis	44/52 (homens)	<u>Objectivo:</u> avaliar o dano genotóxico causado pela exposição a chumbo com base nos testes do MN e do SCE.  <u>Co-exposição ocupacional a cádmio (Cd):</u> 5,4-30,8 µg/L Grupo NOE de departamentos da mesma empresa, mas sem exposição a chumbo.  <u>Quantificação do dano do ADN em 5 níveis:</u> tipo 0: sem dano; tipo 1: dano de nível baixo; tipo 2: dano de nível médio; tipo 3: dano de nível elevado; tipo 4: dano total.	<b>PB-S</b>	OE [28,2-65,5 µg/dL]; NOE [1,7-18,0 µg/dL]
				<b>SCE</b>	<u>Aumento Sig.</u> (p < 0.05) no grupo OE (mesmo comparando fumadores e não fumadores com controlos). Sem correlação com PB-S. Sem diferenças sig. entre fumadores e não fumadores.
				<b>HFC</b>	<u>Aumento Sig.</u> (p < 0.05) no grupo OE. Sem diferenças sig. entre fumadores e não fumadores.
				<b>MN/BNMN</b>	<u>Aumento Sig.</u> (p < 0.01) no grupo OE (mesmo comparando fumadores e não fumadores com

Ref.	País e Indústria	Grupo(s) Estudado(s) OE/NOE	Notas e Principais Conclusões	Biomarcadores Estudados	Resultados
			<p>Valor total de dano ADN = Tipo (1+2+3+4). Avaliação final de 100 células entre 0 (sem dano) e 400 (dano máximo).</p> <p><u>Os autores concluem que o chumbo induz efeitos clastogénicos e aneugénicos nos linfócitos de sangue periférico de indivíduos expostos.</u></p>		<p>controlos. “Outliers” tanto em OE e NOE. Sem diferenças sig. entre fumadores e não fumadores. Sem correlação com PB-S</p>
				<p><b>SCGE</b> (classificação visual)</p>	<p><u>Aumento Sig.</u> da taxa de migração do ADN (<math>p &lt; 0.05</math>) no grupo OE, tanto em fumadores como em não fumadores. Sem correlação com PB-S.</p>
(Danadevi, et al. 2003)	Índia Unidade secundária de reciclagem de baterias	45/36  (homens)	<p><u>Objectivo:</u> avaliar os efeitos genotóxicos do chumbo com base no teste do cometa. Pb no ar = <math>4,2 \mu\text{g}/\text{m}^3</math> (OE) <u>Quantificação do ADN em 4 graus</u> de acordo com a % de ADN na cauda: tipo 0: sem dano; tipo 1: baixo nível de dano (5-20 %); tipo 2: nível médio de dano (20-60 %); tipo 3: nível elevado de dano (60-100 %). <u>% de dano no ADN = Tipo (1+2+3)</u> <u>Os autores concluem que os níveis aumentados do dano do ADN encontrados no grupo exposto justificam o uso do teste do cometa para avaliar os efeitos genotóxicos da exposição a chumbo.</u></p>	<p><b>PB-S</b></p>	<p>Média OE = <math>24,83 \mu\text{g}/\text{dL}</math> <u>sig. maior</u> que média NOE = <math>2,75 \mu\text{g}/\text{dL}</math> (<math>p &lt; 0.05</math>) PB-S correlacionado positivamente com os anos de exposição (<math>r=0.419</math>, <math>P &lt; 0.05</math>).</p>
				<p><b>SCGE</b> (classificação visual)</p>	<p>Média de células com cometas maior no grupo OE (44,85 %) do que no grupo NOE (21,14 %). Percentagem mais elevada de células dos tipos 1, 2 e 3 no grupo OE. <u>Análise de regressão linear simples:</u> PB-S: O dano do ADN está <u>sig. correlacionado</u> com Pb-S em fumadores (<math>r=0.659</math>), não fumadores (<math>r=0.529</math>) e no total (<math>r=0.602</math>), <math>p &lt; 0.01</math>. <u>Efeito Sig.</u> encontrado nos fumadores do grupo NOE mas não no grupo OE. Efeito dos anos de exposição: <u>efeito Sig.</u> no grupo OE (<math>r=0,690</math>, <math>p &lt; 0.01</math>). Sem efeito sig. da idade</p>
(Hengstler, et al. 2003)	Alemanha 10 tipos de serviços	78/22  (homens e mulheres)	<p><u>Objectivo:</u> determinar a indução de quebras simples de ADN (ADN-SSB) e da capacidade de reparação do ADN <u>Co-exposição a cádmio e cobalto.</u> Concentração de chumbo no ar = <math>3,0 [1,6 - 50,0] \mu\text{g}/\text{m}^3</math> <u>Os autores observam que a co-exposição verificada causa efeitos genotóxicos maiores do que a soma dos efeitos devidos à exposição aos metais individualmente: a co-exposição a cádmio, cobalto e chumbo dá origem a efeitos interactivos.</u></p>	<p><b>PB-S</b></p>	<p>Média PB-S = <math>44,1 \mu\text{g}/\text{dL}</math> [<math>28,4 - 136,8</math>] Chumbo no ar está correlacionado com PB-S (<math>r= 0.417</math>; <math>p &lt; 0.001</math>)</p>
				<p><b>DNA-SSB</b></p>	<p>Sem correlação com conc. de chumbo no ar ou com PB-S. Corr. com cobalto e cádmio.</p>
(Duydu e Süzen 2003)	Turquia Produção de	71/20  (homens)	<p><u>Objectivo:</u> avaliar os efeitos genotóxicos do chumbo com base no ensaio do cometa e tendo em conta os polimorfismos de ALAD.</p>	<p><b>PB-S</b></p>	<p>Média OE (<math>34,53 \pm 1,52 \mu\text{g}/\text{dL}</math>) <u>sig. maior</u> que média NOE (<math>10,38 \pm 0,36 \mu\text{g}/\text{dL}</math>), <math>p &lt; 0.001</math>.</p>
				<p><b>SCE</b></p>	<p>Média OE (7,97) <u>sig. maior</u> que média NOE (5,43), <math>p &lt; 0.05</math>. Efeito PB-S: grupo C <u>sig. mais elevado</u> que grupo B (<math>p &lt; 0.05</math>).</p>

*I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA*  
*2. Exposição humana ao chumbo*

Ref.	País e Indústria	Grupo(s) Estudado(s) OE/NOE	Notas e Principais Conclusões	Biomarcadores Estudados	Resultados
	baterias automóveis		<p>Todos os indivíduos do grupo OE são fumadores</p> <p><u>Grupos PB-S:</u> A: PB-S &lt; 40 µg/dL (n = 46) B: 40 ≤ PB-S ≤ 50 µg/dL (n = 14) C: PB-S &gt; 50 µg/dL (n = 11)</p>	<p><b>HFC</b> (células com 10 ou mais SCE)</p> <p><b>Genótipo ALAD</b></p>	<p>Média OE (24,73 %) <u>sig. maior</u> que média NOE (4,24 %), p &lt; 0.001. “Outliers”: 39,44 % no grupo OE; sem “outliers” no grupo NOE. Efeito PB-S: grupo C <u>sig. maior</u> que grupo B (p &lt; 0.05).</p> <p>OE: 50 ALAD 1-1 e 21 ALAD 1-2; nenhum indivíduo ALAD 2-2. NOE: 11 ALAD 1-1 e 9 ALAD 1-2; nenhum indivíduo ALAD 2-2. Sem diferenças sig. para PB-S, SCE, HFC entre estes grupos. Quando se comparam os genótipos ALAD entre os grupos A, B e C encontram-se valores <u>sig. mais elevados</u> de HFC nos indivíduos ALAD1-1 do grupo B (p &lt; 0.001). O grupo C só tem 3 ALAD 1-2, todos “outliers” para HFC.</p>
(Marthino-Roth, et al. 2003)	Brasil Reciclagem de baterias e pintura de automóveis	20/20 (homens)	<p><u>Objectivo:</u> avaliar os efeitos genotóxicos em células de esfoliado bucal com base nos testes do MN e do cometa em trabalhadores de indústrias de renovação de baterias e pintura de automóveis</p> <p>Quantificação do ADN em 5 níveis: tipo 0: sem dano; tipo 1: dano baixo; tipo 2: dano médio; tipo 3: dano elevado; tipo 4: dano total. Índice de dano do ADN expresso como a soma de células com dano dos tipos 1- 4 (1+2+3+4). Avaliação final de 100 células entre 0 (sem dano) e 400 (dano máximo).</p> <p><u>Os autores observaram efeitos genotóxicos mas não especificam a que compostos os trabalhadores estão expostos (concluem que não se pode descartar a existência de co-exposição).</u></p>	<p><b>MN</b></p> <p><b>SCGE</b> (classificação visual: TL, índice de dano)</p>	<p>Efeito da exposição: grupos OE com valores <u>sig. maiores</u> por comparação com grupos NOE (p &lt; 0.001).</p> <p>Valores <u>sig. maiores</u> nos grupos OE, quando comparados com os grupos NOE (p &lt; 0.001).</p>
(Karakaya, et al. 2005)	Turquia Produção de baterias automóveis	23/23 (homens)	<p><u>Objectivo:</u> avaliar os efeitos genotóxicos do chumbo com base no ensaio de CA e os seus efeitos na capacidade de reparação do ADN (pela indução de raios X, XRC)</p> <p>Anos de trabalho [2-26 anos]</p> <p><u>4 classes PB-S:</u> 1 (normal) : PB-S &lt; 40 µg/dL (n = 6) 2 (aceitável): 40 ≤ PB-S ≤ 80 µg/dL (n = 7) 3 (excessiva): 80 ≤ PB-S ≤ 120 µg/dL (n = 8) 4 (perigosa): PB-S &gt; 120 µg/dL (n = 2)</p> <p><u>Os autores concluem que a exposição ao chumbo pode levar à</u></p>	<p><b>PB-S</b></p> <p><b>CA</b></p> <p><b>XRC</b></p>	<p>Média OE (72,66 ± 24,14 µg/dL) <u>sig. maior</u> que média NOE (4,41 ± 2,07 µg/dL), p &lt; 0.0001. Sem corr. sig. com os anos de exposição.</p> <p>Sem diferenças sig. em relação aos valores de Pb-S. Sem corr. sig. com os anos de exposição. Efeito dos hábitos tabágicos: sem diferenças sig. entre fumadores e não fumadores.</p> <p>Observou-se uma <u>redução acentuada</u> na capacidade de reparação do ADN em indivíduos expostos a chumbo; o efeito não é, no entanto, estatisticamente significativo.</p>



*I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA*  
*2. Exposição humana ao chumbo*

Ref.	País e Indústria	Grupo(s) Estudado(s) OE/NOE	Notas e Principais Conclusões	Biomarcadores Estudados	Resultados
			<u>redução da capacidade de reparação do ADN, facilitando a ocorrência de dano do ADN.</u>		
(Steinmetz-Beck, <i>et al.</i> 2005) ( <i>resumo</i> )		62/22 (homens)	<u>Objectivo:</u> avaliar os efeitos genotóxicos em trabalhadores expostos a chumbo através do teste do cometa. <u>Os autores concluem que a exposição crónica a níveis elevados de chumbo induz danos ao ADN.</u>	<b>PB-S</b>	Média grupo OE=42,26 ±18,12 µg/dL <u>Sig. maior</u> que PB-S NOE=8,1±3,78 µg/dL (p < 0.01).
				<b>SCGE</b> (% células com cometas)	<u>Sig. maior</u> no grupo OE do que no grupo NOE (p < 0.05).
(Chen, <i>et al.</i> 2006)	China Produção de baterias automóveis	25/25 (homens e mulheres)	<u>Objectivo:</u> avaliar os efeitos genotóxicos da exposição a chumbo com base nos testes do MN, do cometa e da mutação do gene TCR (Mf-TCR). Pb no ar = 1,26 mg/m <sup>3</sup> Equipamento de ventilação ineficiente Os trabalhadores usavam máscaras como medida de protecção <u>Os autores não tiram conclusões claras.</u>	<b>PB-S</b>	Média grupo OE = 32,0 µg/dL [11,0-62,0] <u>sig. maior</u> do que média grupo NOE = 2 µg/dL - (p < 0.01) 6 trabalhadores com PB-S > 40 µg/dL
				<b>MN</b>	<u>Sig. maior</u> no grupo OE do que no grupo NOE (p < 0.01) Efeito PB-S: não apresenta correlação
				<b>SCGE (TL, TM)</b>	TL: <u>Sig. maior</u> no grupo OE do que no grupo NOE (p < 0.05) TM: <u>Sig. maior</u> no grupo OE do que no grupo NOE (p < 0.05) Efeito PB-S: não apresenta correlação.
				<b>TCR-mf</b>	Sem diferenças sig. entre OE e NOE.
(Shaik, <i>et al.</i> 2006)	<i>In vitro</i>	--	<u>Objectivo:</u> avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos do chumbo em linfócitos humanos <i>in vitro</i> . Linfócitos de dadores saudáveis e não fumadores Incubação de sangue com alíquotas de nitrato de chumbo (PbNO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ; amostras de sangue sem tratamento como controlo. Conc. (PbNO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> : 1/10 e 1/6 do LC <sub>50</sub> . <u>Os autores concluem que o chumbo pode induzir SSB no ADN, ao competir com os locais de ligação a metais.</u>	<b>CA</b>	CAs aumentam com o aumento da concentração de chumbo.
				<b>SCGE (TL)</b>	TL aumenta com o aumento da concentração de chumbo. A frequência de células aptóticas ou necróticas aumenta com o aumento da concentração de chumbo.
(Shaik e Jamil 2009)	Índia Produção de baterias	113/102 (homens e mulheres)	<u>Objectivo:</u> Avaliar os efeitos tóxicos do chumbo e se e qual a correlação entre estes e indicadores clínicos de intoxicação por chumbo. Valores de hemoglobina no grupo OE entre 7,0 e 14,0 g/dL e no grupo NOE 11,3 a 14,8 g/dL. 33 do grupo OE com valor de	<b>Pb-S</b>	Sem relação com a idade nem duração da exposição. Sem relação significativa com consumo de álcool e de tabaco.
				<b>MN</b>	<u>Sig. maior</u> no grupo OE do que no grupo NOE (p < 0.01).

Ref.	País e Indústria	Grupo(s) Estudado(s) OE/NOE	Notas e Principais Conclusões	Biomarcadores Estudados	Resultados
			hemoglobina < 10 g/dL. 12 indivíduos do grupo OE mal nutridos. Factores confundentes: <u>Os autores concluem que o chumbo é um agente genotóxico que causa dano genético e aberrações cromossômicas.</u>	<b>AC</b>	<u>Sig. maior</u> no grupo OE do que no grupo NOE (p < 0.01).
				<b>SCGE</b>	<u>Sig. maior</u> no grupo OE do que no grupo NOE (p < 0.01).
				<b>Genótipo ALAD</b>	Indivíduos com ALAD 1-1/1-2 com valores de Pb-S mais elevados (76-88 µg/dl) que os com ALAD1-2 (2-79 µg/dL) – mas sem significado estatisticamente significativo.

**Unidades de PB-S:** 1 µg/dL = 10 µg/L = 0,048 µmol/L; 1 µmol/L = 20,719 µg/dL.

**ADN** – Ácido Desoxirribo Nucleico; **BNNM** – células binucleadas que apresentam um ou mais micronúcleos; **CA** –Chromosome Aberrations (aberrações cromossômicas)- **DPC** – DNA-protein crosslink; **GSH** – concentrações celulares de glutathione; **HFC** – high frequency cells: células com uma frequência elevada de SCE; **LC<sub>50</sub>** – Dose Letal 50; **MDA** – Malondialdeído; **MN** – ensaio do micronúcleo; **TRC-mf** – frequência de mutação do gene TCR; **NOE** – Sem exposição ocupacional (not occupationally exposed); **NOEL** – No observable effect level (sem efeitos observáveis); **OE** – com exposição ocupacional (occupationally exposed); **PB-S** – concentração de chumbo no sangue; **RBC** – red blood cells (hemáceas); **SCGE** – single cell gel electrophoresis (teste do Cometa); **sig** –estatisticamente significativo; **SSB** – **single strand breaks /quebra de cadeia simples**); **SOD** – Superóxido dismutase; **TD** - % de ADN na cauda do cometa; **TL** – comprimento da cauda do cometa; **TM** – momento da cauda do cometa (TL × TD); **XRC** – raio X.

## 2.7. Diferenças de Susceptibilidade

Há uma variedade de factores que podem aumentar ou diminuir a sensibilidade de um indivíduo a um tóxico o que tem como resultado que indivíduos diferentes respondam de forma distinta a condições semelhantes de exposição a um mesmo tóxico.

Essa variabilidade individual baseia-se no facto dos processos fisiológicos de absorção, distribuição, armazenamento e eliminação do metal serem influenciados por factores endógenos (constituição genética, factores antropométricos, estado de saúde) e factores exógenos (carga de trabalho, exposição simultânea a outras substâncias) (Moreira e Moreira 2004b, 2004a).

Nas últimas décadas tem vindo a ser dada especial atenção à carga genética, ou seja, a características genéticas que possam explicar diferenças de organismos para responderem à presença do mesmo agente tóxico (metabólicas, enzimáticas, de reparação) traduzindo assim a susceptibilidade individual (polimorfismos genéticos).

### 2.7.1. Polimorfismos genéticos

O termo polimorfismo genético refere-se à ocorrência simultânea, na população, de genomas que apresentam variações alélicas (Lewin 1994). Indivíduos que possuem alelos iguais para o mesmo gene designam-se homocigóticos e os que possuem alelos diferentes designam-se heterocigóticos. As diferenças populacionais nesses genes polimórficos podem dar origem a diferenças proteicas (nas proteínas para as quais esses genes codificam) que podem ter importância na forma como o organismo reage perante a presença de determinados xenobióticos, sendo portanto factores que alteram ou modulam a extensão dos efeitos decorrentes da exposição (Sakai 2000).

No que respeita à toxicidade pelo chumbo foram identificados, por ordem da importância que lhes é reconhecida, o gene codificante da enzima desidratase do ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALAD), o gene codificante do receptor da vitamina D (VDR) e o gene da hemocromatose, que codifica a proteína HFE (Goyer e Clarkson 2001).

### 2.7.2. Outras “susceptibilidades”

Para além das diferenças de susceptibilidade genética, há uma série de outros factores que se sabe terem especial importância na vulnerabilidade individual à toxicidade por chumbo, como a idade (crianças e idosos são mais sensíveis aos efeitos do chumbo), alguns factores nutricionais, (tipo de alimentação e quantidade total de calorias ingeridas), hábitos tabágicos e hábitos de consumo de bebidas alcoólicas (Goyer e Clarkson 2001).

As crianças, por estarem em processo de desenvolvimento neurológico, são especialmente vulneráveis aos efeitos neurotóxicos do chumbo. A exposição a este metal na infância compromete, de forma irreversível, o desenvolvimento do sistema nervoso: diminuição dos níveis de atenção, concentração, memória e de inteligência, sintomas acompanhados por aumento dos níveis de agressividade e de comportamentos anti-sociais (COWI 2003; Bechara 2004). Por outro lado, nos idosos, também podem aparecer casos de intoxicação por chumbo. Isto é especialmente válido para pessoas que tenham estado expostas ao chumbo ao longo da vida, tendo acumulado chumbo nos ossos, o qual, cessada a exposição, é agora libertado e exerce os seus efeitos tóxicos (a denominada exposição endógena) (SCOEL 2002; ATSDR 2007).

O tipo de alimentação e a quantidade de calorias ingeridas são factores importantes na forma como o chumbo é absorvido pelos organismos e neles é distribuído. A quantidade de alimentos ingeridos (calorias) é especialmente importante nos casos em que o chumbo é absorvido por via digestiva. Quando o chumbo é deglutido em jejum é absorvido em muito maior extensão do que quando o estômago está cheio (Rabinowitz *et al.* 1980; Mahaffey 1990); por outro lado, dietas com baixos valores de cálcio também resultam numa maior taxa de absorção e, portanto, em maior quantidade de chumbo depositado tanto em ossos como em tecidos moles e em maior risco de efeitos tóxicos exercidos pelo chumbo. A deficiência em ferro interfere com a biossíntese do heme, reforçando os efeitos adversos do chumbo. Nesta situação a enzima ferroquelatase fica mais sensível aos efeitos do chumbo (Mahaffey 1990). Outro nutriente importante na alimentação é o zinco, metal essencial a muitas enzimas, que tem um papel protector dos efeitos do chumbo, uma vez que este último compete com ele por diversos locais de

ligação. A deficiência deste metal na dieta irá resultar em efeitos mais acentuados quando ocorre exposição a chumbo (ATSDR 2007).

Já o acetaldeído, que se forma durante o metabolismo do álcool, inibe a actividade da enzima ALAD. Estudos em animais de laboratório referidos em (ATSDR 2007) confirmam que a combinação de álcool e chumbo apresenta efeitos sinérgicos ao inibir diversas enzimas, entre as quais a ALAD elevando o nível de chumbo em diversos órgãos e o valor de protoporfirina-zinco no sangue (PPZ). Indivíduos fumadores estão em maior risco de exposição pelo facto dos cigarros conterem diversos metais, entre os quais o chumbo, mas também cádmio e mercúrio. A co-exposição a estes metais também demonstrou poder ter efeitos sinérgicos de toxicidade (ATSDR 2007).

### 3. VIGILÂNCIA DA SAÚDE

Para se obter um melhor conhecimento das condições a que estão expostos os indivíduos, procede-se à avaliação da exposição, que consiste na determinação e interpretação de parâmetros biológicos e/ou ambientais com a finalidade de detectar atempadamente (e deter) os possíveis riscos para a saúde associados a uma exposição a agentes químicos. Quando essa avaliação é feita de forma sistemática, contínua e repetitiva no sentido de estabelecer medidas preventivas e de correcção, denomina-se de vigilância (Hoet 1996) e envolve duas abordagens complementares: a vigilância (ou monitorização) ambiental e a vigilância (ou monitorização) biológica (Prista e Uva 2006).

Na vigilância ambiental, a avaliação do risco para a saúde é feita tendo em conta a medição da substância no meio externo ao organismo. A partir da colheita de amostras de ar ambiente (utilizando dispositivos móveis ou estacionários) e da determinação da concentração dos agentes químicos, a avaliação do risco é estimada por comparação com valores de referência para o contexto ocupacional – os designados valores máximos admissíveis (VLE – valores limite de exposição; TLV – *threshold limit values*; OEL – *occupational exposure limits*). Estes representam a maior concentração de uma substância química a que a quase totalidade dos trabalhadores pode estar exposta repetidamente, ao longo do dia normal de trabalho e durante toda a vida profissional, sem que daí resultem efeitos adversos para a saúde. Dentro destes são considerados dois parâmetros: a concentração máxima admissível que se refere ao valor que não deve ser excedido mesmo em curtos períodos de tempo (VLE-CM – concentração máxima; TLV-STEL – *short-term exposure level*; TLV-C – *ceiling*); e a concentração média ponderada, correspondente à quantidade referida a 8 horas diárias em 40 horas semanais (VLE-MP – média ponderada; TLV-TWA – *time-weighted average*) (Morgan 1997; Prista e Uva 2006; ACGIH 2008).

A vigilância biológica, comumente designada de monitorização biológica, recorre à colheita de amostras biológicas para o doseamento do próprio xenobiótico, seus metabolitos ou outros parâmetros resultantes de efeitos bioquímicos específicos, com

vista à determinação da exposição e do risco para a saúde dos indivíduos expostos, por comparação dos resultados com um valor de referência em meios biológicos – os chamados índices biológicos de exposição (BEI – *biological exposure indices*; VLB – valor limite biológico). Estes são estabelecidos de forma a representar os valores dos parâmetros doseados em meios biológicos de trabalhadores em boas condições físicas, após uma exposição por inalação a concentrações correspondentes ao TLV e com o objectivo de garantir que a exposição dos trabalhadores (no presente e/ou no passado recente) não acarreta riscos inaceitáveis para a saúde dos trabalhadores, à luz dos conhecimentos disponíveis (Hoet 1996; Prista e Uva 2006; ACGIH 2008).

O termo indicador biológico, ou biomarcador, é usado num contexto muito lato de forma que abarca uma série de parâmetros que reflectem as interacções entre o agente tóxico e o organismo humano. Aplica-se quer a alterações funcionais, bioquímicas ou fisiológicas, quer a interacções moleculares específicas (Herber *et al.* 2001). Os biomarcadores constituem uma ferramenta importante para a avaliação dos níveis de exposição e para o estabelecimento de valores de referência para a mesma, uma vez que podem ser intermediários entre a exposição e a manifestação clínica de doenças. Não são, por si só, indicadores de uma situação de doença ou de um processo tóxico. Na maioria das situações apenas indicam a exposição do organismo, constituindo informação complementar aos programas de vigilância da saúde (Hoet 1996; IEH 1996; Juberg 1999).

São geralmente classificados em três categorias: biomarcadores de exposição, de efeito e de susceptibilidade. No entanto algumas das informações obtidas sobrepõem-se, podendo alguns biomarcadores ter características que os colocam em mais do que uma categoria.

Os biomarcadores de exposição (ou de dose interna) são usados para determinar se a quantidade de xenobiótico que penetrou no organismo foi efectivamente absorvida, podendo ser medido num compartimento do organismo, pela quantificação deste ou dos seus metabolitos em meios biológicos. Não fornecem, no entanto, informação sobre se essa exposição resultou ou não na ocorrência de danos (Manini *et al.* 2007). Os biomarcadores de efeito dizem respeito a efeitos subclínicos que ocorrem quando a

concentração de determinado tóxico atinge certos níveis de concentração em órgãos ou tecidos no organismo. São alterações bioquímicas, fisiológicas ou outras que ocorreram no organismo como consequência da presença do xenobiótico e que podem prenunciar efeitos prejudiciais à saúde ou o desencadear de processos de doença (Manini, *et al.* 2007). A inibição da actividade de determinadas enzimas ou a alteração da concentração de determinado agente intermediário em certas vias bioquímicas podem ser consideradas indicadores de efeito (Sakai 2000). Os biomarcadores de susceptibilidade são indicadores da capacidade inerente ou adquirida de um organismo para responder ao estímulo provocado pela exposição a um xenobiótico específico. Indicam diferenças individuais e/ou populacionais pré-existentes e independentes da exposição que modulam a cinética e a dinâmica da substância exógena dentro do organismo. Estas diferenças são predominantemente de origem genética, embora a ocorrência de alterações fisiológicas, a existência de medicação, diferenças nutricionais e de estilo de vida, assim como a exposição a outros agentes ambientais possam ter influência na susceptibilidade individual a um agente externo (IEH 1996; Sakai 2000). Os polimorfismos genéticos que determinam diferentes actividades enzimáticas e/ou diferentes capacidade de reparação do ADN incluem-se nestes biomarcadores.

A monitorização ambiental e a monitorização biológica são ferramentas complementares ao conhecimento/avaliação do risco resultante da exposição dos trabalhadores a agentes químicos na realidade ocupacional e os resultados devem ser estudados e avaliados de forma complementar (Manini, *et al.* 2007). Por outro lado, quando se trata de proceder à avaliação dos riscos para a saúde decorrentes da exposição ocupacional, importa ter presente que a monitorização biológica apresenta, neste contexto, algumas vantagens sobre a monitorização ambiental. A monitorização biológica integra todas as possíveis vias de entrada no organismo (para além da via respiratória), eventuais exposições fora do contexto estritamente profissional assim como uma série de factores intrínsecos individuais (relacionados com modos de via, de natureza fisiológica e comportamentais). Para além disso, os parâmetros biológicos relacionam-se de forma mais directa com os efeitos adversos para a saúde que se pretende prevenir. Têm, no entanto, algumas limitações e, para a sua correcta utilização e compreensão, é essencial o conhecimento prévio das relações dose-efeito e exposição-



-resposta do organismo, no que ajuda o conhecimento profundo das cinéticas toxicológicas e dinâmicas (toxicocinética e toxicodinâmica) (IEH 1996; Lauwerys e Hoet 2001; Prista e Uva 2006).

A vigilância da saúde baseia-se na avaliação e acompanhamento dos estados de saúde dos trabalhadores com o objectivo de identificar sinais precoces de efeitos adversos na saúde dos trabalhadores (Hoet 1996; Lauwerys e Hoet 2001). Os efeitos precoces da natureza das reacções bioquímicas ocorrem num espaço de tempo próximo da exposição e são geralmente reversíveis. A inibição de enzimas, por exemplo, ou a alteração na concentração de agentes intermediários de processos bioquímicos, podem ser considerados indicadores de efeito. A identificação de tais efeitos precoces permite tomar medidas para prevenir o desenvolvimento de estados de saúde/doença irreversíveis e diagnosticáveis como doenças clínicas (Sakai 2000; Lauwerys e Hoet 2001).

A selecção de um biomarcador deve assentar numa série de considerações como a extensão do conhecimento das relações dose-efeito (ou dose-resposta), os níveis de exposição em causa, os requisitos analíticos e a estratégia de colheita. De uma forma geral, o biomarcador ideal deve ser específico para o agente cuja exposição está em causa e detectável em pequenas quantidades, de fácil colheita, transporte e conservação e passível de determinar por métodos analíticos fiáveis, devendo existir conhecimento acerca dos valores “normais” na população não exposta (Pivetta, *et al.* 1990; Prista e Uva 2006; Manini, *et al.* 2007; Paschal 2007).

### **3.1. Indicadores de exposição a chumbo**

Diversos indicadores biológicos têm vindo a ser identificados e investigados relativamente ao valor da sua utilização na avaliação da exposição profissional ao chumbo inorgânico. São exemplos de indicadores de dose interna, que evidenciam a absorção de chumbo pelo organismo, as concentrações de chumbo no sangue, no plasma, na urina, no cabelo e no osso e a excreção de chumbo após administração de um agente quelante. Quanto a biomarcadores de efeito, que representam efeitos biológicos precoces induzidos pelo chumbo nos órgãos críticos e nos locais alvo, são actualmente utilizados ou alvo de investigação a actividade da desidratase do ALA, a concentração de ALA na urina, as protoporfirinas eritrocitárias (PPE e PPZ) e a actividade da Pirimidina 5'-Nucleotidase (P5N). Por fim, a investigação científica vem procurando esclarecer o papel que diversas características genéticas podem assumir no grau de susceptibilidade individual aos efeitos do chumbo, sendo actual alvo de interesse a pesquisa dos polimorfismos dos genes da desidratase do ALA e do receptor da vitamina D (VDR) (Sakai 2000).

### **3.2. Biomarcadores de dose interna**

#### **3.2.1. Concentração de chumbo no sangue (plumbémia)**

A plumbémia (Pb-S) é o indicador biológico de exposição mais utilizado na monitorização biológica do chumbo e é universalmente aceite como medida da exposição recente a chumbo que permite estimar o risco (IARC 2006a; ACGIH 2008). A universalidade da sua utilização e referência deve-se à sensibilidade analítica do método e à existência de programas credíveis de controlo de qualidade no que respeita tanto à colheita, como ao manuseamento e análise das amostras (Nieboer e Fletcher 2001).

Os métodos utilizados na determinação da plumbémia variaram ao longo do tempo para corresponderem às necessidades de determinação mais exigentes que acompanharam a

redução dos valores de referência e, paralelamente, melhorar os limites de detecção e quantificação, baixando-os. Inicialmente, a técnica dominante era a espectrometria de absorção atômica (EAA) com atomização em chama. A determinação da Pb-S é feita, actualmente, por EAA com atomização electrotérmica, geralmente denominada por EAA com câmara de grafite, embora haja outras técnicas analíticas disponíveis, como a espectroscopia de massa com plasma indutivo acoplado, ICP-MS (Bonney *et al.* 2002). Este ensaio detecta a presença de chumbo no sangue total, o que inclui o chumbo associado a proteínas nos eritrócitos e o chumbo livre no plasma (fracção plasmática), referenciando-se estas concentrações em microgramas por decilitro de sangue ( $\mu\text{g/dL}$ ) ou em micromoles por litro ( $\mu\text{mol/L}$ ). Os valores de Pb-S são interpretados como reflectindo a exposição recente ao metal e é geralmente aceite que valores de plumbémia elevados correspondem a uma exposição recente mais intensa. No entanto há que ter em conta que esses valores podem também incluir chumbo libertado dos tecidos onde está depositado, representando assim, neste caso, uma exposição mais antiga. Dito de outra forma, a plumbémia reflecte a exposição das últimas semanas. Mas uma Pb-S elevada pode apenas representar uma elevada absorção recente sem que lhe correspondam elevados níveis de depósito; e uma baixa Pb-S não exclui essa possibilidade (Prista e Uva 2003).

### 3.2.2. Concentração de chumbo no plasma

De uma forma geral é mais comum recorrer-se a plasma (soro), em detrimento do sangue total, para a monitorização de substâncias tóxicas no organismo. No que diz respeito ao chumbo, no entanto, as concentrações plasmáticas são tão baixas que este parâmetro é extremamente difícil de medir. De facto, a concentração de chumbo no plasma (Pb-P) equivale apenas a cerca de 1 % da concentração no sangue total.

Assume-se que os efeitos do chumbo estão primeiramente associados aos seus níveis no plasma uma vez que este constitui a fracção sanguínea com maior peso na distribuição do chumbo para os órgãos alvo (Barbosa, *et al.* 2005).

Com efeito, se a determinação da plumbémia tem vindo a tornar-se mais complexa com as crescentes exigências analíticas, as exigências técnicas que se apresentam para a determinação da Pb-P tornam a medição deste parâmetro muito difícil (Bergdahl 1997). O controlo de contaminação é aqui um aspecto essencial e de maior significado dado que as concentrações com que se trabalha são reduzidas, exigindo extremo cuidado na colheita e conservação das amostras assim como nos reagentes a usar. Outra grande desvantagem deste método reside na necessidade de se proceder rapidamente à separação do plasma dos restantes constituintes do sangue para evitar que o chumbo contido nos eritrócitos passe para o plasma devido a hemólise, factor confundente importante (Barbosa, *et al.* 2005). Por todos estes motivos, a determinação do Pb-P é um método de muito mais difícil concretização do que a determinação de Pb-S.

### 3.2.3. Chumbo excretado na urina (plumbúria)

A concentração de chumbo excretado na urina (Pb-U) representa a quantidade da porção plasmática de chumbo eliminado por filtração glomerular (renal) e reflecte a quantidade recentemente absorvida ou posta em circulação por exposição endógena (Barbosa, *et al.* 2005).

A obtenção de amostras de urina é um método não invasivo o que constitui a principal vantagem da avaliação deste parâmetro. Em contrapartida, amostras pontuais de urina apresentam grande variabilidade intra-individual nos resultados de concentração em chumbo, uma vez que são influenciadas pelo estado da função renal e pela diurese. Estes factores podem ser corrigidos pelo valor de creatinina e por colheitas de urina de 24h (Marqués 1993) mas apresentam, ainda assim, uma significativa variabilidade de resultados (Prista 2002).

#### 3.2.4. Conteúdo de chumbo ósseo

Dado que o chumbo acumula maioritariamente no tecido ósseo, a análise do chumbo nos ossos constitui uma tentativa de determinar a exposição de um indivíduo ao chumbo ao longo do tempo. É, assim, um bom indicador da exposição acumulada. A avaliação deste parâmetro por EAA com atomização de chama é eficientemente usada na determinação do chumbo em ossadas, com objectivos de investigações de natureza histórica.

Por motivos óbvios este método não pode ser aplicado quando a análise se refere a indivíduos vivos, sendo possível neste caso recorrer a técnicas de fluorescência de raios X (FRX) que se baseiam na propriedade do chumbo de emitir raios X quando sujeito a fótons de energia apropriada (Barbosa, *et al.* 2005; IARC 2006a). É um método não invasivo e que mostrou ser eficiente em diversos estudos (IARC 2006a). No entanto, a aplicação de raios X é desaconselhada numa avaliação sistemática e periódica, como aquela que é necessária para a vigilância da saúde e monitorização dos valores de chumbo em contexto profissional, ficando o seu interesse reservado para fins de investigação científica (Prista 2002).

#### 3.2.5. Concentração de chumbo noutros tecidos

Têm sido estudadas outras formas de proceder à avaliação da exposição a chumbo, numa tentativa de encontrar métodos menos invasivos que a plumbémia, mas igualmente eficientes e sem inconvenientes de aplicação para a saúde. O cabelo tem a vantagem de ser de colheita fácil e não invasiva e de ser fácil o seu transporte e conservação. A dificuldade está em garantir que o chumbo depositado externamente nos fios do cabelo não seja avaliado como concentração endógena. Isso requer a aplicação prévia de métodos eficientes de lavagem que garantam que esse conteúdo em chumbo é totalmente removido, requisito praticamente impossível de assegurar. A utilização de unhas apresenta as mesmas vantagens e inconvenientes referidos para a colheita de cabelo. Na tentativa de evitar a contribuição de contaminação externa podem utilizar-se

unhas dos pés, com a vantagem acrescida destas unhas crescerem a uma taxa mais baixa que as unhas das mãos, tendo sido levantada a hipótese de constituírem material de maior significado para a avaliação cumulativa (Barbosa, *et al.* 2005). Os estudos desenvolvidos até agora com cabelo e unhas apresentam, contudo, grande variabilidade, pelo que se conclui não constituírem indicadores fidedignos de exposição ao chumbo (Prista 2002; Barbosa, *et al.* 2005; IARC 2006a).

### 3.3. Biomarcadores de efeito

#### 3.3.1. Actividade eritrocitária da ALAD

A inibição da actividade da ALAD eritrocitária pode constituir um indicador da exposição ao chumbo (Wetmur *et al.* 1991; Onalaja e Claudio 2000; Tandon *et al.* 2001). Os métodos de determinação da actividade da ALAD (colorimétrico ou cromatografia líquida) têm por base a quantidade de porfobilinogénio (PBG) formado, produto da reacção catalisada por esta enzima. No método colorimétrico procede-se ao doseamento do complexo formado entre o PBG e o reagente de Erlich. No método de cromatografia líquida (HPLC) procede-se à quantificação directa do PBG formado (IARC 2006a).

A inibição da enzima ocorre rapidamente e de forma acentuada a valores de plumbémia entre 5 µg/dL e 50 µg/dL (Sakai 2000), tornando-se menos evidente a valores mais elevados. É, como tal, considerado o parâmetro bioquímico mais sensível a valores baixos de exposição ao chumbo (Herber e Sallé 1978).

Vários autores referem ter encontrado uma associação negativa entre a actividade da enzima e o aumento dos valores de Pb-S (Campagna, *et al.* 1999; Duydu, *et al.* 2001; Tandon, *et al.* 2001; Gurer-Orhan *et al.* 2004; Ademuyiwa *et al.* 2005). No entanto, a utilização deste parâmetro como indicador da exposição ao chumbo apresenta algumas dificuldades, designadamente a complexidade do ensaio em si e a instabilidade da actividade da enzima durante a conservação da amostra prévia à análise. Paralelamente

é importante o conhecimento prévio da actividade enzimática base de cada indivíduo para se poder concluir se houve decréscimo na sua actividade. Sakai (2000) propõe solucionar este problema através da determinação da diferença na actividade enzimática após restauração desta por aquecimento ou adição à amostra de compostos ricos em grupos -SH ou em iões zinco, estando a extensão da recuperação de actividade enzimática relacionada com a Pb-S.

### 3.3.2. Protoporfirina eritrocitária (livre ou ligada ao zinco)

A inibição do último passo da biossíntese do heme (a incorporação do ião ferro na protoporfirina IX (PP-IX), catalisada pela ferroquelatase) é também afectada pela presença de chumbo e resulta na acumulação no sangue de PP-IX livre ou complexada com zinco (PPZ), constituindo um bom indicador da presença de chumbo (Onalaja e Claudio 2000).

A determinação da PPZ e da PP-IX pode ser feita em laboratório por espectrofluorimetria, nomeadamente em HPLC. Mas a grande vantagem da determinação da PPZ é poder ser feita no local, com recurso a um método rápido, de fácil execução e de baixo custo. A utilização de um hematofluorímetro portátil, que mede a razão entre a fluorescência da PPZ e a quantidade de luz absorvida pela oxihemoglobina, requer apenas a colheita de algumas gotas de sangue capilar (obtido geralmente por punção no dedo após limpeza) e fornece resultados que se correlacionam com os determinados laboratorialmente (Roh *et al.* 2000; Prista *et al.* 2002). A determinação no local dá uma noção rápida das condições de exposição individual a chumbo nos últimos meses (o tempo de formação dos eritrócitos), com grande utilidade para despistar exposições elevadas a chumbo. Diversos autores referem ter encontrado uma relação positiva entre valores de PPZ e de Pb-S embora os valores de PPZ apresentem variações interindividuais mais acentuadas, sejam afectados em situações de anemia hemolítica e não apresentarem aumento quando a Pb-S é inferior a 30 µg/dL (Roh, *et al.* 2000; Cheymol *et al.* 2001; Prista *et al.* 2004).

### 3.3.2. Determinação urinária de ALA (ALA-U) e coproporfirina III (COPRO-U)

A acumulação de ALA em consequência da diminuição da actividade da enzima ALAD determina (por mecanismos de feed-back negativo) a estimulação da enzima ALAS, intensificando a consequente acumulação de ALA no plasma e favorecendo o aumento da sua expressão na urina (Onalaja e Claudio 2000). O coproporfirinogénio I e III são intermediários metabólicos da biossíntese do heme que facilmente são oxidados a coproporfirinas (respectivamente I e III). O isómero COPRO III é excretado em excesso a partir de duas semanas após o início da exposição (Sakai 2000).

A ALA-U apresenta uma relação curvilínea com a Pb-S. Embora a ALA-U comece a relacionar-se com a plumbémia acima de 20 µg/dL de sangue, essa relação só começa a ser bem distinta a partir de valores de plumbémia superiores a 40 µg/dL (Makino *et al.* 2000; Prista *et al.* 2003). A mesma questão surge em relação à COPRO-U e embora a excreção de COPRO-U se relacione positivamente com os valores de Pb-S e ALA-U, estes só aumentam significativamente quando os valores de Pb-S ultrapassam os 70-80 µg/dL (Sakai 2000).

A excreção urinária é influenciada pelos ritmos biológicos do organismo, pelo que a concentração de compostos na urina não é uniforme ao longo do dia (Prista, *et al.* 2003). Assim, da mesma forma que para o doseamento do Pb-U, é necessário proceder à correcção com a concentração urinária de creatinina. Prista e col. (2003) concluíram que, pelo menos no caso da ALA-U, é aconselhável recorrer a colheitas de 24h, procedimento com pouca adequabilidade prática para avaliações de rotina.

### 3.3.4. Actividade da Pirimidina 5'-Nucleotidase (P5N)

O interesse da utilização da actividade enzimática da pirimidina 5'-nucleotidase (P5N) como indicador biológico da exposição ao chumbo surgiu do reconhecimento de que esta enzima é inibida a concentrações de chumbo muito baixas (Sakai, *et al.* 1988; Marqués 1993). A enzima P5N catalisa a hidrólise de nucleótidos pirimidínicos, facilitando a libertação de fósforo inorgânico. Os ensaios de doseamento recorrem à



determinação da quantidade de fosfato inorgânico ou de nucleótidos pirimidínicos. O primeiro tem por base um método colorimétrico que exige tratamentos prévios da amostra complexos e demorados pelo que não serve para ser usado como ensaio de rotina. O segundo constitui um método muito mais simples e menos moroso, logo mais exequível, mas requer a utilização de um nucleótido marcado radioativamente o que faz com que não seja prática laboratorial comum (Sakai 2000).

### **3.4. Biomarcadores de susceptibilidade**

#### 3.4.1. Polimorfismos genéticos (biomarcadores de susceptibilidade)

Os biomarcadores de susceptibilidade são indicadores da capacidade inerente ou adquirida de um organismo para responder ao estímulo provocado pela exposição a um xenobiótico específico. Indicam diferenças individuais e/ou populacionais pré-existent e independentes da exposição. Estas diferenças são predominantemente de origem genética embora a ocorrência de alterações fisiológicas, a existência de medicação e a exposição a outros agentes ambientais possam ter influência na susceptibilidade individual a um agente externo (IEH 1996).

Os genes polimórficos mais conhecidos e estudados por terem influência na bioacumulação, toxicocinética e toxicodinâmica do chumbo nos organismos humanos encontram-se nos genes da ALAD, do VDR e da hemocromatose (Onalaja e Claudio 2000; Kelada, *et al.* 2001; Chuang *et al.* 2004; IARC 2006a).

##### 3.4.1.1. Polimorfismos do gene ALAD

A influência do polimorfismo do gene que codifica a enzima ALAD no efeito do chumbo sobre a biossíntese do grupo heme tem sido consensualmente referida quando se fala da exposição a chumbo e de susceptibilidade genética. Tanto mais quando se

sabe que esta enzima catalisa um passo fundamental da biossíntese do heme e que qualquer alteração à sua eficiência se reflecte na produção de hemoglobina.

Esse gene está localizado no cromossoma 9q34 e apresenta duas formas polimórficas ou alelos codominantes: ALAD1 e ALAD2. As diferentes combinações dos dois alelos dão origem a três fenótipos ou isoenzimas: ALAD1-1, ALAD2-2 e ALAD1-2. O polimorfismo (G177C) ocorre por transversão de uma guanina para citosina no nucleótido 177 da região codificante, resultando na substituição de uma lisina por uma asparagina na posição 59 da proteína (Wetmur, *et al.* 1991; Kelada, *et al.* 2001). Esta simples substituição altera a carga eléctrica molecular e as diferentes combinações alélicas resultam em proteínas com cargas diferentes, sendo mais electronegativa a proteína ALAD2-2, seguida da ALAD1-2 e, finalmente, da ALAD1-1 que apresenta menor carga negativa (Sakai 2000 Onalaja, 2000, 290; Kelada, *et al.* 2001).

Diversos autores têm obtido resultados que indiciam que este polimorfismo esteja relacionado com o efeito do chumbo na biossíntese do heme e, logo, com a concentração de chumbo no sangue. Os dados apontam para que, perante uma mesma exposição a chumbo, indivíduos portadores do alelo ALAD2 (homozigóticos ou heterozigóticos) apresentem concentrações mais elevadas de chumbo no sangue do que indivíduos ALAD1 (Wetmur, *et al.* 1991; Onalaja e Claudio 2000; Sakai *et al.* 2000). Estes no entanto manifestam mais efeitos a outros níveis, como por exemplo, no SNC e no sistema hematopoiético (Onalaja e Claudio 2000). A explicação pode estar na característica de maior electronegatividade do alelo ALAD2, que confere à enzima ALAD maior afinidade para o chumbo, ficando este metal menos disponível para ser distribuído para outros órgãos, uma vez que se mantém complexado com a proteína. Isto pode significar que a presença do alelo ALAD2 confere um efeito protector para os outros órgãos e sistemas (Onalaja e Claudio 2000; Kelada, *et al.* 2001). Há no entanto outros estudos que não encontraram uma associação significativa entre a concentração de chumbo no sangue e o genótipo desta enzima (Smith *et al.* 1995; Bergdahl *et al.* 1997; Alexander *et al.* 1998a; Süzen *et al.* 2003) e Schwartz J. 1995 e Schwartz e col. 1997, citados por ATSDR (2007).

Numa revisão de 2001 (Kelada, *et al.* 2001), os autores concluíram que, dependendo das populações, a prevalência do alelo ALAD2 varia entre 0 e 20 %. De acordo com a mesma revisão, cerca de 80 % da população caucasiana apresenta o fenótipo ALAD1-1, 19 % o fenótipo ALAD1-2 e apenas 1 % da população o fenótipo ALAD2-2 ao que correspondem frequências genéticas de 0,9 e 0,1 para os alelos ALAD1 e ALAD2 (Bergdahl 1997). Noutras populações, como a africana e a asiática, a frequência do alelo ALAD2 é mais baixa e raramente se encontram homozigóticos para esse alelo. Kelada e col. apresentam os resultados obtidos por Amorim e col. num estudo realizado na população portuguesa, nomeadamente, frequências de 0,827, 0,165 e 0,008 para os genótipos ALAD1-1, ALAD1-2 e ALAD2-2, respectivamente (Amorim *et al.* 1994; Kelada, *et al.* 2001).

#### 3.4.1.2. Polimorfismos do gene VDR

O gene do receptor da vitamina D (VDR), localizado no cromossoma 12cen-q12 (Zmuda *et al.* 2000), está envolvido na absorção do cálcio do intestino. A vitamina D liga-se ao VDR no núcleo das células intestinais, rins e osso, activando assim genes que codificam para proteínas que ligam ao cálcio. Estas proteínas estão envolvidas no transporte de cálcio ao regularem a produção de proteínas que ligam ao cálcio. De acordo com Onalaja e Claudio (2000) o gene do VDR é responsável por cerca de 75 % da carga genética com influência na densidade óssea (ATSDR 2007). A sua activação resulta na elevação da taxa de absorção de cálcio e, conseqüentemente, de chumbo, se estiver presente, uma vez que este compete para os mesmos locais de ligação. Este processo parece ser especialmente importante quando os valores de chumbo são elevados tendo sido colocada a hipótese de que um polimorfismo neste gene pode ter influência na acumulação de chumbo nos ossos. Ou seja o cálcio e o chumbo seriam transportados simultaneamente através do intestino para a circulação sanguínea e, seguidamente, distribuídos conjuntamente para os tecidos ricos em cálcio. Este gene apresenta diversas formas polimórficas no organismo humano que resultam do corte do ADN com 3 enzimas de restrição diferentes: *TaqI*, *FokI* e *BsmI* (Lidsky e Scheider 2003).

O polimorfismo definido pela enzima *BsmI* (localizado no intrão que separa os exões VIII e IX (Zmuda, *et al.* 2000)) dá origem a dois alelos (b na presença, ou B, na ausência do local de restrição) que se traduzem em três isoenzimas: B-B, b-b e B-b. A hipótese é de que a toxicidade do chumbo possa ser modificada por polimorfismos deste tipo neste gene, em que o alelo B esteja associado a um receptor menos funcional, afectando de forma negativa a absorção do cálcio e a sua distribuição no organismo e resultando numa menor densidade óssea (Zmuda, *et al.* 2000). Os resultados obtidos por diversos grupos têm originado resultados controversos mas há estudos que apontam para que indivíduos portadores do alelo B apresentem maiores concentrações de chumbo quelatável assim como níveis mais elevados de chumbo no sangue e nos ossos (Schwartz *et al.* 2000a e Schwartz 2000b citados por ATSDR (2007). Chuang e col. (Chuang, *et al.* 2004), pelo contrário, não concluíram haver evidência de risco aumentado da susceptibilidade à toxicidade do chumbo. No entanto apenas 0,4 % do grupo estudado tinha o genótipo BB.

De acordo com Kamel e col. (2003) o genótipo homozigótico BB encontra-se em cerca de 10 a 20 % da população caucasiana. Numa meta-análise em que foram comparados os resultados obtidos em 29 estudos, as frequências encontradas para o genótipo BB foram de 17,2, 4,9, e 2,3 % para as populações caucasiana, africana e asiática, respectivamente (Cooper e Umbach 1996).

#### 3.4.1.3. Polimorfismos do gene da Hemocromatose

O organismo humano obtém ferro elementar através da dieta sendo variáveis as quantidades ingeridas. Hash (Hash 2001) estima, por exemplo, que os americanos ingiram entre 15 e 20 g de ferro diariamente. Mas independentemente da quantidade de ferro proveniente da dieta, o organismo apenas absorve entre 1 e 2 g diários (no intestino) e perde aproximadamente a mesma quantidade, no suor e no sangue menstrual, por exemplo (Hash 2001). Desta forma, e uma vez que o organismo humano não possui mecanismos fisiológicos para regular a quantidade de ferro excretado, o equilíbrio do teor em ferro é mantido por controlo dos mecanismos de absorção no

intestino onde a transferrina (proteína plasmática que transporta o ferro) e os seus receptores no intestino formam um complexo estável e modulam o transporte de ferro (Hash 2001). A proteína HFE (codificada pelo gene HFE localizado no cromossoma 6) actua como o principal regulador da absorção de ferro ao formar um complexo transmembranar com o receptor da transferrina, reduzindo a afinidade deste para a transferrina (Hash 2001; Ponka 2002).

Duas mutações específicas no gene HFE resultam na produção de proteína HFE disfuncional e dão origem a taxas excessivas de absorção intestinal de ferro, com conseqüente depósito em órgãos internos (sobretudo no fígado) resultando em lesões e comprometimento funcional patológicos, distúrbio que se denomina de hemocromatose (Onalaja e Claudio 2000; Beutler *et al.* 2003). A mais frequente (C282Y) aparece como conseqüência de uma mutação na posição 282 em que uma cisteína é substituída por uma tirosina e tem como resultado a produção de uma proteína HFE incapaz de se ligar à globulina membranar. A outra mutação (H63D) ocorre na posição 63 em que, por substituição de uma histidina por um aspartato, a proteína resultante, embora mantenha a capacidade de se ligar ao receptor da transferrina, não consegue impedir que ocorra simultaneamente a ligação à transferrina (Hash 2001). Na população americana essas frequências são da ordem dos 7-17 % para a variante C282Y e 10-32 % para a variante H63D (Hash 2001; Wright *et al.* 2004).

Dois factos contribuíram para a hipótese de estas variantes genéticas serem relevantes para a toxicodinâmica do chumbo: a elevada frequência na população geral de indivíduos heterozigóticos, com um dos alelos mutados C282Y ou H63D e a existência de associação entre absorção de ferro e de chumbo (Wright, *et al.* 2004).

Resultados obtidos neste tipo de estudos indicam que indivíduos com uma das variantes C282Y ou H63D no gene HFE acumulam mais chumbo do que indivíduos que não os possuem (Wright, *et al.* 2004; Hopkins *et al.* 2008). De acordo com Hopkins e col. este efeito é mais acentuado na presença da variante P570S do gene da transferrina (Hopkins, *et al.* 2008).

### 3.5. Valores de Referência

Ao longo das últimas décadas têm sido desenvolvidos vários estudos no sentido de determinar um limite de segurança máximo de chumbo presente no ar e no sangue, tanto em indivíduos expostos ocupacionalmente como não expostos.

A *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) publica todos os anos um conjunto de valores de referência (TLV e BEI). A maioria dos valores de BEI é definida por relação directa com o valor de TLV. Representam o valor de dose interna que corresponde à inalação de uma concentração correspondente ao TLV. Mas há excepções a este critério e o valor indicado para Pb-S é uma delas. No caso da exposição a chumbo, os especialistas da ACGIH entenderam haver informação documentada suficiente para estabelecer o valor de BEI para o Pb-S com base directa em estudos epidemiológicos que demonstraram a associação desses valores aos efeitos na saúde. Esse valor não tem, portanto, relação directa com o valor indicado como TLV (Morgan 1997). O valor de BEI ou VLB (Valor Limite Biológico) actualmente indicado é de 30 µg/dL, desde que foi adoptado em 1987, e o TLV é 50 µg/m<sup>3</sup> pela ACGIH (Morgan 1997; SCOEL 2002; ACGIH 2008).

Em Portugal, a legislação em vigor para a protecção dos trabalhadores contra os riscos da exposição ao chumbo e aos seus compostos iónicos nos locais de trabalho data de 1989. É o Decreto-Lei n.º 274/89 de 21 de Agosto que transpõe para o direito interno a Directiva do Conselho n.º 82/605/CEE de 28 de Julho de 1982. O VLE-MP estabelecido para o chumbo é de 150 µg/m<sup>3</sup>. De acordo com esta lei a monitorização biológica dos trabalhadores deve compreender a determinação da plumbémia (Pb-S) por espectrometria de absorção atómica. Pode também conter a medição de um ou de vários dos seguintes indicadores biológicos: protoporfirina de zinco no sangue (PPZ) por hematofluorimetria, do ácido δ-aminolevulínico na urina (ALA-U) por método Davis, e da desidratase do ácido δ-aminolevulínico no sangue (ALAD) pelo método padrão europeu (ou métodos equivalentes). Assim, o VLB para a plumbémia é de 70µg/dL de sangue (para pessoas expostas a este metal em actividades profissionais). Salvaguarda no entanto algumas excepções a esse valor, nomeadamente que a Pb-S pode ultrapassar

as 70 µg/dL, até um máximo de 80 µg/dL, desde que sejam avaliados e cumpridos os valores indicados para outros parâmetros de indicadores biológicos: ALA-U inferior a 20 mg/g de creatinina; ou PPZ inferior a 20 mg/g de hemoglobina<sup>7</sup>; ou actividade da ALAD superior a 6 unidades europeias (UE).

Este Decreto-Lei prevê que a vigilância biológica seja feita com base em valores de ALA-U apenas quando o trabalhador tenha estado sujeito a exposição elevada num período de tempo inferior a um mês. Neste caso o VLB de ALA-U a ser considerado é de 20 mg/g de creatinina.

Em Setembro de 2000 a SCOEL-EU (Scientific Committee for Occupational Exposure Limits – União Europeia) publicou recomendações no sentido de baixar o limite de exposição aplicável a toda a União Europeia para 30 µg/dl para todos os trabalhadores expostos (SCOEL 2002).

---

<sup>7</sup> Neste ponto o DL n.º 274/89 apresenta uma incorrecção: as unidades referidas para PPZ são mg/g de creatinina, embora na Directiva do Conselho nº82/605/CEE as unidades sejam mg/g hemoglobina.

## **II. ESTUDO PRESENTE**

### **1. OBJECTIVO DO ESTUDO**

Com este estudo pretendeu-se contribuir para o conhecimento da toxicidade do chumbo, nomeadamente a nível de dano genético com recurso aos testes do cometa e de mutação do receptor de linfócitos T (TCR) em leucócitos de sangue periférico, cruzando esses danos com uma gama de valores de plumbémia, desde os valores encontrados na população geral até aos encontrados em trabalhadores em indústrias em que se utiliza chumbo.

Adicionalmente procurou-se caracterizar os valores de plumbémia que se encontram na população portuguesa de indústrias onde actualmente se utiliza chumbo inorgânico em Portugal e caracterizar a resposta da actividade da enzima ALAD e da PPZ nos valores de plumbémia encontrados e avaliar a possível influência dos diferentes polimorfismos genéticos da ALAD e da VDR na toxicidade do chumbo, nomeadamente a nível de genotoxicidade.

Para alcançar os objectivos propostos foi definido efectuar o doseamento analítico, em cada indivíduo estudado, dos seguintes parâmetros e testes:

- Plumbémia (Pb-S);
- Protoporfirina-zinco (PPZ) no sangue;
- Actividade sanguínea da enzima desidratase do ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALAD);
- Teste do cometa (single cell gel electrophoresis);
- Ensaio de mutação no receptor do antigénio de linfócitos T (TCR-mf);
- Polimorfismos genéticos ALAD e VDR.



## **2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### **2. 1. Amostra de Estudo**

No planeamento do estudo foi previsto considerar como amostra alvo dois grupos de trabalhadores: o primeiro, com exposição profissional a chumbo inorgânico e sem exposição profissional a outros agentes carcinogénicos<sup>8</sup>; o segundo, constituído por indivíduos sem exposição ocupacional a chumbo, servindo como grupo de controlo.

Através da Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP) da UNL e dos seus contactos com os serviços de Medicina do Trabalho, foi obtida a colaboração de duas Empresas na área de Lisboa, em cuja produção se utiliza chumbo (uma indústria química e outra de produção de acumuladores de chumbo ácido), bem como dos respectivos trabalhadores.

Como grupo de trabalhadores não expostos profissionalmente recorreu-se à participação voluntária de indivíduos a laborar na mesma área geográfica mas em empresas e em funções que não implicassem exposição ocupacional a chumbo, com base em informação dos respectivos serviços de Medicina do Trabalho.

No final o conjunto de indivíduos alvo do estudo ficou constituído por 186 trabalhadores, todos do sexo masculino, 148 dos quais desenvolvendo as suas actividades profissionais com exposição a chumbo.

Não foi possível alargar o grupo de trabalhadores não expostos (N = 38) por razões que se prendem com as óbvias dificuldades de encontrar voluntários nessas condições e também tendo em conta limitações de tempo e recursos. Assim, foi abandonada a perspectiva inicial de desenvolver um estudo de caso-controlo. Os trabalhadores não expostos integram a análise estatística como um dos grupos de análise.

---

<sup>8</sup> Informação a obter junto dos serviços de Medicina de Trabalho.

Os critérios de inclusão para todos os participantes consistiram em não ter (conhecimento da existência de) doenças crónicas como cancro, não ter sido exposto a raios X nos 12 meses anteriores à colheita e não estar regularmente exposto a (outros) agentes genotóxicos. Isto foi assegurado com recurso a um pequeno questionário *ad hoc* aplicado pela própria investigadora (anexo A).

O trabalho foi realizado em laboratórios do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, por ser a instituição proponente do projecto à FCT, financiadora, (PDCT/SAU-OBS/59821/2004) e por a investigadora ser bolseira dessa instituição.

O estudo foi submetido à Comissão de Ética do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge e desenvolvido de acordo com a Declaração de Helsínquia de 1975 revista em 1989, tendo todos os participantes dado o seu consentimento informado.

## **2.2. Colheita de Amostras Biológicas**

As colheitas de amostras biológicas foram efectuadas entre Julho de 2006 e Março de 2007, de acordo com o calendário de colheitas estabelecido pelos Serviços de Medicina do Trabalho das duas empresas em causa.

No momento da colheita das amostras biológicas (8–10 participantes por dia de colheita) foi explicado o âmbito e objectivo do estudo, obtido o seu consentimento informado. Foi-lhes pedido que respondessem ao inquérito atrás referido – informações sobre características demográficas (idade, sexo), estilos de vida (em especial hábitos tabágicos), história clínica (exposição a raios X, vacinação, medicação) e história de exposição ocupacional (anos de exposição, existência de exposição potencial a outras substâncias reconhecidamente carcinogénicas).

A cada participante foi colhida uma amostra de sangue em tubos de EDTA e heparina sódica – NaHep (num total de cerca de 25 mL). Todas as amostras foram codificadas no local de colheita e transportadas para o laboratório, a 4°C, onde foram separadas em

alíquotas para utilização imediata ou armazenamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  ou  $-70^{\circ}\text{C}$  até ao momento da análise.

Nas horas que se seguiram à colheita a amostra de sangue colhida foi manipulada e/ou repartida em quantidades óptimas para permitir que todas as técnicas fossem realizadas. Foi efectuada a separação de alíquotas de sangue em tubos com heparina, para determinação da actividade da enzima ALAD e análise do hematócrito; e tubos com EDTA, para doseamento de chumbo no sangue, isolamento de leucócitos em gradiente de Ficoll e condicionamento em frio.

### **2.3. Ensaio Analítico**

#### **2.3.1. Doseamento de chumbo no sangue por espectrofotometria de absorção atómica electrotérmica – EAA**

Uma alíquota de sangue total é diluída com um tensoactivo para facilitar a sua hemólise. A quantificação do chumbo presente efectua-se por espectrofotometria de absorção atómica a 283,3 nm, utilizando câmara de grafite com plataforma de L'vov e modificador de matriz. Um volume conhecido de amostra é injectado num tubo de grafite que é sujeito a um programa de temperaturas constituído por diversas etapas sequenciais. Na primeira etapa, secagem, uma baixa corrente eléctrica aquece o tubo e o solvente da amostra é volatilizado. Na segunda etapa, pirólise, ocorre a destruição da matéria orgânica e volatilização dos outros componentes da matriz, a uma temperatura intermédia. Na terceira etapa, atomização, uma elevada corrente aquece o tubo até à incandescência, em atmosfera inerte, convertendo o elemento a determinar em vapor atómico no estado fundamental, havendo absorção de radiação monocromática proveniente de uma fonte característica (lâmpada de cátodo oco). Um detector fotoeléctrico mede a intensidade da radiação transmitida, que é inversamente proporcional à quantidade de átomos existentes no percurso óptico. Após a atomização, o tubo de grafite é aquecido a uma temperatura superior à etapa anterior de modo a remover possíveis resíduos da amostra no interior do tubo (limpeza). Finalmente, o tubo

de grafite arrefece automaticamente até próximo da temperatura ambiente. As temperaturas e os tempos correspondentes às diferentes etapas de aquecimento do tubo dependem do elemento a dosear e do tipo de matriz da amostra.

A concentração do elemento na amostra (chumbo) é determinada relativamente a uma curva de calibração preparada com padrões aquosos e é obtida por interpolação na curva de calibração em  $\mu\text{g/dL}$ .

O método utilizado baseia-se nas condições aconselhadas pelo fornecedor do equipamento (UNICAM 1991) e nas condições utilizadas por (Parsons *et al.* 2001) com limite de detecção de  $0,93 \mu\text{g/dL}$ . As leituras foram feitas a  $283,3 \text{ nm}$  com correcção de *background* – Zeeman. A análise efectuou-se com um programa de cinco fases com temperaturas e tempos de acordo com a TABELA 4.

TABELA 4 – Programa de forno utilizado no método de análise em EAA.

Fase	Temperatura (°C)	Tempo (s)	Rampa (°C/s)	Gás
1	90	10	5	Árgon
2	110	20	5	
3	850	20	50	
4	1900	3	off	
5	2500	3	off	

Os padrões para a curva de calibração são preparados a cada sessão de trabalho com 5 padrões (50, 100, 150, 200 e 250  $\mu\text{g/dL}$ ) – padrões preparados a partir de uma solução stock comercial de chumbo de  $1000 \mu\text{g/mL}$  em solução de ácido nítrico a 0,1 %.  $100 \mu\text{L}$  de cada um destes padrões são diluídos em  $900 \mu\text{L}$  de uma solução modificadora de

matriz<sup>9</sup> (SMM) para leitura no equipamento de EAA. O branco de calibração contém apenas SMM. As amostras (sangue total colhido para tubo com K<sub>2</sub>EDTA) são diluídas da mesma forma (100 µL de amostra em 900 µL de SMM). Padrões e amostras são colocados no amostrador automático sendo utilizados 10 µL de cada que são injectados no tubo de grafite.

### 2.3.2. Doseamento da Protoporfirina-zinco (PPZ)

O doseamento da PPZ é um método fluorimétrico de leitura directa que usa sangue total como matriz de análise. A determinação da PPZ é feita por meio de um hematofluorímetro portátil que contém uma lâmpada de halogéneo cuja luz produz um feixe de comprimento de onda de 415 nm. A excitação da PPZ por sua vez origina um feixe de 595 nm que é traduzido pelo equipamento em µmol PPZ/mol de heme. O resultado também pode ser apresentado pelo aparelho em µg/dL (µg de PPZ por dL de sangue).

O doseamento da protoporfirina-zinco foi feito como descrito e validado por Prista e col. (2002). O sangue capilar foi colhido por punção da extremidade do 4º dedo da mão direita (cerca de 75 µL) em tubo de hematócrito heparinizado e vertido para tubo de ensaio, onde foram adicionadas duas gotas de reagente próprio fornecido pelo fabricante. Após ligeira agitação do tubo (para homogeneização da mistura), o sangue foi colocado em lamela de vidro e esta introduzida no aparelho (através do porta-lâminas), procedendo-se à leitura no monitor de visualização do equipamento. Antes de cada leitura de amostra, cada lamela foi sujeita a leitura sem gota de sangue, sendo rejeitadas aquelas que revelaram leituras superiores a 3 (referência que foi adoptada por ser o limite de variação aceite pelas instruções do fabricante). O valor de PPZ assumido

---

<sup>9</sup> SMM: 0,2 % (m/v) dihidrogenofosfato de amónia ((NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 0,1 % (v/v) de HNO<sub>3</sub> e 0,5 % v/v Triton X-100 a 0,1 % (v/v)(UNICAM 1991).

no final de cada leitura foi o da leitura registada subtraída do valor de leitura da respectiva lamela. O equipamento permite a escolha de calibração para um de dois valores fixos de hematócrito (35 % e 42 %) e foi escolhido o último por se constatar (por leitura aleatória de resultados analíticos) ser mais aproximado dos valores habituais em grupos de trabalhadores considerados saudáveis. Os valores de PPZ dados pelo hematofluorímetro foram, posteriormente, corrigidos em função do hematócrito real, segundo a fórmula: valor da leitura  $\times$  (hematócrito real/42). Em cada sessão de colheitas efectuou-se calibração prévia do hematofluorímetro consoante as instruções do fabricante, com dois padrões (alto e baixo) por este fornecidos. O mesmo procedimento foi repetido sensivelmente a meio e no final de cada sessão. O resultado é apresentado em  $\mu\text{g PPZ/dL}$  sangue.

### 2.3.3. Determinação da actividade da enzima desidratase do ácido $\delta$ -aminolevulínico (actALAD)

O princípio do método adoptado para a determinação da actividade da desidratase do ácido  $\delta$ -aminolevulínico baseia-se no conhecimento de que a presença de chumbo no organismo humano inibe a actividade da enzima desidratase do ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALAD) nos eritrócitos. Procede-se à incubação da enzima com um excesso de substrato de ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA). O porfobilinogéneo (PBG) formado é misturado com o reagente de Ehrlich modificado e a cor obtida é medida com auxílio dum fotómetro contra um fundo branco. A quantidade de porfobilinogéneo produzido é indicativa da actividade da ALAD. O porfobilinogéneo é particularmente sensível à luz pelo que a análise deve ser completamente realizada ao abrigo da luz solar directa. O produto da reacção forma-se em quantidade directamente proporcional à actividade da enzima, a qual é revelada mediante a reacção de Ehrlich e determinada quantitativamente por espectrofotometria a 553 nm. A leitura é feita contra um branco de reagente.

A actividade da enzima ALAD foi determinada pelo método europeu padronizado, executando-se a técnica descrita por Berlin e Schaller em 1974, citado por Gurer-Orhan

e col. (2004) Duydu e col. (2001), Cordeiro e col. (1996) e Herber e Sallé (1978), e é expressa em unidades (U/ml, que corresponde a nmolALA/min/mL eritrócitos).

#### 2.3.4. Teste do Cometa ou Electroforese em microgel (SCGE)

A electroforese em microgel é uma técnica rápida, sensível e fiável que permite detectar e quantificar danos no ADN de células individuais. A técnica mais utilizada nos dias de hoje é a que foi desenvolvida por Singh e col. (1988), a partir do procedimento de Östling e Johenson (1984), em que a electroforese é realizada a pH alcalino (>13), o que facilita a desnaturação e o desenrolar das cadeias assim como a expressão das quebras de cadeia simples de ADN, para além de ajudarem à geração de rupturas nos locais alcali-lábeis. Utilizam-se núcleos embebidos numa camada fina de agarose em lâminas. Todas as proteínas celulares são removidas por lise celular. O ADN sofre desnaturação em condições alcalinas após o que é aplicado um campo eléctrico (electroforese) para permitir que os fragmentos de ADN migrem a partir do núcleo. Após coloração com um marcador fluorescente (como o brometo de etídeo) faz-se a leitura das células individuais em microscópio por contraste de fluorescência. O nome Teste do Cometa deve-se ao facto de, após a sua realização, as células com ADN danificado apresentarem a aparência de um cometa com a cabeça intensamente brilhante e uma cauda, em que o comprimento da cauda e a intensidade do brilho estão relacionados com a quantidade de rupturas na cadeia de ADN. As células com o ADN intacto (não danificado) apresentam-se como núcleos intactos sem cauda.

O teste do cometa foi realizado com base no procedimento descrito por Laffon e col. (2002). Utilizaram-se amostras de sangue total heparinizado, de onde se isolaram os linfócitos mononucleares por meio de um gradiente de densidade de Ficoll. Diluíram-se 5 mL de sangue em tampão fosfato pH 7,4 (Sigma Chemicals) na relação de 1:1 e centrifugou-se em meio de isolamento de linfócitos – (Lymphocytes isolation solution, Rafer) durante 30 min a 2100 rpm. A fase contendo os linfócitos foi extraída e lavada duas vezes com tampão fosfato pH 7,4 e centrifugada 5 min a 1500 rpm. As células foram ressuspensas para se obterem  $5 \times 10^5$  células/mL em meio RPMI 1640 contendo

1 % de dimetilsulfóxido (DMSO), após o que se incubaram em estufa a 37°C durante 30 min. Posteriormente foram centrifugadas durante 3 min a 9000 rpm, lavadas em tampão fosfato pH 7,4 e centrifugadas de novo. A viabilidade celular foi avaliada mediante a técnica de exclusão com azul de Trypan (Sigma), tendo sido superior a 80 % em todas as culturas analisadas.

Usaram-se lâminas esmeriladas (para facilitar a adesão) em que se estendeu uma primeira camada de 130 µL de agarose de ponto de fusão normal (Life Technologies) a 1 % em tampão fosfato pH 7,4, cobrindo com lamela para se obter uma capa homogénea. As células foram ressuspensas em 80 µL de agarose de ponto de fusão baixo (Life Technologies) a 0.7 % em tampão fosfato pH 7,4 e espalhadas sobre a primeira camada de agarose, após terem sido retiradas as lamelas. As lâminas foram colocadas sobre gelo durante 15 min para permitir a gelificação, após o que se aplicou uma terceira camada de 80 µL de agarose de ponto de fusão baixo, levando-se de novo a solidificar sobre gelo.

As lamelas foram retiradas e as preparações foram submersas em solução de lise durante 1 h a 4°C no escuro. A solução de lise contém NaCl 2,5 M, Na<sub>2</sub>EDTA 100 mM, Tris-HCl 10 mM a pH 10 e Triton X-100 1 % que se adiciona mesmo antes da sua utilização. A partir deste ponto o processo foi todo realizado no escuro para prevenir qualquer dano adicional no ADN.

Depois da lise, as lâminas foram colocadas em tinas de electroforese horizontal colocadas num recipiente com gelo e foram cobertas com tampão de electroforese composto por Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM e NaOH 300 mM a pH>13 e permaneceram em contacto com este durante 20 minutos, para permitir o desenrolamento do ADN e a expressão dos locais alcalino-lábeis. De seguida levou-se a cabo a electroforese durante 20 min a 300 mA e 25 V (0,83 V/cm).

As lâminas foram posteriormente lavadas por três vezes durante 5 minutos com tampão de neutralização, contendo Tris-HCl 0,4 M a pH 7,5. Depois de se deixarem secar durante 10 minutos, as preparações foram coradas com DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) 5 µg/mL em solução *antifade* (Vectashield mounting medium for



fluorescence, Vector Laboratories) e guardaram-se em caixa humedecida e selada para manter a hidratação do gel.

Prepararam-se duas lâminas para cada amostra. Todas as lâminas da mesma amostra foram processadas na mesma electroforese. As lâminas foram observadas num período máximo de 48 horas e foram analisadas aleatoriamente 100 células por cada amostra (50 de cada réplica). As imagens foram obtidas e analisadas através do programa QWIN Comet, que se baseia em medidas densitométricas, fazendo a fragmentação das células em cabeça e cauda, assumindo que a forma da cabeça é esférica; considera como cauda tudo aquilo que se encontra na direcção da electroforese e fora da circunferência da cabeça, como se ilustra na FIGURA 7.

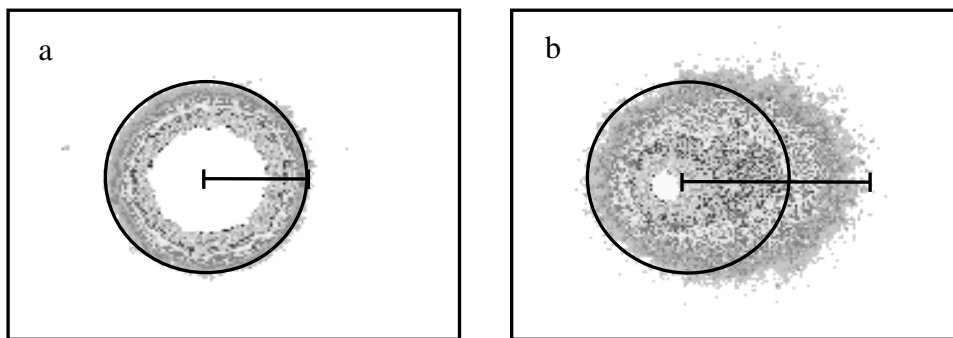


FIGURA 7 – Tratamento de imagem de uma célula com ADN intacto (a) e de uma célula com ADN danificado (b) através do programa Leica QWIN Comet. As circunferências indicam a área da cabeça e as linhas horizontais o comprimento da cauda (ADN danificado).

Para cada célula foram determinados diversos parâmetros: comprimento da cauda em  $\mu\text{m}$  (TL – Tail Length), momento da cauda (TM – Tail Moment), comprimento da cabeça em  $\mu\text{m}$  (HL – Head Length) e a percentagem de ADN na cauda e na cabeça, obtidas com base na intensidade do brilho.

### 2.3.5. Ensaio de mutação no receptor do antigénio de linfócitos T (TCR) por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica usada para distinguir e contar partículas microscópicas suspensas em meio líquido. É um método multiparamétrico que permite a análise simultânea de características físicas e químicas de células ou partículas individuais. Tem como princípio básico aspirar células ou partículas de uma suspensão previamente preparada que ficam incluídas na corrente em fluxo laminar dum líquido condutor e são forçadas a passar uma a uma através de uma câmara que é atravessada por um feixe de raios laser com comprimento de onda pré-estabelecido. Sempre que o raio laser choca com uma célula, a radiação vai sofrer desvios que, depois de convertidos pelo citómetro em sinais electrónicos, vão ser reconhecidos pelos detectores (ou sensores), responsáveis por medir diferentes características.

Os detectores estão apontados para o local onde a corrente de fluido passa através do feixe de luz. Um deles está na linha do laser a atrás da zona onde passam as partículas, é designado por *Forward Scatter* (FSC). O outro localiza-se perpendicularmente à direcção do laser, designando-se por isso Ortogonal ou *Side Scatter* (SSC). Simplificadamente pode dizer-se que o detector FSC dá informação sobre o tamanho da célula, baseado na difracção e refracção da luz, enquanto que o detector SSC, que mede a luz dispersada, avalia a granulosidade intra-celular, constituída pelo núcleo, cromossomas, mitocôndias e outros organelos ou partículas. Os citómetros de fluxo podem ainda possuir um número variável de detectores especializados em medir fluorescência, nomeadamente de fluorocromos como o FITC (isocianato de fluoresceína), o PE (ficoeritrina) e outros que vão ser acoplados a anticorpos monoclonais.

A amostragem dos dados, as análises e a interpretação são analisados através de software específico e podem ser medidos simultaneamente seis parâmetros: tamanho celular, granularidade interna das células, fluorescência verde, fluorescência amarela, fluorescência laranja, fluorescência vermelha e fluorescência roxa. De acordo com as características das células estas são agrupadas em histogramas virtuais semelhantes ao

representado na FIGURA 8. Circunscrevendo-se no histograma uma determinada amostra celular («gating») poderá proceder-se à sua imunofenotipagem.

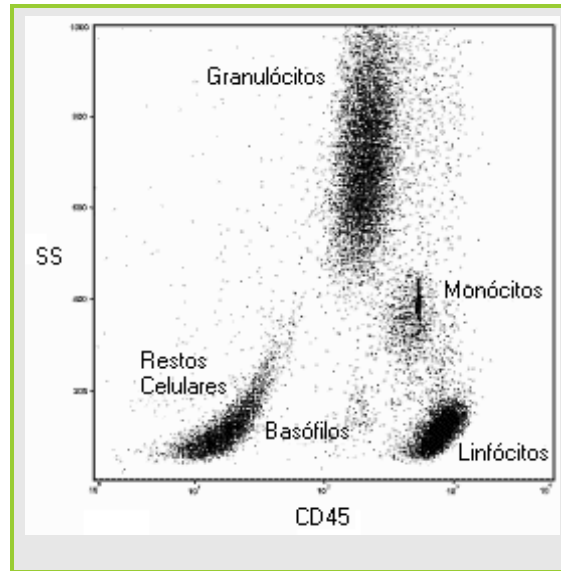


FIGURA 8 – Histograma de células normais do sangue periférico, obtido em função da presença de CD<sub>45</sub> lida no detector SSC.

Com esta técnica consegue excluir-se os monócitos que se encontrem entre as células estudadas, podendo separar-se e quantificar especialmente os linfócitos T, os linfócitos B e as células «Natural Killer (NK)». Se a soma T+B+NK (no seu conjunto designada por imunossoma) for aproximadamente igual a 95 %, temos a garantia de que não se perderam durante a separação quantidades significativas de células linfocitárias. de FL2 versus FL3 para o cálculo das citocinas circulantes.

Os receptores de células T (TCR) são receptores específicos para antígenos e são essenciais para a resposta imune. O receptor TCR convencional, ou TCR alfa/beta é um heterodímero formado por duas cadeias,  $\alpha$  e  $\beta$ , que se expressa na maioria dos linfócitos T periféricos CD4<sup>+</sup> (ou T auxiliares) e CD8<sup>+</sup> (T citotóxicos ou supressores). Os genes dessas cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  estão localizados nos cromossomas 14 e 7, respectivamente, e são fenotipicamente hemizigóticos, ou seja, apenas um alelo de cada um dos genes (de

ambas as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do TCR) está activo e é expresso na proteína. Por esse motivo, uma só mutação no gene funcional do TCR pode resultar na ausência de expressão fenotípica do TCR na superfície celular. As cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do TCR só podem ser expressas à superfície após formação de complexos moleculares com as cadeias CD3. Se a expressão de um dos genes das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do TCR estiver inactiva, o complexo TCR $\alpha\beta$ /CD3 não é transportado para a superfície na membrana. Como consequência vão acumular-se no citoplasma complexos malformados (Kyoizumi *et al.* 1990; Akiyama *et al.* 1991; Iwamoto *et al.* 1994; Ishioka *et al.* 1997; Taooka *et al.* 2006).

Podem detectar-se mutações nos genes das cadeias  $\alpha$  e/ou  $\beta$  do TCR por citometria de fluxo FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) usando anticorpos que reconheçam a molécula CD3. As células em suspensão líquida passam individualmente por um orifício e um raio laser analisa o tamanho e a estrutura das células, reconhecendo-as pela presença ou ausência dos marcadores fluorescente (Ross 1998a).

Esta técnica permite detectar e contar mutantes TCR $\alpha\beta$  (embora não diferencie as mutações das cadeias  $\alpha$  ou  $\beta$ ) na amostra de linfócitos T-auxiliares que expressam CD4, uma vez que mede a frequência de células mutantes CD3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> entre células T CD4<sup>+</sup> normais (Akiyama, *et al.* 1991; Iwamoto, *et al.* 1994).

O isolamento da fracção sanguínea correspondente aos leucócitos mononucleares (linfócitos e monócitos) foi feito em tubos BD Vacutainer<sup>®</sup> CPT<sup>™</sup> que contém no seu interior uma barreira de gel e uma solução que cria um gradiente de densidade que permitem a separação das diferentes fracções sanguíneas por centrifugação a 3100 rpm durante 30 minutos em centrífuga com rotor basculante. Depois da centrifugação transferiu-se a fracção que se encontra na parte superior da barreira de gel para outros tubos (esta porção contém linfócitos, monócitos e plasma sanguíneo) a que se adicionou PBS (Tampão fosfato; *Phosphate Buffered Saline*) para um volume final de 10mL e levaram-se a centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos. Rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento celular em PBS. Após nova centrifugação nas mesmas condições e voltou a ressuspender-se o sedimento celular obtido em 250  $\mu$ L de PBS.

Este volume é distribuído por 3 tubos de citometria (um para controlo do isotipo e os outros dois como duplicados para avaliação da frequência de mutação do TCR).

Os linfócitos de sangue periféricos foram corados com 7-amino-actinomicina D para excluir células não viáveis, anticorpos anti-CD4 marcados com PE e anticorpos anti-CD3 marcados com FITC, medindo-se a frequência de células T CD3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> mutantes em células T CD4<sup>+</sup> normais. Para o controlo usaram-se os anticorpos específicos conjugados com fluorocromos IgG2a-CD3-FITC e IgG1-CD4-PE.

A partir deste ponto todos os passos foram realizados em no escuro para evitar perdas de fluorescência dos fluorocromos conjugados com anticorpos. Adicionaram-se 20 µL de cada anticorpo marcado aos tubos e levaram-se a incubar no escuro durante 15 minutos, após o que se adicionou 1 mL de PBS a cada tubo, que foram levados a centrifugar a 1600 rpm durante 5 minutos. Rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento celular com PBS. Repetiu-se o passo anterior. Finalmente ressuspendeu-se o sedimento celular obtido do controlo de isotipo com 250µL de PBS e os outros dois com 500 µL de PBS.

As suspensões celulares assim preparadas foram analisadas por citometria de fluxo de acordo com Akiyama e col. (1995). O manuseamento do citómetro e a análise dos dados foram realizados através do programa *Cell Quest Pro*. Depois de circunscrever no histograma uma janela (“gate”) os linfócitos com base no tamanho e na complexidade obtiveram-se os dados de fluorescência de FITC (FL1) e PE (FL2). Adquiriram-se um mínimo de 250 000 células na janela de linfócitos.

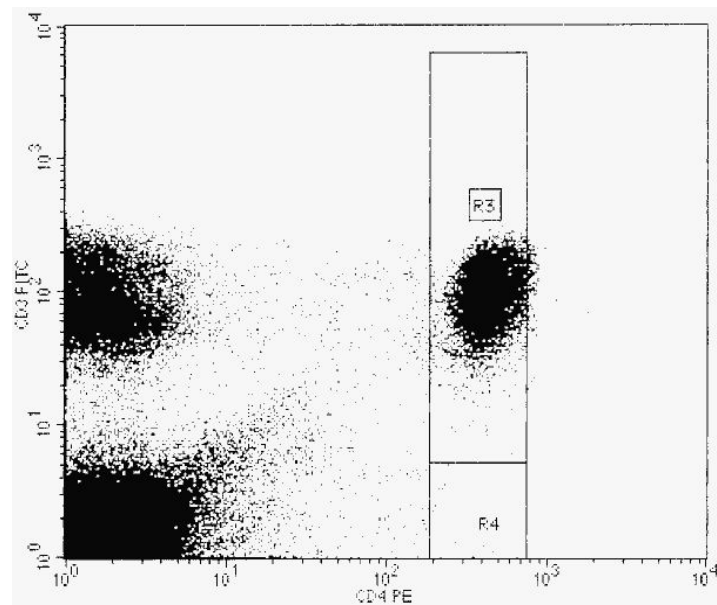


FIGURA 9 – Gráfico da fluorescência FL1 (CD3-FITC) versus a fluorescência FL2 (CD4-PE) realçando a janela CD3-CD4+ onde estarão situados os mutantes TCR $\alpha\beta$ .

Foi estabelecida uma janela CD3-CD4+ seguindo os critérios que se mostram na FIGURA 9 em que o limite superior de FL1 (CD3-FITC) para a janela de mutantes é 4 % do valor máximo da intensidade da fluorescência de CD3 para as células normais. Este limite superior é cerca de sete vezes mais alto que o pico máximo de FL1 no controlo do isótopo. Os limites, esquerdo e direito, foram estabelecidos respectivamente nos valores de metade e o dobro da intensidade do pico máximo de FL2 para células normais. Os valores das frequências de mutações foram calculados com o número de eventos lidos na janela de mutantes dividindo por o número de CD4+ totais.

### 2.3.6. Determinação de polimorfismos genéticos

Procede-se ao isolamento de amostras de ADN a partir de sangue total após o que se faz a amplificação do gene pretendido usando o PCR (Reacção em Cadeia de Polimerase; do inglês *Polymerase Chain Reaction*) obtendo-se um elevado número de cópias do gene. Para haver amplificação é necessário a utilização de iniciadores específicos (*primers*) do gene que se pretende amplificar (*forward* e *reverse*), nucleótidos (dNTP's), Taq – ADN polimerase (enzima estável a elevadas temperaturas) e solução de cloreto de

magnésio. Após amplificação é adicionada enzima de restrição para a obtenção dos fragmentos com comprimentos específicos dos alelos do gene pretendido (RFLP's – do inglês *Restriction Fragment Length Polymorfisms*). Estes fragmentos vão ser separados por electroforese. Após adição de um corante com fluorescência, na análise do gel de electroforese nos UV pode verificar-se se um determinado indivíduo é homozigótico ou heterozigótico, uma vez que os fragmentos dos vários alelos têm diferentes comprimentos e migram até pontos diferentes no gel.

#### 2.3.6.1. Genótipo da ALAD

O ADN genómico foi isolado a partir de sangue total utilizando o Kit de extracção *NucleoSpin® Blood L* (Machery-Nagel) segundo o procedimento fornecido pela marca. A amplificação do ADN, executou-se segundo o descrito por Süzen e col. (2003) com algumas alterações. Os *primers* utilizados foram *forward* 5'– AGA CAG ACA TTA GCT CAG TA –3' e *reverse* 5'– GGC AAA GAC CAC GTC CAT TC –3' (Thermo Scientific). Para um volume de reacção final de 50 µL foram adicionados 5 µL de ADN isolado, 1.2 mM de dNTPs (Thermo Scientific ABgene), 1.25 unidades de enzima Taq polimerase *Extensor Hi-Fidelity PCR Enzyme Mix* (Thermo Scientific ABgene), 20 pmol de cada *primer*, 2.75 mM de MgCl<sub>2</sub> e tampão de reacção fornecido com a enzima. O programa de PCR consistiu numa desnaturação inicial a 95 °C durante 2 min e 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 95 °C durante 1 min, emparelhamento a 55 °C durante 30 seg e extensão a 72 °C durante 1 min). O ADN amplificado (10 µL) foi então digerido com 40 unidades da enzima *Msp1* (Promega) num volume final de 25 µL, a 37 °C durante 3 h. Amostras, controlo negativo (contendo todos os reagentes com excepção de ADN) e um marcador de peso molecular correram em electroforese em gel de agarose a 1,5 % em tampão 0.5×TBE (0.45 M Tris-Borate, 0.01M EDTA). Cada gel foi posteriormente corado com uma solução a 1 µg/mL de brometo de etídeo em TBE e mantido no escuro com agitação horizontal (30 min), visualizado num transiluminador com luz ultra-violeta (UV) e os resultados observados foram registados.

O alelo ALAD1 tem peso molecular de 582 pb e é considerado *wild-type*. O alelo ALAD2 tem peso molecular de 511 pb e é considerado mutante, uma vez que codifica uma forma mutante desta enzima. O genótipo ALAD1-1 é caracterizado por possuir apenas um fragmento com 582 pb, o genótipo ALAD1-2 possui dois fragmentos com 582 e 511 pb e o genótipo ALA2-2 possui apenas o fragmento com 511 pb (FIGURA 10).

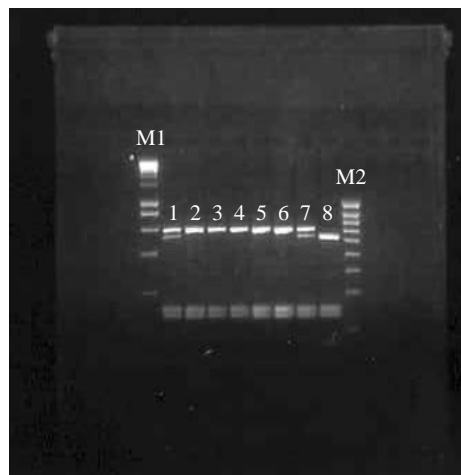


FIGURA 10 – Exemplo de um gel de agarose a 2 % submetido a uma voltagem de 70V durante 1 hora. As amostras pertencem a indivíduos homozigóticos ALAD1-1 (2, 3, 4, 5, 6), heterozigóticos ALAD1-2 (1 e 7) e homozigóticos ALAD2-2 (8). Foram utilizados dois marcadores com diferentes pesos moleculares (M1 e M2).

#### 2.3.6.2. Genótipo do receptor da vitamina D (VDR)

O ADN genómico foi isolado a partir de sangue total utilizando o Kit de extracção *NucleoSpin® Blood L* (Machery-Nagel) segundo o procedimento fornecido pela marca. A amplificação do local polimórfico para a enzima *BsmI* (intrão 8) foi executada de acordo com o descrito por Schwartz e col. (Schwartz *et al.* 2000b) com ligeiras alterações. Os *primers* utilizados foram 5'– CAA CCA AGA CTA CAA GTA CCG CGT CAG TGA –3' (*forward*) e 5' –AAC CAG CGG GAA GAG GTC AAG GG –3' (*reverse*) (Thermo Scientific). A reacção foi executada num volume final de 50 µL contendo 5 µL de ADN amplificado, 0.4 mM de dNTP (Thermo Scientific ABgene),



1.2 mM de cada *primer*, 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1.25 unidades de *GoTaq<sup>®</sup> Flexi* DNA polymerase (Promega) e tampão de reação fornecido com a enzima. As condições do programa de PCR consistiram em desnaturação inicial 94 °C por 5 min, a que se seguiram 35 ciclos de amplificação (95 °C durante 30 seg, 60 °C por 30 seg e 72 °C por 1 min) e uma extensão final a 72 °C durante 5 min. O ADN amplificado (1 µL) foi digerido com 5 unidades de *Bsm1* (Promega) a 65°C durante 3 h. Amostras, controlo negativo e um marcador de peso molecular correram em electroforese num gel a 1.5 %. Cada gel foi posteriormente corado em solução com brometo de etídeo, mantido no escuro com agitação horizontal (30 min) e foram visualizados num transiluminador com luz ultra-violeta (UV) e os resultados observados foram registados.

O genótipo homozigótico B-B apenas apresenta um fragmento sem local de restrição (825 pb), o genótipo homozigótico b-b apresenta dois fragmentos resultantes da restrição pela enzima (os de 650 e 175 pb) e o genótipo heterozigótico B-b apresenta os três fragmentos (825, 650 e 175 pb).

## 2.4. Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando o programa SPSS (versão 16.0 para Windows) considerando-se um nível de significância de 5 % ( $p = 0,05$ ) para todas as hipóteses testadas.

A normalidade da distribuição de todas as variáveis quantitativas foi analisada utilizando o teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov (K-S), com a correcção de Lilliefors, uma vez que a distribuição normal constitui uma boa descrição empírica das variáveis e ocupa um lugar central na maioria das técnicas estatísticas (Kirkwood 1988).

A influência das variáveis independentes nas variáveis dependentes foi avaliada pelos testes paramétricos t de Student e ANOVA a um factor, nos casos em que as distribuições obedeciam à normalidade. Na aplicação de ANOVA também se verificou o pressuposto de homogeneidade da variância por aplicação do teste de Levene. Na

ausência de normalidade recorreu-se aos testes não paramétricos de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis, por comparação de dois ou mais grupos independentes, respectivamente.

Para medir a associação existente entre as variáveis qualitativas utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$  de Pearson). Esta correlação de Pearson é uma medida da associação linear entre as variáveis. De acordo com Pestana e Gageiro (2000) está definido por convenção que  $r$  de Pearson menor que 0,2 indica uma associação muito baixa; entre 0,2 e 0,39 baixa; entre 0,4 e 0,69 moderada; entre 0,7 e 0,89 alta; entre 0,9 e 1 uma associação muito alta. De igual modo, quando as variáveis apresentavam uma associação não linear o seu grau de associação foi medido pelo coeficiente de correlação não paramétrico de Spearman ( $r_s$ ).

Na representação da distribuição das diferentes variáveis em função dos diferentes grupos em estudo recorreu-se à construção de gráficos de erro com representação de médias e intervalos de confiança para cada grupo em análise. No caso específico das variáveis que violavam o pressuposto de normalidade representaram-se as distribuições das variáveis para cada grupo em análise através de diagramas de caixa de bigodes (*box-plot* segundo a terminologia anglo-saxónica).

O diagrama de caixa de bigodes permite a observação expedita de um conjunto de estatísticas.

Os gráficos de *box-plot*, identificam o 1º quartil (Q1) e o 3º quartil (Q3) e é possível observar a amplitude inter-quartil,  $AIQ = Q3 - Q1$ , correspondendo ao comprimento da caixa. Os valores representados por um asterisco (\*) afastam da mediana mais do que três vezes o valor de AIQ são considerados valores aberrantes. Os valores representados por uma circunferência (o) afastam-se mais do que  $1,5 * AIQ$ , mas menos do que  $3 * AIQ$ , e são considerados valores extremos ou *outliers* moderados.

Finalmente, foi utilizado o modelo de regressão linear múltipla (MRLM) normalizado (Pestana e Gageiro 2000) com o objectivo de explorar a relação entre as variáveis dependentes contínuas e um conjunto de variáveis independentes (ou preditores). A

regressão linear múltipla baseia-se na correlação entre as variáveis mas permite uma exploração mais sofisticada da inter-relação entre elas. Usa-se com o objectivo de avaliar quanto é que a variação de uma determinada variável dependente é explicada com base no conjunto de variáveis estudadas, assim como qual é o peso de cada uma dessas variáveis independentes na variável dependente (Pallant 2007).

### 3. RESULTADOS <sup>10</sup>

#### 3.1. Características da amostra em estudo

##### 3.1.1. Características etárias

Os 186 indivíduos estudados são todos do sexo masculino, 38 deles sem exposição profissional a chumbo (NOE) e 148 com exposição profissional a chumbo (OE). De entre estes últimos, foram avaliados trabalhadores de duas indústrias com actividades distintas, uma indústria química (unidade fabril A) e a outra, uma indústria de produção de acumuladores de chumbo ácido (unidade fabril B).

Analisando a constituição dos grupos estudados (TABELA 5) verifica-se que a unidade fabril A (unidade A) contribuiu com maior número de trabalhadores para o total (47,9 %), e a unidade fabril B (unidade B) com 31,7 % destes, sendo o número de trabalhadores sem exposição profissional de apenas 38 (20,4 %).

TABELA 5 – Características etárias da amostra.

	Total	Sem exposição profissional (NOE)	Com exposição profissional a chumbo (OE)		
			unidade A	unidade B	Total OE
Média de idades (anos) <sup>a</sup>	45 ± 10	35 ± 8	46 ± 10	50 ± 7	48 ± 9
Intervalo de idades (min-max)	21 – 66	24 – 55	21 – 66	29 – 62	21 – 66
<b>Total</b>	<b>186</b>	<b>38 (20,4 %)</b>	<b>89 (47,9 %)</b>	<b>59 (31,7 %)</b>	<b>148</b>

Todos os indivíduos são do sexo masculino

<sup>a</sup> média ± desvio padrão;

<sup>10</sup> Todos os resultados individuais se encontram em tabela apresentada no Anexo B.

Em relação às idades, e ainda com base na TABELA 5, constata-se que o grupo sem exposição profissional apresenta uma média de idades mais baixa (35 anos) e um intervalo de variação mais estreito do que os outros dois grupos. O grupo de trabalhadores mais velhos é o proveniente da unidade B (média de 50 anos).

Para analisar o efeito da variável independente idade foram criados 5 grupos etários: [20, 30[, [30, 40[, [40,50[, [50,60[ e + de 60 anos. O grupo com maior número de elementos (indivíduos) corresponde ao intervalo [50, 60[ anos (38 %). Verifica-se também que 31 % do total tem menos de 40 anos (FIGURA 11).

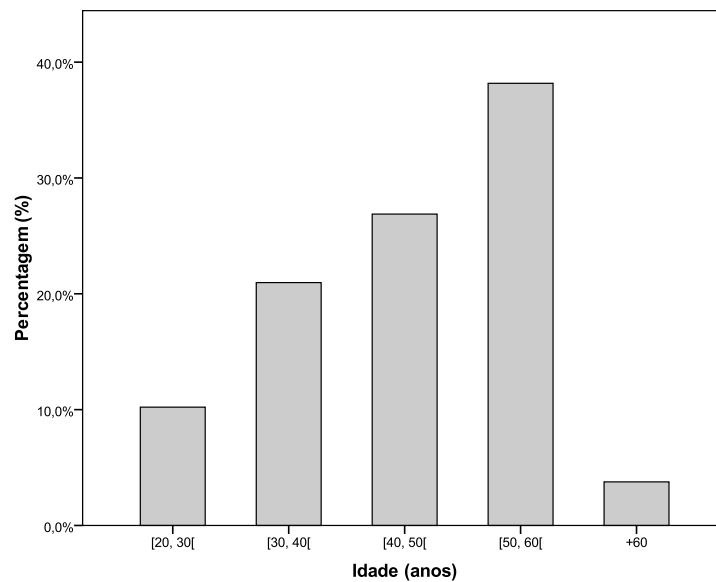


FIGURA 11 – Distribuição da amostra por faixas etárias.

3.1.2. Hábitos tabágicos

Em todos os grupos há maior número de indivíduos não fumadores, cerca de 82 % no grupo NOE e 60 % no grupo OE (TABELA 6, FIGURA 12), totalizando 64 % do grupo total.

TABELA 6 – Hábitos tabágicos da amostra em função da origem dos indivíduos.

Hábitos tabágicos		Sem exposição profissional (NOE)		Com exposição profissional a chumbo (OE)		Total
				unidade A	unidade B	
Hábitos tabágicos	Não fumadores	31	47	41		<b>119 (64 %)</b>
	Fumadores	7	42	18		<b>67 (36 %)</b>
<b>Total</b>		<b>38</b>	<b>89</b>	<b>59</b>		<b>186</b>

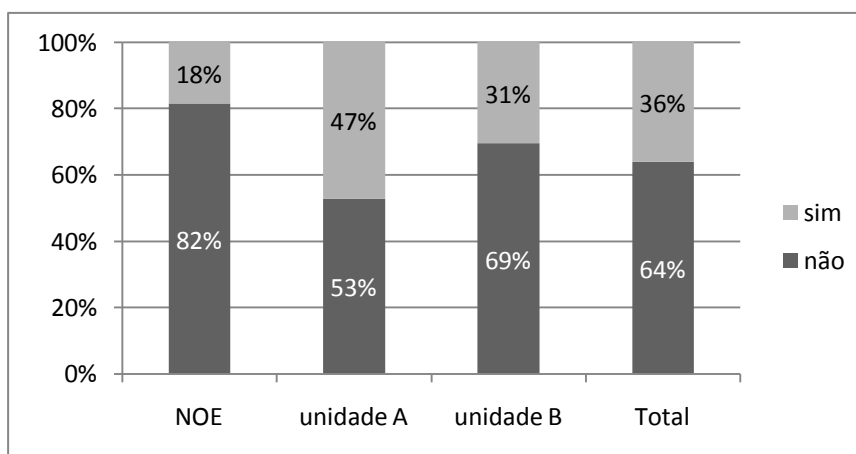


FIGURA 12 – Distribuição de fumadores e não fumadores em função da origem dos indivíduos da amostra.

### 3.1.3. Tempo de exposição

O efeito do tempo de exposição, definido como anos de trabalho com exposição a chumbo, foi avaliado com base nos grupos formados: [0,1[, [1, 6[, [6, 11[, [11, 21[, [20, 31[ e 31 +. Estes apresentam médias etárias de 34,6 anos (grupo [0,1[), 40,5 ([1, 6[), 45,8 ([6, 11[), 44,4 ([11, 21[), 54,4 ([20, 31[) e 66,7 anos (grupo 31 +) (TABELA 7).

TABELA 7 – Características etárias dos grupos criados com base no tempo de exposição.

Tempo de exposição (anos)	n	Idade* (anos) (min-max)
[0,1[	38	34,6 ± 7,6 24 – 55
[1, 6[	25	40,5 ± 11,2 21 – 58
[6, 11[	16	45,8 ± 11,7 24 – 66
[11, 21[	36	44,4 ± 7,8 32 – 58
[20, 31[	41	54,4 ± 4,3 44 – 58
31 +	30	66,7 ± 3,4 51 – 62

(\* , média ± desvio padrão; n, dimensão da amostra)

### 3.1.4. Exposição a chumbo

Os valores de plumbémia encontrados na amostra estudada apresentam distribuição normal e variam entre 1,0 e 67,2 µg/dL. Observa-se na

TABELA 8 que:

- As plumbémias do grupo NOE variam entre 1,0 e 14,5 µg/dL, com valor médio de 3,9 µg/dL;
- As plumbémias da unidade A variam entre 8,2 e 55,7 µg/dL com valor médio de 30,5 µg/dL;
- As plumbémias da unidade B variam entre 5,4 e 67,2 µg/dL com valor médio de 34,3 µg/dL.

TABELA 8 – Caracterização da exposição a chumbo em função da origem dos indivíduos da amostra.

Pb-S (µg/dL)	Sem exposição profissional (NOE)	Com exposição profissional a chumbo (OE)		Total
		unidade A	unidade B	
média ± DP	3,9 ± 3,1	30,5 ± 11,5	34,3 ± 15,3	<b>26,2 ± 16,4</b>
min – max	1,0 – 14,5	8,2 – 55,7	5,4 – 67,2	<b>1,0 – 67,2</b>

Considerando a amostra total verifica-se que mais de metade dos indivíduos estudados apresenta valores de plumbémia inferiores a 30 µg/dL (que corresponde ao valor VLB recomendado pela ACGIH (2008)) e não há nenhum caso com valor superior a 70 µg/dL (3). Este é o valor máximo admitido em Portugal para pessoas expostas a este metal em actividades profissionais, de acordo com o Decreto-Lei n.º 274/89 de 21 de Agosto que transpõe para o direito interno a Directiva do Conselho nº82/605/CEE de 28 de Julho de 1982.

A análise dos resultados de plumbémia foi feita com base em intervalos de 10 µg/dL (FIGURA 14): [0, 10[, [10, 20[, [20, 30[ e [40, 50[; o último intervalo, [50,70], reúne todos os indivíduos com plumbémia superior a 50 µg/dL, com o intuito de englobar elementos suficientes para ser considerado na análise estatística (caso se mantivessem intervalos de 10 µg/dL, apenas ficariam 3 elementos no último intervalo, de 60 a 70 µg/dL).



Os três primeiros intervalos reúnem 110 indivíduos e distribuem-se da seguinte forma: [0, 10[  $\mu\text{g/dL}$  com 40, [10, 20[  $\mu\text{g/dL}$  com 27 e [20, 30[  $\mu\text{g/dL}$  com 43. Os restantes encontram-se: 29 no [30, 40[  $\mu\text{g/dL}$ , 31 no [40, 50[  $\mu\text{g/dL}$  e 16 no [50, 70]  $\mu\text{g/dL}$ , totalizando 76 indivíduos.

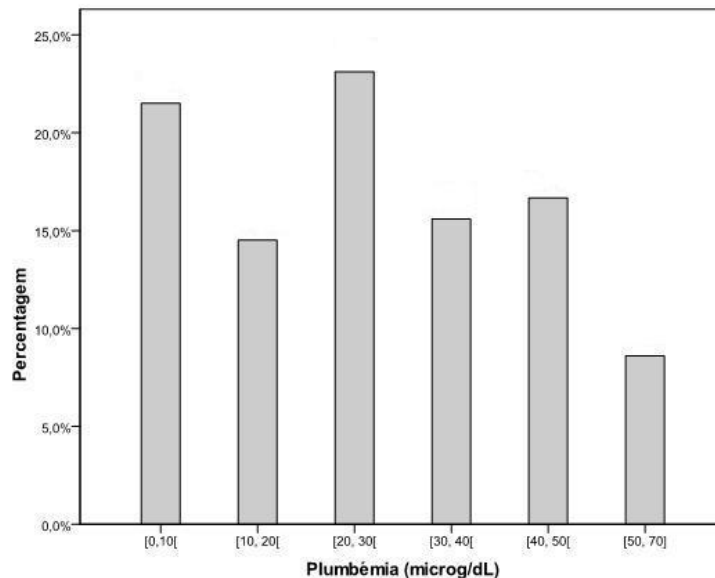


FIGURA 13 – Distribuição da amostra por intervalos de plumbémia.

Para efeitos do estudo estatístico, e uma vez que os indivíduos sem exposição ocupacional a chumbo (NOE) se revelaram em número inadequado para serem estudados como controlo num estudo de caso-controlo, optou-se por reunir a totalidade dos indivíduos (NOE e OE) e avaliar cada efeito tendo por comparação os valores da plumbémia (dose interna).

Os indivíduos passaram a ser considerados como um único grupo.

Para analisar os efeitos do tempo de exposição, definido como anos de trabalho com exposição a chumbo, formaram-se 6 grupos: [0,1[, [1, 6[, [6, 11[, [11, 21[, [20, 31[ e mais de 31 (31 +) anos de exposição.

Verifica-se a existência de menor número de indivíduos nos intervalos [1, 6[ e [6, 11[ anos de exposição (TABELA 11). Estes são também os grupos com menor amplitude. Foi nossa opção diminuir a amplitude dos grupos com menor tempo de exposição, com o intuito de dar visibilidade a eventuais alterações resultantes dos primeiros anos de exposição.

TABELA 9 – Tempo de exposição profissional ao chumbo da amostra estudada.

Tempo de exposição	n	Porcentagem
[0,1[	38	20,4 %
[1, 6[	25	13,4 %
[6, 11[	16	8,6 %
[11, 21[	36	19,4 %
[20, 31[	41	22,1 %
31 +	30	16,1 %

### 3.1.5. Caracterização dos polimorfismos genéticos

Os dados obtidos para os polimorfismos genéticos são: 96,9 % da amostra estudada apresenta o genótipo ALAD1-1 para o polimorfismo genético da ALAD. Apenas se encontraram três indivíduos com ALAD1-2 (1,9 %) e dois com ALAD2-2 (1,2 %).

Em relação aos genótipos de VDR a frequência na amostra foi de 29,6 % para o genótipo b-b, 39,3 % para o genótipo B-b e 31,1 % para o B-B. Dividindo a amostra por grupos de polimorfismos de VDR, não se encontraram diferenças estatisticamente significativas nos valores de Pb-S (FIGURA 14).

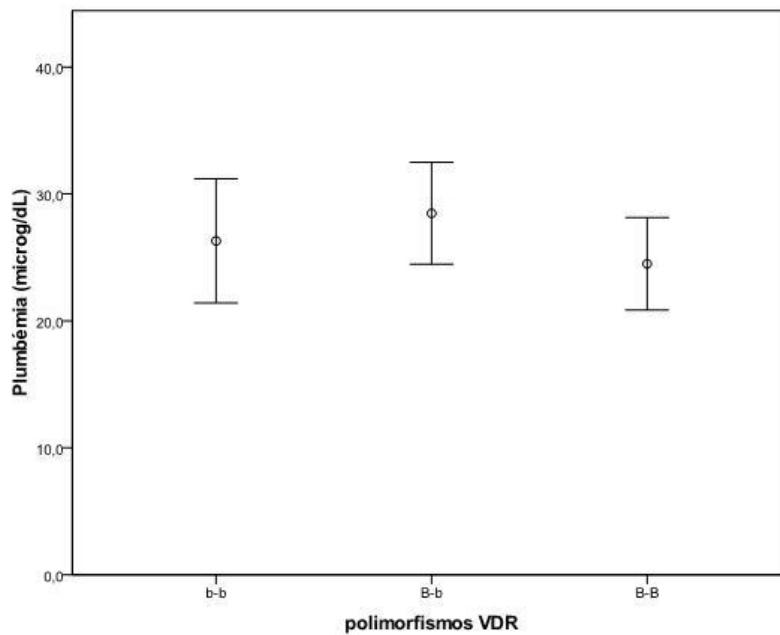


FIGURA 14 – Efeito dos polimorfismos de VDR na plumbémia (sem diferenças significativas de acordo com ANOVA a um factor a 95 % de confiança; as linhas verticais representam o I.C. a 95 %).

### 3.1.6. Estudo de normalidade

O estudo da normalidade das variáveis utilizando o teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov (K-S), com a correcção de Lilliefors deu os seguintes resultados: as variáveis com distribuição normal ( $p > 0,05$ ) são a plumbémia, Pb-S, com  $p = 0,327$  e todos os parâmetros do teste do Cometa (comprimento da cauda com  $p = 0,636$ , comprimento da cabeça com  $p = 0,481$ , percentagem de ADN na cabeça com  $p = 0,145$ , percentagem de ADN na cauda com  $p = 0,150$  e momento da cauda com  $p = 0,206$ ); as variáveis com distribuição não normal ( $p < 0,05$ ) são a protoporfirina zinco, PPZ, com  $p = 0,000$ , a actividade da ALAD, com  $p = 0,002$  e a frequência de mutação do TCR com  $p = 0,000$ .

## 3.2. Análise dos resultados

### 3.2.1. Protoporfirina-zinco (PPZ)

Por motivos logísticos relacionados com o equipamento, os valores de protoporfirina-zinco (PPZ) só foram avaliados para o grupo de trabalhadores das unidades fabris com exposição profissional a chumbo ( $n = 148$ ).

De acordo com o coeficiente de correlação de Spearman, os valores de PPZ estão relacionados de forma positiva com os valores de plumbémia ( $r_s = 0,639$ ;  $p < 0,001$ ).

Importa referir que os valores de PPZ tendem a aumentar exponencialmente com a plumbémia, sendo este efeito mais acentuado para valores superiores a  $30 \mu\text{g/dL}$  e que se observa a ocorrência de uma maior dispersão de resultados para valores mais elevados de plumbémia (FIGURA 15).

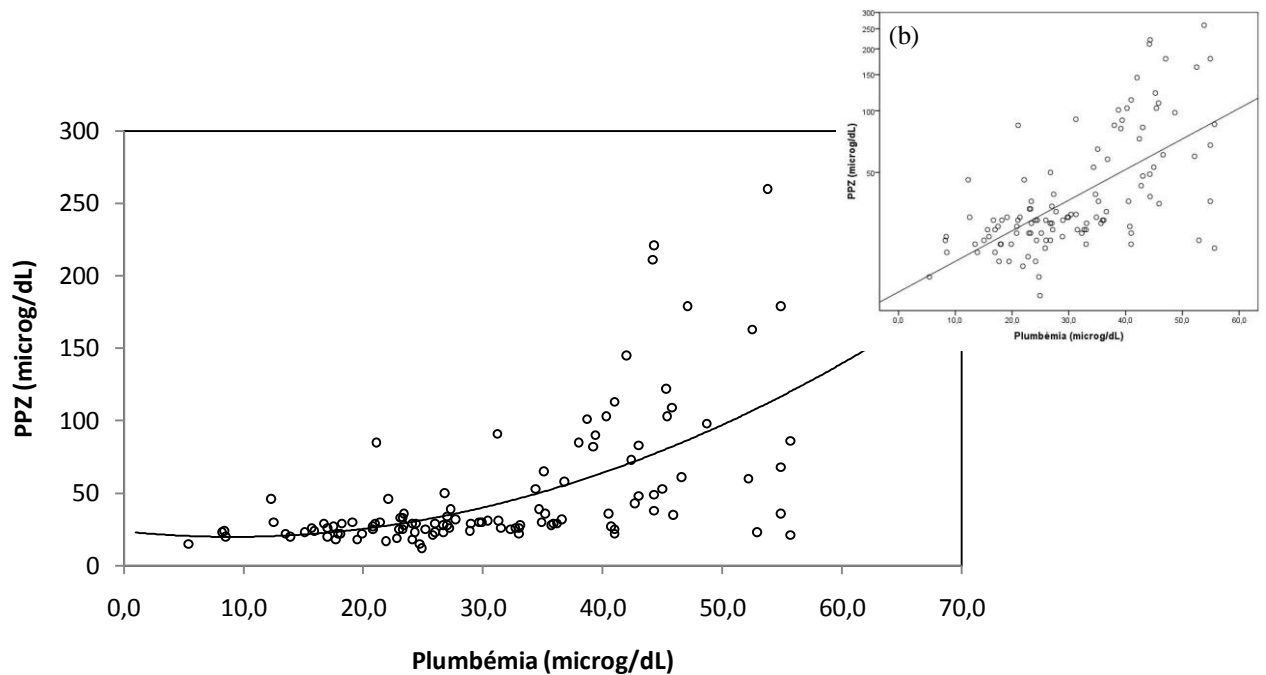


FIGURA 15 – Variação dos valores de protoporfirina zinco (PPZ) com os valores de plumbémia; (b) representação da variação em escala logarítmica.

Os valores médios de PPZ apresentam diferenças significativas entre os intervalos de plumbémia (TABELA 10 e FIGURA 16), especialmente notórias a partir de valores de plumbémia na ordem dos 40 µg/dL, nomeadamente nos dois intervalos [40, 50[ e [50, 70] µg/dL (cujos valores médios são 86,8 e 99,6 µg/dL) quando comparados com os três primeiros ([0, 10[, [10, 20[ e [20, 30[ µg/dL: valores médios 20,5; 25,2 e 29,3 µg/dL). O valor médio de PPZ do intervalo de plumbémia [30, 40[ µg/dL (45,5 µg/dL) não apresenta diferenças estatisticamente significativas quando comparado com o intervalo imediatamente anterior, [20, 30[ µg/dL, e o seguinte, [40, 50[ µg/dL. Apenas o valor médio verificado no último intervalo de plumbémia, [50, 70], se diferencia de forma estatisticamente significativa daquele.

TABELA 10 – Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) de protoporfirina zinco (PPZ) nos intervalos de plumbémia.

Pb-S (µg/dL)	n	PPZ* (µg/dL) (min-max)	logPPZ* (µg/dL) (min-max)
[0, 10[	4	20,5 <sup>a</sup> $\pm$ 4,04 (15 – 24)	1,30 $\pm$ 0,09
[10, 20[	18	25,2 <sup>a</sup> $\pm$ 6,5 (18 – 46)	1,39 $\pm$ 0,10
[20, 30[	35	29,3 <sup>a</sup> $\pm$ 12,4 (12 – 35)	1,44 $\pm$ 0,15
[30, 40[	24	45,5 <sup>b</sup> $\pm$ 25,6 (22 – 101)	1,60 $\pm$ 0,22
[40, 50[	23	86,8 <sup>b</sup> $\pm$ 58,2 (22 – 221)	1,84 $\pm$ 0,30
[50, 70]	9	99,6 <sup>b</sup> $\pm$ 88,8 (21 – 260)	1,85 $\pm$ 0,39

(\* , média  $\pm$  desvio padrão; a e b, grupos homogêneos de acordo com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 95 %; n, dimensão da amostra)

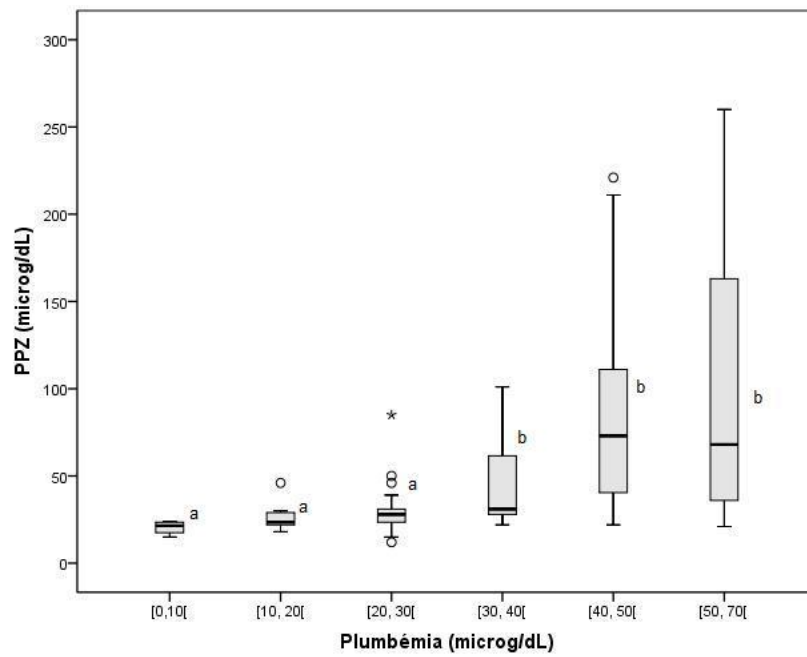


FIGURA 16 – Efeito dos valores de plumbemia nos valores de PPZ (a e b, grupos homogêneos de acordo com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 95 % de confiança).

### 3.2.2. Actividade da enzima desidratase do ácido $\delta$ -aminolevulínico (actALAD)

Os resultados da actividade da ALAD não apresentam distribuição normal. Revelam uma grande dispersão, com valores semelhantes de plumbémia a corresponderem a diferentes actividades enzimáticas (FIGURA 17). De acordo com o coeficiente de correlação de Pearson a actividade da ALAD correlaciona-se de forma negativa com a plumbémia ( $r = -0,491$ ;  $p < 0,001$ ).

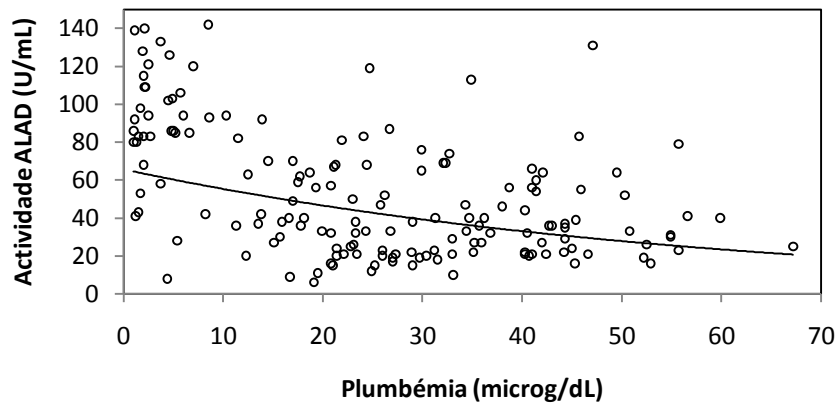


FIGURA 17 – Variação dos valores de actividade de ALAD e sua linha de tendência.

Apreciando a variação por intervalos de plumbémia, verifica-se uma descida acentuada (com significado estatístico) do primeiro para o segundo intervalo, de 90,3 para 46,6 U/mL, verificando-se uma relativa estabilização dos valores a partir daí, não tendo as variações significado estatístico (TABELA 11 e FIGURA 18).

TABELA 11 – Efeito da plumbémia na actividade da ALAD.

Pb-S ( $\mu\text{g/dL}$ )	n	Actividade ALAD* (U/mL) (min-max)
[0, 10[	37	90,3 <sup>a</sup> $\pm$ 32,0 (8 – 142)
[10, 20[	25	46,6 <sup>b</sup> $\pm$ 24,2 (6 – 94)
[20, 30[	36	39,4 <sup>b</sup> $\pm$ 26,7 (12 – 119)
[30, 40[	24	43,0 <sup>b</sup> $\pm$ 24,2 (10 – 113)
[40, 50[	27	42,0 <sup>b</sup> $\pm$ 25,3 (16 – 131)
[50, 70]	12	34,6 <sup>b</sup> $\pm$ 17,3 (16 – 79)

(\* , média  $\pm$  desvio padrão; a e b, grupos homogéneos de acordo com o teste de Tukey a 95 % de confiança, aplicado após ANOVA a um factor; n, dimensão da amostra)

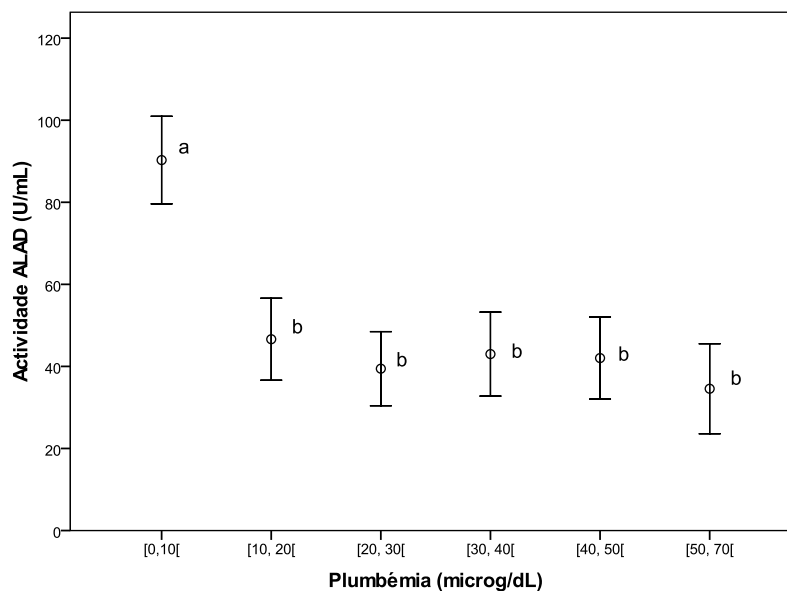


FIGURA 18 – Efeito da plumbémia na actividade da ALAD (a e b, grupos homogéneos de acordo com o teste de Tukey a 95 % de confiança, aplicado após ANOVA a um factor; as linhas verticais representam o I.C. a 95 %).



### 3.2.3. Ensaio do Cometa ou Electroforese em microgel (SCGE)

No ensaio do cometa (FIGURA 19) determinaram-se vários parâmetros de leitura das células: três parâmetros relativos à cauda do cometa — o comprimento, a percentagem de ADN e o momento da cauda; e dois relativos à cabeça — o comprimento e a percentagem de ADN. A percentagem de ADN (tanto na cauda como na cabeça) é obtida com base na intensidade do brilho e o momento da cauda é o produto da percentagem de ADN na cauda com a distância da cauda (Hellman *et al.* 1995). Todos estes parâmetros apresentaram distribuição normal.

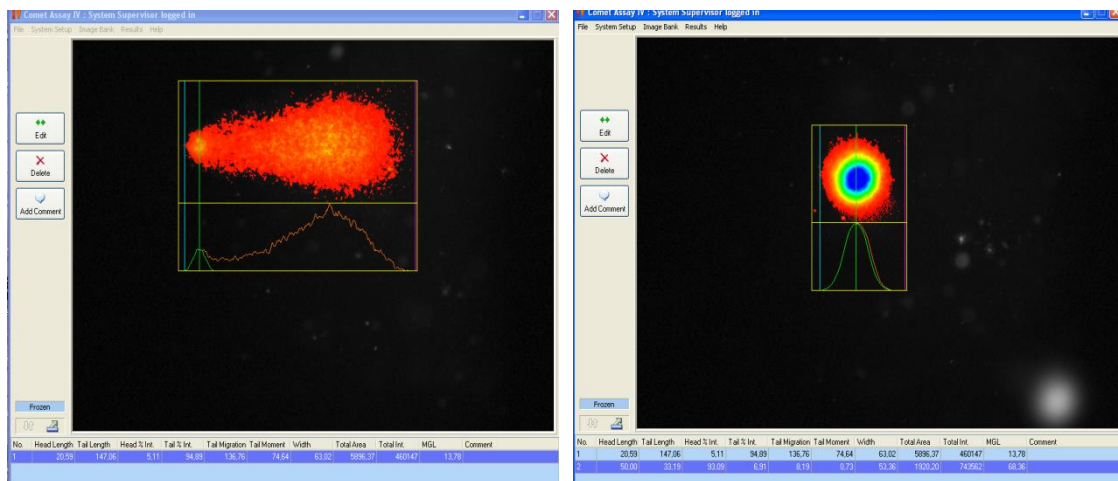


FIGURA 19 – Exemplo de observação de dois cometas: o primeiro com dano genético (comprimento da cauda e percentagem de ADN na cauda) e o segundo com a cabeça intacta, sem dano genético.

Verificando-se a existência de uma correlação positiva entre o comprimento da cauda e a percentagem de ADN na cauda ( $r = 0,797$ ;  $p < 0,001$ ), e atendendo a que o momento da cauda corresponde ao produto dessas duas variáveis, optou-se por se apresentar e avaliar apenas os valores do momento da cauda e do comprimento da cauda (em  $\mu\text{m}$ ) (FIGURA 20 e FIGURA 21) por serem os mais referidos por outros autores (Kassie, *et al.* 2000; Collins 2004).

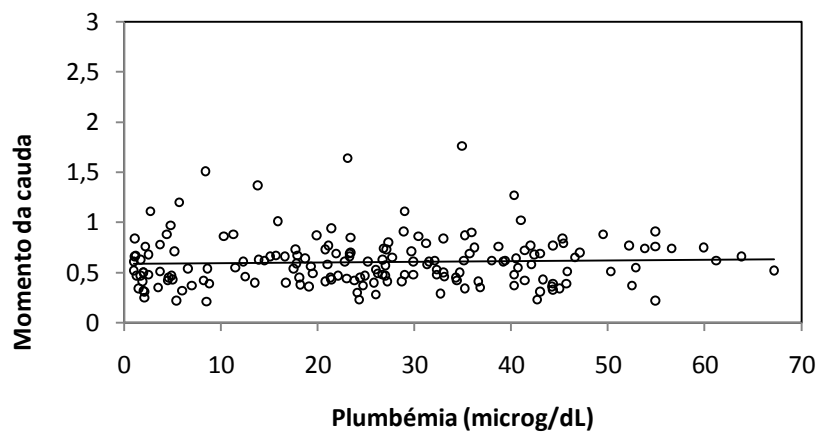


FIGURA 20 – Variação dos valores do momento da cauda do cometa com a plumbémia e respectiva linha de tendência.

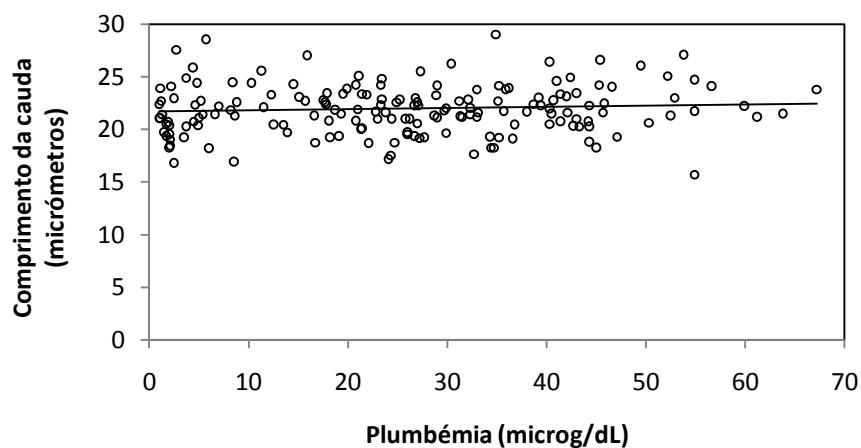


FIGURA 21 – Variação dos valores do comprimento da cauda do cometa com a plumbémia e respectiva linha de tendência.

Constata-se a existência de uma associação estatisticamente significativa entre os vários parâmetros analisados pelo teste do cometa, nomeadamente: (1) entre os comprimentos da cauda e da cabeça do cometa ( $r = 0,566$ ;  $p < 0,001$ ); (2) entre a % de ADN na cabeça e o comprimento da cauda ( $r = -0,796$ ;  $p < 0,001$ ); (3) entre a % de ADN na cauda e a % de ADN na cabeça ( $r = -0,999$ ;  $p < 0,001$ ); e (4) entre o momento da cauda tanto

com o comprimento da cabeça ( $r = -0,392$ ;  $p < 0,001$ ) e da cauda ( $r = 0,824$ ;  $p < 0,001$ ), como com a % de ADN na cabeça ( $r = -0,974$ ;  $p < 0,001$ ) e na cauda ( $r = 0,975$ ;  $p < 0,001$ ).

Nenhum dos parâmetros avaliados pelo teste do cometa apresenta alterações significativas com a plumbémia, como é exemplificado pelos dados obtidos para o momento da cauda e o comprimento da cauda (TABELA 12).

TABELA 12 – Efeito da plumbémia nos parâmetros do Teste do Cometa (momento e comprimento da cauda).

Pb-S ( $\mu\text{g/dL}$ )	n	Momento da cauda* (min-max)	Comprimento da cauda* ( $\mu\text{m}$ ) (min-max)
[0, 10[	39	$0,57 \pm 0,28$ (0,21 – 1,51)	$21,6 \pm 2,6$ (16,8 – 28,6)
[10, 20[	25	$0,64 \pm 0,23$ (0,36 – 1,37)	$22,6 \pm 2,6$ (18,7 – 30,4)
[20, 30[	42	$0,60 \pm 0,25$ (0,23 – 1,64)	$21,7 \pm 2,5$ (17,2 – 30,5)
[30, 40[	29	$0,63 \pm 0,27$ (0,29 – 1,76)	$21,8 \pm 2,4$ (16,7 – 29,0)
[40, 50[	27	$0,60 \pm 0,24$ (0,23 – 1,27)	$22,3 \pm 2,3$ (18,3 – 26,6)
[50, 70]	13	$0,63 \pm 0,19$ (0,22 – 0,91)	$22,5 \pm 2,7$ (15,7 – 27,1)

(\* , média  $\pm$  desvio padrão; sem diferenças significativas entre os grupos de plumbémia, de acordo com o teste de ANOVA a um factor, a 95 % de confiança; n, dimensão da amostra)

3.2.4. Ensaio de mutação no receptor do antígeno de linfócitos T (TCR-mf)

Os valores obtidos neste ensaio não têm distribuição normal e apresentam, de forma geral, uma grande dispersão dos resultados (FIGURA 22). Os valores de TCR-mf estão correlacionados de forma positiva com os valores de plumbémia ( $r = 0,203$ ;  $p < 0,05$ ).

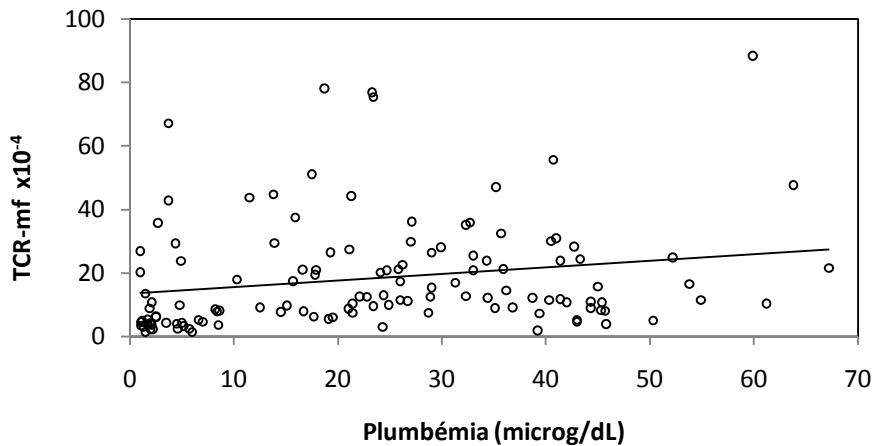


FIGURA 22 – Variação dos valores de frequência de mutação do receptor do antígeno de linfócitos T (TCR) com linha de tendência.

Embora nenhuma das diferenças se apresente como estatisticamente significativa, observa-se um aumento do valor médio do grupo de plumbémia até 10 µg/dL e o grupo imediatamente a seguir, entre [10, 20] µg/dL, de  $10,7 \times 10^4$  para  $24,2 \times 10^4$ . Todos os outros grupos apresentam valores médio semelhantes entre si, entre  $20,3 \times 10^4$  e  $28,2 \times 10^4$  (TABELA 13 e FIGURA 23).

TABELA 13 – Efeito da plumbémia na frequência de mutação do receptor do antígeno de linfócitos T (TCR).

Pb-S (µg/dL)	n	TCR-mf x10 <sup>-4</sup> * (min-max)
[0, 10[	38	10,7 <sup>a</sup> ± 13,7 (1,4 – 67,1)
[10, 20[	19	24,2 <sup>b</sup> ± 19,3 (5,6 – 78,1)
[20, 30[	27	21,8 <sup>b</sup> ± 18,3 (3,0 – 76,9)
[30, 40[	18	20,3 <sup>b</sup> ± 11,9 (1,9 – 47,1)
[40, 50[	19	26,4 <sup>b</sup> ± 43,4 (4,0 – 55,6)
[50, 70]	8	28,2 <sup>b</sup> ± 27,6 (5,0 – 88,4)

(\* , média ± desvio padrão; a e b grupos homogêneos de acordo com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 95 % de confiança; n, dimensão da amostra)

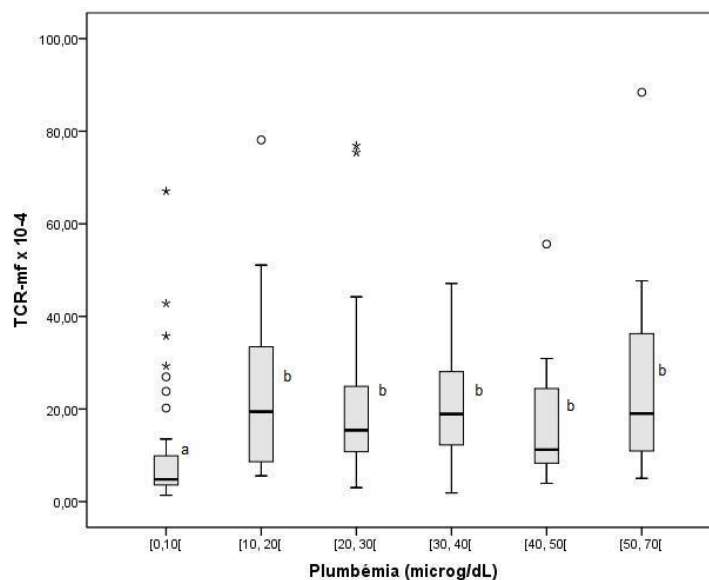


FIGURA 23 – Efeito da plumbémia na frequência de mutação do receptor do antígeno de linfócitos T (TCR) (a e b, grupos homogêneos de acordo com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 95 % de confiança).

### 3.3. Efeitos das variáveis independentes (idade, hábitos tabágicos e tempo de exposição) nos parâmetros estudados

O efeito da idade foi avaliado com base nos grupos criados: [20, 30[, [30, 40[, [40,50[, [50,60[ e + de 60 anos.

Sendo o número de fumadores bastante inferior ao número de não fumadores a análise da influência do consumo de tabaco sobre a resposta das variáveis estudadas foi avaliada apenas com base nas categorias de fumador/não fumador sem considerar a intensidade nem a duração do consumo.

O efeito do tempo de exposição foi avaliado com base nos grupos formados: [0,1[, [1, 6[, [6, 11[, [11, 21[, [20, 31[ e 31 +.

#### 3.3.1. Plumbémia (Pb-S)

De acordo com o coeficiente de correlação de Pearson os valores de plumbémia apresentam uma relação positiva moderada com a idade ( $r = 0,491$ ,  $p < 0,001$ ) (FIGURA 24).

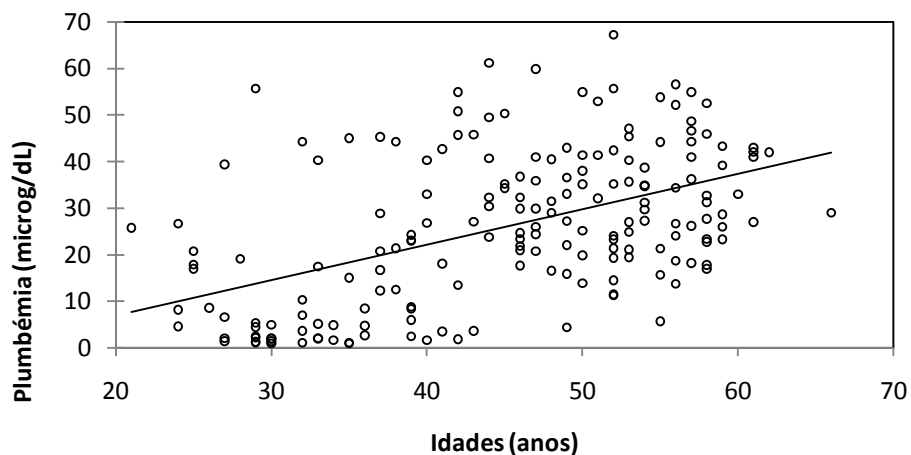


FIGURA 24 – Variação dos valores de plumbémias, Pb-S, com a idade e respectiva linha de tendência.

Os valores de plumbémia médios em cada faixa etária são os seguintes: [20, 30[ de 11,6 µg/dL, [30, 40[ de 13,5 µg/dL, [40,50[ de 30,3 µg/dL, [50,60[ de 33,4 µg/dL e para + de 60 anos de 36,7 µg/dL. Observa-se a existência de diferenças estatisticamente significativas dos dois primeiros grupos para os restantes (TABELA 14 e FIGURA 25).

TABELA 14 – Efeito da idade nos valores de plumbémia, Pb-S.

Idade (anos)	n	Pb-S (µg/dL)* (min-max)
[20, 30[	19	11,3 <sup>a</sup> ± 11,0 1,2 – 39,4
[30, 40[	39	13,5 <sup>a</sup> ± 14,1 1,0 – 45,3
[40, 50[	50	30,3 <sup>b</sup> ± 14,5 1,7 – 61,2
[50, 60[	71	33,4 <sup>b</sup> ± 14,1 5,7 – 67,2
+60	7	36,7 <sup>b</sup> ± 6,9 27,0 – 43,0

(\* , média ± desvio padrão; a e b, grupos homogêneos de acordo com o teste de Tukey a 95 % de confiança, aplicado após ANOVA a um factor; n, dimensão da amostra)

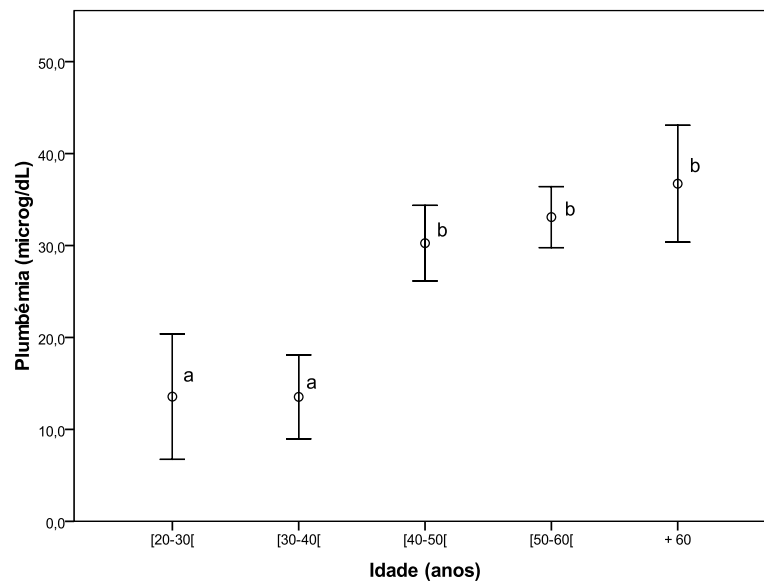


FIGURA 25 – Efeito da idade no valor de plumbémia, Pb-S (a e b, grupos homogêneos de acordo com o teste de Tukey a 95 % de confiança, aplicado após ANOVA a um factor; as linhas verticais representam o I.C. a 95 %).

No que respeita aos hábitos tabágicos, verifica-se a existência de um aumento estatisticamente significativo no grupo de fumadores (29,4 µg/dL) em relação aos não fumadores (24,5 µg/dL) (TABELA 15 e FIGURA 26).

TABELA 15 – Efeito dos hábitos tabágicos nos valores de plumbémia, Pb-S.

Hábitos tabágicos	n	Pb-S (µg/dL)* (min-max)
Não fumador	119	24,5 ± 17,3 1,0 – 67,2
Fumador	67	29,4 ** ± 14,4 1,0 – 63,8

(\* , média ± desvio padrão; \*\*, p <0,05 em relação ao controlo de acordo com o teste t de Student para duas amostras independentes assumindo igualdade de variâncias; n, dimensão da amostra)



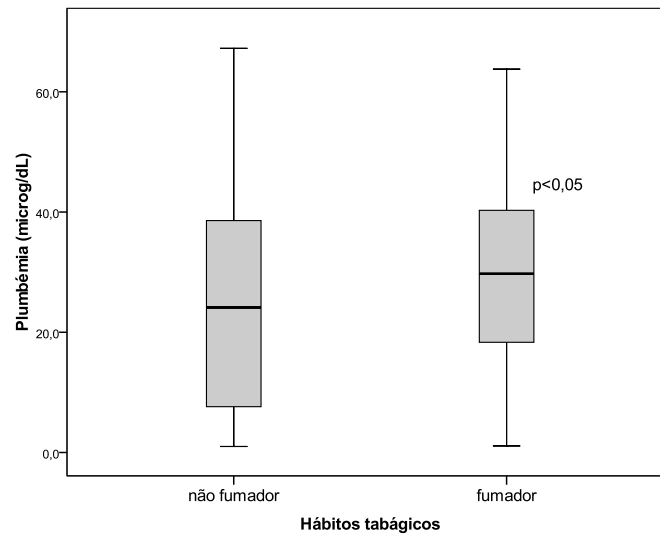


FIGURA 26 – Distribuição dos valores de plumbémia, Pb-S, em função dos hábitos tabágicos ( $p < 0,05$  em relação ao controlo de acordo com o teste t de Student para duas amostras independentes assumindo igualdade de variâncias)

Pela observação dos resultados obtidos para os grupos criados com base no tempo de exposição observa-se desde logo uma diferença estatisticamente significativa e acentuada entre o grupo com [0,1[ anos de exposição e todos os outros grupos com maior tempo de exposição (TABELA 16 e FIGURA 27).

Também se observa, relativamente ao grupo [1,6[ a ocorrência de um aumento dos valores médios de plumbémia nos outros grupos com mais anos de exposição, embora sem significado estatístico.

TABELA 16 – Efeito do tempo de exposição nos valores de plumbémia, Pb-S.

Tempo de exposição (anos)	n	Pb-S ( $\mu\text{g}/\text{dL}$ )* (min-max)
[0,1[	38	$3,9^a \pm 3,1$ 1,0 – 14,5
[1, 6[	25	$26,3^b \pm 14,8$ 8,2 – 67,2
[6, 11[	16	$35,7^b \pm 12,9$ 5,4 – 54,9
[11, 21[	36	$31,2^b \pm 12,5$ 8,4 – 54,9
[20, 31[	41	$34,7^b \pm 12,6$ 15,9 – 63,8
31 +	30	$32,0^b \pm 12,7$ 11,3 – 55,7

(\* , média  $\pm$  desvio padrão; a e b grupos homogêneos de acordo com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 95 % de confiança; n, dimensão da amostra)

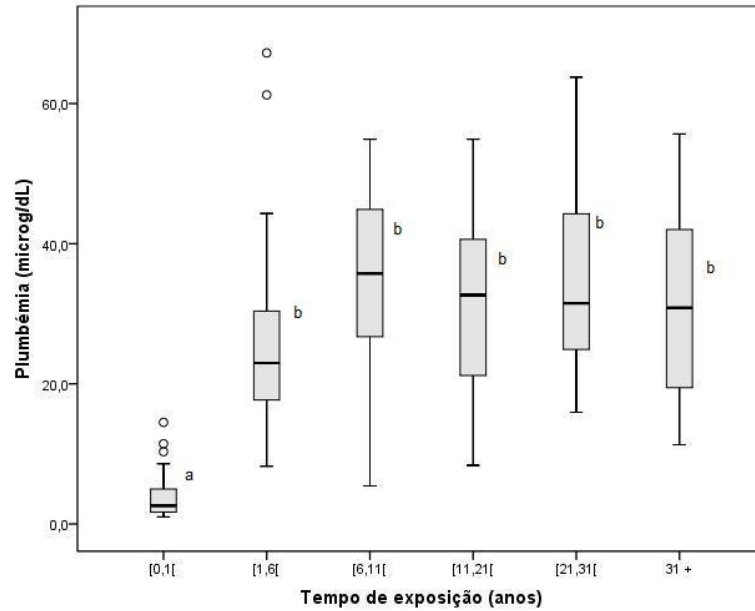


FIGURA 27 – Efeito do tempo de exposição no valor de plumbémia, Pb-S (a e b grupos homogéneos de acordo com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 95 % de confiança).

### 3.3.2. Protoporfirina-zinco (PPZ)

De acordo com o coeficiente de correlação de Pearson não se encontrou variação dos valores de PPZ com a idade.

Não se encontraram diferenças significativas entre os valores de PPZ entre os grupos de fumadores e não fumadores para  $p < 0,05$ .

Observa-se um aumento de PPZ com o aumento do tempo de exposição, até ao intervalo [11, 21[ anos, embora sem significado estatístico (TABELA 17 e FIGURA 28). Aqui não são apresentados valores para o grupo sem exposição ([0,1[ anos) uma vez que os indivíduos deste grupo não foram incluídos na avaliação deste parâmetro.

TABELA 17 – Efeito do tempo de exposição nos valores de protoporfirina zinco, PPZ.

Tempo de exposição (anos)	n	PPZ ( $\mu\text{g/dL}$ )* (min-max)
[0,1[	0	---
[1, 6[	23	31,2 $\pm$ 19,0 18 – 113
[6, 11[	16	55,6 $\pm$ 40,8 15 – 179
[11, 21[	27	64,2 $\pm$ 59,5 20 – 221
[20, 31[	28	43,8 $\pm$ 46,7 12 – 260
31 +	19	51,5 $\pm$ 43,9 18 – 163

(\* , média  $\pm$  desvio padrão; sem diferenças estatísticas de acordo com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 95 % de confiança; n, dimensão da amostra)

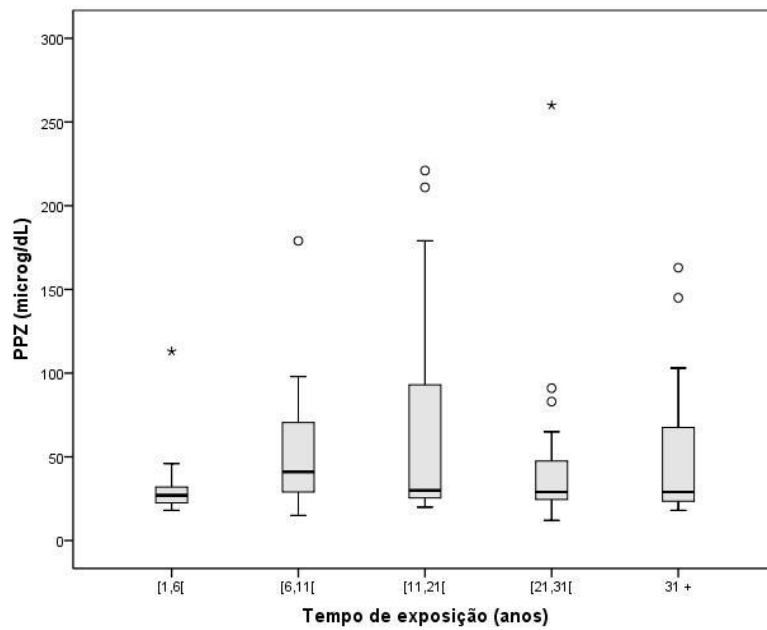


FIGURA 28 – Efeito do tempo de exposição nos valores de protoporfirina zinco, PPZ (sem diferenças significativas de acordo com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 95 %).

### 3.3.3. Actividade da enzima desidratase do ácido $\delta$ -aminolevulínico (actALAD)

De acordo com o coeficiente de correlação de Pearson a actividade da ALAD está relacionada de forma negativa com a idade ( $r = -0,372$ ;  $p < 0,001$ ) (FIGURA 29).

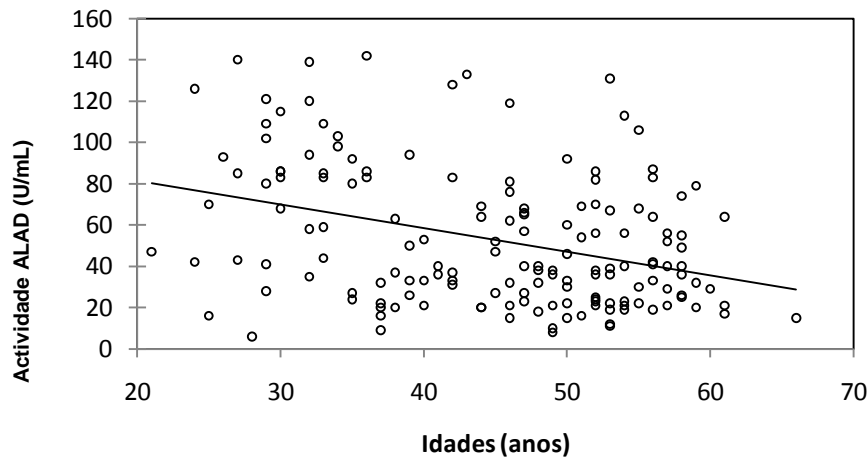


FIGURA 29 – Variação dos valores de actividade da enzima ALAD com a idade e respectiva linha de tendência.

Os valores médios actividade da enzima ALAD em cada faixa etária são: 71,7 U/mL para [20, 30[ anos, de 67,9 U/mL para [30, 40[, de 46,2 U/mL para [40,50[, de 45,6 U/mL para [50,60[ e de 28,8 U/mL para + de 60 anos.

Observa-se uma descida dos valores do grupo [30, 40[ para o grupo [40,50[ e do grupo [50,60[ para o grupo +60. No entanto apenas se verifica a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os dois primeiros grupos e o último (TABELA 18 e FIGURA 30).

TABELA 18 – Efeito da idade na actividade da enzima ALAD.

Idade (anos)	n	Actividade ALAD (U/mL)* (min-max)
[20, 30[	16	71,7 <sup>a</sup> ± 41,2 6 – 140
[30, 40[	37	67,9 <sup>a</sup> ± 36,5 9 – 142
[40, 50[	42	46,2 <sup>a,b</sup> ± 30,0 8 – 133
[50, 60[	60	45,6 <sup>a,b</sup> ± 27,2 11 – 131
+60	6	28,8 <sup>b</sup> ± 18,1 15 – 64

(\* , média ± desvio padrão; a e b, grupos homogéneos de acordo com o teste de Tukey a 95 % de confiança, aplicado após ANOVA a um factor; n, dimensão da amostra)

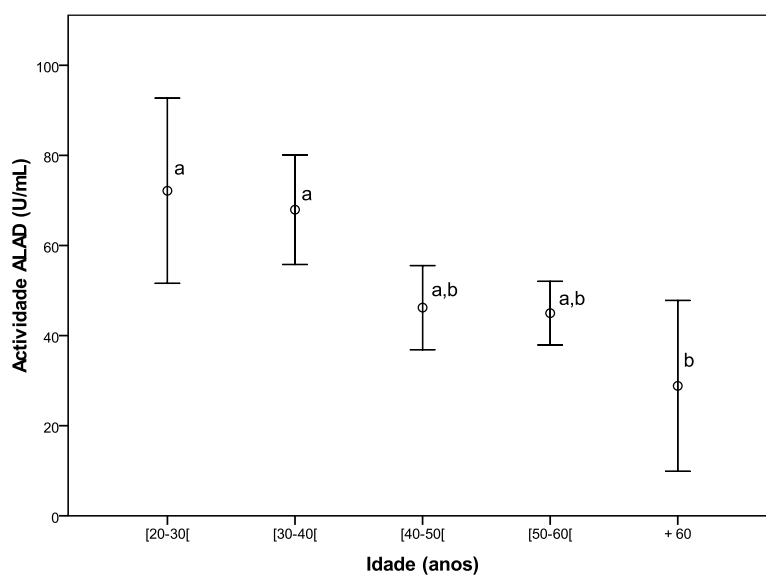


FIGURA 30 – Efeito da idade na actividade da ALAD (a e b, grupos homogéneos de acordo com o teste de Tukey a 95 % de confiança, aplicado após ANOVA a um factor; as linhas verticais representam o I.C. a 95 %).

Não se encontraram diferenças significativas dos valores de actividade da enzima ALAD entre os grupos de fumadores e não fumadores, para  $p < 0,05$ .

Também não se encontraram diferenças estatisticamente significativas na actividade da enzima com o tempo de exposição dos trabalhadores expostos a chumbo. Há no entanto uma diferença bem marcada quando se compara o grupo [0, 1[ com qualquer um dos outros grupos (TABELA 19 e FIGURA 31).

TABELA 19 – Efeito do tempo de exposição na actividade da enzima ALAD.

Tempo de exposição (anos)	n	Actividade ALAD (U/mL)* (min-max)
[0,1[	37	91,2 <sup>a</sup> ± 28,1 8-140
[1, 6[	23	43,9 <sup>b</sup> ± 30,2 6-142
[6, 11[	13	40,6 <sup>b</sup> ± 29,9 15-131
[11, 21[	30	42,0 <sup>b</sup> ± 25,2 9-113
[20, 31[	35	40,2 <sup>b</sup> ± 23,7 12-119
31 +	23	40,4 <sup>b</sup> ± 21,8 11-86

(\* , média ± desvio padrão; a e b, grupos homogéneos de acordo com o teste de Tukey a 95 % de confiança, aplicado após ANOVA a um factor; n, dimensão da amostra)



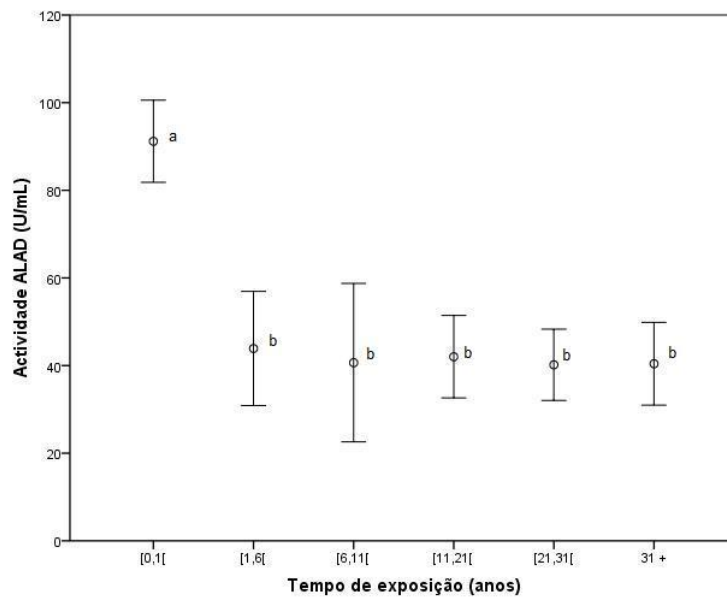


FIGURA 31 – Efeito do tempo de exposição na actividade da enzima ALAD (a e b, grupos homogéneos de acordo com o teste de Tukey a 95 % de confiança aplicado após ANOVA a um factor; as linhas verticais representam o I.C. a 95 %).

### 3.2.4. Ensaio do cometa ou electroforese em microgel (SCGE)

Dos parâmetros estudados no teste do cometa apenas se encontrou a existência de associação com a idade para a percentagem de ADN na cauda ( $r = 0,217$ ;  $p=0,004$ ) de acordo com o coeficiente de correlação de Pearson. Apenas se encontraram diferenças estatisticamente significativas para o momento da cauda comparando o grupo de [20, 30[ anos com os grupos [50,60[ e + 60 anos (TABELA 20).

TABELA 20 – Efeito da idade nos parâmetros do Teste do Cometa (momento e comprimento da cauda).

Idade (anos)	n	Momento da cauda* (min-max)	Comprimento da cauda* ( $\mu\text{m}$ ) (min-max)
[20, 30[	18	0,49 <sup>a</sup> $\pm$ 0,14 0,22 – 0,76	21,2 $\pm$ 1,7 16,8 – 24,1
[30, 40[	38	0,62 <sup>a,b</sup> $\pm$ 0,33 0,21 – 1,64	21,7 $\pm$ 2,9 16,9 – 30,5
[40, 50[	47	0,56 <sup>a,b</sup> $\pm$ 0,19 0,22 – 1,0	21,7 $\pm$ 2,2 15,7 – 27,0
[50, 60[	65	0,64 <sup>b</sup> $\pm$ 0,24 0,29 – 1,8	22,4 $\pm$ 2,7 17,2 – 30,4
+60	7	0,74 <sup>b</sup> $\pm$ 0,28 0,31 – 1,1	23,0 $\pm$ 1,3 21,0 – 24,6

(\* , média  $\pm$  desvio padrão; a e b grupos homogêneos de acordo com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 95 % de confiança; comprimento da cauda sem diferenças significativas entre os grupos de idades, de acordo com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 95 % de confiança; n, dimensão da amostra)

Não se encontraram diferenças significativas dos valores de nenhum dos parâmetros do ensaio do cometa entre os grupos de fumadores e não fumadores, para  $p < 0,05$ .

Nenhum dos parâmetros avaliados pelo teste do cometa apresenta alterações significativas com o tempo de exposição (TABELA 21).

TABELA 21 – Efeito do tempo de exposição nos valores dos parâmetros do Teste do Cometa (momento e comprimento da cauda).

Tempo de exposição (anos)	n	Momento da cauda* (min-max)	Comprimento da cauda* (µg/dL) (min-max)
[0,1[	37	0,58 ± 0,22 0,25 – 1,20	21,7 ± 2,6 16,8 – 28,6
[1, 6[	21	0,56 ± 0,29 0,21 – 1,64	21,8 ± 2,8 16,9 – 30,5
[6, 11[	15	0,54 ± 0,25 0,22 – 1,11	21,0 ± 2,3 15,7 – 24,9
[11, 21[	35	0,68 ± 0,32 0,23 – 1,76	22,5 ± 2,3 17,5 – 29,0
[20, 31[	39	0,62 ± 0,17 0,29 – 1,00	22,2 ± 2,2 17,6 – 27,1
31 +	28	0,59 ± 0,24 0,30 – 1,37	21,9 ± 2,8 17,2 – 30,4

(\* , média ± desvio padrão; sem diferenças significativas de acordo com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 95 % de confiança; n, dimensão da amostra)

### 3.3.5. Ensaio de mutação no receptor do antígeno de linfócitos T (TCR–mf)

De acordo com o coeficiente de correlação de Pearson, a frequência de mutação do receptor do antígeno de linfócitos T (TCR–mf) está relacionada de forma positiva com a idade ( $r = 0,266$ ;  $p = 0,002$ ) (FIGURA 32).

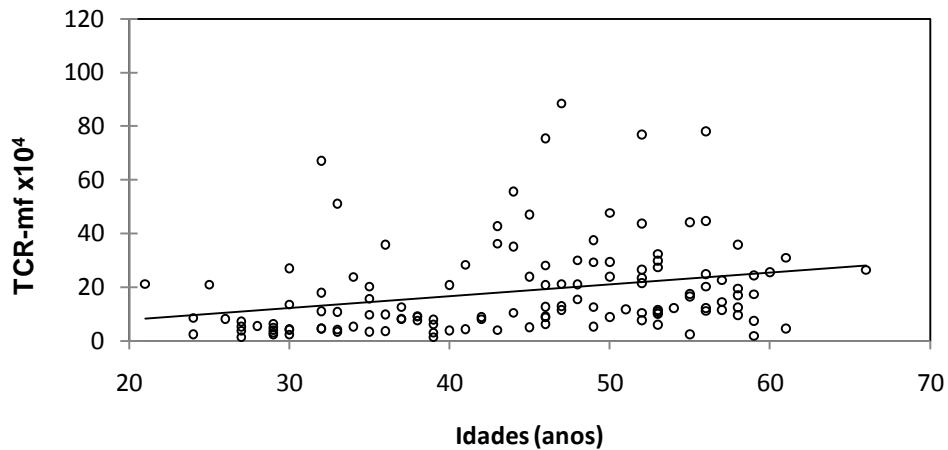


FIGURA 32 – Variação dos valores da frequência de mutação do receptor do antígeno de linfócitos T (TCR–mf) com a idade.

Os valores médios de frequência de mutação do TCR em cada faixa etária são:  $7,0 \times 10^4$  para  $[20, 30[$  anos, de  $12,9 \times 10^4$  para  $[30, 40[$ , de  $23,7 \times 10^4$  para  $[40,50[$ , de  $22,3 \times 10^4$  para  $[50,60[$  e de  $19,7 \times 10^4$  para mais de 60 anos.

Observa-se a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos  $[20,30[$  e  $[30,40[$  anos com todos os outros e entre si (TABELA 22 e FIGURA 33).

TABELA 22 – Efeito da idade na frequência de mutação do receptor do antígeno de linfócitos T (TCR–mf).

Idade (anos)	n	TCR–mf $\times 10^{-4}$ * (min-max)
[20, 30[	15	7,0 <sup>a</sup> $\pm$ 6,1 1,4 – 21,2
[30, 40[	33	12,9 <sup>b</sup> $\pm$ 14,3 1,4 – 67,1
[40, 50[	33	23,7 <sup>c</sup> $\pm$ 20,3 3,9 – 88,4
[50, 60[	42	22,3 <sup>c</sup> $\pm$ 17,0 1,9 – 78,1
+ 60	5	19,7 <sup>c</sup> $\pm$ 11,3 4,6 – 30,9

(\* , média  $\pm$  desvio padrão; a, b e c grupos homogêneos de acordo com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 95 % de confiança; n, dimensão da amostra)

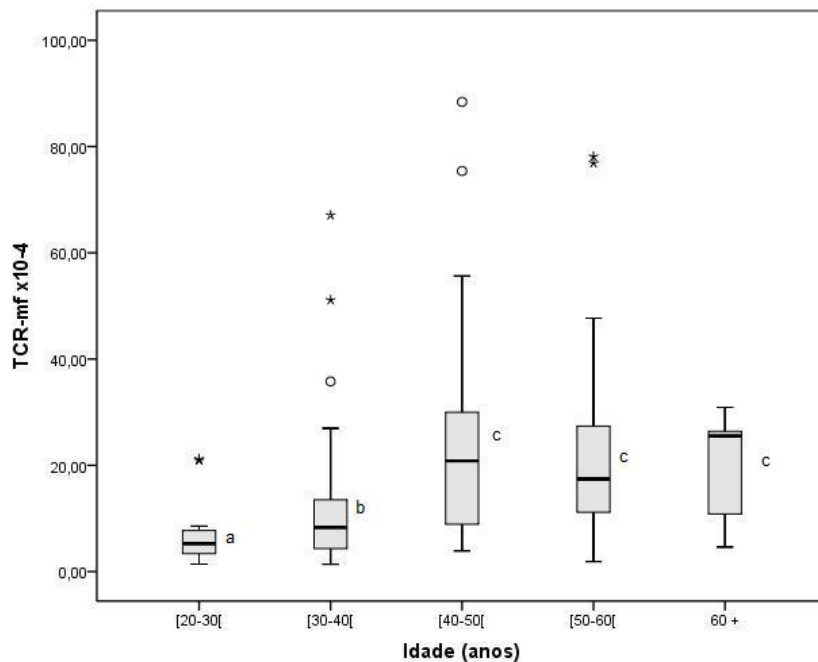


FIGURA 33 – Efeito do tempo de exposição na frequência de mutação do receptor do antígeno de linfócitos T, TCR–mf (a, b e c, grupos homogêneos de acordo com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 95 % de confiança).

Não se encontraram diferenças significativas dos valores de TCR-mf entre os grupos de fumadores e não fumadores, para  $p < 0,05$ .

No que respeita ao tempo de exposição não se observam diferenças estaticamente significativas entre quaisquer intervalos. (TABELA 23 e FIGURA 34).

TABELA 23 – Efeito do tempo de exposição nos valores de TCR-mf .

Tempo de exposição (anos)	n	TCR-mf x 10 <sup>-4*</sup>
[0,1[	38	12,0 ± 14,7 1,4 – 67,1
[1, 6[	14	17,3 ± 18,9 3,6 – 76,9
[6, 11[	8	16,1 ± 8,3 7,3 – 28,3
[11, 21[	26	23,0 ± 18,8 3,0 – 75,4
[20, 31[	23	23,3 ± 17,9 5,0 – 88,4
31 +	20	20,3 ± 17,0 1,9 – 78,1

(\* , média ± desvio padrão; sem diferenças significativas de acordo com ANOVA a um factor a 95 % de confiança; n, dimensão da amostra)

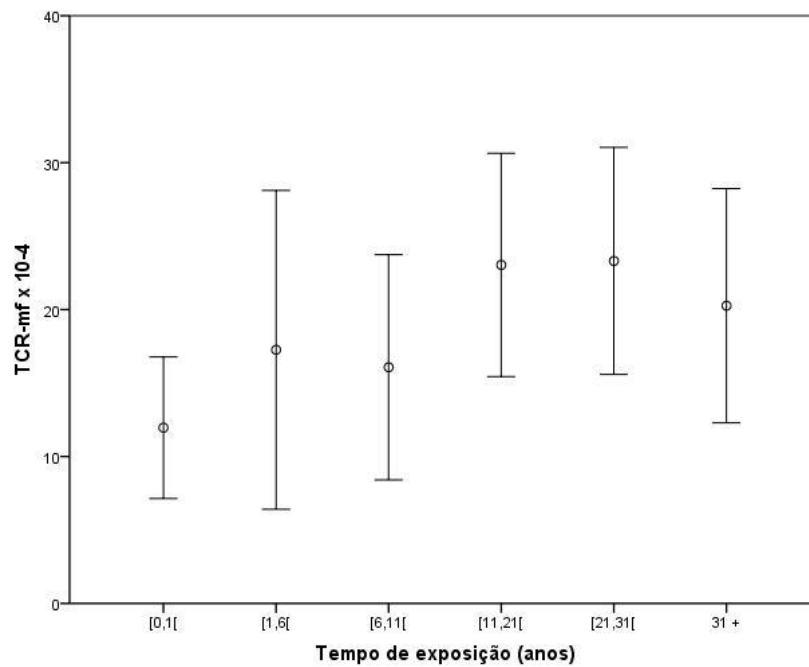


FIGURA 34 – Efeito do tempo de exposição nos valores de TCR–mf (sem diferenças estatísticas de acordo com ANOVA a um factor a 95% de confiança; as linhas verticais representam o I.C. a 95 %).

### 3.4. Aplicação do modelo de regressão linear múltipla (MRLM)

Aplicou-se o modelo de regressão linear múltipla (MRLM) com procedimento de optimização (Pestana e Gageiro 2000). Só se consideraram os indivíduos com valores válidos para todas as variáveis estudadas ( $n = 172$ ). Foram efectuadas análises preliminares para assegurar que não se violavam os pressupostos de normalidade, linearidade, multicolinearidade e homoscedasticidade. As variáveis consideradas como independentes foram a plumbémia (exceptuando quando se avaliou a plumbémia como variável dependente), a idade, o tempo de exposição, os hábitos tabágicos, os polimorfismos da VDR e a existência de exposição profissional. Como foi dito, o polimorfismo ALAD não foi incluído porque a maioria dos indivíduos apresenta o mesmo genótipo, ALAD 1-1. As variáveis hábitos tabágicos e exposição profissional foram incluídas como variáveis dicotómicas enquanto que a variável polimorfismos VDR foi incluída como variável binária simulada (*dummy*), ou seja, apenas usando dois dos genótipos, neste caso os genótipos B-B e B-b, por comparação com o mais

frequente na população que serviu como grupo de referência — o genótipo B-b (39,3 %), de acordo com o quadro de operacionalização seguinte da TABELA 24.

TABELA 24 – Quadro de operacionalização das variáveis usadas no MRLM.

<b>Preditor</b>	<b>Codificação</b>	
Hábitos tabágicos	0	Não fumador
	1	Fumador
Exposição profissional	0	NOE
	1	OE
Polimorfismos VDR B-B	0	VDR B-b
	1	VDR B-B
Polimorfismos VDR b-b	0	VDR B-b
	1	VDR b-b

Obtiveram-se modelos estatisticamente significativos (Sig F < 0,05) para as variáveis Pb-S, actividade da ALAD, momento da cauda, comprimento da cauda, percentagem de ADN na cauda, percentagem de ADN na cabeça e TCR-mf (TABELA 25). Os valores indicados pelo coeficiente de determinação ajustado ( $R_{adj}$ ) quadrado ajustado indicam a proporção da variável dependente na amostra que é explicada pelo modelo. Assim pode observar-se que o modelo explica grande parte da variação de Pb-S (51,4 %) e actALAD (39,3 %) (TABELA 25).

Apresenta três preditores para a plumbémia, nomeadamente, a exposição como preditor de mais peso, seguidos da idade e do genótipo VDR B-B por comparação ao genótipo mais frequente na amostra, B-b; o genótipo b-b não tem influência em qualquer dos marcadores estudados (TABELA 25). Para a actividade da enzima ALAD apenas há um preditor, a existência ou não de exposição ocupacional.



Para os parâmetros do teste do cometa em que o modelo aplicado é significativo (momento da cauda, comprimento da cauda, % de ADN na cabeça e % de ADN na cauda) e para a frequência de mutações do TCR (TCR–mf), embora o  $R_{adj}$  apresente valores mais baixos, encontraram-se dois preditores, a idade (para todos eles) e os hábitos tabágicos, ser ou não fumador (para o momento da cauda, a % de ADN na cabeça e TCR–mf).

TABELA 25 – Valores para os modelos de regressão linear múltipla.

Variável dependente	$R_{adj}$	F	Sig F	Preditores	Coeficientes	
					$\beta$ padronizado	Sig
Pb-S	0,514	66,240	< 0,001*	Exposição profissional	0,615	< 0,001
				Idade	0,177	0,003
				Polimorfismo VDR B-B	- 0,136	0,009
actALAD	0,393	104,49	< 0,001*	Exposição profissional	- 0,630	< 0,001
Momento da cauda	0,050	5,617	0,004*	Idade	0,193	0,010
				Hábitos tabágicos	0,157	0,035
Comprimento cauda	0,020	4,603	0,033*	Idade	0,161	0,033
% ADN cauda	0,042	8,575	0,004*	Idade	0,217	0,004
% ADN cabeça	0,059	6,455	0,002*	Idade	- 0,220	0,003
				Hábitos tabágicos	- 0,148	0,045
TCR–mf	0,093	7,511	0,001*	Idade	0,263	0,002
				Hábitos tabágicos	0,191	0,026

\*  $p < 0,05$ , o modelo aplicado é estatisticamente significativo

## 4. DISCUSSÃO



O objectivo deste trabalho foi contribuir para o conhecimento dos efeitos genotóxicos decorrentes da exposição a chumbo em indivíduos sem co-exposição conhecida a outros agentes classificados como carcinogénicos (ou suspeitos de o serem).

Inicialmente pretendia-se efectuar um estudo de caso-controlo, através de uma abordagem múltipla que permitisse relacionar diferentes tipos de marcadores biológicos de exposição: indicadores de dose interna, indicadores de efeito (sobre a síntese do heme e genotóxicos) e indicadores de susceptibilidade (polimorfismos genéticos).

A população exposta ao chumbo seria de cerca de 100 trabalhadores de unidades industriais com exposição àquele metal e o grupo controlo teria um número semelhante de indivíduos que trabalhassem nas mesmas empresas ou em outras sediadas na mesma zona, mas sem contacto com chumbo. Cedo se percebeu que seria difícil, no que respeitava ao grupo controlo, atingir o objectivo de igualdade no número de indivíduos voluntários desde logo, pela maior dificuldade de acesso a voluntários não expostos mas, também, pela menor sensibilização destes para o estudo em causa, sobretudo por ser necessária uma colheita de sangue. Esta dificuldade era tanto maior quanto se pretendia obter semelhança das características dos indivíduos dos dois grupos, de forma a minorar os efeitos confundentes (como idades e factores associados a estilos de vida).

Simultaneamente, considerou-se ser pertinente aumentar o grupo de indivíduos expostos, englobando todos os trabalhadores disponíveis das duas unidades fabris contactadas. Este aumento tornou mais complicada a tarefa de encontrar controlos em número suficiente para formar um grupo controlo com número equivalente ou superior de indivíduos, como é desejável estatisticamente neste tipo de estudos.

Assim, optou-se, finalmente, por considerar o número total de trabalhadores com exposição profissional a chumbo das duas unidades fabris consideradas e adicionar o número possível de pessoas não expostas. Não se conseguindo obter um número equivalente de controlos, pretendeu-se então abranger uma gama alargada de valores de

plumbémia e tentar perceber a associação entre a exposição a chumbo, avaliada pelos níveis de dose interna (plumbémia), e os marcadores de genotoxicidade escolhidos, nomeadamente os parâmetros obtidos por meio do ensaio do cometa e a frequência de mutação do receptor de células T (TCR) em leucócitos de sangue periférico.

Assim, e diferentemente do objectivo de comparação entre casos e controlos como inicialmente definido, passou a fazer-se a análise dos resultados em função da distribuição da população em estudo segundo os níveis reais de chumbo no sangue (independentemente da sua origem ser ou não profissional).

Pelas razões já referidas e com os objectivos definidos, concentrou-se a selecção de indivíduos em estudo em duas unidades fabris: uma de indústria química onde são produzidos diversos produtos (entre os quais aditivos para polímeros contendo chumbo e óxidos de chumbo); outra onde se produzem baterias de chumbo ácido, essencialmente para automóveis, a partir de ligas de chumbo e de óxido de chumbo.



A avaliação da carga de chumbo no organismo foi feita através de um indicador de dose interna, a concentração de chumbo no sangue (plumbémia, Pb-S). Com base na plumbémia foi pesquisada a existência de uma eventual associação entre a dose interna e os parâmetros escolhidos para avaliação dos efeitos adversos.

Este indicador biológico de exposição é de utilização universal pela sua sensibilidade analítica e pela existência de programas credíveis de controlo de qualidade na colheita, no manuseamento e na análise das amostras (Nieboer e Fletcher 2001). A sua medição reflecte a exposição global de um indivíduo a um agente externo tendo em conta todas as possíveis vias de entrada no organismo e todos os contextos em que a exposição tiver ocorrido (IEH, 1996).



Para avaliação dos efeitos genotóxicos foram seleccionados dois testes, o ensaio do cometa e o ensaio de mutação em TCR.

O ensaio do cometa foi escolhido por ser uma técnica rápida, sensível e fiável que permite visualizar e detectar danos nas cadeias de ADN em células individuais que tem vindo a ser extensamente utilizada na detecção de danos genéticos em biomonitorização humana (Fairbairn *et al.* 1995; Rojas *et al.* 1999; Kassie, *et al.* 2000; Olive 2002; Laffon *et al.* 2005; Laffon *et al.* 2006; Roma-Torres *et al.* 2006).

O nome teste do Cometa deve-se ao facto de as células com ADN danificado apresentarem a aparência de um cometa com uma cabeça, intensamente brilhante, e uma cauda. O comprimento e a intensidade do brilho da cauda estão relacionados com a quantidade de rupturas na cadeia de ADN. As células com o ADN não danificado apresentam-se como núcleos intactos, sem cauda. Quanto maior é o dano genético maiores serão a intensidade do brilho da cauda (percentagem de ADN) e o comprimento da cauda observados, verificando-se paralelamente uma diminuição dos valores de todos os parâmetros que respeitam à quantidade de ADN na cabeça, ADN intacto. Ou seja, quando um parâmetro da cauda aumenta, os outros parâmetros medidos na cauda devem acompanhar esse aumento. Pelo contrário, os parâmetros medidos na cabeça irão variar de forma inversa, diminuindo.

Uma vez que todos estes parâmetros estão correlacionados optou-se por considerar, na avaliação dos resultados, apenas o momento e o comprimento da cauda, por serem os parâmetros mais frequentemente referidos nos estudos publicados e os mais aconselhados por investigadores especializados no teste do cometa (Kassie, *et al.* 2000; Collins 2004).

Sendo aceite a existência de uma associação entre o dano genético e eventos mutagénicos e carcinogénicos, o ensaio do cometa é uma técnica com grande sensibilidade que permite identificar o efeito provocado por concentrações baixas de agentes genotóxicos (Fairbairn, *et al.* 1995; Tice 1995; Rojas, *et al.* 1999; Kassie, *et al.* 2000).

O ensaio de mutação em TCR apresenta uma série de vantagens em relação a outros ensaios de mutagenicidade frequentemente usados uma vez que utiliza linfócitos do sangue acabado de colher, logo, sem necessidade de recorrer a cultura de células (procedimentos mais morosos). A técnica recorre à utilização de anticorpos, disponíveis comercialmente, e os resultados são obtidos em algumas horas. Tendo já sido aplicado com sucesso na detecção de efeitos genotóxicos de diversos compostos, o ensaio de mutação em TCR permite identificar e quantificar os linfócitos que sofreram mutação das cadeias  $\alpha$  ou  $\beta$  do receptor das células T e, conseqüentemente, não expressam o complexo CD3/TCR na sua superfície (Nakamura e col. 1992 e Kyoizumi e col. 1992 citados por Garcia-Lestón 2007 e Kyoizumi, *et al.* 1990; Akiyama, *et al.* 1991; Iwamoto, *et al.* 1994; Ishioka, *et al.* 1997; Taooka, *et al.* 2006).



Para investigar diferenças de resposta à dose, eventualmente relacionáveis com diferentes características individuais, foram avaliados dois polimorfismos genéticos associados aos efeitos do chumbo: o genótipo da enzima ALAD e o genótipo do receptor da vitamina D, VDR. Estes polimorfismos representam diferenças individuais e/ou populacionais (pré-existent e independentes da exposição), que modulam a cinética e a dinâmica da substância exógena dentro do organismo, pelo que têm vindo a ser utilizados como biomarcadores de susceptibilidade (IEH 1996; Sakai 2000).

Foi escolhido o polimorfismo da enzima ALAD por esta enzima se apresentar sob a forma de três fenótipos (ALAD 1-1, ALAD 2-2 ou ALAD 1-2) e ser sugerido que esses três fenótipos apresentam diferentes taxas de actividade, influenciando a forma como o chumbo afecta o organismo humano (Wetmur, *et al.* 1991; Onalaja e Claudio 2000; Sakai *et al.* 2000). O estudo da relação na amostra em estudo, entre os dados da plumbémia e da actividade da ALAD poderia contribuir para o conhecimento sobre esse fenómeno.

O polimorfismo do gene do receptor da vitamina D (VDR) foi estudado por este receptor estar envolvido na absorção do cálcio do intestino. O polimorfismo definido pela enzima *BsmI* dá origem a três isoenzimas: B-B, b-b e B-b. A hipótese de que o

alelo B possa estar associado a um receptor menos funcional que resulte em teores mais elevados de chumbo no sangue (plumbémias mais elevadas), de acordo com Schwartz (Schwartz *et al.* 2000a e Schwartz 2000b citados por ATSDR (2007)), aumenta o interesse do seu estudo.



Adicionalmente foram avaliados os biomarcadores de efeito protoporfirina-zinco (PPZ) e actividade da enzima ALAD (actALAD), que dão indicação sobre alterações bioquímicas que ocorreram no organismo como consequência da presença do chumbo e que podem prenunciar efeitos prejudiciais à saúde ou o desencadear de processos de doença (Manini, *et al.* 2007).

A PPZ é um bom indicador biológico de efeito uma vez que, permanecendo nos eritrócitos durante cerca de 120 dias, é indicativo da exposição no período de cerca de três meses anteriores à colheita (Roh, *et al.* 2000; Cheymol *et al.* 2001, Prista e col. 2004). A PPZ complementa, portanto, o conhecimento obtido pelo estudo da plumbémia, uma vez que a Pb-S indicia sobre o risco e a PPZ mede um efeito real no organismo.

A actividade da enzima ALAD, outro indicador biológico de efeito, é considerada o parâmetro bioquímico mais sensível a valores baixos de exposição a chumbo (Herber e Sallé 1978). De acordo com Sakai (2000) a inibição da enzima ocorre rapidamente e de forma acentuada a valores de plumbémia entre 5 µg/dL e 50 µg/dL, tornando-se menos evidente a valores mais elevados.

O interesse do estudo destes dois parâmetros prende-se com a caracterização da resposta da actividade da enzima ALAD e da PPZ à carga de chumbo do organismo, estimada pelos valores de plumbémia, e avaliar a possível influência dos diferentes polimorfismos genéticos da ALAD e da VDR no desenvolvimento dos efeitos do chumbo sobre o organismo, nomeadamente a nível da genotoxicidade.



A amostra final englobou 186 voluntários do sexo masculino: 89 provenientes da unidade fabril A e 59 da unidade B, perfazendo 148 indivíduos com exposição ocupacional a chumbo e 38 sem exposição ocupacional a chumbo.

A não existência dos indivíduos do gênero feminino nos setores de trabalho com exposição a chumbo condicionou a não inclusão de elementos femininos no grupo sem exposição profissional, desde logo afastando qualquer possível análise em função dos diferentes gêneros.

A maioria dos indivíduos integrantes da amostra era não fumadora (64 % do total). A comparação para os hábitos tabágicos foi sempre feita de acordo com a categorização entre fumadores e não fumadores.

A média de idades (total) era de 45 anos, variando entre 21 e 66 anos. Procedeu-se à categorização por cinco grupos etários de [20,30[ anos, [30,40[ anos, [40,50[ anos, [50,60[ anos e mais de 60 anos, para a avaliação do efeito da idade nos parâmetros estudados. Verifica-se que o grupo com maior número de indivíduos é o de [50, 60[ anos (38 %) e que 31 % do total tem menos de 40 anos.

A categorização por tempo de exposição (anos de trabalho com exposição profissional a chumbo) também foi feita por intervalos (seis intervalos), correspondentes a [0,1[ anos, [1,6[ anos, [6,11[ anos, [11,21[ anos, [20,31[ anos e 31 e mais anos. É importante salientar que os indivíduos que não trabalham nas unidades fabris com exposição a chumbo foram incluídos no grupo [0,1[ anos. Os dois grupos seguintes, [1,6[ anos e [6,11[ anos, são de intervalo mais pequeno que os restantes: apenas incluem 5 anos cada. Em conformidade com isso, englobam menos elementos do que os outros (25 e 16 elementos respectivamente, enquanto que todos os restantes grupos por tempo de exposição contêm entre 36 e 41 elementos). Em termos de número de elementos poderia fazer sentido reunir ambos num só, mas isso faria incorrer no risco de mascarar eventuais alterações presentes durante os primeiros anos de exposição, antes do

organismo se poder adaptar ao factor exposição. Daí a opção de os manter como grupos separados.

As médias de idades dos grupos constituídos com base no tempo de exposição tendem a aumentar com o aumento do tempo de exposição. Esta relação era esperada uma vez que o tempo de exposição (em anos) corresponde ao tempo a que os indivíduos trabalham no sector e, de forma intuitiva, podemos concluir que são as pessoas mais velhas as que, de uma forma geral, têm há mais tempo vida profissional activa.



Os dados obtidos no presente estudo revelam valores de plumbémia entre 1 µg/dL e 67 µg/dL. Entre os indivíduos não profissionalmente expostos a chumbo, o valor médio de plumbémia foi de 3,9 µg/dL. Os valores médios de plumbémia para os trabalhadores das unidades fabris A e B foram 30,5 µg/dL e 34,3 µg/dL, respectivamente.

Comparando esses valores com os do trabalho de Prista (2002) que avaliou 110 trabalhadores nas mesmas unidades fabris (aqui denominadas unidades A e B), verificase uma menor incidência dos valores mais altos de plumbémia. Nesse estudo, 15 % dos trabalhadores apresentaram valores de plumbémia superiores a 70 µg/dL e 61 % superiores a 40 µg/dL. Ao contrário, no presente trabalho não se encontraram valores de plumbémia superiores a 70 µg/dL, valor que corresponde ao limite máximo admissível de acordo com a legislação portuguesa. A percentagem de valores de plumbémia superior a 40 µg/dL (valor ainda tido como referência limite para a população em geral) é inferior à daquele estudo em mais de metade (47 trabalhadores correspondendo a 25 % do total). Esta variação terá sido resultado das importantes alterações implementadas desde 2002, em ambas as unidades fabris, que terão conduzido a uma efectiva diminuição da intensidade de exposição e a uma gestão mais eficaz da vigilância médica.

Para a análise dos efeitos da plumbémia nos outros parâmetros avaliados recorreu-se a uma divisão por seis grupos, desta vez categorizados por intervalos de 10 µg/dL de



plumbémia (excepto o último, de 20 µg/dL). Os grupos formados foram [0, 10[ µg/dL, [10, 20[ µg/dL, [20, 30[ µg/dL e [40, 50[ µg/dL e [50,70] µg/dL integrando, respectivamente, 40, 27, 43, 29, 31 e 16 indivíduos.

Os resultados revelam um aumento significativo da plumbémia com o aumento da idade ( $r = 0,491$  para  $p < 0,001$ ). A análise da variação por grupos etários também revelou a ocorrência de um aumento estatisticamente significativo entre os dois grupos de idades mais baixas ([20,30[ e [30,40[ anos) quando comparados com os outros três, de idades mais elevadas ([40,50[, [50,60[ e +60 anos). Isto poderá ser explicado pelo facto de os trabalhadores mais velhos corresponderem aos que trabalham com exposição a chumbo há mais tempo.

Também a condição de ser fumador está associada a níveis mais elevados da plumbémia ( $p < 0,05$ ) o que está de acordo com o facto previamente conhecido do tabaco conter metais pesados, entre eles o chumbo.

Pela aplicação da regressão linear múltipla verifica-se que o modelo utilizado explica cerca de 50 % das alterações observadas nos valores de plumbémia, com o factor exposição profissional (avaliada como sim/não) a ter maior influência, seguido da idade. Do ponto de vista das características genéticas (estudadas), o genótipo B-B do receptor da vitamina D tem um efeito negativo nos valores de plumbémia, por comparação com os portadores do genótipo B-b.

A influência da exposição ocupacional não surpreende, uma vez que o biomarcador plumbémia (Pb-S) foi escolhido exactamente por ser um bom indicador da exposição a chumbo. Mas é interessante verificar que não se encontraram diferenças estatisticamente significativas nos valores de Pb-S entre grupos de tempo de exposição, apesar da idade ser um factor com peso no aumento de Pb-S e se ter encontrado uma correlação moderada entre esses dois parâmetros ( $r = 0,680$ ;  $p < 0,001$ ).

A comparação dos valores de plumbémia entre os grupos com diferentes tempos de exposição confirma esta apreciação, uma vez que apenas se verifica um aumento significativo do primeiro grupo, [0,1[, para os outros. Entre os grupos subsequentes, apesar de se verificarem algumas oscilações de plumbémias, não se encontram

diferenças estatisticamente significativas. Sendo verdade que todos os indivíduos inicialmente classificados como NOE (ou seja, sem exposição ocupacional a chumbo) ficaram todos incluídos nesta categoria, este facto apenas reforça a conclusão acima formulada.

Assim, é legítimo considerar-se que o simples facto de existir exposição profissional a chumbo dá origem a valores mais elevados de plumbémia, mas, no presente caso, a importância desse aumento é independente dos anos de trabalho no sector.

Surpreendentemente o modelo não apontou como preditor do aumento de plumbémia a característica de ser fumador, apesar de, como dito acima, se terem encontrado diferenças significativas entre os dois grupos. Tal dever-se-á, provavelmente, à existência de uma grande dispersão dos resultados (embora as médias difiram, em ambos os grupos o valor mínimo é de 1 µg/dL, sendo o valor máximo mais elevado no grupo não exposto do que no grupo exposto, aproximadamente 67 µg/dL e 64 µg/dL, respectivamente.



A determinação da PPZ não foi efectuada nos indivíduos avaliados fora das unidades fabris por condicionamento da disponibilidade do equipamento, associado ao conhecimento teórico prévio de que a PPZ não regista aumentos significativos relacionáveis com o chumbo para plumbémias inferiores a 30 µg/dL (Roh, *et al.* 2000; Prista, *et al.* 2004). Uma vez que não eram esperados valores de plumbémia desta natureza nos indivíduos sem exposição profissional a chumbo, conclui-se ser desnecessário torneir esta questão.

A variação dos valores de PPZ com os valores de plumbémia não obedece ao comportamento normal. Apresenta-se sensivelmente constante até ao valor aproximado de 35 µg/dL, valor a partir do qual se verifica uma tendência para aumento com o aumento dos valores de plumbémia, no que é acompanhada de uma maior dispersão dos resultados. Ou seja, para valores de plumbémia superiores a aproximadamente

35 µg/dL, podemos encontrar indivíduos que apresentem valores de plumbémia muito semelhantes e valores de PPZ extremos. Este tipo de comportamento dos valores de PPZ está de acordo com os referidos em Prista (2002) e Prista e col. (2004) onde é referida alteração significativa da PPZ a partir de plumbémias próximas dos 40 µg/dL e, da mesma forma, grande dispersão de resultados com base nos valores de plumbémia.

A observação do comportamento da PPZ entre os grupos de plumbémia confirma que o aumento significativo se apresenta entre os grupos de [20,30[ e [30,40[ µg/dL. Aos grupos seguintes, correspondentes a maiores valores de plumbémia, já não corresponde nenhum aumento estatisticamente significativo, o que pode ser devido à maior dispersão dos resultados, acima referida, que fica evidente também na FIGURA 17.

Para tal influenciará o facto de a PPZ se formar na presença de chumbo livre no sangue para ligar à enzima ferroquelatase (Sellers, *et al.* 2001; Ferreira, *et al.* 2002; Medlock, *et al.* 2007). Aliás, os valores de PPZ também estão correlacionados (coeficiente de correlação de Spearman) com os valores de plumbémia ( $r_s = 0,639$ ;  $p < 0,001$ ) o que está de acordo com o publicado por Gurer-Orhan e col. num estudo sobre indicadores de exposição a chumbo e de stress oxidativo em 20 trabalhadores expostos e 16 controlos (Gurer-Orhan, *et al.* 2004). No trabalho destes autores, a associação encontrada é um pouco mais elevada o que pode estar relacionado com o tamanho reduzido da amostra. Por outro lado, em outros trabalhos, como o de Roh e col., não foi encontrada nenhuma correlação entre os valores de PPZ e plumbémia (Roh, *et al.* 2000). Neste caso apenas foram incluídos 49 trabalhadores expostos e a média de plumbémia era de 42,60 µg/dL o que, à luz dos nossos resultados, se explica pelo facto de a PPZ só ter sensibilidade para valores de plumbémia superiores a 40 µg/dL.

Também é comum nas avaliações de PPZ o aumento da dispersão dos resultados com o aumento da plumbémia (Cheymol, *et al.* 2001; Prista, *et al.* 2004). Este facto impõe a necessidade de precaução na interpretação dos valores deste parâmetro, sobretudo na ausência do doseamento de chumbo no sangue, uma vez que um valor baixo de PPZ (entre 25 e 30 µg/dL por exemplo) pode não corresponder a um valor baixo de plumbémia.

Não se encontraram variações significativas nos valores de PPZ entre fumadores e não fumadores, nem com a idade.

As variações da PPZ por intervalos de tempo de exposição não apresentam significado estatístico. Com efeito, observa-se um aumento de PPZ com o aumento do tempo de exposição do grupo de [1,6[ para o grupo [6,11[, mas este não é estatisticamente significativo.

Pelas características próprias deste parâmetro, nomeadamente o facto de ser influenciado pelos níveis de plumbémia dos últimos 3 meses, não se esperava encontrar outro tipo de associações, com tempo de exposição, idade ou com os hábitos tabágicos (Prista, *et al.* 2004).



A variação dos valores de actividade de ALAD com a plumbémia também não obedece à distribuição normal. No entanto, apesar da grande dispersão de resultados, consegue observar-se uma descida dos valores, aproximadamente a partir dos 10 µg/dL de plumbémia. Na análise da variação dos valores de actividade de ALAD por grupos de plumbémia fica evidente que a única descida acentuada e estatisticamente significativa dos valores de actividade de ALAD se dá do grupo mais baixo de plumbémia ([0,10[ µg/dL) para os outros grupos, o que indica que a inibição da enzima se dá perto do valor 10 µg/dL, o que está de acordo com os trabalhos de Sakai e Morita (1996) e de Campagna e col. (1999).

No trabalho de Gurer-Orhan e col., a actividade da enzima ALAD aparece inversa e fortemente correlacionada com os valores de plumbémia ( $r = -0,85$ ), levando os autores a indicar a actividade da ALAD como um indicador eficiente da exposição a chumbo (Gurer-Orhan, *et al.* 2004). Duydu e col. também referem uma forte correlação inversa entre esses dois parâmetros, num estudo em 31 trabalhadores de uma indústria de baterias (Duydu, *et al.* 2001). No nosso estudo encontra-se uma relação inversa mais moderada entre a ALAD e a plumbémia ( $r = -0,491$ ;  $p < 0,001$ ).

Por outro lado, a aplicação do modelo de regressão linear múltipla exclui a plumbémia como tendo influência na variação dos valores da actividade da ALAD, embora aponte a exposição profissional como um preditor para a inibição da ALAD ( $\beta$  padronizado  $< 0$ ).

Estes resultados permitem concluir que a actividade desta enzima, sendo um bom indicador para apreciar a existência ou não de exposição a chumbo, não constitui um bom indicador de dose (quantidade de chumbo a que cada indivíduo está exposto).

Não se encontraram variações significativas na actividade da ALAD entre fumadores e não fumadores mas, diferentemente do que foi encontrado para a PPZ, a actividade da ALAD aparece (inversamente) correlacionada tanto com a idade como com o tempo de exposição, embora as associações sejam baixa ( $r = -0,372$ ;  $p < 0,001$ ) e moderada ( $r = -0,489$ ;  $p < 0,001$ ), respectivamente. Estas duas informações resultam, no entanto, em informação redundante já que a idade e o tempo de exposição (anos de trabalho) estão directamente correlacionadas entre elas ( $r = 0,680$ ;  $p < 0,001$ ), ou seja, os indivíduos com mais tempo de exposição são também os mais velhos. Esta descida da actividade da ALAD seria de esperar uma vez que esta varia inversamente com o valor de plumbémia e a plumbémia aumenta com a idade.



No que respeita ao polimorfismo da enzima ALAD era esperado que, de acordo com os dados compilados por Kelada e col. (2001), cerca de 80 % da população apresentasse o fenótipo ALAD 1-1, 19 % o fenótipo ALAD 1-2 e cerca de 1 % da população tivesse o fenótipo ALAD 2-2. Mais especificamente, num estudo efectuado em Portugal e incluído nessa revisão de Kelada e col., Amorim e col. encontraram frequências de 82,7 %, 16,5 % e 0,8 % para os mesmos genótipos, respectivamente (Amorim *et al.* 1994). Neste estudo, em indivíduos portugueses, esperávamos encontrar percentagens semelhantes às referidas por Amorim e col.

No entanto verificou-se que a grande maioria da amostra estudada apresenta um único polimorfismo neste gene (96,9 % apresenta o genótipo ALAD 1-1). Apenas cinco

indivíduos apresentam os genótipos ALAD 1-2 e 2-2, tornando impraticável a tentativa de avaliar o efeito destes polimorfismos nos parâmetros avaliados.

Por esse motivo o polimorfismo da enzima ALAD não foi incluído no modelo de regressão linear múltipla (MRLM) efectuado.



Em relação aos genótipos de VDR, as frequências obtidas na amostra estudada são de 39,3 % para o genótipo B-b, 31,1 % para o B-B e 29,6 % para o genótipo b-b. Estes dados são igualmente diferentes do esperado. De acordo com Kamel e col. (2003) o genótipo homozigótico B-B encontra-se em cerca de 10 a 20 % da população caucasiana e, na meta-análise de Cooper e Umbach (1996) em que foram comparados os resultados obtidos em 29 estudos, a frequência encontrada para o genótipo B-B foi de 17,2 % em populações caucasianas. Na nossa amostra a incidência do genótipo B-B é, portanto, bastante superior ao que estaríamos à espera (31,1 %).

Apesar de não se encontrarem diferenças estatisticamente significativas nos valores de plumbémia tendo em conta os genótipos de VDR, no MRLM. Por ser uma variável qualitativa foi incluída como variável binária simulada (dummy), de forma a assumir apenas os valores de 0 e 1. Usaram-se dois dos genótipos, B-B e b-b, por comparação com o mais frequente na população que serviu como grupo de referência — o genótipo B-b (39,3 %). Verifica-se que a presença do genótipo B-B faz baixar os valores de plumbémia por comparação com o genótipo heterozigótico (B-b). Isto poderá indiciar que o genótipo do VDR modifica a toxicocinética do chumbo apesar de, neste trabalho, essa influência não se ter traduzido em diferenças estatisticamente significativas.

Segundo Schwartz e col., é a presença do alelo B que dá origem a valores mais elevados de plumbémia (Schwartz, *et al.* 2000a). Num outro trabalho que avaliou, em trabalhadores com exposição ocupacional a chumbo no passado, a associação do polimorfismo VDR com a concentração de chumbo na tíbia, Schwartz e col. concluíram que este polimorfismo modifica a forma como o chumbo é libertado do osso após

cessação da exposição, com os indivíduos com genótipo b-b a mostrarem um declínio na deposição de chumbo no osso ao longo do tempo, enquanto que os que tinham genótipos B-b e B-B, pelo contrário, apresentavam uma tendência para aumentar a taxa de deposição ao longo do tempo, embora de forma mais notória nos B-B (Schwartz, *et al.* 2000b). Kamel e col. citam Zmuda e col. para explicar que o genótipo VDR poderá estar associado a alterações na homeostasia do cálcio, uma vez que a presença do alelo B está associada a um receptor para a vitamina D menos eficiente, com consequências nas taxas de absorção e distribuição do cálcio no organismo pelo que a absorção desse cálcio será menos eficiente em indivíduos portadores desse alelo (Zmuda, *et al.* 2000; Kamel, *et al.* 2003). A ser válida, essa explicação justifica os resultados obtidos quer neste trabalho quer nos outros referidos, uma vez que uma diminuição da absorção de cálcio facilitaria a absorção do chumbo assim como a sua deposição no osso.



Para o estudo dos efeitos genotóxicos, o consumo de tabaco é uma variável importante a ter em conta uma vez que o fumo de cigarro contém uma grande quantidade de substâncias mutagénicas e carcinogénicas (Hoet 1996; Smith *et al.* 2003). Outro factor a ter em conta é a idade já que uma das causas do aparecimento de mutações espontâneas no ADN é a existência de erros associados à replicação que aumentam com a idade, uma vez que a frequência de mutações aumenta com o aumento do número de divisões celulares (Akiyama, *et al.* 1995).

O modelo de regressão linear múltipla aplicado aos parâmetros de avaliação do dano genotóxico (teste do cometa e frequência de mutação de TRC, TCR-mf) mostrou-se válido estatisticamente sem no entanto explicar, em nenhum dos casos, mais do que 9 % do comportamento das variáveis. Como factores a influenciar os valores desses parâmetros apenas se registam a idade, para todos, e o consumo de tabaco (como variável dicotómica: ser ou não ser fumador) para o momento da cauda, a percentagem de ADN na cauda e a frequência de mutação do TCR.

Por outro lado, o estudo da relação existente entre as variáveis evidenciou a existência de associações da percentagem de ADN na cabeça, da percentagem de ADN na cauda e do TCR-mf, com a idade, embora sejam associações de fraca intensidade ( $r = -0,219$ ,  $p < 0,005$ ;  $r = 0,217$ ,  $p < 0,005$ ; e  $r = 0,266$ ,  $p < 0,005$ , respectivamente).

Igualmente, os valores de TCR-mf apresentam uma correlação positiva, embora fraca, com os valores de plumbémia ( $r = 0,216$ ;  $p < 0,001$ ). Este facto poderá explicar que nem a plumbémia nem a idade apareçam como factores preditores na análise de regressão efectuada.

Foram encontradas correlações fortes entre os diversos parâmetros do teste do cometa (avaliação do dano genético) o que está de acordo com o facto de estes parâmetros serem medidos no mesmo conjunto de células e funciona como validação dos resultados.

Verifica-se uma associação inversa da idade com a percentagem de ADN na cabeça e, como seria de esperar, a associação directa da idade com a percentagem de ADN na cauda. É também directa a associação da idade com os valores de TCR-mf.

Contrariamente ao que se poderia esperar, tendo em conta o conteúdo do fumo do tabaco e apesar de se verificar um aumento estatisticamente significativo no grupo de fumadores (29,4  $\mu\text{g/dL}$ ) em relação ao de não fumadores (24,5  $\mu\text{g/dL}$ ), não se registaram diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos parâmetros de genotoxicidade quando se avaliou a média do grupo de fumadores contra a do grupo de não fumadores, o que não surpreende, uma vez que os resultados desses mesmos parâmetros também não evidenciaram diferenças relevantes com o aumento da plumbémia.

Os resultados obtidos com a aplicação do Teste do Cometa indiciam não haver alterações genotóxicas significativas entre os diversos grupos de plumbémia. Nem mesmo parece existir qualquer tendência para aumento de dano genético, mantendo-se a média dos valores dos parâmetros analisados muito semelhante em todos os grupos. A mesma constância de valores foi observada nos grupos por tempo de exposição.



Quanto aos resultados do TCR–mf também os valores entre os diversos grupos são estatisticamente semelhantes, quer na avaliação por grupos de plumbémia, quer nos grupos por tempo de exposição. No entanto, o facto de estes valores serem afectados por uma maior dispersão, associada com o aumento dos valores de plumbémia, pode estar a mascarar alguma influência deste factor nos valores, já que, por observação das figuras, parece haver um aumento evidente da frequência de mutações em todos os grupos de plumbémia quando comparados com os de menor concentração (plumbémia < 10 µg/dL), assim como em todos os grupos organizados por tempo de exposição quando comparados com o grupo [0,1] anos de exposição.

Considerando, assim, não serem conclusivos os resultados de mutagenicidade (TCR–mf), devido à grande sua elevada dispersão, o presente estudo não permite atribuir um efeito genotóxico ao chumbo, considerado isoladamente.

Um estudo preliminar da presente investigação havia conduzido a um diferente tipo de conclusões (Garcia-Lestón *et al.* 2008). Contudo, à data apenas foram contemplados os efeitos na mutação do TCR e os efeitos imunotóxicos em 30 trabalhadores expostos e em 30 controlos (estudo caso-controlo), condições em que foram registadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos. A diferença entre esses resultados e os agora obtidos permite equacionar a hipótese de que as conclusões seriam diferentes caso tivesse sido possível aumentar o grupo de trabalhadores com baixos valores de plumbémia (por exemplo por recurso a um grupo mais numeroso de indivíduos não-expostos profissionalmente). Os resultados actuais poderão, por outro lado, ser explicados por uma hipotética variabilidade interindividual que a maior dimensão da amostra tenha feito sobressair. Com efeito, sendo este estudo novo na avaliação da mutação do TCR em populações humanas, não pode ser comparado com outros.



No que respeita à associação entre a exposição a chumbo e manifestações de genotoxicidade, alguns estudos em trabalhadores ocupacionalmente expostos evidenciam resultados diferentes dos alcançados com a presente investigação.

Por exemplo, Ye e col. identificaram, em trabalhadores de uma fundição, uma correlação positiva entre o dano genético e os valores de plumbémia, assim como entre o dano genético e o stress oxidativo (Ye, *et al.* 1999). Também Fracasso e col., comparando um grupo de 37 pessoas expostas ocupacionalmente com um grupo de 29 controlos, referiram ter detectado aumentos significativos do momento da cauda e da percentagem de ADN na cauda, assim como de radicais livres (Fracasso, *et al.* 2002). Danadevi e col. e Marthino-Roth e col. publicaram resultados que concluem por um significativo aumento do dano genético que relacionaram com a exposição a chumbo, em trabalhadores de reutilização de baterias (no caso do primeiro estudo) e em trabalhadores em pintura de automóveis e recolha de baterias para reciclagem (no segundo estudo) (Danadevi, *et al.* 2003; Marthino-Roth, *et al.* 2003). Palus e col., numa população masculina de 44 expostos e 52 não expostos, referem ter observado aumento do dano genético com base no teste do cometa, acompanhado de aumento de diversos parâmetros citogenéticos, como a frequência de micronúcleos (MN), HFC e trocas de cromátídeos irmãos (SCE), não tendo, no entanto, verificado correlações significativas entre esses parâmetros e os valores de plumbémia (Palus, *et al.* 2003).

O estudo realizado por Chen e col., tal como o presente, não verificou a existência de correlação entre o dano genético e a plumbémia, assim como não evidenciou efeitos da plumbémia nos valores de TRC–mf (grupo ocupacionalmente exposto contra grupo não ocupacionalmente exposto) – note-se que, até à data, estes foram os únicos autores a estudar *in vivo* o efeito do chumbo na frequência de mutações no TCR em populações humanas (Chen, *et al.* 2006).

No entanto, comparando os estudos destes autores com o presente trabalho, é importante referir que todos aqueles são estudos de caso-controlo em populações mais reduzidas e que, à excepção de Palus e col., nenhum forneceu informação no que

respeita à existência ou não de co-exposição a outras substâncias passíveis de serem carcinogénicas — embora Palus e col. refiram a ocorrência de exposição simultânea e elevada a cádmio no local de trabalho (co-exposição) (Palus, *et al.* 2003).

A co-exposição a outras substâncias é muito difícil de controlar em estudos de populações humanas, pelo que nem sempre é possível determinar quais são os efeitos totalmente atribuíveis à substância que se pretende estudar. Nas indústrias e postos de trabalho em que o nosso estudo foi levado a cabo, e de acordo com o que foi pesquisado, não há conhecimento da ocorrência de exposição a outros agentes genotóxicos. Como tal, poderemos inferir que os efeitos encontrados no nosso estudo poderão ser atribuídos somente ao chumbo.

O estudo em que se verificam resultados com maior semelhança aos da presente investigação, no que respeita à não atribuição de genotoxicidade ao chumbo por si só, é o de Hengstler e col. (2003). Estes autores utilizaram a técnica de eluição alcalina para avaliar o dano genético numa população de 78 expostos e 22 controlos (homens e mulheres) em 10 tipos de serviços, tendo concluído que o dano genético se correlacionava mais fortemente com a concentração de cádmio e cobalto no ar do que com a de chumbo.

Estes e outros autores afirmam que a presença do chumbo tem o efeito de reforçar os efeitos genotóxicos de outros compostos carcinogénicos, tais como o cádmio e o arsénio (Anttila, *et al.* 1995; Lundström, *et al.* 1997; Englyst, *et al.* 2001; Hengstler, *et al.* 2003; Silbergeld, 2003), assumpção igualmente assumida pela equipa de peritos científicos na Monografia da IARC (2006a).



Os resultados do presente estudo vêm reforçar esta ideia ao indiciar a ausência de efeitos genotóxicos decorrentes da exposição a chumbo por si só, apoiando a hipótese de que o chumbo não terá um papel iniciador no processo genotóxico.

O chumbo poderá, no entanto, agir numa fase de promoção da carcinogénese, quando em presença de outros agentes com capacidade para a iniciar, potenciando os seus efeitos.

Seria interessante testar esta hipótese, nomeadamente através de um estudo que avaliasse os mesmos biomarcadores de genotoxicidade desde estudo (teste do cometa e TCR-mf) em trabalhadores com exposição simultânea chumbo e a outro(s) agente(s) reconhecidamente carcinogénico(s), como o cádmio ou o arsénio.

## 5. CONCLUSÕES

Os níveis de plumbémia verificados na população estudada, se comparados com dados obtidos na mesma população alguns anos antes, revelam uma redução significativa, o que é concordante com o que vem sendo verificado a nível global por força de alterações na regulação, no conhecimento e na implementação de sistemas preventivos. Serão, ainda, fruto de uma aposta na melhoria contínua da acção dos Serviços de Saúde e Segurança do Trabalho das empresas em que o estudo se desenvolveu, particularmente notória nos últimos anos.

Especificamente, do trabalho desenvolvido e dos resultados obtidos será permitido concluir que:

1. A plumbémia é mais elevada no grupo de fumadores e eleva-se com a idade embora de revele independente do número de anos de exposição a chumbo. Pelo contrário, a actividade da ALAD diminui com a idade.
2. Foram verificadas correlações fortes entre os diversos parâmetros do teste do cometa (avaliação do dano genético), o que está em consonância com o facto de estes parâmetros serem medidos no mesmo conjunto de células e permite uma validação dos resultados.
3. Tanto a idade como o consumo de tabaco revelam-se como factores influenciadores dos parâmetros de genotoxicidade estudados. A idade regista uma associação inversa com a percentagem de ADN na cabeça e, como seria de esperar, uma associação directa com a percentagem de ADN na cauda. É também directa a associação da idade com os valores de TCR-mf. Não se registaram diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos parâmetros de genotoxicidade
4. Sem exposição simultânea a agentes comprovadamente genotóxicos, a exposição a chumbo não parece desencadear processos de genotoxicidade.
5. Do ponto de vista da saúde pública, e em particular da saúde dos trabalhadores, interessa aprofundar o conhecimento da genotoxicidade do chumbo. Na sequência dos presentes resultados são recomendáveis, nomeadamente, estudos que avaliem os processos de stress oxidativo e que incluam a comparação directa entre grupos de

trabalhadores expostos apenas a chumbo, grupos de trabalhadores com exposição simultânea a chumbo e a outro(s) agente(s) carcinogénico(s) e, de preferência, um terceiro grupo apenas exposto ao(s) agente(s) carcinogénico(s) considerado(s) como co-exposição no segundo grupo referido.

### III. BIBLIOGRAFIA

ACGIH - Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices. Cincinnati: American Conference of Governmental Industrial Hygienists, 2008.

ADEMUYIWA, O. *et al.* - Reversal of aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) inhibition and reduction of erythrocyte protoporphyrin levels by Vitamin C in occupational lead exposure in Abeokuta, Nigeria. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 20 (2005) 404-411.

ADHIKARI, A. *et al.* - 5-aminolevulinate and 4,5-dioxovalerate ions decrease GABA<sub>A</sub> receptor density in neuronal cells, synaptosomes and rat brain. *Brain Research*. 1093 (2006) 95-104.

AHAMED, M.; SIDDIQUI, M. K. J. - Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. *Clinica Chimica Acta*. 383 (2007) 57-64.

AKIYAMA, M. *et al.* - Mutation frequency in human blood cells increases with age. *Mutation Research*. 338 1-6 (1995) 141-9.

AKIYAMA, M. *et al.* - Somatic cell mutations in atomic bomb survivors. *Journal of Radiation Research*. Supplement (1991) 178-282.

ALEXANDER, B. H. *et al.* - Interaction of blood lead and delta-aminolevulinic acid dehydratase genotype on markers of heme synthesis and sperm production in lead smelter workers. *Environmental Health Perspectives*. 106 4 (1998a) 213-216.

ALEXANDER, B. H. *et al.* - Contrasting associations of blood and semen lead concentrations with semen quality among lead smelter workers. *American Journal of Industrial Medicine*. 34 (1998b) 464-469.

AMICI, A. *et al.* - Homogeneous pyrimidine nucleotidase from human erythrocytes: enzymic and molecular properties. *Biochemical Journal*. 304 (1994) 987-92.

AMORIM, A. *et al.* - Distribution of ACP1, AK1 and ALAD polymorphisms in northern Portugal. *Gene Geography*. 8 2 (1994) 147-50.

ANTTILA, A. *et al.* - Excess lung cancer among workers exposed to lead. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*. 21 6 (1995) 460-469.

APOSTOLI, P. *et al.* - The effect of lead on male fertility: a time to pregnancy (TTP) study. *American Journal of Industrial Medicine*. 38 3 (2000) 310-5.

APOSTOLI, P. *et al.* - Male reproductive toxicity of lead in animals and humans. *Occupational and Environmental Medicine*. 38 3 (1998) 310-315.

ASHTON, J.; SEYMOR, H. - *The New Public Health*. Liverpool: Open University Press, 2000.

ATSDR - Lead toxicity. Atlanta: U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ASTDR), 1992.

ATSDR - ToxGuide for Lead (Cas# 7439-92-1). U. S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ASTDR), 2005.

ATSDR - Toxicological Profile for Lead. Atlanta, Georgia: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department Of Health and Human Services, Public Health Service, 2007.

BARBOSA, F. J. *et al.* - A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. *Environmental Health Perspectives*. 113 12 (2005) 1669-1674.

BARTON, J. C.; CONRAD, M. E. - Organ retention and excretion of radiolead administered intravenously in rats: a comparison of erythrocyte- and plasma-associated lead. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* 14 (2001) 89-98.

BASARAN, N.; UNDEGER, U. - Effects of lead on immune parameters in occupationally exposed workers. *American Journal of Industrial Medicine*. 38 3 (2000) 349-54.

BECHARA, E. J. H. *et al.* - A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. *Química Nova*. 16 4 (1993) 385-392.

BECHARA, J. H. - Chumbo, intoxicação e violência. *Jornal do Conselho Regional de Química IV Região (SP e MS)*. 65 (2004) 8-10.



- BERG, J. M. *et al.* - Biochemistry. 5th. New York: W.H. Freeman and Company, 2001.
- BERGDAHL, I. A. - PhD Thesis: Lead in blood: ICP-MS studies of lead in plasma, blood and erythrocyte proteins. Lund, Sweden: Lund University, 1997.
- BERGDAHL, I. A. *et al.* - Delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism: influence on lead levels and kidney function in humans. *Archives of Environmental Health*. 52 2 (1997) 91-96.
- BERGDAHL, I. A. *et al.* - Plasma and blood lead in humans: capacity-limited binding of delta-aminolevulinic acid dehydratase and other lead-binding components. *Toxicological Sciences*. 46 (1998) 247-253.
- BERGDAHL, I. A. *et al.* - Lead in plasma and whole blood from lead-exposed children. *Environmental Research, Section A*. 80 (1999) 25-33.
- BERTRAM, J. S. - The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*. 21 (2001) 167-223.
- BEUTLER, E. *et al.* - Iron deficiency and overload. *Hematology American Society of Hematology Education Program*. (2003) 40-61.
- BEYERSMANN, D. - Effects of carcinogenic metals on gene expression. *Toxicology Letters*. 127 1-3 (2002) 63-8.
- BONNEFOY, C. *et al.* - Validation of the determination of lead in whole blood by ICP-MS. *Journal of Analytical and Atomic Spectrometry*. 17 (2002) 1161-1165.
- BORJA-ABURTO, V. H. *et al.* - Blood lead and the risk of adverse reproductive outcomes. IARC Gargnano Conference, I.4. Italy, 1999.
- BOSCOLO, P. *et al.* - Expression of lymphocyte subpopulations, cytokine serum levels, and blood and urinary trace elements in asymptomatic atopic men exposed to an urban environment. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 72 1 (1999) 26-32.

BOWER, J. J. *et al.* - Conference overview: molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis. *Molecular and Cell Biochemistry*. 279 1-2 (2005) 3-15.

BRESSLER, J. *et al.* - Molecular mechanisms of lead neurotoxicity. *Neurochemical Research*. 24 4 (1999) 595-600.

CAMPAGNA, D. *et al.* - Environmental lead exposure and activity of delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) in maternal and cord blood. *Toxicology*. 134 2-3 (1999) 143-52.

CELIK, M. *et al.* - Effects of environmental lead pollution, smoking, and smokeless tobacco (Maras powder) use on blood lead level. *Biological Trace Element Research*. 120 1-3 (2007) 121-6.

CHEN, Z. *et al.* - Evaluating the genotoxic effects of workers exposed to lead using micronucleus assay, comet assay and TCR gene mutation test. *Toxicology*. 223 3 (2006) 219-26.

CHEYMOL, J. *et al.* - Foetopathie saturnine. *Archives Pédiatriques*. 8 2 (2001) 506-507.

CHUANG, H.-Y. *et al.* - Investigations of vitamin D receptor polymorphisms affecting workers' susceptibility to lead. *Journal of Occupational Health*. 46 (2004) 316-321.

COLLINS, A. R. - The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*. 26 3 (2004) 249-61.

COLLINS, A. R. *et al.* - The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research*. 375 2 (1997) 183-93.

COOPER, G.; UMBACH, D. - Are vitamin D receptor polymorphisms associated with bone mineral density? *Journal of Bone and Mineral Research*. 11 12 (1996) 1841-40.

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. *Cadernos de Saúde Pública*. 11 2 (1995) 177-186.

CORDEIRO, R. *et al.* - Reajustando o limite de tolerância biológica aplicado à plumbemia no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. 12 4 (1996) 455-463.

COSTA, C. A. *et al.* - Correlation between plasma 5-aminolevulinic acid concentrations and indicators of oxidative stress in lead-exposed workers. *Clinical Chemistry*. 43 7 (1997) 1196-202.

COWI - Lead Review. COWI Consulting Engineers and Planners - Nordic Council of Ministers, 2003.

CSD - Protocolos de Vigilancia Sanitaria Específica: Plomo. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo, Comisión de Salud Pública (CSD), Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud, 1999.

DAILEY, H. A. *et al.* - Ferrochelatase at the millenium: structures, mechanisms and [2Fe-2S] clusters. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 57 (2000) 1909-1926.

DAILEY, T. A.; DAILEY, H. A. - Identification of [2Fe-2S] clusters in microbial ferrochelatases. *Journal of Bacteriology*. 184 9 (2002) 2460-4.

DANADEV, K. *et al.* - DNA damage in workers exposed to lead using comet assay. *Toxicology*. 187 (2003) 183-193.

DAVIDSON, K. A. - Toxicity summary for lead (inorganic). Oak Ridge, Tennessee: Oak Ridge National Laboratory, 1994.

DE RESTREPO, H. G. *et al.* - DNA damage and repair in cells of lead exposed people. *American Journal of Industrial Medicine*. 38 (2000) 330-334.

DENG, W.; PORETZ, R. D. - Protein kinase C activation is required for the lead-induced inhibition of proliferation and differentiaion of cultured oligodendroglial progenitor cells. *Brain Research*. 929 (2002) 87-95.

DUC, M. *et al.* - Intoxication par le plomb et ses sals. In - Toxicologie - Pathologie professionnelle Encyclopédie Médico-Chirurgicale (EMC). Paris: Editions Techniques, 1994. 1-10.

DUFFUS, J. H. - Heavy metals - A meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure Applied Chemistry*. 74 5 (2002) 793-807.

DUYDU, Y.; SÜZEN, H. S. - Influence of delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) polymorphism on the frequency of sister chromatid exchange (SCE) and the number of high-frequency cells (HFCs) in lymphocytes from lead-exposed workers. *Mutation Research*. 540 (2003) 79-88.

DUYDU, Y. *et al.* - Correlation between lead exposure indicators and sister chromatid exchange (SCE) frequencies in lymphocytes from inorganic lead exposed workers. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 41 2 (2001) 241-246.

ENGLYST, V. *et al.* - Lung cancer risks among lead smelter workers also exposed to arsenic. *Science of the Total Environment*. 273 (1-3) (2001) 77-82.

ERNST, E. - Heavy metals in traditional Indian remedies. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 57 12 (2002) 891-6.

FAIRBAIRN, D. W. *et al.* - The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*. 339 (1995) 37-59.

FASSIN, D. - Faire de la santé publique. Editions de l'École nationale de santé publique, Rennes. (2ª edição) 2008.

FERREIRA, G. C. *et al.* - Unraveling the substrate - metal binding site of ferrochelatase: an x-ray absorption spectroscopic study. *Biochemistry*. 41 (2002) 4809-4818.

FISCHBEIN, A. *et al.* - The immune system as target for subclinical lead related toxicity. *British Journal of Industrial Medicine*. 50 2 (1993a) 185-6.

FISCHBEIN, A. *et al.* - Phenotypic aberrations of CD3+ and CD4+ cells and functional impairments of lymphocytes at low-level occupational exposure to lead. *Clinical Immunological and Immunopathology*. 66 2 (1993b) 163-8.

FRACASSO, M. E. *et al.* - Lead induced DNA strand breaks in lymphocytes of exposed workers: role of reactive oxygen species and protein kinase C. *Mutation Research*. 515 (2002) 159-169.

FU, H.; BOFFETTA, P. - Cancer and occupational exposure to inorganic lead compounds: a meta-analysis of published data. *Occupational and Environmental Medicine*. 52 (1995) 73-81.

FUNASA - Textos de Epidemiologia para Vigilância Ambiental em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), 2002.

GARCIA-LESTÓN, J. - Evaluation de los efectos tóxicos asociados a la exposición ocupacional a plomo. La Coruña: Facultad de Ciencias, 2007.

GARCIA-LESTÓN, J. *et al.* - Efectos genotóxicos e inmunotóxicos de la exposición laboral al plomo. *Archivos de Prevención y Riesgos Laborales*. 11 3 (2008) 124-130.

GARZA, A. *et al.* - Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. *Medical Science Monitor*. 12 3 (2006) RA57-65.

GERHARDSSON, L. *et al.* - Lead concentrations in cortical and trabecular bones in deceased smelter workers. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 19 (2005) 209-215.

GODWIN, H. A. - The biological chemistry of lead. *Current Opinion in Structural Biology*. 5 2 (2001) 223-7.

GONÇALVES, O. N. B. D. S. M. - A criança e o chumbo. Porto: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, 1997. Dissertação de candidatura ao grau de Doutor.

GOYER, R. A. - Lead Toxicity: from overt to subclinical to subtle effects. *Environmental Health Perspectives*. 86 (1990) 177-181.

GOYER, R. A. - Lead. In C. D. Klaassen - Cassarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons. New York: McGraw-Hill, 2001.

GOYER, R. A.; CLARKSON, T. W. - Toxic effects of metals. In C. D. Klaassen - Cassarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons. New York: McGraw-Hill, 2001.

GURER-ORHAN, H. *et al.* - Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology*. 195 (2004) 147-154.

GURER, H.; ERCAL, N. - Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radical Biology and Medicine* 29 10 (2000) 927-45.

HANAS, J. S. *et al.* - Lead inhibition of DNA-binding mechanism of Cys(2)His(2) zinc finger proteins. *Molecular Pharmacology*. 56 5 (1999) 982-8.

HARTWIG, A.; SCHWERDTLE, T. - Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicology Letters*. 127 (2002) 47-54.

HASH, R. B. - Hereditary hemochromatosis. *Journal of the American Board of Family Medicine*. 14 4 (2001) 266-273.

HELLMAN, B. *et al.* - The concepts of tail moment and tail inertia in the single electrophoresis assay. *Mutation Research*. 336 (1995) 123-131.

HENGSTLER, J. G. *et al.* - Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis*. 24 1 (2003) 63-73.

HERBER, R. F. M. *et al.* - Risk assessment for occupational exposure to chemicals. A review of current methodology (IUPAC Technical Report). *Pure Applied Chemistry*. 73 6 (2001) 993-1031.

HERBER, R. F. M.; SALLÉ, H. J. A. - On the value of 5-aminolevulinic acid dehydratase activity as predictor for lead in blood. *International Archives of Environmental Health*. 41 (1978) 147-150.

HERNBERG, S. - Lead poisoning in a historical perspective. *American Journal of Industrial Medicine*. 38 (2000) 244-254.

HILTON, F. G. - Poverty and pollution abatement: Evidence from lead phase-out. *Ecological Economics*. 56 (2006) 125-131.

HOET, P. - General principles. In WHO - Biological Monitoring of chemical exposure in the workplace. Geneva: WHO, 1996. 1-19.

HOPKINS, M. R. *et al.* - Variants in iron metabolism genes predict higher blood lead levels in young children. *Environmental Health Perspectives*. 116 9 (2008) 1261-1266.

HSU, P. C. *et al.* - Effect of smoking on blood lead levels in workers and role of reactive oxygen species in lead-induced sperm chromatin DNA damage. *Fertility and Sterility*. 91 4 (2009) 1096-103.

HU, H. - Intoxicação por metais pesados. In E. Braunwald - Harrison Medicina Interna. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2002.

HUNTER, G. A. *et al.* - Metal ion substrate inhibition of ferrochelatase. *Journal of Biological Chemistry*. 283 35 (2008) 23685-91.

HWANG, K. Y. *et al.* - Associations of lead exposure and dose measures with erythrocyte protein kinase C activity in 212 current Korean lead workers. *Toxicological Sciences*. 62 2 (2001) 280-8.

IARC - IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human, 87: Inorganic and Organic Lead Compounds. Lyon, France: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 2006a.

IARC - IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 100: a review of human carcinogens draft planning document (draft). World Health Organization, International Agency for research on Cancer, 2006b.

IEH - The use of biomarkers in environmental exposure assessment (report R5). Leischester: Institute for Environment and Health (IEH) - Medical Research Council, 1996.

ILZSG - Lead and Zinc Statistics 2007. [Em linha] [Consult. 4 Fevereiro 2010]. Disponível em [www.ilzsg.org](http://www.ilzsg.org)

IPCS - Environmental Health Criteria 165: Inorganic Lead. Geneva: International Programme on Chemical Safety (IPCS), World Health Organization, 1995.

ISHIOKA, N. *et al.* - Stimulated rapid expression in vitro for early detection of in vivo T-cell receptor mutations induced by radiation exposure. *Mutation Research*. 390 3 (1997) 269-82.

IWAMOTO, K. S. *et al.* - A positive correlation between T-cell-receptor mutant frequencies and dicentric chromosome frequencies in lymphocytes from radiotherapy patients. *Journal of Radiation Research (Tokyo)*. 35 2 (1994) 92-103.

JUBERG, D. R. - Traces of environmental chemicals in the human body: Are they a risk to health? New York: American Council on Science and Health, 1999.

KALES, S. N. *et al.* - Hematopoietic toxicity from lead-containing Ayurvedic medications. *Medical Science Monitor*. 13 7 (2007) CR295-8.

KAMEL, F. *et al.* - Amyotrophic Lateral Sclerosis, Lead, and Genetic Susceptibility: Polymorphisms in the delta-Aminolevulinic Acid Dehydratase and Vitamin D Receptor Genes. *Environmental Medicine*. 111 10 (2003) 1335-1339.

KARAKAYA, A. E. *et al.* - Assessment of abnormal DNA repair responses and genotoxic effects in lead exposed workers. *American Journal of Industrial Medicine*. 47 (2005) 358-363.

KASSIE, F. *et al.* - Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutation Research*. 463 (2000) 13-31.

KELADA, S. N. *et al.* - Delta-aminolevulinic acid dehydratase genotype and lead toxicity: A HuGE review. *American Journal of Epidemiology*. 154 1 (2001) 1-13.

KHALIL-MANESH, F. *et al.* - Experimental model of lead nephropathy. II. Effect of removal from lead exposure and chelation treatment with dimercaptosuccinic acid (DMSA). *Environmental Research*. 58 1 (1992b) 35-54.

KHALIL-MANESH, F. *et al.* - Experimental model of lead nephropathy. I. Continuous high-dose lead administration. *Kidney International*. 41 5 (1992a) 1192-203.

KIRKWOOD, B. R. - Essentials of Medical Statistics. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1988.

KLAASSEN, C. D. - Cassarett and Doull's Toxicology - The Basic Science of Poisons. 6th. New York: McGraw-Hill, 2001.

KYOIZUMI, S. *et al.* - Spontaneous loss and alteration of antigen receptor expression in mature CD4+ T cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 171 6 (1990) 1981-99.

LAFFON, B. *et al.* - Evaluation of genotoxic effects in a group of workers exposed to low levels of styrene. *Toxicology*. 171 (2002) 175-186.



LAFFON, B. *et al.* - Genotoxic effects in a population of nurses handling antineoplastic drugs, and relationship with genetic polymorphisms in DNA repair enzymes. *American Journal of Industrial Medicine*. 48 (2005) 128-136.

LAFFON, B. *et al.* - Assessment of occupational genotoxic risk in the production of rubber tyres. *Annals of Occupational Hygiene*. 50 6 (2006) 583-592.

LANDRIGAN, P. J. - Toxicity of lead at low dose. *Br J Ind Med*. 46 9 (1989) 593-6.

LANDRIGAN, P. J. *et al.* - The reproductive toxicity and carcinogenicity of lead: a critical review. *American Journal of Industrial Medicine*. 38 231-243 (2000)

LANDRIGAN, P. J.; TODD, A. C. - Direct measurement of lead in blood: a promising biomarker. *Journal of the American Medical Association*. 271 3 (1994) 239-140.

LAST, J. M. - Public health and human ecology. Connecticut: Appleton and Langue, 1926.

LAUWERYS, R. - Toxicologie industrielle et intoxications professionnels. 4<sup>ème</sup> ed. Paris: Masson, 1999.

LAUWERYS, R. R.; HOET, P. - Industrial Chemical Exposure. Guidelines for Biological Monitoring. 3rd Edition. CRC Press, 2001.

LEONARD, A.; BERNARD, A. - Biomonitoring exposure to metal compounds with carcinogenic properties. *Environmental Health Perspectives*. 101 Suppl 3 (1993) 127-33.

LESSLER, M. A. - Lead and lead poisoning from Antiquity to Modern Times. *Ohio Journal of Science*. 88 3 (1988) 78-84.

LEWIN, B. - Genes V. Oxford: Oxford University Press, 1994.

LEWIT-BENTLEY, A.; RETY, S. - EF-hand calcium-binding proteins. *Current Opinion in Structural Biology*. 10 6 (2000) 637-43.

LIDSKY, T. I.; SCHEIDER, J. S. - Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates - review article. *Brain*. 126 1 (2003) 5-19.

LUNDSTRÖM, N. G. *et al.* - Cumulative lead exposure in relation to mortality and lung cancer morbidity in a cohort of primary smelter workers. . *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*. 23 1 (1997) 24-30.

MAGOS, L. - Epidemiological and experimental aspects of metal carcinogenesis: physicochemical properties, kinetics, and the active species. *Environmental Health Perspectives*. 95 (1991) 157-89.

MAGYAR, J. S. *et al.* - Reexamination of lead(II) coordination preferences in sulfur-rich sites: implications for a critical mechanism of lead poisoning. *Journal of the American Chemical Society*. 127 26 (2005) 9495-505.

MAHAFFEY, K. R. - Environmental lead toxicity: nutrition as a component of intervention. *Environmental Health Perspectives*. 89 (1990) 75-78.

MAKINO, S. *et al.* - Relationship between blood lead level and urinary ALA level in workers exposed to very low levels of lead. *Industrial Health*. 38 (2000) 95-98.

MANINI, P. *et al.* - Exposure assessment at the workplace: implications of biological variability. *Toxicology Letters*. 168 3 (2007) 210-8.

MAO, J. S. *et al.* - The multilevel cycle of anthropogenic lead. II. Results and discussion. *Resources, Conservation and Recycling*. 52 (2008) 1050-1057.

MARCY, S. *et al.* - Chapter 7 - Conclusions and Recommendations. In - AMAP Assessment 2002: Heavy metals in the Arctic. Oslo, Noruega: Arctic Monitoring and Assessment Programme, 2004. 134.

MARKOWITZ, M. - Lead Poisoning: A Disease for the Next Millennium. *Current Problems in Pediatrics*. 30 (2000) 62-70.

MARQUÉS, F. M. - Plomo: criterios toxicológicos actuales para la vigilancia médica de trabajadores expuestos. Barcelona: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, Centro Nacional de Condiciones de Trabajo, 1993.

MARTHINO-ROTH, M. G. *et al.* - Occupational genotoxicity risk evaluation through the comet assay and the micronucleus test. *Genetic and Molecular Biology*. 4 2 (2003) 410-417.

MAYAN, O. *et al.* - Childhood lead exposure in Oporto, Portugal. *International Journal of Occupational and Environmental Health*. 7 (2001) 209-216.

MCCONNELL, J. R.; EDWARDS, R. - Coal burning leaves toxic heavy metal legacy in the Arctic. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. 105 34 (2008) 12140-4.

MEDLOCK, A. *et al.* - Substrate interactions with human ferrochelatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. 104 6 (2007) 1789-93.

MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. - A cinética do chumbo e a sua importância para a saúde. *Ciência e Saúde Colectiva*. 9 1 (2004a) 167-181.

MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. - Effects of lead exposure on the human body and health implications (special report). *Pan American Journal of Public Health*. 15 2 (2004b) 119-129.

MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. - The significance of lead speciation analysis in blood plasma for health risk assessment. *Química Nova* 27 2 (2004c) 251-260.

MORGAN, M. S. - The biological exposure indices: a key component in protecting workers from toxic chemicals. *Environmental Health Perspectives*. 105 Suppl 1 (1997) 105-15.

NEEDLEMAN, H. - Lead poisoning. *Annual Revisions of Medicine*. 55 (2004) 209-222.

NIEBOER, E.; FLETCHER, G. G. - Toxicological profile and related health issues: Inorganic Lead (for Physicians). 2001.

NORA - Priorities for development of research methods in occupational cancer. *Environmental Health Perspectives*. 111 1 (2003) 1-12.

O'FLAHERTY, E. J. - A physiologically based kinetic model for lead in children and adults. *Environmental Health Perspectives*. 106 Sup6 (1998) 1495-1503.

OLIVE, P. L. - The comet assay: an overview of techniques. *Methods in Molecular Biology*. 203 (2002) 179-94.

ONALAJA, A. O.; CLAUDIO, L. - Genetic susceptibility to lead poisoning. *Environmental Health Perspectives*. 108 sup.1 (2000) 23-28.

OSHA - OSHA Regulations (Standards - 29 CFR): medical surveillance guidelines - 1926.62 App C, 1993. [Em linha] [Consult. Março 2009]. Disponível em <http://www.osha.gov>.

ÖSTLING, O.; JOHNSON, K. J. - Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 123 1 (1984) 291-298.

PALLANT, J. - SPSS Survival Manual. 3a. Nova Iorque: Mc-Graw-Hill, 2007.

PALUS, J. *et al.* - Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutation Research*. 540 (2003) 19-28.

PAPANIKOLAOU, N. C. *et al.* - Lead toxicity update: a brief review. *Medical Science Monitor*. 11 10 (2005) 329-336.

PARSONS, P. *et al.* - An assessment of contemporary atomic spectroscopic techniques for the determination of lead in blood and urine matrices. *Spectrochimica Acta Part B*. 56 (2001) 1953-1604.

PASCHAL, D. - Biological monitoring of toxic elements. *Journal of Chemical Health and Safety*. doi: 10.1016/j.jchas.2007.10.001 (2007)

PESTANA, M. H.; GAGEIRO, J. N. - Análise de dados para ciências sociais: a complementaridade do SPSS. 2a edição. Lisboa: Edições Sílabo, 2000.

PIRKLE, J. L. *et al.* - The relationship between blood lead levels and blood pressure and its cardiovascular risk implications. *American Journal of Epidemiology*. 121 2 (1985) 246-58.

PIVETTA, F. *et al.* - Monitoramento biológico: conceitos e aplicações em saúde pública. *Cadernos de Saúde Pública*. 17 3 (1990) 545-554.

PONKA, P. - Rare causes of hereditary iron overload. *Seminars in Hematology*. 39 4 (2002) 249-262.

PRESTON, R. J.; HOFFMANN, G. R. - Genetic toxicology. In C. D. Klaassen - Cassarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons. New York: McGraw-Hill, 2001.

PRISTA, J. - Exposição profissional a chumbo: utilização da protoporfirina-zinco (PPZ) na vigilância de saúde de trabalhadores expostos. Lisboa: Escola Nacional de Saúde Pública - Universidade Nova de Lisboa, 2002. Tese de doutoramento.

PRISTA, J. *et al.* - Determinação da protoporfirina-zinco por hematofluorímetro portátil: investigação sobre validade dos dados. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*. 20 1 (2002) 5-10.

PRISTA, J.; UVA, A.S. - Exposição profissional a agentes químicos: os indicadores biológicos na vigilância de saúde dos trabalhadores. *Revista Saúde e Trabalho*. 4 (2003) 5-12.

PRISTA, J.; UVA, A.S. - A utilização de indicadores biológicos em Saúde Ocupacional. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*. 6 (2006) 45-54.

PRISTA, J. *et al.* - Variação temporal da protoporfirina-zinco (PZZ) em trabalhadores expostos a chumbo. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*. 22 2 (2004) 21-32.

PRISTA, J. *et al.* - Exposição profissional ao chumbo: utilização do doseamento do ácido delta-aminolevulínico urinário na vigilância médica dos trabalhadores. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*. 21 1 (2003) 17-22.

RABINOWITZ, M. B. - Toxicokinetics of bone lead. *Environmental Health Perspectives*. 91 (1991) 33-37.

RABINOWITZ, M. B. *et al.* - Effect of food intake and fasting on gastrointestinal lead absorption in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*. 33 8 (1980) 1784-8.

ROH, Y.-M. *et al.* - Zinc protoporphyrin IX concentrations between normal adults and the lead-exposed workers measured by HPLC, spectrofluorometer, and hematofluorometer. *Industrial Health*. 38 (2000) 372-379.

ROJAS, E. *et al.* - Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B*. 722 (1999) 225-254.

ROMA-TORRES, J. *et al.* - Lead exposure of children and newborns in Porto, Portugal. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 210 (2007) 411-414.

ROMA-TORRES, J. *et al.* - Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. *Mutation Research*. 604 (2006) 19-27.

ROSS, D. W. - Molecular Diagnosis. In Springer - Introduction to oncogenes and molecular cancer medicine. Nova lorque: 1998a. 75-93.

ROSS, D. W. - Multiple steps in molecular causes of cancer. In Springer - Introduction to oncogenes and molecular cancer medicine. Nova lorque: 1998b. 57-71.

SAKAI, T. - Biomarkers of lead exposure. *Industrial Health*. 38 (2000) 127-142.

SAKAI, T. e MORITA, Y. - delta-Aminolevulinic acid in plasma or whole blood as a sensitive indicator of lead effects, and its relation to the other heme-related parameters. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 68 2 (1996) 126-32.

SAKAI, T. *et al.* - Determination of pyrimidine 5'-nucleotidase (P5N) activity in whole blood as an index of lead exposure. *British Journal of Industrial Medicine*. 45 6 (1988) 420-5.

SAKAI, T. *et al.* - Relationship between delta-aminolevulinic acid dehydratase genotypes and heme precursors in lead workers. *American Journal of Industrial Medicine*. 38 (2000) 355-360.

SATA, F. *et al.* - Changes in natural killer cell subpopulations in lead workers. *International Archives on Occupational and Environmental Health*. 69 5 (1997) 306-10.

SCHWARTZ, B. S. *et al.* - Associations of blood lead, dimercapturic acid-chelatable lead, and tibia lead with polymorphisms in the vitamin D receptor and delta-aminolevulinic acid dehydratase genes. *Environmental Health Perspectives*. 108 (2000a) 949-954.

SCHWARTZ, B. S. *et al.* - Associations of tibial lead levels with *Bsm1* polymorphisms in the vitamin D receptor in former organolead manufacturing workers. *Environmental Health Perspectives*. 108 3 (2000b) 199-203.

SCOEL - Recommendation from scientific committee on occupational exposure limits for lead and its organic compounds. 2002.

SELLERS, V. M. *et al.* - Human ferrochelatase: characterization of substrate-iron binding and proton-abstracting residues. *Biochemistry*. 40 33 (2001) 9821-7.

SHAIK, A. P. e JAMIL, K. - Individual susceptibility and genotoxicity in workers exposed to hazardous materials like lead. *Journal of Hazardous Materials*. 168 2-3 (2009) 918-24.

SHAIK, A. P. *et al.* - Lead-induced genotoxicity in lymphocytes from peripheral blood samples of humans: *In vitro* studies. *Drug and Chemical Toxicology*. 29 (2006) 111-124.

SHEPHERD, M. *et al.* - A new class of [2Fe-2S]-cluster-containing protoporphyrin (IX) ferrochelatases. *Biochemistry Journal*. 397 1 (2006) 47-52.

SILBERGELD, E. K. - Facilitative mechanisms of lead as a carcinogen. *Mutation Research*. 533 (2003) 121-133.

SILBERGELD, E. K. *et al.* - Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action. *American Journal of Industrial Medicine*. 38 (2000) 316-323.

SINGH, N. P. *et al.* - A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 175 (1988) 184-191.

SMITH, C. J. *et al.* - IARC carcinogens reported in cigarette mainstream smoke and their calculated log P values. *Food and Chemical Toxicology*. 41 6 (2003) 807-17.

SMITH, C. M. *et al.* - A polymorphism in the delta-aminolevulinic acid dehydratase gene may modify the pharmacokinetics and toxicity of lead. *Environmental Health Perspectives*. 103 3 (1995) 248-253.

STAUDINGER, K.; ROTH, V. S. - Occupational lead poisoning. *American Family Physician*. 1998.

STEENLAND, K.; BOFFETTA, P. - Lead and cancer in humans: where are we now? *American Journal of Industrial Medicine*. 38 (2000) 295-299.

STEINMETZ-BECK, A. *et al.* - [Genotoxicity effect of chronic lead exposure assessed using the comet assay]. *Medycyna Pracy (abstract)*. 56 4 (2005) 295-302.

SÜZEN, H. S. *et al.* - Influence of the delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) polymorphism on biomarkers of lead exposure in Turkish storage battery manufacturing workers. *American Journal of Industrial Medicine*. 43 (2003) 165-171.

TANDON, S. K. *et al.* - Lead poisoning in Indian silver refiners. *The Science of the Total Environment*. 281 (2001) 177-182.

TAOOKA, Y. *et al.* - Increased T-cell receptor mutation frequency in radiation-exposed residents living near the Semipalatinsk nuclear test site. *Journal of Radiation Research (Tokyo)*. 47 Suppl A (2006) A179-81.

TELISMAN, S. *et al.* - Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc, and copper in men. *Environmental Health Perspectives*. 108 1 (2000) 45-53.

THORNE, P. S. - Occupational Toxicology. In C. D. Klaassen - Cassarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons. New York: McGraw-Hill, 2001.

THORNTON, I. *et al.* - Lead: The facts. London: 2001.

TICE, R. R. - The single cell gel/ comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In D. H. Phillips e S. Venitt - Environmental mutagenesis. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1995. 315-339.

TONG, S. *et al.* - Environmental lead exposures: a public health problem of global dimensions. *Bulletin of the World Health Organization*. 78 9 (2000) 1068- 1077.

TORRES-SANCHEZ, L. E. *et al.* - Intrauterine lead exposure and preterm birth. *Environmental Research*. 81 4 (1999) 297-301.



TOSCANO, C. D.; GUILARTE, T. R. - Lead neurotoxicity: From exposure to molecular effects *Brain Research Reviews*. 49 (2005) 529-554.

UNDEGER, U. *et al.* - Immune alterations in lead-exposed workers. *Toxicology*. 109 2-3 (1996) 167-72.

UNICAM - Atomic Absorption Spectrometry *Methods Manual Cambridge*. 1991

USGS - Lead Statistics 2007. [Em linha] [Consult. Disponível em [www.usgs.com](http://www.usgs.com)].

VAGLENOV, A. *et al.* - Biomonitoring of workers exposed to lead: genotoxic effects, its modulation by polyvitamin treatment and evaluation of the induced radioresistance. *Mutation Research*. 418 (1998) 79-92.

VAGLENOV, A. *et al.* - Occupational exposure to lead and induction of genetic damage. *Environmental Health Perspectives*. 109 3 (2001) 295-298.

VAGLENOV, A. K. *et al.* - Cytogenetic monitoring of workers exposed to lead. *Central European Journal of Occupational Environmental Medicine*. 3 4 (1997) 298-308.

VENITT, S.; PHILLIPS, D. H. - The importance of environmental mutagens in human carcinogenesis and germline mutation. In D. H. Phillips e S. Venitt - Environmental mutagenesis. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited, 1995. 1-20.

VIJVERBERG, H. P. *et al.* - Metal interactions with voltage- and receptor-activated ion channels. *Environmental Health Perspectives*. 102 Suppl 3 (1994) 153-8.

WANG, C. Y. *et al.* - Activation of protein kinase C-alpha signaling prevents cytotoxicity and mutagenicity following lead acetate in CL3 human lung cancer cells. *Toxicology*. 250 1 (2008) 55-61.

WANG, S.; SHI, X. - Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis. *Molecular and Cell Biochemistry*. 222 1-2 (2001) 3-9.

WETMUR, J. G. *et al.* - Molecular characterization of the human delta aminolevulinate dehydratase 2 (ALAD-2) allele: implications of molecular screening of individuals for genetic susceptibility to lead poisoning. *American Journal Human Genetics*. 49 (1991) 757-763.

WHO - Chapter 6.7: Lead, 2001. [Em linha] [Consult. 6 Nov 2008]. Disponível em [www.euro.who.int/document/aig/6\\_7lead.pdf](http://www.euro.who.int/document/aig/6_7lead.pdf).

WILBURN, D. R.; BUCKINGHAM, D. A. - Apparent consumption vs. total consumption: a lead-acid battery case study. U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2006-5155, 2006.

WOGAN, G. N. *et al.* - Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*. 14 6 (2004) 473-86.

WRIGHT, R. O. *et al.* - Association between hemochromatosis genotype and lead exposure among elderly men: the normative aging study. *Environmental Health Perspectives*. 112 6 (2004) 746-750.

WU, C. K. *et al.* - The 2.0 Å structure of human ferrochelatase, the terminal enzyme of heme biosynthesis. *Nature Structural Biology*. 8 2 (2001) 156-60.

WU, F.-Y. *et al.* - Correlations of blood lead with DNA-protein cross-links and sister chromatid exchanges in lead workers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 11 (2002) 287-290.

YE, X.-B. *et al.* - A study on oxidative stress in lead-exposed workers. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 56 (1999) 161-172.

ZMUDA, J. M. *et al.* - Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants. *Epidemiologic Reviews*. 22 2 (2000) 203-17.

## IV. ANEXOS

### ANEXO A

**CÓDIGO DE IDENTIFICAÇÃO:** \_\_\_\_\_

**NOME:** \_\_\_\_\_

**EMPRESA:** \_\_\_\_\_

**DATA:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**INSTRUÇÕES DE PREENCHIMENTO:**

1. Desenhe um círculo em volta do número correspondente à resposta escolhida (se preferir pode fazer uma cruz)  
Ex: Sexo: Masculino

1	2

 ou 

Masculino	Feminino
X	2

2. Quando não souber responder ou não se lembrar da resposta, então escolha a resposta (NS/NL), fazendo um círculo no número 8, da seguinte forma:

N/A	NS/NL	N/R
7	8	9

3. Não utilize as respostas 9 e 7 (destinam-se a conclusões finais).

Muito obrigada pela sua disponibilidade e colaboração!

**Declaro que fui informado acerca do objecto de estudo e colaboro de livre vontade,**

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

QUESTIONÁRIO ToxPb

K<sub>2</sub>EDTA O  
NaHeparina O  
Linfócitos Corincha O  
DPC e SOX O Plasma O

CÓDIGO DE IDENTIFICAÇÃO: \_\_\_\_\_

**A | Caracterização sócio-demográfica**

A. 1 Idade (em 30 de Dezembro de 2006):

A. 2 Qual é o seu sexo?

Masculino	Feminino
1	2

A. 3 Quantos anos de escolaridade completou? Se a sua resposta se situa entre 2 casos (por ex. 5 anos) marque a caso da esquerda (nesse caso, 4 anos)

Nenhum	4 anos (primária)	6 anos (2ºano)	9 anos (3ºano)	12 anos (12ºano)	Mais de 12 anos	N/S,NL	N/R
1	2	3	4	5	6	8	9

A. 4 Há quantos anos trabalha nesta empresa?

(ano)	Menos de 1	1 a 5	6 a 10	11 a 15	Mais de 15	N/S,NL	N/R
	1	2	3	4	5	8	9

A. 5 Nacionalidade:

Portuguesa	Brasileira	Países Leste	Áfricana	Outra	N/S,NL	N/R
1	2	3	4	5	8	9

Qual? \_\_\_\_\_

A. 6 Etnia:

Caucasiana (Europeia)	Áfricana	Asiática	Alto-Europeia	Outra	N/S,NL	N/R
1	2	3	4	5	8	9

Qual? \_\_\_\_\_

A. 7 Ao longo de um dia normal de trabalho está exposto a poeiras de chumbo?

(tempo)	Nunca	Menos da metade do dia	Mais da metade do dia	Sempre	N/S,NL	N/R
	1	2	3	4	8	9

1

QUESTIONÁRIO ToxPb

**B | Caracterização de estilos de vida e de saúde**

**B. 1 É fumador?**

Não fuma, nunca fumou	Durou de fumar há mais de 2 anos	Durou de fumar há pouco de 2 anos	Sim, fuma	Sim, mas de forma irregular	N/S,NL	N/R
1	2	3	4	5	8	9

Se respondeu **Não**, passe à pergunta B. 3.

**B. 2 Quantos cigarros fuma por dia?**

1-4	5-10	11-15	>20	N/A	N/S,NL	N/R
1	2	3	4	7	8	9

**B. 3 Sabe se tem de alguma das seguintes doenças? Se sim indique qual.**

Hipertensão	Diabetes	Hepatite	Câncer	Outra	N/S,NL	N/R
1	2	3	4	5	8	9

Qual? \_\_\_\_\_

**B. 4 Tem alergias?**

Sim	Não	N/S,NL	N/R
1	2	8	9

Se respondeu **Não**, passe à pergunta B.6.

**B. 5 Se Sim, está com algum sintoma de alergias neste momento?**

Sim	Não	N/A	N/S,NL	N/R
1	2	7	8	9

**B. 6 Está com sintomas de gripe neste momento?**

Sim	Não	N/S,NL	N/R
1	2	8	9

**B. 7 Sente, neste momento, irritação na garganta?**

Sim	Não	N/S,NL	N/R
1	2	8	9

**B. 8 Está a tomar alguma medicação?**

Sim	Não	N/S,NL	N/R
1	2	8	9

Se respondeu **Sim**, indique:

Nome do medicamento \_\_\_\_\_ Quantidade diária \_\_\_\_\_ Desde quando \_\_\_\_\_

Nome do medicamento \_\_\_\_\_ Quantidade diária \_\_\_\_\_ Desde quando \_\_\_\_\_

Nome do medicamento \_\_\_\_\_ Quantidade diária \_\_\_\_\_ Desde quando \_\_\_\_\_

2

QUESTIONÁRIO ToxPb

B. 9 Nos últimos 12 meses tomou regularmente algum medicamento?

Sim	Não
1	2

N/S,NL	N/R
8	9

Se respondeu **Sim**, indique:  
Nome do medicamento \_\_\_\_\_ Quantidade diária \_\_\_\_\_ Quanto tempo \_\_\_\_\_  
Nome do medicamento \_\_\_\_\_ Quantidade diária \_\_\_\_\_ Quanto tempo \_\_\_\_\_

B. 10 Fez algum Raio X nos últimos 12 meses?

1	2-3	4 ou mais	Não
1	2	3	4

N/S,NL	N/R
8	9

B. 11 Tomou alguma vacina nos últimos 12 meses?

Sim	Não
1	2

N/S,NL	N/R
8	9

Se respondeu **Sim** indique quando \_\_\_\_\_

B. 12 Recebeu alguma transfusão de sangue nos últimos 12 meses?

Sim	Não
1	2

N/S,NL	N/R
8	9

B. 13 Fez algum tratamento por quimio ou radioterapia nos últimos 12 meses?

Sim	Não
1	2

N/S,NL	N/R
8	9

B. 14 Esteve de baixa nos últimos 6 meses?

Sim	Não
1	2

N/S,NL	N/R
8	9

Se respondeu **Sim** indique durante quanto tempo \_\_\_\_\_

Mais uma vez... muito obrigada

3

## ANEXO B

### Apresentação dos resultados individuais

ID	Unidade Fabril	Idade	Anos de trabalho	Fumador	Pb-S (µg/dL)	PPZ (µg/dL)	actALAD (U/mL)	Comp cabeça (µm)	Comp cauda (µm)	% ADN cabeça	% ADN cauda	Momento cauda	polim ALAD	polim VDR	TCR mf x10 <sup>-4</sup>
1001	A	47	[1,6[	não	41	113	66						1;1	b-b	
1002	A	25	[1,6[	sim	17	20	70						1;1	B-b	
1003	A	50	[6,11[	não	54,9	68	30	31,79	21,74	92,88	7,12	0,76	1;1	b-b	
1004	A	52	30+	não	55,7	86	23						1;1	B-b	
1005	A	47	[20,31[	não	29,9	30	65	31,29	19,63	95,21	4,79	0,48	1;1	B-b	
1006	A	57	[1,6[	não	41	25	56						1;1	B-B	
1007	A	58	[1,6[	sim	17	26	49						1;1	B-b	
1008	A	42	[6,11[	não	54,9	36	31	30,4	15,7	97,36	2,65	0,22	1;1	B-b	
1009	A	59	30+	não	55,7	21	79						1;1	B-b	
1010	A	58	[20,31[	não	45,9	35	55						1;1	B-b	
1011	A	39	[11,21[	sim	24,3	23	33	30,01	17,52	97,19	2,81	0,234	1;1	B-b	3,04
1012	A	35	[11,21[	sim	15,1	23	27	31,7	23,08	93,41	6,59	0,659	1;1	B-B	9,76
1013	A	24	[1,6[	não	8,2	23	42	33,02	21,82	95,89	4,11	0,424	1;1	B-b	8,56
1014	A	47	[6,11[	não	26	23	23	30,79	19,51	96,77	3,23	0,277	1;1	B-b	11,54
1015	A	46	[6,11[	não	36,8	58	32	32,04	20,46	95,88	4,12	0,353	1;1	B-B	9,13
1016	A	38	[1,6[	sim	44,3	38	37	29,36	18,81	95,7	4,3	0,385	1;1	b-b	8,99
1017	A	21	[1,6[	sim	25,8	21	47	31,63	21,02	95,61	4,39	0,398	1;1	B-b	21,18
1018	A	32	[11,21[	sim	44,3	221	35	30,95	20,28	96,62	3,38	0,327	1;1	B-b	10,98
1019	A	41	[6,11[	sim	42,7	43	36	32,53	20,33	97,55	2,45	0,231	1;1	B-B	28,28
1020	A	55	[11,21[	sim	44,2	211	22	30,96	20,78	96	4	0,357	1;1	B-b	

IV. ANEXOS  
ANEXO B. Resultados

ID	Unidade Fabril	Idade	Anos de trabalho	Fumador	Pb-S (µg/dL)	PPZ (µg/dL)	actALAD (U/mL)	Comp cabeça (µm)	Comp cauda (µm)	% ADN cabeça	% ADN cauda	Momento cauda	polim ALAD	polim VDR	TCR mf x10 <sup>-4</sup>
1021	B	53	30+	não	45,4	103	39	35,56	26,6	92,98	7,02	0,79	1;1	B-b	10,84
1022	B	49	[20,31[	não	43	83	36	35,08	23,45	93,7	6,3	0,688	1;1	B-B	5,26
1023	B	60	30+	não	33	22	29	35,57	23,78	92,52	7,48	0,838	1;1	B-B	25,54
1024	B	62	30+	não	42	145	27	33,42	23,14	93,25	6,75	0,766	1;1	b-b	10,84
1026	B	55	[20,31[	sim	53,8	260		33,14	27,11	93,2	6,8	0,741	1;1	B-b	16,53
1027	B	43	[11,21[	não	45,8	109		35,08	22,47	95,47	4,53	0,514	1;1	B-B	3,96
1028	B	59	30+	não	39,2	82		31,1	23,02	93,45	6,56	0,613	1;1	B-b	1,89
1029	B	57	[6,11[	sim	48,7	98							1;1	B-B	
1030	B	57	[11,21[	não	54,9	179		31,04	24,71	91,77	8,23	0,91	1;1	B-b	11,5
1031	A	38	[1,6[	não	21,4	30	20	31,22	20,11	95,42	4,58	0,43	1;1	b-b	7,51
1032	A	37	[11,21[	sim	16,7	29	9	30,33	18,72	95,44	4,56	0,4	1;1	B-B	8
1033	A	28	[1,6[	não	19,1	30	6	30,36	19,36	96,16	3,84	0,36	1;1	B-B	5,59
1034	A	49	[20,31[	não	22,1	46	21	28,81	18,7	94,8	5,2	0,47	1;1	b-b	12,57
1035	A	46	[20,31[	sim	21	29	15	31,39	21,91	94,01	5,99	0,58	1;1	B-b	8,75
1036	A	49	[1,6[	sim	33,1	28	10	31,7	21,58	95,36	4,64	0,46	1;1	B-b	
1037	A	53	[1,6[	não	27	34	19	33,62	20,55	95,32	4,68	0,47	1;1	b-b	29,85
1038	A	40	[11,21[	sim	40,3	103	21	31,46	22	95,07	4,94	0,48	1;2	B-B	
1039	A	37	[1,6[	não	12,3	46	20	32,64	23,29	94,74	5,26	0,61	1;1	B-B	
1040	A	25	[1,6[	sim	20,8	27	16	32,25	20,84	95,96	4,04	0,41	1;1	B-b	
1041	A	54	[20,31[	não	27,3	39	21	34,16	25,52	92,57	7,44	0,8	1;1	B-b	
1042	A	45	[11,21[	sim	35,2	36	27	31,17	24,16	91,81	8,19	0,87	1;1	b-b	47,11
1043	A	52	[6,11[	sim	42,4	73	21	32,01	24,93	93,44	6,56	0,68	1;1	B-b	
1044	A	61	30+	não	27	28	17	31,93	22,59	94,53	5,47	0,57	2;2	B-b	
1045	A	48	[11,21[	não	40,5	36	32	32,88	21,5	93,5	6,5	0,64	1;1	b-b	29,99
1046	A	58	[20,31[	não	22,8	19	25	29,61	21,67	93,34	6,66	0,61	1;1	B-b	12,46



IV. ANEXOS  
ANEXO B. Resultados

ID	Unidade Fabril	Idade	Anos de trabalho	Fumador	Pb-S (µg/dL)	PPZ (µg/dL)	actALAD (U/mL)	Comp cabeça (µm)	Comp cauda (µm)	% ADN cabeça	% ADN cauda	Momento cauda	polim ALAD	polim VDR	TCR mf x10 <sup>-4</sup>
1047	A	39	[1,6[	sim	23,1	33	26	32,7	30,51	86,4	13,6	1636	1;1	B-b	
1048	A	35	[11,21[	sim	45	53	24	30,1	18,29	96,25	3,75	0,34	1;1	B-b	15,71
1049	A	59	30+	não	26	29	20	29,69	19,74	94,44	5,57	0,53	1;1	b-b	17,39
1050	A	44	[1,6[	sim	30,4	31	20	33,12	26,23	91,73	8,27	0,86	1;1	B-B	
1051	A	56	30+	sim	34,4	53	33	29,46	18,26	95,49	4,51	0,42	1;1	B-B	12,24
1052	A	48	[20,31[	não	31,5	26	18	30,71	21,16	93,97	6,03	0,61	1;1	B-b	
1053	A	50	[20,31[	sim	25,2	25	15	31,47	22,83	93,73	6,27	0,61	1;1	B-B	
1054	A	51	[20,31[	não	52,9	23	16	32,35	23	94,59	5,41	0,55	1;2	B-b	
1055	A	44	[11,21[	sim	40,7	27	20	31,89	22,77	94,77	5,23	0,55	1;1	B-b	55,63
1056	A	46	[11,21[	não	23,4	28	21	31,41	22,88	93,47	6,53	0,7	1;1	B-B	75,4
1057	A	40	[11,21[	sim	33	26	21	30,54	21,16	94,71	5,29	0,5	1;1	B-B	20,84
1058	A	57	[20,31[	não	46,6	61	21	32,16	24,06	93,65	6,35	0,65	1;1	B-B	
1059	A	56	[20,31[	não	52,2	60	19	32,17	25,05	93,07	6,93	0,77	1;1	B-b	24,9
1060	A	54	[20,31[	sim	29,7	30	19	30,6	21,76	93,3	6,7	0,71	1;1	B-B	
1061	A	66	[6,11[	sim	29	29	15	32,09	24,17	91,19	8,81	1,11	2;2	b-b	26,38
1062	A	38	[1,6[	não	12,5	30	63	31,37	20,46	95,17	4,83	0,46		b-b	9,23
1063	A	46	[1,6[	não	17,7	18	62	30,93	22,58	93,43	6,57	0,73		b-b	6,25
1064	A	53	[20,31[	não	35,7	28	36	31,43	21,73	93,13	6,87	0,69		b-b	32,44
1065	A	47	[20,31[	sim	35,9	29	27	31,59	23,82	92,12	7,89	0,9		B-b	21,22
1066	A	33	[11,21[	sim	17,5	27	59	33,74	22,79	94,71	5,29	0,54		B-B	51,11
1067	A	57	[11,21[	sim	36,2	29	40	33,23	23,94	93,18	6,82	0,75		B-b	14,51
1068	A	52	[1,6[	sim	23,3	33	38	32,62	24,22	94,06	5,94	0,66		B-b	76,89
1069	A	54	[11,21[	sim	38,7	101	56	32,51	22,38	93,09	6,91	0,76		B-B	12,25
1070	A	49	[20,31[	não	15,9	24	38	35,1	27,04	91,47	8,53	1,01		b-b	37,51
1071	A	61	30+	não	41	22	21	30,73	24,6	90,77	9,23	1,02		B-b	30,9

IV. ANEXOS  
ANEXO B. Resultados

ID	Unidade Fabril	Idade	Anos de trabalho	Fumador	Pb-S (µg/dL)	PPZ (µg/dL)	actALAD (U/mL)	Comp cabeça (µm)	Comp cauda (µm)	% ADN cabeça	% ADN cauda	Momento cauda	polim ALAD	polim VDR	TCR mf x10 <sup>-4</sup>
1072	B	59	30+	não	43,3			29,19	20,24	95	5	0,43		B-B	24,41
1073	B	50	[20,31[	sim	63,8			30,03	21,5	93,46	6,54	0,66		B-b	47,68
1074	B	44	[20,31[	sim	49,5		64	33,9	26,06	92,11	7,89	0,88	1;1	B-B	
1075	B	33	[11,21[	sim	40,3		44	34,89	26,42	89,76	10,24	1,27	1;1	B-b	
1076	B	52	30+	sim	11,3		36	33,41	25,58	92,28	7,72	0,88	1;1	B-B	
1077	B	47	[20,31[	não	20,8		57						1;1	B-B	
1078	B	56	30+	sim	13,8		42	37,81	30,43	89,47	10,53	1,37	1;1	b-b	44,72
1079	B	56	[20,31[	não	56,6		41	31,2	24,11	92,9	7,1	0,74	1;1	b-b	
1080	B	51	30+	não	41,4		54	30,18	23,37	92,78	7,22	0,72	1;1	B-b	11,77
1081	B	50	[20,31[	não	41,4		60	30,57	20,78	95,59	4,41	0,42	1;1	B-B	23,93
1082	B	45	[20,31[	sim	34,3		47	29,11	19,3	94,96	5,04	0,45	1;1	b-b	23,92
1083	B	44	[11,21[	sim	32,3		69	30,61	21,41	94,65	5,35	0,53	1;1	B-b	35,16
1084	B	61	30+	não	42,1		64	29,87	21,6	93,85	6,15	0,58	1;1	b-b	
1085	B	47	[20,31[	não	59,9		40	30,14	22,23	93,19	6,81	0,75	1;1	B-b	88,41
1086	B	56	30+	sim	18,7		64	30,33	21,85	93,71	6,29	0,64	1;1	B-B	78,12
1087	B	57	[20,31[	não	26,2		52	29,63	21	94,51	5,49	0,49	1;1	B-b	22,58
1088	B	55	[11,21[	não	21,3		68	29,58	20,03	95,1	4,9	0,45	1;1	b-b	44,22
1089	B	46	[20,31[	não	29,9		76	30,1	22,01	93,82	6,18	0,61	1;1	B-b	28,08
1090	B	48	[20,31[	não	16,6		40	28,7	21,33	93,01	6,99	0,66	1;1	B-B	21,1
1091	B	52	30+	sim	19,3		56	29,7	21,46	94,09	5,91	0,56	1;1	B-b	26,53
1092	B	48	[20,31[	não	29		38	30,26	21,14	94,78	5,22	0,48	1;1	B-B	15,43
1093	B	51	[11,21[	não	32,1		69	31,07	22,83	93,71	6,29	0,62	1;1	B-B	
1094	B	45	[20,31[	não	50,3		52	30,49	20,63	94,88	5,12	0,51	1;1	b-b	5,02
1095	A	59	30+	não	23,3	25	32	31,05	22,31	93,3	6,7	0,69	1;1	B-b	
1096	A	37	[11,21[	não	20,8	25	32	31,51	24,24	92,9	7,1	0,73	1;1	b-b	

IV. ANEXOS  
ANEXO B. Resultados

ID	Unidade Fabril	Idade	Anos de trabalho	Fumador	Pb-S (µg/dL)	PPZ (µg/dL)	actALAD (U/mL)	Comp cabeça (µm)	Comp cauda (µm)	% ADN cabeça	% ADN cauda	Momento cauda	polim ALAD	polim VDR	TCR mf x10 <sup>-4</sup>
1097	A	58	[6,11[	sim	31,3	31	40	30,19	21,25	94,43	5,57	0,58	1;1	B-b	16,98
1098	A	42	[11,21[	sim	13,5	22	37	29,83	20,42	95,52	4,48	0,4	1;1	b-b	
1099	A	40	[6,11[	não	26,8	50	33	31,16	22,98	92,95	7,05	0,74	1;1	b-b	
1100	A	50	[20,31[	não	19,9	22	33	32,96	23,87	93,18	6,83	0,87	1;1	B-b	
1101	A	49	[20,31[	sim	27,2	26		29,42	19,16	94,71	4,34	0,41	1;1	b-b	
1102	A	24	[6,11[	não	26,7	28		31,71	22,28	93,97	6,03	0,63	1;1	B-B	
1103	A	53	[6,11[	sim	47,1	179	130,7	31,28	19,28	94,3	5,7	0,7	1;1	B-b	
1104	B	42	[11,21[	sim	50,8		33						1;1	b-b	
1105	B	53	30+	não	40,3		22	28,89	20,49	95,42	4,58	0,37	1;1	b-b	11,48
1106	B	52	30+	não	35,2			29,53	19,23	96,27	3,73	0,34	1;1	B-b	
1107	B	58	30+	não	17,8		35,5	28,4	22,37	93,82	6,18	0,59	1;1	B-B	19,44
1108	B	39	[11,21[	não	8,8			30,62	22,6	95,81	4,19	0,39		b-b	
1109	B	44	[20,31[	sim	23,8			31,19	21,61	95,51	4,49	0,42		B-b	
1110	B	42	[11,21[	sim	45,7		82,9	30,03	21,59	95,43	4,57	0,39	1;1	B-B	8,05
1111	B	44	[1,6[	sim	61,2			29,67	21,21	94,07	5,94	0,62	1;1	b-b	10,42
1112	B	52	[1,6[	não	67,2		24,5	32,8	23,79	94,37	5,64	0,52	1;1	b-b	21,54
1113	B	59	30+	não	28,7			30,11	21,31	95,95	4,05	0,41	1;1	b-b	7,43
1114	A	57	30+	não	18,2	29		29,62	19,25	95,51	4,49	0,38	1;1	B-B	
1115	A	39	[1,6[	não	23	25	49,8	31,37	20,97	95,39	4,61	0,44	1;1	B-B	
1116	A	50	[11,21[	não	38	85	45,5	29,84	21,69	93,35	6,65	0,62	1;1	b-b	
1117	A	58	30+	não	27,7	32		30,5	19,26	93,2	6,8	0,65	1;1	B-B	
1118	A	54	[20,31[	não	31,2	91	22,7	28,68	22,68	91,69	8,31	0,79	1;1	B-b	
1119	A	54	[11,21[	sim	34,9	30	112,8	30,83	29	84,88	15,12	1,76	1;1	B-B	
1120	A	54	[6,11[	não	34,7	39	40,3	28,28	18,26	93,93	6,07	0,5	1;1	B-B	
1121	A	57	[20,31[	sim	44,3	49	28,8	28,53	22,27	91,36	8,64	0,77	1;1	B-b	

IV. ANEXOS  
ANEXO B. Resultados

ID	Unidade Fabril	Idade	Anos de trabalho	Fumador	Pb-S (µg/dL)	PPZ (µg/dL)	actALAD (U/mL)	Comp cabeça (µm)	Comp cauda (µm)	% ADN cabeça	% ADN cauda	Momento cauda	polim ALAD	polim VDR	TCR mf x10 <sup>-4</sup>
1122	A	49	[20,31[	sim	36,6	32		29,08	19,14	95,38	4,62	0,41	1;1	B-b	
1123	A	56	[1,6[	sim	26,7	23	86,6	29,65	19,38	94,53	5,47	0,48	1;1	B-B	11,17
1124	A	27	[6,11[	sim	39,4	90		29,24	22,3	93,37	6,63	0,62	1;1	b-b	7,27
1125	A	53	[11,21[	não	21,1	85	66,8	29,63	25,08	92,23	7,78	0,77		B-b	27,37
1126	A	43	[11,21[	não	27,1			30,26	22,25	92,48	7,52	0,73	1;1	B-b	36,22
1127	A	39	[11,21[	não	8,4	24		29,2	24,48	88,23	11,77	1,51	1;1	B-B	7,92
1128	A	37	[11,21[	sim	28,9	24	22,1	31,47	23,23	91,38	8,62	0,91	1;1	b-b	12,53
1129	A	58	[11,21[	não	23,4	36		28,43	24,81	91,13	8,87	0,85	1;1	B-B	9,63
1130	A	25	[1,6[	sim	17,9	22		31,01	23,44	93,1	6,9	0,67	1;1	B-B	20,92
1131	A	52	[11,21[	sim	21,4		23,5	28,95	23,37	89,56	10,44	0,94	1;1	B-B	10,43
1132	A	47	[6,11[	não	24,4	29	68,2	29,83	21,01	95,12	4,88	0,45	1;1	B-B	12,96
1133	B	37	[11,21[	não	45,3	122	15,5	28,25	242,21	92,06	7,94	0,84	1;1	b-b	8,32
1134	B	46	[20,31[	sim	32,3	25		27,07	22,05	94,59	5,41	0,48	1;1	b-b	12,72
1135	B	50	[20,31[	não	35,1	65	22,1	27,96	22,69	93,11	6,9	0,62	1;1	b-b	8,93
1136	B	53	[20,31[	não	24,9	12	11,8	28,7	22,56	94,67	5,33	0,47	1;1	B-b	10,03
1137	B	58	30+	não	52,5	163	26,2	29,57	21,32	95,67	4,33	0,37	1;1	b-b	
1138	B	61	30+	não	43	48		28,2	20,97	96,3	3,7	0,31	1;1	B-b	4,62
1139	B	29	[6,11[	não	5,4	15	28,3	27,88	21,41	96,7	3,3	0,22	1;1	B-B	
1140	B	53	30+	não	19,5	18	11,3	29,23	23,39	95,01	4,99	0,49	1;1	B-B	6,05
1141	B	55	30+	não	15,7	26	30	29,07	22,71	93,27	6,73	0,67	1;1	B-b	17,49
1142	B	50	[11,21[	sim	13,9	20	92,2	27,47	19,71	92,75	7,25	0,63	1;2	B-b	29,4
1143	B	41	[1,6[	não	18,1	22	40	29,73	20,82	95,1	4,9	0,45	1;1	B-B	
1144	B	58	[20,31[	não	32,7	26	73,7	29,05	17,63	96,62	3,38	0,29	1;1	b-b	35,88
1145	B	46	[20,31[	não	24,7	15	119,1	28,37	18,72	95,51	4,49	0,37	1;1	B-b	20,82
1146	B	46	[20,31[	sim	21,9	17	80,6	30,61	23,28	93,16	6,84	0,69		b-b	

IV. ANEXOS  
ANEXO B. Resultados

ID	Unidade Fabril	Idade	Anos de trabalho	Fumador	Pb-S (µg/dL)	PPZ (µg/dL)	actALAD (U/mL)	Comp cabeça (µm)	Comp cauda (µm)	% ADN cabeça	% ADN cauda	Momento cauda	polim ALAD	polim VDR	TCR mf x10 <sup>-4</sup>
1147	B	52	30+	não	24,1	29	85,7	29,71	17,62	96,06	3,94	0,33	1;1	B-B	23,4
1148	B	36	[1,6[	não	8,5	20	141,9	29,88	16,94	97,37	2,63	0,21	1;1	B-B	3,59
1149	B	56	30+	não	24,1	18	82,8	27,74	17,18	96,42	3,59	0,3	1;1	B-b	20,17
1150	NOE	39	[0,1[	não	6		93,5	29,47	18,2	96,19	3,81	0,32			1,39
1151	NOE	34	[0,1[	não	4,9		103,1	29,4	20,36	94,79	5,21	0,47	1;1	b-b	23,82
1152	NOE	27	[0,1[	não	6,6		85,2	33,34	21,44	94,66	5,35	0,54	1;1	B-B	5,26
1153	NOE	36	[0,1[	sim	4,8		85,9	34,21	24,42	91,85	8,15	0,97	1;1	B-B	9,89
1154	NOE	36	[0,1[	não	2,7		83,3	35,55	27,56	90,51	9,49	1107	1;1	B-B	35,79
1155	NOE	43	[0,1[	sim	3,7		133,1	33,75	24,88	92,74	7,26	0,78	1;1	b-b	42,82
1156	NOE	32	[0,1[	não	10,3		93,6	33,1	24,42	92,44	7,57	0,86	1;1	b-b	17,98
1157	NOE	52	[0,1[	sim	11,5		81,9	30,26	22,1	94,03	5,97	0,55		b-b	43,7
1158	NOE	32	[0,1[	não	3,7		57,8	30,23	20,27	94,53	5,47	0,51		B-b	67,07
1159	NOE	29	[0,1[	não	4,5		101,5	30,73	20,74	95,25	4,75	0,42	1;1	B-B	4,01
1160	NOE	55	[0,1[	não	5,7		106,2	32,27	28,57	88,85	11,15	1197	1;1	B-B	2,42
1164	NOE	39	[0,1[	sim	2,5		93,5	30,06	22,95	92,89	7,11	0,68		b-b	6,17
1166	NOE	29	[0,1[	não	1,2		40,6	32,04	22,68	93,44	6,56	0,67		B-B	4,98
1167	NOE	40	[0,1[	não	1,7		52,7	29,66	20,51	94,76	5,24	0,47	1;1	B-b	3,89
1168	NOE	35	[0,1[	não	1		80,2	30,17	22,38	94,57	5,43	0,52	1;1	B-b	20,22
1170	NOE	49	[0,1[	não	4,4		7,9	33,99	25,89	92,17	7,83	0,88	1;1	B-b	29,31
1171	NOE	32	[0,1[	não	1,1		139,2	30,94	23,9	93,24	6,76	0,66		b-b	4,59
1172	NOE	30	[0,1[	não	1		85,9	29,6	21,06	93,59	6,41	0,61		B-B	26,96
1173	NOE	33	[0,1[	não	5,2		85,4	31,03	22,72	93,07	6,93	0,71		B-b	3,34
1174	NOE	29	[0,1[	não	2,2		108,5	32,6	24,07	92,53	7,47	0,76	1;1	B-b	2,3
1175	NOE	26	[0,1[	não	8,6		92,8	31,03	21,29	94,52	5,48	0,54	1;1		8,18
1176	NOE	30	[0,1[	não	5		86,1	31,1	21,11	95,58	4,43	0,43	1;1		4,33

IV. ANEXOS  
ANEXO B. Resultados

ID	Unidade Fabril	Idade	Anos de trabalho	Fumador	Pb-S (µg/dL)	PPZ (µg/dL)	actALAD (U/mL)	Comp cabeça (µm)	Comp cauda (µm)	% ADN cabeça	% ADN cauda	Momento cauda	polim ALAD	polim VDR	TCR mf x10 <sup>-4</sup>
1177	NOE	32	[0,1[	não	7		120,3	31,98	22,2	95,8	4,2	0,37	1;1	B-B	4,63
1178	NOE	24	[0,1[	não	4,6		125,7	32,04	22,33	95,34	4,67	0,45	1;1	b-b	2,47
1179	NOE	27	[0,1[	não	2,1		140	32,94	19,05	96,65	3,35	0,31	1;1	B-b	3,72
1180	NOE	30	[0,1[	não	2		114,6	31,64	18,29	96,37	3,63	0,32	1;1	b-b	2,34
1181	NOE	33	[0,1[	sim	2,1		108,8	31,43	18,47	97,27	2,73	0,25	1;1	b-b	10,75
1187	NOE	52	[0,1[	sim	14,5		70,1	28,74	24,29	93,56	6,44	0,62	1;1	b-b	7,73
1188	NOE	42	[0,1[	não	1,9		128,3	28,93	20,71	95,03	4,98	0,41	1;1	b-b	8,92
1190	NOE	30	[0,1[	não	1,5		83,2						1;1	B-b	13,53
1191	NOE	33	[0,1[	não	2		82,8	28,9	19,55	94,7	5,3	0,5	1;1	B-b	4,21
1192	NOE	30	[0,1[	não	2		68,3	28,92	20,36	94,1	5,9	0,5	1;1	B-b	4,13
1193	NOE	41	[0,1[	não	3,5			28,79	19,26	96,22	3,78	0,35	1;1	b-b	4,32
1194	NOE	27	[0,1[	não	1,5		43,2	29,5	19,75	96,08	3,92	0,34	1;1	B-b	1,41
1195	NOE	29	[0,1[	não	1,3		79,6	29,01	21,42	95,38	4,62	0,47	1;1	B-b	3,03
1196	NOE	35	[0,1[	sim	1,1		92	28,07	21,08	92,01	8	0,84	1;1	b-b	3,39
1197	NOE	34	[0,1[	não	1,7		98,1	29,64	19,38	93,63	6,38	0,63	1;1	b-b	5,31
1198	NOE	29	[0,1[	não	2,5		121	26,5	16,82	95,18	4,82	0,48	1;1	B-b	6,35

