

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

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES PRECOSES NA
EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL À SÍLICA**

CAROLINE PORTELA PERUZZI

Porto Alegre, 2018

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

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES PRECOSES NA
EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL À SÍLICA**

Dissertação apresentada por **Caroline
Portela Peruzzi** para obtenção do
GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a Dr^a Solange Cristina Garcia

Porto Alegre, 2018

Esta Dissertação de Mestrado foi desenvolvida sob a orientação da Prof^a Dr^a Solange Cristina Garcia, no Laboratório de Toxicologia (LATOX) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Caroline Portela Peruzzi recebeu bolsa de mestrado CNPq.

Este trabalho foi avaliado pela Banca Examinadora composta por:

Prof^a. Dr^a. Angela Moro

Faculdade Especializada na Área de Saúde do Rio Grande do Sul (FASURGS)

Prof^a. Dr^a. Patrícia Nardin

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Fabrício Figueiró

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Dr^a. Sabrina Nunes do Nascimento (Membro Suplente)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

CIP - Catalogação na Publicação

Peruzzi, Caroline
AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES PRECOSES NA EXPOSIÇÃO
OCUPACIONAL À SÍLICA / Caroline Peruzzi. -- 2018.
96 f.
Orientadora: Solange Garcia.

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

1. Exposição Ocupacional. 2. Sílica Cristalina. 3.
Inflamação. 4. Estresse Oxidativo. 5. Biomarcadores
precozes. I. Garcia, Solange, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Profa. Dr. Solange Cristina Garcia no laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia do Rio Grande do Sul e no Hospital de Clínicas de Porto Alegre com a supervisão do Dra. Ursula da Silveira Matte. A pesquisa foi financiada pelos projetos Fapergs (PqG 2017). Caroline Portela Peruzzi recebeu bolsa de mestrado CNPq.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à professora Solange C. Garcia por ter me concedido a oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa. Obrigada por todos os ensinamentos e por confiar em mim ao me entregar este trabalho.

Agradeço à família, minha mãe Rejane, que mesmo contra vontade que eu morasse tão longe, ainda assim sempre me apoiou e me proporcionou toda a estrutura para que eu pudesse realizar este sonho. Ao meu pai Antônio, e aos meus irmãos Renan e Matheus. Obrigada pelo amor incondicional. Amo vocês!

Agradeço a meu namorado Giordano, por ser tão importante na minha vida. Obrigada por estar sempre ao meu lado, pelo amor e carinho, e por me dar forças para passar por todas as dificuldades. Te amo.

Agradeço a Jessica Nardi, que começou esse trabalho de forma extremamente competente. Obrigada pelas inúmeras explicações e por ter sido tão paciente comigo.

Agradeço imensamente a Sabrina e a Bruna, sem elas, esse trabalho não teria acontecido. Sa e Bruna, vocês duas, são grandes exemplos na minha vida. Obrigada por acreditarem em mim, pela paciência ao longo desse mestrado e por me ensinarem que com foco e determinação conseguimos realizar nossos sonhos. Só tenho a agradecer por ter conhecido vocês!

Agradeço imensamente também a Elisa e a Gabi, vocês me ensinaram a ser uma pessoa mais paciente e mudaram completamente a visão que eu tinha sobre a vida. Obrigada por me mostrarem que não importa a situação, sempre vai existir um lado positivo e algo a ser aprendido. Vocês me tornaram uma pessoa melhor, e serei eternamente grata a isso!

Agradeço à toda equipe LATOX, sem vocês nada disso seria possível! Obrigada especialmente aos IC's, meus amados, vocês são extraordinários!

Agradeço a minha amiga do coração Keli, obrigada por todo apoio, principalmente quando viemos morar juntas, por me aguentar todos os dias e pela amizade verdadeira. Te amo amiga!

Agradeço aos meus amigos, pois sem a companhia deles, o caminho seria muito mais difícil. Obrigada por entenderem minhas ausências e por acrescentarem tantas alegrias aos meus dias.

À equipe da Urest e Prefeitura Municipal de Ametista do Sul pela acolhida, pelo

espaço físico e pelo auxílio no recrutamento dos participantes. Parabéns pelo grande trabalho que desempenham na comunidade, vocês fazem a diferença e são exemplos de dedicação!

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

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

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

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

Agradeço às professoras Angela Moro, Patrícia Nardin e ao professor Fabrício Figueiró por aceitarem o convite para participar da banca examinadora deste trabalho.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e a Profa. Úrsula, por disponibilizar a estrutura necessária para realização dos experimentos.

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

À CNPq pelo fomento através da concessão da bolsa.

APRESENTAÇÃO

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

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

A seção Discussão contém uma interpretação geral dos resultados obtidos.

A seção Conclusões aborda as conclusões gerais da dissertação.

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

A seção “Anexos” contém o parecer do Comitê de Ética da UFRGS, o modelo do termo de consentimento livre esclarecido e o questionário aplicado aos voluntários da pesquisa.

RESUMO

Trabalhadores envolvidos em atividade de mineração estão cronicamente expostos à sílica cristalina (SC). Devido à exposição ocupacional, esses trabalhadores estão suscetíveis a vários efeitos adversos à saúde, como silicose e câncer de pulmão. Este estudo teve como objetivo avaliar possíveis biomarcadores periféricos de inflamação e estresse oxidativo, através de expressões proteicas e gênicas, em mineiros ocupacionalmente expostos à SC. O grupo exposto à SC, foi composto por mineradores, dividido em dois subgrupos: trabalhadores sem silicose (WECS I, n=39) e indivíduos aposentados diagnosticados com silicose (WECS II, n=42). Como grupo controle, foram avaliados trabalhadores não expostos ocupacionalmente (OUW, n=29) à SC. Os seguintes biomarcadores foram avaliados: expressão proteica (em linfócitos) e gênica da L-selectina; expressão gênica de CXCL2, CXCL8/IL-8, HO-1 e p53; níveis plasmáticos de malondialdeído (MDA) e níveis de tióis não proteicos nos eritrócitos. Nossos dados mostraram uma redução significativa na expressão da proteína L-selectina na superfície de linfócitos nos grupos expostos (WECS I e WECS II) em relação ao grupo controle (OUW) ($p < 0,05$). A expressão gênica da L-selectina foi diminuída no grupo sem silicose (WECS I) quando comparada ao grupo controle (OUW) ($p < 0,05$). Quanto à expressão gênica de CXCL2, CXCL8/IL-8, HO-1 e p53, observaram-se diminuições significativas nos trabalhadores expostos à SC (WECS I e WECS II) quando comparados ao grupo controle (OUW) ($p < 0,05$). O biomarcador de peroxidação lipídica, MDA, foi significativamente aumentado nos grupos expostos (WECS I e WECS II), e foi negativamente associado à expressão gênica de CXCL2, CXCL8/IL-8 e p53 ($p < 0,05$). Os trabalhadores com silicose (WECS II) apresentaram níveis significativamente mais elevados de tióis não proteicos em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Em resumo, acreditamos que nossas descobertas ajudam a aumentar o conhecimento sobre os mecanismos complexos envolvidos na patogênese da silicose em trabalhadores cronicamente expostos à SC. Adicionalmente, as alterações encontradas podem ser sugeridas como potenciais novos biomarcadores úteis no diagnóstico precoce da silicose. Além disso, os resultados aqui apresentados podem auxiliar na concepção de novos e mais detalhados estudos envolvendo trabalhadores ocupacionalmente expostos à SC.

Palavras-chave: sílica cristalina, silicose, fibrose pulmonar, expressão gênica.

ABSTRACT

Workers involved in mining activities are chronically exposed to respirable crystalline silica (CS). Due to this exposure, they are susceptible to adverse health effects like silicosis and lung cancer. This study aimed to investigate potential early peripheral biomarkers of inflammation and oxidative stress, through protein and gene expressions, in miners occupationally exposed to CS. WECS group, composed by miners, was divided into two subgroups: workers without silicosis (WECS I, n=39) and workers diagnosed with silicosis, retired from work (WECS II, n=42). As a control group, occupationally unexposed workers to CS (OUW, n=29) participated of this study. The following biomarkers were evaluated: L-selectin protein and gene expression (in lymphocytes); gene expression of CXCL2, CXCL8/IL-8, HO-1, and p53; malondialdehyde (MDA) plasma levels and non-protein thiol levels in erythrocytes. Our data showed a significant downregulation of L-selectin protein expression in lymphocytes surface in the exposed groups (WECS I and WECS II) in relation to control group (OUW) ($p < 0.05$). Gene expression of L-selectin was decreased in the non-silicosis group (WECS I) when compared to the control group (OUW) ($p < 0.05$). Regarding gene expression of CXCL2, CXCL8/IL-8, HO-1, and p53, significant fold change decreases were observed in workers exposed to CS in relation to control group (OUW) ($p < 0.05$). The lipid peroxidation biomarker, MDA, was significantly increased in the exposed groups (WECS I and WECS II), and was negatively associated with the gene expression of CXCL-2, IL-8 and p53 ($p < 0.05$). The participants with silicosis (WECS II) presented significant higher non-protein thiol levels in relation to other groups ($p < 0.05$). In summary, we believe that our findings help to increase the knowledge about the complex mechanisms involved in the silicosis pathogenesis in workers chronically exposed to SC. In addition, the alterations found may be suggested as potential new biomarkers useful in the early diagnosis of silicosis. In addition, the results showed herein may help the designing of new and more detailed studies involving workers occupationally exposed to CS.

Keywords: crystalline silica, silicosis, pulmonary fibrosis, gene expression.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACGIH	American Conference of Governmental Industrial Hygienists/ Conferência Americana de Higienistas Industriais Governamentais
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CD62E	E-selectina
CD62L	L-selectina
CD62P	P-selectina
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CO	Monóxido de carbono
CXCL2	CXC ligante 2
DNA	Deoxyribonucleic acid/ Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ethylene diamine tetracetic acid/Ácido etilenodiamino tetra- acético
EPI	Equipamento de proteção individual
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GSH	Glutathione reduzida
HO-1	Heme oxygenase-1
IARC	International Agency for Research on Cancer/Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-8/CXCL8	Interleucina 8
LT	Limite de tolerância
MIP-2	Proteína inflamatória de macrófago 2
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health/Instituto Nacional para Saúde e Segurança Ocupacional
NR	Norma Regulamentadora
OSHA	Occupational Safety and Health Administration/ Administração de Segurança e Saúde Ocupacional
PCMSO	Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional
PELs	Permissible exposure limits/Limites de exposição admissíveis
PNES	Programa Nacional para Eliminação da Silicose
SiO ₂	Dióxido de silício
TNF- α	Fator de necrose tumoral α

UFRGS

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

WHO

World Health Organization/Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
OBJETIVOS	16
1. Objetivo geral.....	16
2. Objetivos específicos	16
REVISÃO DE LITERATURA	18
1. Toxicologia Ocupacional	18
2. Sílica cristalina.....	18
3. Silicose e sua relação na exposição ocupacional.....	20
4. Formas de diagnóstico da silicose.....	21
5. Resposta inflamatória na exposição à sílica cristalina.....	22
6. Biomarcadores na exposição à sílica cristalina	23
6.1. L-selectina	23
6.2. Quimiocina CXCL2 ligante 2 (CXCL2).....	24
6.3. Quimiocina CXCL8/Interleucina-8 (IL-8).....	24
6.4. Supressor tumoral p53	25
6.5. Biomarcadores de estresse oxidativo.....	25
6.5.1. Heme-oxygenase-1 (HO-1).....	25
6.5.2. Malondialdeído (MDA)	26
6.5.3. Tóxis não-proteicos (GSH)	26
CAPÍTULO I (ARTIGO):	28
DISCUSSÃO	46
CONCLUSÕES	52
PERSPECTIVAS FUTURAS	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	61
ANEXO I	62
ANEXO II	63
ANEXO III	64
ANEXO IV.....	69
ANEXO V	74

A saúde de trabalhadores expostos a agentes tóxicos depende da relação entre o tempo de trabalho e o processo saúde/doença. A exposição ocupacional a partículas de sílica ocorrida em garimpos, construção civil, indústrias de lapidação de rochas, está, frequentemente, relacionada a danos epiteliais pulmonares, devido às pequenas lesões físicas constantes e repetidas (LOPES-PACHECO, 2016).

Um grupo importante de doenças, no âmbito ocupacional, decorrente da inalação de poeira contendo partículas de minerais, são chamadas de pneumoconioses (WHO, 2007; BRASIL, 2010; LANEY & WEISSMAN, 2012). Essas doenças ocorrem devido à deposição de partículas de minerais no parênquima pulmonar, provocando o início de um reparo pela ativação da resposta inflamatória (NIOSH, 2002; OSHA, 2010; BRASIL, 2010; SELLAMUTHU *et al.*, 2011; LANEY & WEISSMAN, 2012). Entre as principais pneumoconioses que ocorrem a nível ocupacional está a silicose, decorrente da inalação de sílica na sua forma cristalina (PERKINS *et al.*, 2015). A silicose pode ser prevenida, e vários trabalhos são realizados por órgãos nacionais e internacionais para erradicação desse problema, porém a doença continua tendo um grande impacto ocupacional importante no mundo, especialmente nos países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil (NIOSH, 2002; GREENBERG *et al.*, 2007; WHO, 2007; OSHA, 2010; BRASIL, 2010).

De acordo com dados do Programa Nacional para Eliminação da Silicose (PNES), um programa desenvolvido em parceria com a International Labour Organization, aproximadamente 2 milhões de trabalhadores formais estavam expostos à sílica cristalina no Brasil no período de 1999 a 2000. Porém, infelizmente, as estatísticas do problema não são exatas, e o número real de trabalhadores acometidos não é conhecido (BRASIL, 2006). Além disso, a sílica cristalina é considerada um agente carcinogênico do grupo 1 pela International Agency on Research on Cancer (IARC) (IARC, 2009).

De modo geral, os trabalhadores expostos à sílica cristalina desenvolvem uma resposta inflamatória e fibrótica, o que leva ao aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), citocinas inflamatórias e de leucócitos infiltrados no pulmão (HAMAGUCHI *et al.*, 2002). Quando há um intenso processo inflamatório, os leucócitos, principalmente neutrófilos, acumulam-se no tecido lesionado, ocorrendo concomitantemente a liberação de citocinas e quimiocinas inflamatórias, moléculas de adesão e quimiotaxia. Além dos neutrófilos, os macrófagos também estimulam a

liberação de citocinas e quimiocinas inflamatórias (FRANCHIN *et al.*, 2018).

A silicose é uma doença irreversível e incurável, e as medidas preventivas, como o uso de equipamentos de proteção individual (EPIs), não são suficientes para a prevenção dessa doença. Geralmente, a silicose é diagnosticada em estados avançados, onde há severa perda de função pulmonar, o que demonstra a importância do desenvolvimento de técnicas mais precisas e biomarcadores capazes de detectar alterações precoces provocadas pela exposição à sílica (BRASIL, 2006; GREENBERG *et al.*, 2007; LEUNG *et al.*, 2012). Desse modo, os biomarcadores periféricos se fazem importantes, uma vez que podem diagnosticar precocemente a doença, antes da sua propagação, possibilitando uma vida saudável e prolongada aos trabalhadores expostos à SC (PANDEY & AGARWAL, 2012).

À vista dessa situação, esse trabalho apresenta uma proposta para avaliar biomarcadores precoces que sejam capazes de indicar que a exposição à sílica esteja promovendo alterações que podem resultar em silicose em trabalhadores de garimpos expostos à sílica cristalina, na cidade de Ametista do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Avaliar biomarcadores periféricos em trabalhadores expostos ocupacionalmente à sílica cristalina no município de Ametista do Sul-RS.

2. Objetivos específicos

- Avaliar do uso de Equipamentos de Proteção Individual;
- Analisar o perfil de expressão proteica da molécula de adesão L-selectina;
- Avaliar do perfil de expressão gênica, através de genes relacionados à inflamação, estresse oxidativo e gene supressor tumoral a partir do sangue periférico;
- Quantificar os níveis de biomarcadores de estresse oxidativo;
- Analisar biomarcadores do sistema imune inato;
- Verificar possíveis associações entre os parâmetros analisados e sua importância no diagnóstico precoce da toxicidade provocada pela exposição ocupacional à poeira contendo sílica cristalina.

1. Toxicologia Ocupacional

A Toxicologia Ocupacional estuda os efeitos nocivos causados por substâncias químicas presentes no ambiente de trabalho, tendo como objetivo prevenir os efeitos adversos à saúde de trabalhadores (KLAASSEN & WATKINS, 2012). Em vista da promoção da saúde e segurança do trabalhador, existem limites de exposição para agentes químicos, biológicos e físicos no ambiente de trabalho (KLAASSEN & WATKINS, 2012).

No Brasil, a Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho estabelece parâmetros biológicos para controle da exposição à agentes químicos e biológicos, através da Norma Regulamentadora nº 7 (NR-7). Conforme essa Portaria, todos os empregadores e instituições que admitam trabalhadores devem elaborar e implementar o Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO), com objetivo de promover e preservar a saúde dos trabalhadores (BRASIL, 1978). Nos Estados Unidos, a Occupational Safety and Health Administration (OSHA), órgão do Department of Labor, promulga padrões legalmente estabelecidos, conhecidos como *permissible exposure limits* (PELs). Já a National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), publica limites de exposição recomendados, frequentemente atualizados, e que são, em geral, mais restritivos do que os PELs (KLAASSEN & WATKINS, 2012).

Durante a exposição ocupacional, os trabalhadores entram em contato com xenobióticos, ficando suscetíveis a efeitos adversos sobre o organismo. As principais vias de exposição dos trabalhadores a agentes no ambiente de trabalho são: inalação, ingestão ou cutânea (DELLA ROSA et al., 2014). Visando a segurança do trabalhador, o trabalho ocupacional requer a utilização de equipamentos de proteção individual (EPIs) que têm como finalidade diminuir a exposição, minimizando assim o contato dos agentes tóxicos. A legislação brasileira dispõe da Norma Regulamentadora nº 6 (NR-6), que trata sobre o emprego de EPIs. A NR-6 considera que EPI é um dispositivo de uso individual destinado a proteger a integridade física do trabalhador (BRASIL, 2001).

2. Sílica Cristalina

A sílica ou dióxido de silício (SiO_2) é um composto químico natural formado por um átomo de silício e dois átomos de oxigênio (BROWN & HARRISON, 2014; OSHA,

2010). A sílica é encontrada em abundância na crosta terrestre, principalmente em areias e rochas e em variados minerais, sozinha ou combinada com outros elementos químicos, correspondendo a 60% da constituição do planeta (BROWN & HARRISON, 2014; BRASIL, 2010).

A sílica é encontrada basicamente em duas formas, cristalina ou amorfa (não cristalina) (NIOSH, 2002). A sílica cristalina pode ser em forma de quartzo, tridimita, cristobalita e trípoli, entre outras. Já a sílica na conformação amorfa pode ser em forma de gel ou coloidal. A forma cristalina é mais tóxica que a forma amorfa, entretanto, sob calor e pressão a forma amorfa pode sofrer mudança em sua estrutura para a forma cristobalita (uma forma cristalina) (BROWN & HARRISON, 2014; RIMAL *et al.*, 2005). Dentre essas, as formas mais importantes do ponto de vista ocupacional são o quartzo, tridimita e cristobalita (Greenberg *et al.*, 2007; NIOSH 2002).

O quartzo é um mineral rochoso, comumente encontrado no solo e nas rochas. Existem diversas variedades de quartzo, encontradas no granito, no arenito e em pedras preciosas e semipreciosas (LEUNG *et al.*, 2012; GREENBERG *et al.*, 2007). Uma das variedades mais popular do quartzo é a ametista, um cristal de coloração violeta ou púrpura devido à presença de resíduos férricos (DUMAŃSKA-SŁOWIK *et al.*, 2017).

Em 1997, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classificou a sílica cristalina como carcinógeno humano do Grupo I (IARC, 2009). Sabe-se que a toxicidade da sílica está diretamente relacionada com o tamanho da partícula inalada (TUOMI *et al.*, 2018). O limite de tolerância estabelecido pela legislação brasileira, para a exposição à sílica cristalina é de 0,10 mg/m³ para uma jornada de trabalho de até 48 horas semanais (BRASIL, 2010). Em contrapartida, o valor preconizado pelo NIOSH e pela American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) é menor, levando em conta uma jornada de trabalho de 40 horas semanais, e é de 0,05 mg/m³ (BRASIL, 2010).

Devido ao seu grande número de aplicações, milhões de trabalhadores estão expostos à sílica em todo o mundo. As principais áreas de atuação relacionadas a esta exposição estão associadas a trabalhadores de mineração, construção civil, alvenarias, operações de fundição, fabricação de vidros, indústrias de cerâmicas, cimentos e concretos, laboratórios dentários, entre outros. Todas essas atividades envolvem trabalhos como lixar, esmerilhar, furar, cortar, polir, moldar, o que facilita a

penetração dessas partículas pela via respiratória (MAZUREK *et al.*, 2017; GÜNDÜZÖZ *et al.*, 2017).

A concentração de poeira, o teor de sílica que contém na poeira, a duração da exposição ocupacional e a suscetibilidade individual são fatores determinantes para o desenvolvimento de pneumoconioses, sendo a silicose uma das principais (BRASIL, 2010).

3. Silicose e sua relação na exposição ocupacional

A exposição prolongada à forma cristalina da sílica pode desencadear doenças respiratórias chamadas pneumoconioses (WHO, 2007; CARNEIRO *et al.*, 2017). A silicose é a principal pneumoconiose, uma doença caracterizada pela ocorrência de fibrose pulmonar nodular, potencialmente fatal e irreversível, sendo na maior parte das vezes, assintomática (TUOMI *et al.*, 2018; LEUNG *et al.*, 2012). A principal forma de sílica causadora da silicose é a sílica livre cristalizada, mais conhecida como quartzo (NIOSH, 2002). Conhecidamente como a doença ocupacional mais antiga do mundo, a silicose é uma doença grave e sem cura. A exposição à sílica ocorre através da inalação de poeira contendo sílica cristalina respirável (isto é, partículas com diâmetro inferior a 10 µm) (LI *et al.*, 2017; NIOSH, 2002, POLLARD, 2016 WHO, 2007; CARNEIRO *et al.*, 2017).

A silicose pode ser desenvolvida de três formas diferentes: silicose crônica, silicose acelerada e silicose aguda (NIOSH, 2002; POLLARD, 2016). A silicose crônica é a mais comum, e ocorre normalmente após longos períodos de exposição em baixas concentrações de sílica cristalina, geralmente após 10 anos de exposição (NIOSH, 2002). Os trabalhadores expostos podem ser assintomáticos ou sintomáticos. Quando há sintomas, esses estão relacionados à falta de ar, fadiga, dores no peito ou insuficiência respiratória (OSHA, 2002). A silicose acelerada se desenvolve num tempo de exposição entre 5 a 10 anos, após exposição a concentrações altas de sílica cristalina respirável (NIOSH, 2002; POLLARD, 2016). Os sintomas são semelhantes à forma crônica, porém, sua evolução é mais rápida, com fibrose mais irregular e difusa (FUBINI & HUBBARD, 2003). A forma aguda ocorre após um curto período de exposição, podendo ser em semanas, meses ou até 5 anos, somado a concentrações extremamente altas de sílica cristalina (NIOSH, 2002; POLLARD, 2016). Os sintomas relacionados a este tipo de silicose são tosse, perda de peso, fadiga e fraqueza

(OSHA, 2002).

Um trabalhador pode desenvolver qualquer um dos três tipos de silicose. O fator determinante será a quantidade de pó inalado contendo sílica respirável associada ao tempo de exposição. Outros fatores que podem contribuir são o tamanho da partícula e sua conformação (cristalina ou amorfa) (NIOSH, 2002).

Segundo dados do NIOSH, estima-se que pelo menos 1,7 milhões de trabalhadores americanos estejam expostos à sílica na sua forma cristalina. No Brasil, foi visto que mais de 6 milhões de trabalhadores estão expostos à sílica. Em 2007, foi estimado um total de 318 mil casos de silicose. No Rio Grande do Sul estima-se, nesse mesmo período, que cerca de 180 mil trabalhadores estavam expostos à sílica cristalina, e desses 18 mil tinham silicose (BRASIL, 2010).

Com o avanço da silicose, infecções por fungos ou bactérias podem se instalar no pulmão doente, agravando ainda mais o quadro do indivíduo acometido. A doença mais comum é a tuberculose, pois o pulmão está coberto de partículas de sílica e os macrófagos são incapazes de fagocitar o agente *Mycobacterium tuberculosis* (NIOSH, 2002). Indivíduos com silicose possuem uma susceptibilidade de desenvolver essa doença cerca de 40 vezes maior do que a população em geral (BRASIL, 2010).

4. Formas de diagnóstico da silicose

O diagnóstico da silicose geralmente se baseia na história clínica do paciente relacionada ao tempo de exposição, e nas características encontradas no exame de radiografia do tórax. Para um melhor diagnóstico, a história clínica do paciente deve ser minuciosamente detalhada, contendo todos os sintomas presentes e ausentes. Geralmente os sintomas associados à silicose são dispneia com astenia, devido à redução da capacidade pulmonar de realizar as trocas gasosas (BRASIL, 2010; LEUNG *et al.*, 2012).

O exame de radiografia deve ser interpretado com base nos critérios estabelecidos pela Organização Internacional do Trabalho. A sensibilidade da radiografia de tórax melhora com o aumento do grau de silicose, porém em pacientes com grau moderado de silicose, pode não ser diagnosticada radiologicamente (LEUNG *et al.*, 2012). Quando houver dúvidas no exame de radiografia, a tomografia computadorizada poderá ser utilizada como exame de imagem complementar (BRASIL, 2010).

Até o momento, não existe um exame que detecte precocemente o início desta doença e também não há tratamentos específicos e eficazes para a silicose. A conduta médica utilizada nesses casos é o afastamento do trabalho que expõe esse indivíduo à sílica cristalina (BRASIL, 2010). Entretanto, é importante lembrar que remover um trabalhador da exposição, após o diagnóstico, não garante que a doença irá parar de progredir (NIOSH, 2002).

5. Resposta inflamatória na exposição à sílica cristalina

Em indivíduos ocupacionalmente expostos à sílica, o acúmulo dessas partículas de SC respirável no pulmão desenvolvem um processo inflamatório (BRASIL, 2010; LEUNG *et al.*, 2012; SELLAMUTHU *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2017; MUZEMBO *et al.*, 2015; CHAN *et al.*, 2018). Esse processo inflamatório, pode aumentar ou suprimir níveis de biomarcadores inflamatórios (FRANCHIN *et al.*, 2018). A inflamação é um processo biológico complexo que ocorre em resposta a estímulos nocivos e cuja função é eliminar a causa da lesão celular e iniciar o processo de reparo. Muitos tipos de células estão envolvidos nesse processo inflamatório, incluindo células epiteliais que revestem as vias aéreas e alvéolos e as células do sistema imunológico no sangue. As células epiteliais das vias aéreas são importantes no sistema de defesa do hospedeiro, pois secretam citocinas e quimiocinas que servem como mediadores inflamatórios e fatores de crescimento que promovem a reparação tecidual e a fibrose (WONG *et al.*, 2016; HUAUX, 2007; LUNA-GOMES *et al.*, 2015).

Em um processo inflamatório, os macrófagos são ativados para fagocitarem as partículas invasoras e secretarem mediadores inflamatórios e variadas enzimas. O número de linfócitos T também aumenta e pode contribuir para a fisiopatologia da inflamação pulmonar. As citocinas e quimiocinas também desempenham um papel importante no processo inflamatório. Em particular, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-1 beta (IL-1 β) atuam como citocinas iniciadoras induzindo a produção aumentada de si mesmas e a síntese de outras citocinas, quimiocinas (CXCL8/IL-8, CXCL2) e moléculas de adesão (L-selectina), além de atraírem e ativarem outras células imunes para o local da inflamação (WONG *et al.*, 2016; LEUNG *et al.*, 2012). Após o encontro com o antígeno, as moléculas de adesão controlam o tráfico de leucócitos constitutivos e inflamatórios. As selectinas,

especialmente a L- selectina, desempenham um papel crucial na fixação inicial dos leucócitos ao endotélio e a outros leucócitos (RAFFLER *et al.*, 2015).

6. Biomarcadores na exposição à sílica cristalina

Os marcadores biológicos, também chamados de biomarcadores, são qualquer alteração a nível celular, bioquímico ou molecular (PANDEY & AGARWAL, 2012). Um biomarcador pode indicar a ocorrência e os efeitos da exposição, um diagnóstico precoce e a suscetibilidade à doença ou aos efeitos da exposição ocupacional (NIOSH, 2002). Sua determinação pode ser realizada através de tecidos, células ou fluidos humanos, sendo utilizado como indicador precoce de processos biológicos patogênicos, a fim de evitar futuros danos adversos à saúde. Os biomarcadores podem ser utilizados sozinhos ou associados, e predizem de forma eficiente o estado de saúde e progresso de uma doença (PANDEY & AGARWAL, 2012).

Devido ao complexo mecanismo da silicose e das respostas celulares à exposição à sílica, a utilidade de biomarcadores como uma ferramenta de triagem para o risco de silicose tem sido muito estudado (NIOSH, 2002). Portanto, descobrir se a silicose ou o câncer de pulmão provindo da exposição à sílica estão associados a um gene específico seria extremamente valioso para a determinação precoce desta doença.

6.1. L-selectina

As selectinas são uma família de glicoproteínas transmembranares do tipo I que desempenham um papel importante nas interações dos leucócitos circulantes e o endotélio (FENG *et al.*, 2017). Existem três membros conhecidos nessa família, denominados de L-, E- e P-selectina (IVETIC, 2018; XU & SONG, 2017). Cada selectina foi denominada de acordo com seu tipo celular, por exemplo, a L-selectina é expressa pela maioria dos leucócitos, logo seu nome foi caracterizado pela letra L (IVETIC, 2018). A L-selectina é expressa em linfócitos T e B, guiando essas células para os linfonodos (FENG *et al.*, 2017).

A L-selectina interage com seus ligantes na superfície dos leucócitos circulantes, permitindo que os leucócitos deixem a corrente sanguínea e se liguem às células endoteliais nas paredes dos vasos, onde começam a rolar e se aderir (HAMAGUCHI *et al.*, 2002; RAFFLER *et al.*, 2005). Após a ativação da L-selectina,

ela pode passar por três fases distintas: (a) fase inicial, onde predomina o derramamento, diminuindo os níveis de L-selectina, (b) fase intermediária, onde há um aumento da estabilidade do RNAm e, portanto, há um aumento dos níveis de L-selectina, (c) fase tardia, onde a taxa de transcrição é reduzida e as células permanecem em níveis normais de L-selectina (RAFFLER *et al.*, 2005).

6.2. Quimiocina CXC ligante 2 (CXCL2)

A quimiocina CXC ligante 2 (CXCL2), também conhecida como proteína inflamatória de macrófago (MIP)-2, faz parte da família das quimiocinas. Todas as quimiocinas possuem a capacidade de mediar a quimiotaxia, ativar leucócitos e outras células para o local de inflamação. São produzidas por variadas células como macrófagos, monócitos, células epiteliais, entre outras, e está envolvida em processos imunorregulatórios e inflamatórios (QIN *et al.*, 2017; DRISCOLL, 1997). A família das quimiocinas CXC é dividida em 4 subfamílias baseada na localização da cisteína na cadeia polipeptídica (QIN *et al.*, 2017). A CXCL2 está diretamente relacionada ao recrutamento de neutrófilos para os locais de lesão tecidual e inflamação, estando presente em respostas imunológicas (GRIFFITH *et al.*, 2014).

6.3. Quimiocina CXCL8 / interleucina-8 (IL-8)

A interleucina-8 (IL-8), atualmente chamada de CXCL8, é uma quimiocina pró-inflamatória, que exerce o recrutamento e a migração de neutrófilos (TSILIMIGRAS *et al.*, 2018). Faz parte da subfamília α de quimiocinas, caracterizada por um tripeptídeo contendo cisteínas (CXC) (FUJITA *et al.*, 2018). Está presente em inflamações crônicas, que estimulam a liberação de grânulos em neutrófilos por meio do processo de desgranulação, sendo que esses grânulos ajudam a combater a inflamação. A IL-8 é produzida por variadas células, dentre elas, células inflamatórias, queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais (SPROSTON & ASHWORTH, 2018).

6.4. Supressor tumoral p53

O gene supressor tumoral p53 é essencial no controle do crescimento de células neoplásicas, ciclo celular, resposta ao estresse oxidativo, senescência, diferenciação, indução a apoptose e morte celular (SAGIV *et al.*, 2018; COOKS *et al.*, 2014). A proteína p53 interrompe o ciclo celular na fase G1 em células que apresentam danos

ao DNA. Células que têm p53 funcional param o ciclo celular em G1 quando expostas à agentes que causam danos no DNA, enquanto células que não tem p53 funcional são incapazes de bloquear o ciclo celular (KLAASSEN & WATKINS, 2012; COOKS *et al.*, 2014).

O p53 é ativado por uma série de fatores estressores. Na maioria das células, a acumulação de p53 também provoca a indução de proteínas que promovem apoptose e, assim, previnem a proliferação de células que poderiam acumular múltiplas mutações. Quando o controle p53 não funciona adequadamente, o dano no DNA pode se propagar, produzindo mutações e rearranjos no DNA que contribuem para o desenvolvimento das células transformadas (KLAASSEN & WATKINS, 2012).

6.5. Biomarcadores de estresse oxidativo

O estresse oxidativo pode ser descrito como um desequilíbrio entre a produção de espécies oxidantes e as defesas antioxidantes, que podem afetar a homeostase redox celular, levando a alterações moleculares, resultando em dano celular e tecidual, e conseqüentemente, em peroxidação lipídica (GALLELLI *et al.*, 2018). A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), entre outras espécies reativas, fazem parte metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas. Quando há uma produção exacerbada dessas espécies reativas, o sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio (GALLELLI *et al.*, 2018).

6.5.1. Heme-oxygenase-1 (HO-1)

O sistema de defesa celular contra o estresse oxidativo é composto por um subgrupo de proteínas antioxidantes. A heme oxigenase-1 (HO-1) é uma enzima microssômica que é induzida em resposta ao estresse celular e a diversos estímulos oxidativos (ZHU *et al.*, 2017). A HO-1 decompõe heme em biliverdina, ferro livre e monóxido de carbono (CO). Seu produto de decomposição, biliverdina, pode ainda ser metabolicamente degradado em bilirrubina. Ambos exibem uma potente capacidade antioxidante contra o estresse oxidativo. Além disso, a bilirrubina também possui capacidade citoprotetora e anti-inflamatória (LIAO *et al.*, 2018). Dentre as funções biológicas do CO estão efeitos de proteção contra a morte celular, anti-

inflamatórios, antiapoptóticos, proteção contra estresse oxidativo, inibição da proliferação celular, entre outros (LI *et al.*, 2017; LIAO *et al.*, 2018).

6.5.2. Malondialdeído (MDA)

Os produtos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA), podem ser utilizado como indicadores da ação dos radicais livres no organismo. A quantificação de MDA nos sistemas biológicos é um parâmetro importante para avaliação do estresse oxidativo celular (BARRERA *et al.*, 2018).

6.5.3. Tióis não-proteicos (GSH)

A glutathiona é um antioxidante hidrossolúvel que exerce funções essenciais contra o estresse oxidativo. A glutathiona pode ser encontrada na forma oxidada (GSSG) ou reduzida (GSH) e a GSH é a forma mais encontrada dentro do grupo de tióis não proteicos. A glutathiona redutase é a enzima responsável por catalisar a redução da ligação dissulfeto na glutathiona oxidada (GSSG) com NADPH para dar glutathiona em seu estado tiol reduzido (GSH). Este processo é importante para manter uma proporção de glutathiona nos seus estados reduzido e oxidado (KEDROWSKI *et al.*, 2014).

Em sua forma reduzida (GSH), a glutathiona age como um substrato em vários processos celulares importantes, como a desintoxicação de ROS, reações de conjugação que auxiliam na remoção de agentes citotóxicos e na produção de desoxirribonucleotídeos para síntese de DNA (KEDROWSKI *et al.*, 2014).

Uma das causas mais importantes na produção de estresse oxidativo é a depleção de GSH. Durante o processo de estresse oxidativo, ocorre a diminuição nos níveis de GSH e aumento da produção de GSSG. Se o sistema redox estiver em bom funcionamento, os níveis de GSH serão reestabelecidos. Entretanto, se houver excesso de agentes oxidantes no organismo, acontecerá esse desequilíbrio. Assim, a ocorrência de estresse oxidativo juntamente com a depleção dos níveis de GSH pode levar à morte celular (SENTELLAS *et al.*, 2014).

CAPÍTULO I (ARTIGO):

**Inflammatory and oxidative stress biomarkers at protein and molecular levels
in workers occupationally exposed to crystalline silica**

A ser submetido para publicação na revista
Environmental Science and Pollution research

Inflammatory and oxidative stress biomarkers at protein and molecular levels in workers occupationally exposed to crystalline silica

Caroline Peruzzi^{1,2}; Sabrina Nascimento^{1,2}; Bruna Gauer^{1,2}; Jessica Nardi^{1,2}; Elisa Sauer^{1,2}; Gabriela Göethel^{1,2}; Larissa Cestonaro^{1,2}; Nuryan Fão^{1,2}; Shanda Cattani¹; Cristiane Paim³; Jorge Souza⁴; Daniela Gnoatto⁴; Solange Cristina Garcia^{1,2}.

¹ Laboratório de Toxicologia (LATOX), Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

³ FUNDACENTRO - Fundação Jorge Duprat e Figueiredo, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁴ Unidade Regional de Saúde do Trabalhador, Ametista do Sul, RS, Brasil.

*Corresponding author at: Avenida Ipiranga 2752, Santa Cecília, Porto Alegre, RS, CEP: 90610-000, Brazil. Tel.: +55 3308 5297; fax: +55 51 3308 5437.

E-mail address: solange.garcia@ufrgs.br (S.C. Garcia)

Abstract

Workers chronically exposed to respirable crystalline silica (CS), they are susceptible to adverse health effects like silicosis and lung cancer. This study aimed to investigate potential early peripheral biomarkers of inflammation and oxidative stress. Occupationally unexposed workers (OUW, n=29) and WECS group, composed by miners, was divided into two subgroups: workers without silicosis (WECS I, n=39) and workers diagnosed with silicosis, retired from work (WECS II, n=42) participated of this study. The following biomarkers were evaluated: L-selectin protein and gene expression; gene expression of CXCL2, CXCL8/IL-8, HO-1, and p53; malondialdehyde (MDA) plasma levels and non-protein thiol levels in erythrocytes. Our data showed a significant downregulation of L-selectin protein expression in lymphocytes surface in the WECS groups in relation to OUW group ($p<0.05$). Gene expression of L-selectin was decreased in the WECS I group when compared to the OUW group ($p<0.05$). Regarding gene expression of CXCL2, CXCL8/IL-8, HO-1, and p53, significant fold change decreases were observed in workers exposed to CS in relation to unexposed workers ($p<0.05$). The MDA was negatively associated with the gene expression of CXCL-2, IL-8 and p53 ($p<0.05$). The participants with silicosis (WECS II) presented significant higher non-protein thiol levels in relation to other groups ($p<0.05$). Taken together, we believe our findings help to increase the knowledge about the complex mechanisms involved in the silicosis pathogenesis and in the risk of lung cancer development in workers chronically exposed to CS.

Keywords: Miners; silicosis; lung cancer; inflammatory process; oxidative stress; early biomarkers.

Introduction

Exposure to respirable crystalline silica (CS) is a common occupational hazard in Brazil, which is one of the largest exporters of precious stones in the world (Souza et al. 2017). In the town of Ametista do Sul, located in the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil, amethyst mining corresponds to approximately 75% of the economic activity (Ametista do Sul 2018).

Quartz is the most common form of CS. The inhalation of suspended CS in the air is the main cause of negative health effects (Brasil 2010; WHO 2007), especially freshly fractured particles, that exhibit a higher toxic potential than aged dusts. Occupational exposure to respirable CS may lead to the development of several diseases including silicosis, lung cancer and pulmonary obstructive disease. It also leads to higher risk of mycobacterial infection, as tuberculosis (Tavakol et al. 2017). In addition, chronic exposure to CS powders may cause pulmonary emphysema, chronic bronchitis, and pulmonary fibrosis (Brasil 2010; WHO 2007; Lopes-Pacheco 2016). Silicosis, one of the most well-known types of pneumoconiosis, is a restrictive lung disease characterized by extensive fibrosis, which is considered the oldest occupational disease in the world and is still responsible for the death of thousands of workers exposed to CS (WHO 2007; Carneiro et al. 2017). In Brazil, it is believed that more than 6 million workers are exposed to CS. In 2007, a total of 318 thousand cases of silicosis were estimated. In Rio Grande do Sul, it is estimated that about 180 thousand workers were exposed to CS, and 18 thousand of these subjects developed silicosis (Brasil 2010). Silicosis is an irreversible and incurable disease caused by impairment of particle clearance, culminating in a persistent pulmonary inflammatory process. In chronic lung inflammation, cells are unable to remove CS particles from the alveoli, so the lung loses its ability to repair tissues, and the problem is further aggravated by massive pulmonary fibrosis, resulting in the generation of fibrotic nodules, which characterizes silicosis (Huaux 2007; Luna-Gomes 2015). Additionally, it can lead to lung cancer (Satpathy et al. 2015).

Mining workers are especially exposed to high concentrations of CS dust. When these particles reach the alveoli, they unleash an inflammatory response and the induction of oxidative stress. Silica dust reacts with lung cells by stimulation of alveolar macrophages, inducing to overproduction of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species, leading to reduced antioxidant defenses, and thereby resulting in lipid peroxidation and damage to the lungs (Mohammadi et al. 2018; Hamaguchi 2002). In fact, in our previous study we found higher malondyaldehyde (MDA) plasma levels, a biomarker of lipid peroxidation, and reduced vitamin C levels, an exogenous antioxidant, in retired miners with silicosis when compared to workers without silicosis (Nardi et al. 2018).

In the inflammatory process caused by the inhalation of CS particles, several elements of the immune system are released and/or activated, as macrophages, neutrophils, lymphocytes, cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules (CAMs), such as L-selectin (CD62L) (Satpathy et al. 2015). L-selectin is responsible for the traffic of lymphocytes and neutrophils to inflammatory sites (Franchin et al. 2018). Our previous results showed the relevance of this inflammatory parameter as a potential early peripheral biomarker for monitoring CS-induced toxicity in workers occupationally exposed (Nardi et al. 2018). However, in this prior study we only assessed the protein expression of L-selectin. Therefore, in the current work we evaluated the gene expression of this important protein together with the protein expression in lymphocytes. In parallel, interleukin-8 (CXCL8/IL-8), a proinflammatory cytokine, also acts on neutrophils recruitment and migration (Tsilimigras et al. 2018) and is expressed in chronic inflammatory processes (Sproston and Ashworth 2018). Another important chemokine in the

inflammatory process is CXC ligand 2 (CXCL2), also known as macrophage inflammatory protein (MIP) -2, and has the ability to mediate chemokines (Qin et al. 2017; Driscoll et al. 1997) related to the recruitment of neutrophils, leukocytes, and other cells to sites of tissue injury and inflammation (Griffith et al. 2014).

The HO-1 (heme oxygenase-1), encoded by the HMOX-1 gene, is an enzyme that degrades the heme group in free iron, carbon monoxide and biliverdin, which is converted into bilirubin by the action of biliverdin reductase. In addition to being part of the heme metabolism (Jeong et al. 2018; Lu et al. 2018), HO-1 is also a useful biomarker to evaluate oxidative stress (Kaplan et al. 2017; Liao et al. 2018). The HO-1 is involved in the inflammatory process, and the byproducts derived from the heme degradation induced by HO-1 possess potent anti-inflammatory and antioxidant activities. Therefore, they can reduce oxidative stress by reducing ROS generation (Chau 2015; Liao et al. 2018; Zhu et al. 2017); consequently, HO-1 is one of the antioxidants that protect against ROS-induced airway inflammation (Sato et al. 2006). The current study explores whether HO-1 can play a role in attenuating silica-mediated lung injury.

The *TP53* gene is known as an important tumor marker, since mutation or loss of the gene is found in most cancers. The p53 protein exerts many different effects, such as in the control of neoplastic growth, cell cycle, oxidative stress response, senescence, differentiation, induction to apoptosis, and cell death (Sagiv et al. 2018; Cooks et al. 2014). In addition, p53 can act both in the control of the mutation through the activation of repair proteins and in the induction of apoptosis, preventing the proliferation of mutated cells. It is known that the process of chronic inflammation is directly related to the promotion of cancer. Thus, p53 plays a significant role in immune responses and proinflammatory reactions, as well as in cancer (Cooks et al. 2014). The International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified CS as a Group I carcinogen in 1997 and confirmed this classification in 2009 (IARC 2009). Therefore, the evaluation of the expression of *TP53* gene may be a useful biomarker for monitoring workers chronically exposed to CS.

Nowadays, there is no effective treatment for silicosis or effective diagnosis available, and preventive measures such as the use of personal protective equipment (PPE) are not sufficient to prevent silicosis (Greenberg et al. 2007). The disease is usually diagnosed in advanced stages, where there is a severe loss of lung function, which demonstrates the importance of developing more precise techniques and biomarkers capable of detecting early changes caused by exposure to CS (Brasil, 2006; Jiang et al. 2015). In this way, the investigation of new peripheral biomarkers becomes important, since they can be useful on early diagnosis of silicosis, before the fibrotic nodules are formed, enabling a healthy and prolonged life (Pandey and Agarwal 2012). Furthermore, in addition to early detection, a comprehensive understanding of the mechanism(s) underlying development of silicosis has important implications in prevention and management of this disease. Thus, the aim of this study was to investigate the relation between peripheral biomarkers of inflammation and oxidative stress with silicosis, through protein and molecular expressions in workers occupationally exposed to CS.

Material and Methods

Study population

In this case–control study, we evaluated 110 male participants. This study was composed of three groups. The workers exposed to crystalline silica (WECS) consisted of men who work in mining activities in the town of Ametista do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil. These workers were subdivided into two groups: workers without

silicosis (WECS I, n=39) and workers diagnosed with silicosis (WECS II, n=42). The workers of WECS II group, who had been diagnosed with silicosis, were retired from mining activities. In addition, the occupationally unexposed workers (OUW, n= 29) consisted of men who work in administrative functions from Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, all healthy volunteers and who have never had history of crystalline silica occupational exposure.

Recruitment of WECS groups was achieved by contact with a public institution especially focused on miner's occupational health in the town. Nurses and the doctor of the institute contacted the mining companies, and invited them to participate of the study. Individuals with chronic diseases (diabetes, hepatitis, tuberculosis, and previous cancer history) and with less than one year of occupational exposure to crystalline silica were excluded of the study.

All the participants answered a questionnaire regarding health status, lifestyle, drinking, smoking and exercising habits, diet, medicines use, and occupational activities. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Registry CAAE n°175 60976516.7.0000.5347). All volunteers provided their written informed consent.

Collection and processing of biological samples

Blood samples were collected in the morning, after an 8-hour fasting period, by venipuncture using vacutainer tubes. An EDTA tube (2 mL) was collected for blood count and L-selectin surface protein expression and another EDTA tube (2 mL) was collected for L-selectin, Interleukin-8, CXCL2 Chemokine Ligand 2 (CXCL2) and p53 gene expression. A third EDTA tube (2 mL) was collected and was centrifuged at 1500g for 10 min at room temperature to obtain plasma for malondialdehyde (MDA) levels quantification. The erythrocytes were used to the determination of non-protein thiol levels.

Anthropometric measurements

In the same day of blood collection, subjects were evaluated for weight and height to obtain the body mass index (BMI). Weight was measured with an upright scale (Plenna Sport MEA 07420), with a capacity to weigh 150 kg in 100-g increments. Height was measured using a standing stadiometer. BMI was obtained by division of the person's weight in kilograms (kg) by the person's square height in meters (m) (kg m^2).

Protein expression analysis: L-selectin in lymphocytes

L-selectin surface protein expression in lymphocytes was performed through flow cytometry. The samples were incubated with fluorescein-5-isothiocyanate (FITC)-conjugated L-selectin antibody (BD Biosciences™, San Jose, CA, USA). BD® FACS lysing solution was used following the manufacturer's instructions. The cells were immediately analyzed at Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using Attune® Cytometric Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Lymphocytes were identified by manual gating, according the parameters of side scatter and size. Results are expressed as the percentage of L-selectin surface expression.

Gene expression analysis

The determination of gene expression was performed by real-time reverse-transcriptase polymerase chain

reaction (RT-PCR) analysis. The extraction of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from whole blood was performed through density gradient separation with Ficoll-Histopaque (Sigma Chemical Co, St Louis, MO). Total RNA of PBCM cells was obtained by organic extraction using Trizol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) in according to the manufacturer's protocols. The concentration ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) and reason (260/280) were measured using the equipment NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Only samples with purity between 1.8 and 2.0 were used for the analysis of gene expression. Additionally, RNA integrity was measured by standard denaturing agarose gel electrophoresis, visualizing RNA bands 18S and 28S. Only samples with a suitable purity and integrity were used for gene expression analysis. Total RNA was converted into complementary DNA (cDNA) and, in order to ensure no more genomic DNA residue, total RNA was treated with DNase (Promega, Madison, Wisconsin, USA) for 30 min at 37°C. For cDNA synthesis, total RNA was transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcriptase kit (Thermo Fisher Scientific) according to the kit's protocol. The gene-specific TaqMan primers and probes were acquired from Thermo Fisher Scientific. Data were collected and quantitatively analyzed using StepOne™ Software v2.1. The β -actin was used as an internal control gene to normalize all mRNA expression levels. Calculations were made with the use of the comparative Ct ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) method and the $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Fold Change) value was calculated using the ΔCt values of each sample and the median ΔCt values of the OUW group.

Inflammatory biomarkers: L-selectin, CXCL2 and CXCL8/IL-8

The gene expression of the following inflammatory proteins were evaluated: L-selectin (Hs00174151_m1), CXCL2 (Hs00601975_m1), and CXCL8/IL-8 (Hs00174103_m1), analyzed in a duplex reaction with the housekeeping human β -actin (ACTB) gene (Hs_01060665_g1) as endogenous control.

Suppressor tumor gene: p53

The suppressor tumor gene, p53 (*TP53*) (Hs_01034249_m1) was also assessed in a duplex reaction using the ACTB gene (Hs_01060665_g1) as endogenous control.

Oxidative stress response biomarker: heme-oxygenase-1 (HO-1)

The gene expression of the oxidative stress enzyme HO-1 was evaluated (Hs01110250_m1) in a duplex reaction using the ACTB gene (Hs_01060665_g1) as endogenous control.

MDA plasma levels

Lipid peroxidation was determined through the MDA quantification in plasma by HPLC with VIS detection (Shimadzu® Kyoto, Japan), according to Grotto et al. (2007). The levels of MDA were expressed as mmol L^{-1} .

Erythrocytes non-protein thiol levels

Erythrocytes were hemolyzed with Triton X-100, and then precipitated with 20% trichloroacetic acid (w/v). After centrifugation, supernatant aliquots reacted with 10 mM of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and the non-protein thiol levels were determined in erythrocytes by spectrophotometrically at 412 nm, as described by Ellman (1959). The results were expressed in $[\text{mM}] * (\text{Ht}/\text{Hb})$.

Statistical analysis

Analysis of data was performed using IBM SPSS software version 22. All the study variables were tested for normality by the Shapiro-Wilk test. Variables with a non-normal distribution were log transformed to be included in UNIANOVA and partial correlations. Comparisons between groups were achieved by chi-square test and by univariate analysis (UNIANOVA) controlling for the influence of confounding factor (smoking habits). Other possible influences of confounding factors, such as anti-inflammatory use, multivitamin use, age, and body mass index were evaluated by non-parametric and ANCOVA tests and did not influence the analyses. Significance was accepted at $p \leq 0.05$.

Results

Characteristics of the study population

A summary of the data obtained from the questionnaires applied to the participants is presented in Table 1. A significant difference was observed between the groups for age, use of alcoholic beverage, anti-inflammatories, multivitamins, physical activity practices, clothes washing at home, and regarding to use of some personal protective equipment ($p < 0.05$). The miners of WECS I and WECS II groups presented a significant lower education level when compared to the OUW group ($p < 0.001$). The majority of individuals in the WECS I ($n = 23$, 62.2%) and WECS II ($n = 32$, 84.2%) groups reported incomplete elementary school. Whereas in the OUW group, 23 (82.1%) of the individuals answered that they have complete higher education. Regarding the weekly workload, no significant differences were found between the groups.

Among the individuals who wash miners' clothes at home, 13 (19.70%) have respiratory problems, including silicosis, shortness of breath, cough, bronchitis, asthma, and rhinitis. When we asked the miners about the mask model used, the majority of individuals in the WECS I ($n = 26$, 70.3%) and WECS II ($n = 22$, 64.7%) groups answered that they use the semifacial mask with a filter. In relation to mask filter replacement, the majority of workers in the WECS I group ($n = 13$, 36.1%) responded that they changed every two to three months and the WECS II group ($n = 11$, 34.4%) changed once a month.

Table 1. Characteristics of the study population.

	OUW (n=28)	WECS I (n=37)	WECS II (n=38)
Age (years)	44.81 ± 2.10	39.27 ± 1.89 ^a	51.53 ± 1.25 ^b
BMI (kg m⁻²)	27.38 ± 0.75	26.94 ± 0.87	24.93 ± 0.77
Smokers	5 (18,5%)	15 (40.5%)	25 (68.8%) ^c
Use of alcoholic beverage	27 (96.4%)	17 (44.7%) ^e	26 (70.3%) ^{c,d}
Use of anti-inflammatories	2 (7.1%)	4 (10.8%)	21 (56.8%) ^{c,g}
Use of multivitamins	5 (17.9%)	0 (0%) ^e	1 (2.6%) ^h
Physical activity	21 (77.8%)	19 (51.4%) ^h	17 (44.7%) ^e
Clothes washed at home	NA	33 (89.2%)	38 (100%) ^d
PPE			
Masks	NA	36 (97.3%)	32 (94.1%)

Gloves	NA	28 (75.7%)	15 (44.1%) ⁱ
Glasses	NA	11 (29.7%)	10 (29.4%)
Apron	NA	32 (86.5%)	13 (38.2%) [§]
Hearing protection	NA	34 (91.9%)	20 (58.8%) [§]
Education level			
Middle school	0 (0%)	7 (18.9%)	4 (10.5%)
High school	5 (17.9%)	5 (13.5%)	1 (2.6%)
Undergraduate school	23 (82.1%)	2 (5.4%)	0 (0%) ^{c,§}
Weekly workload (hours)	38.93 ± 0.59	37.17 ± 1.22	39.49 ± 2.04

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

^a $p < 0.01$ compared to OUW group (Kruskal-Wallis test);

^b $p < 0.01$ compared to WECS I group (Kruskal-Wallis test);

^c $p < 0.001$ compared to OUW group (Chi-squared test);

^d $p < 0.05$ compared to WECS I group (Chi-squared test);

^e $p < 0.01$ compared to OUW group (Chi-squared test);

[§] $p < 0.001$ compared to WECS I group (Chi-squared test);

^h $p < 0.05$ compared to OUW group (Chi-squared test);

ⁱ $p < 0.01$ compared to WECS I group (Chi-squared test);

Abbreviations: OUW: occupationally unexposed workers; WECS I: workers exposed to crystalline silica; WECS II: workers exposed to crystalline silica with silicosis, BMI: body mass index, PPE: personal protective equipment, NA: not applicable.

Inflammatory biomarkers

L-selectin surface expression in lymphocytes

The percentage of L-selectin surface expression in lymphocytes in the three evaluated groups is showed in Figure 1. Corroborating our previous results (Nardi et al. 2018), we observed a significant downregulation of L-selectin protein expression in lymphocytes surface for the WECS II group ($28.17 \pm 1.48\%$) in comparison with the WECS I ($41.48 \pm 1.98\%$) and OUW groups ($47.82 \pm 1.87\%$) ($p < 0.05$). Moreover, the percentage of L-selectin protein expression in lymphocytes was positively associated with gene expression of CXCL2, CXCL8/IL-8, p53 and HO-1 (Table 2; $p < 0.05$).

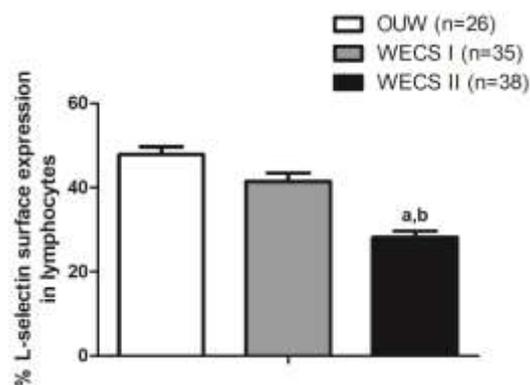


Figure 1. Percentage of L-selectin protein expression in lymphocytes surface. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). ^a $p < 0.001$ compared to OUW group; ^b $p < 0.001$ compared to WECS I group by UNIANOVA adjusted by smoking habits. Abbreviations: OUW: occupationally unexposed workers; WECS I: workers exposed to crystalline silica; WECS II: workers exposed to crystalline silica with silicosis.

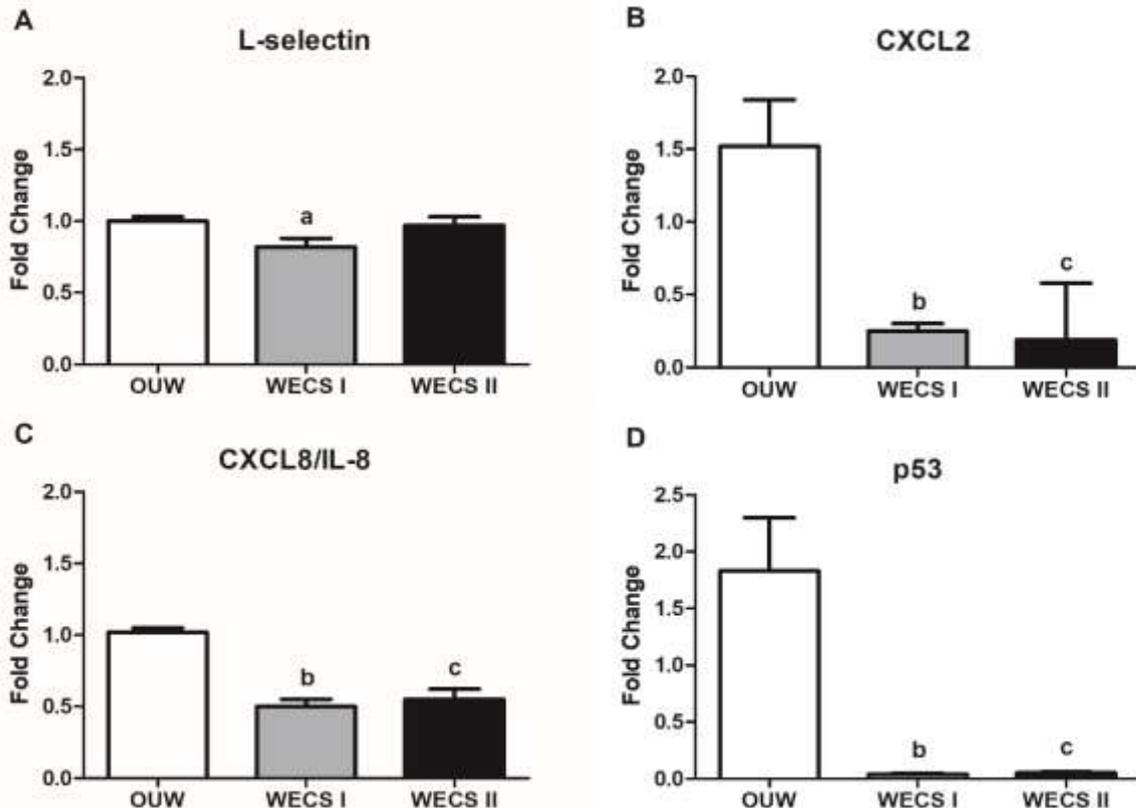
Table 2. Spearman's rank correlations between gene expression of L-selectin, CXCL2, CXCL8/IL-8, p53 and HO-1 with % L-selectin expression in lymphocytes and MDA in plasma (n= 103).

		L-selectin	CXCL2	CXCL8/IL-8	p53	HO-1
		r	r	r	r	r
% L-selectin expression in lymphocytes	L-selectin	$p > 0.05$	0.364 ^b	0.276 ^a	0.387 ^b	0.233 ^a
	MDA	$p > 0.05$	-0.348 ^b	-0.217 ^a	-0.354 ^a	$p > 0.05$

^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.001$. Abbreviations: p53: tumor suppressor protein; HO-1 (heme oxygenase-1).

Gene expression of L-selectin, CXCL2 and CXCL8/IL-8

Fold change (FC) values from the gene expression analysis of inflammatory biomarkers are shown in Figure 2. With regard to L-selectin (Fig. 2A), we observed significant differences for the WECS I (0.82 ± 0.06 FC) in comparison with the OUW (1.00 ± 0.03 FC). CXCL2 showed a significant fold change decrease in both WECS I (0.25 ± 0.05 FC) and WECS II (0.19 ± 0.39 FC) groups in relation to OUW group (1.52 ± 0.32 FC) (Fig. 2B; $p < 0.001$). In addition, CXCL8/IL-8 presented a significant fold change decrease in the WECS I (0.50 ± 0.05 FC) and WECS II (0.55 ± 0.07 FC) groups when compared to OUW group (1.02 ± 0.03 FC) (Fig. 2C; $p < 0.001$).



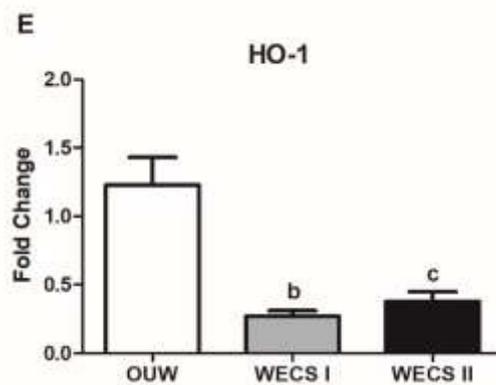


Figure 2. Results of gene expression analysis of L-selectin (A), CXCL2 (B), CXCL8/IL-8 (C), tumor suppressor protein (p53) (D), and heme oxygenase-1 (HO-1) (E). Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). ^a $p < 0.05$ compared to OUW group; ^b $p < 0.001$ compared to OUW group; ^c $p < 0.001$ compared to WECS I group by UNIANOVA adjusted by smoking habits. Abbreviations: OUW: occupationally unexposed workers; WECS I: workers exposed to crystalline silica; WECS II: workers exposed to crystalline silica with silicosis.

Tumor suppressor gene: p53

The tumor suppressor gene p53 showed a significant fold change decrease in the WECS I (0.04 ± 0.01 FC) and WECS II (0.05 ± 0.01 FC) groups in relation to OUW group (1.83 ± 0.47 FC) (Fig. 2D; $p < 0.001$).

Oxidative status biomarkers

The WECS II group presented higher plasma levels of malondialdehyde (MDA), a biomarker of lipid peroxidation, when compared to WECS I and OUW groups ($p < 0.01$) (data not shown), corroborating our recent publication (Nardi et al. 2018). In addition, we observed that the increased MDA plasma levels were negatively correlated with the gene expression of CXCL2, CXCL8/IL-8, and p53 (Table 2; $p < 0.05$).

The non-protein thiol levels, that have glutathione (GSH) as the most abundant component, were significantly increased in the WECS II (1.03 ± 0.03 [mM]*(Ht/Hb)) group when compared to WECS I (0.75 ± 0.02 [mM]*(Ht/Hb)) and OUW (0.82 ± 0.03 [mM]*(Ht/Hb)) groups ($p < 0.05$).

The expression levels of gene encoding HO-1 were significantly lower in PBMCs in the WECS I (0.27 ± 0.04 FC) and WECS II (0.38 ± 0.07 FC) groups when compared to OUW group (1.23 ± 0.20 FC) (Fig. 2E; $p < 0.001$).

Discussion

Occupational exposure to CS has been associated with progressive pulmonary inflammation, fibrosis (Alaya et al. 2018), and lung cancer (Tuomi et al. 2018). The silicosis disease, caused by this exposure, is usually diagnosed in advanced stages, where there is a severe loss of lung function. As the use of personal protective equipment (PPE) is not enough to prevent the development of silicosis in workers occupationally exposed to CS, the investigation of new peripheral biomarkers which are able to detect early changes caused by CS has an extreme importance (Greenberg et al. 2007; Jiang et al. 2015). When CS is inhaled, it is deposited in the pulmonary alveoli, leading to the activation of alveolar macrophages and to an increase in ROS production, which in turn increases inflammatory responses, causing lung tissue damage (Wu 2012; Sato et al. 2006). Thus, the present study explored

the inflammatory process, response to oxidative stress and the risk of cancer development through peripheral biomarkers in miners with and without silicosis.

According to the Brazilian Legislation (Regulatory Norm 6 – NR-06), PPE is every individual device or product used by the worker, designed to protect risks that could threaten health at work (Brasil 2001). With regard to our results, we observed that all individuals with silicosis (WECS II group) used less PPE than the individuals without silicosis (WECS I group I). Every company should promote training for their employees so that everyone gets the knowledge and awareness of the importance of using PPE correctly. However, our study group exposed to CS are autonomous individuals, and the only information they receive comes from the person in charge of the mine that they are exploring. Our findings are in agreement with a study of Kalliny and Bassyouni (2011) conducted with workers exposed to CS, who showed that workers without silicosis (70%) reported using PPE more frequently than workers with silicosis (8%). Therefore, we suggest that the use of PPE by workers occupationally exposed to CS helps to reduce the risks of developing silicosis, although this behavior is not enough to avoid the disease. In addition, studies have showed that there is a lack of information about the importance of using PPE and that there should be occupational health education programs (Kalliny and Bassyouni 2011; Bondori et al. 2018; Gelati et al. 2018). While the use of PPE may initially seem unpleasant, workers need to be trained in how to use it, because many workers do not make proper use due to many reasons, such as thermal stress, restricted vision, among other uncomfortable factors (Bondori et al. 2018). The irregular use of PPE is among the main factors for the increase of pathologies in occupational exposures (Zeljezic et al. 2016; Wilson et al. 2018).

In relation to the inflammatory markers evaluated in this study, L-selectin, an important protein in adaptive immunity, is responsible for mediating the capture and roll of leukocytes and monocytes in the endothelium (Feng et al., 2017). In accordance to our previous results (Nardi et al. 2018), we observed a significant negative regulation of L-selectin surface protein expression in lymphocytes in participants with silicosis (WECS II group) in comparison to individuals from other groups ($p<0.05$). In addition, in the present study, we also evaluated the gene expression of L-selectin. Our data showed a significant decrease in gene expression in the WECS I group in relation to the OUW group ($p<0.05$). Singh and coworkers (2018) also demonstrated a decrease in L-selectin expression in leukocytes, and suggested it is possibly related to the release process during the activation of innate cells. L-selectin is expressed on the surface of leukocytes after activation of T cells. Its release from the surface of the leukocytes occurs by a cleavage process, and consequently its expression is decreased at protein and gene levels (Rainer 2002; Raffler et al. 2005; Hobbs and Nolz 2017). The decrease in L-selectin expression reduces the frequency of neutrophil rolling events, which are a limiting step in the recruitment of these cells (Rainer 2002). Another explanation involves the process of internalization occurs, when an adhesion molecule is incorporated back into the cell membrane or into the cytoplasm (Rainer 2002). However, further studies should be performed to elucidate this possible mechanism.

Due to the critical role of CXCL2 and CXCL8/IL-8 in the inflammatory response, we analyzed the gene expression of these chemokines in order to understand the inflammatory mechanism in workers exposed to CS. Our study demonstrated, for the first time, significant decrease of CXCL2 and CXCL8/IL-8 gene expression in workers occupationally exposed to CS. Although many studies show an increase in the levels of these markers (Lee et al. 2010; Lee et al. 2015; Dragon et al. 2015), our results suggest a possible mechanism of negative feedback regulation in the production of CXCL2 and CXCL8/IL-8. The decrease in these chemokines may be associated with a worse prognosis in CS exposure. In the study of Souto et al. (2014), they also found significant lower levels

of CXCL8/IL-8, suggesting that this mechanism may be associated with a deficiency in neutrophil inflammatory response. Further studies explain that the reduction of CXCL2 levels could be involved in the inhibition of neutrophil recruitment in inflammatory processes, making it difficult to perform the immune response (Qin et al. 2017; Rouault et al. 2013). Some studies have shown that the production of CXCL8/IL-8 is regulated by the Nuclear Kappa B Factor (NFκB) (Hidalgo et al. 2015; Khan et al. 2014). We may suggest that this negative regulation could be by inhibition of NFκB activity. Unfortunately, in this study, we did not evaluate the gene expression of NFκB, but we intend to confirm the possibility of this regulation in our future studies. A study of Damby et al. (2016) explains that NFκB is responsive to the proinflammatory effects of many pathogenic particles, and that upon exposure to CS, NFκB becomes inactive to control the transcription of CXCL8/IL-8.

Our results demonstrated a positive correlation between L-selectin protein expression in lymphocytes with gene expression of CXCL2 and CXCL8/IL-8 chemokines. It is known that in the inflammatory process, adhesion molecules, such as L-selectin, play an important role in capture and rolling of leukocytes (Singh et al. 2018; Mosevoll et al. 2018). The inflammatory process also depends on the support of chemokines, such as CXCL2 and CXCL8/IL-8, as they are important in the recruitment of neutrophils to the site of inflammation. Another important point is that neutrophils are considered effector cells, that is, they cause bacterial death, tissue destruction and angiogenesis (Singh et al. 2018; Kobayashi 2008).

Lung cancer is another negative health consequence from the chronic exposure to CS (Sellamuthu et al. 2013). Nowadays, it is well established that p53 protein is associated with lung cancer, and the frequencies of p53 mutations are up to 80% in small cell lung cancer and 50% in non-small cell lung cancer (Liu et al. 2014; Zhu 2018). Therefore, the gene expression of p53 was assessed in the current study. Our results showed a significant negative regulation of p53 gene expression in the WECS groups compared to the OUW group ($p < 0.05$). p53 gene plays an important role in the regulation of damaged cells and the cell cycle, repairing DNA damage, preventing uncontrolled cell growth or inducing apoptosis of tumor cells (Uehara and Tanaka 2018; Reed and Quelle 2015). It is known that mutations caused in the *TP53* gene may lead to loss of function of this protein, and that p53 deficiency increases the likelihood of tumor development (Reed and Quelle 2015; Biegging et al. 2014). Another important point is that these types of tumors have more malignant characteristics due to lack of cell differentiation, genetic instability and increased invasiveness (Biegging et al. 2014). In this scenario, our results suggest that exposure to CS may increase the risk of development of lung cancer in occupationally exposed workers. Furthermore, we found a positive significant correlation between gene expression of p53 and protein expression of L-selectin. Indeed, it is known that inflammatory processes have a major impact on the cancer development (Ansari et al. 2015).

CS exposure induces oxidative stress by lipid peroxidation in the lung (Anlar et al. 2017). Malondialdehyde (MDA) is a lipid peroxidation product widely used as a measure of oxidative stress in cells (Sapkota et al. 2017; Wyatt et al. 2012; Pandey and Agarwal 2012). Recent data published by our group showed an increase in MDA levels in workers exposed to CS (Nardi et al. 2018). In the current work, MDA levels were inversely associated with the gene expression of CXCL2 and CXCL8/IL-8 chemokines and with the p53 gene expression. It is known that MDA is associated with increased oxidative stress caused by the inhalation of CS, and consequently is associated with inflammation (Nardi et al. 2018; Anlar et al. 2017). Therefore, we suggest that these inflammatory chemokines are associated with the high levels of oxidative stress that may promote tissue damage and fibrosis (Xu et al. 2014).

We also evaluated the most important endogenous antioxidant, non-protein thiols groups. The results showed that workers with silicosis (WECS II group) presented increased levels of non-protein thiols when compared to both OUW and WECS I groups. Our results are in accordance with previous studies that showed increased non-protein thiol levels in advanced stages of silicosis (Miao et al. 2012, Zhang et al. 2000), suggesting a compensatory mechanism in order to protect the organism against the accumulation of reactive species (Brucker et al. 2013).

The enzyme HO-1 is an important antioxidant against airway inflammation induced by ROS (Sato et al. 2006). Its byproducts generated by its enzymatic activity have a cytoprotective action, and several studies have demonstrated that overexpression of HO-1 has antioxidant, anti-inflammatory, and antiapoptotic properties (Sherif 2018; Dong et al. 2015; Andrés et al. 2014; Dennery 2014), providing protection against pulmonary lesions (Wu 2012). In this line, we evaluated the gene expression of HO-1 in the present study. Our results showed that there was a significant decrease in the gene expression of HO-1 in the WECS group compared to the OUW group ($p < 0.05$). In fact, suppression of HO-1 is related to increased inflammatory responses and oxidative stress (Sherif 2018), resulting in increased mucosal permeability, mucus hypersecretion, emphysema and pulmonary fibrosis (Wu 2012). Thus, it is assumed that elevated levels of HO-1 may act as a protection mechanism against the development and progression of pulmonary fibrosis, and that its decrease would be directly related to a worse prognosis in lung diseases caused by exposure to CS (Wu 2012).

Conclusions

In conclusion, our findings showed evidence of a possible negative feedback mechanism for inflammatory chemokines in workers exposed to CS, as a protective response against the oxidative and inflammatory processes observed in these workers. We have also shown that these inflammatory and oxidative effects may contribute to enhance the predisposition to develop cancer after chronic occupational exposures to CS. Despite limiting factors such as number of individuals, our results provide an additional panel of candidate genes to decipher mechanisms for early response to CS exposure.

Acknowledgments

The authors would like to thank the volunteers who participated in this study, the healthcare professionals from Ametista do Sul, RS, Brazil, and the volunteers from Porto Alegre, RS, Brazil, Banrisul, especially Mr. Sérgio Arantes, who were essential for the development of this study, and Fernando Freitas and Otávio Lovison for their substantial help during sample collection. We also thank the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (research project number 170222) for providing the facilities for flow cytometry and RT-PCR analyses. This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, protocol number 27671.414.17115.26062017, PqG 2017). C. Peruzzi had a CNPq MSc. research fellowship and S.C. Garcia is a recipient of CNPq research fellowship.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest. The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Abe N, Xou DX, Munemasa S, Murata Y, Nakamura, Y (2014) Nuclear factor-kappaB sensitizes to benzyl isothiocyanate-induced antiproliferation in p53-deficient colorectal cancer cells. *Cell Death Dis* 5:1-9. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.495>
- Alaya Z, Braham M, Aissa S, Kalboussi H, Bouajina E (2018) A case of Caplan syndrome in a recently diagnosed patient with silicosis: A case report. *Radiol Case Rep* 13:663–666. <https://doi.org/10.1016/j.radcr.2018.03.004>
- Ametista do Sul (2018) Official Website. <https://www.ametistadosul-rs.com/dado-gerais>. Accessed 04 June 2018.
- Andrés NC, Fermento ME, Gandini NA, Romero AL, Ferro A, Donna LG, Curino AC, Facchinetti MM (2014) Heme oxygenase-1 has antitumoral effects in colorectal cancer: Involvement of p53. *Exp Mol Pathol* 97:321–331. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2014.09.012>.
- Anlar HG, Bacanlı M, İritaş S, Bal C, Kurt T, Tutkun E, Yılmaz HO, Basaran N (2017) Effects of Occupational Silica Exposure on OXIDATIVE Stress and Immune System Parameters in Ceramic Workers in TURKEY. *J Toxicol Environ Health A* 80:688–696. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1286923>
- Ansari D, Andersson R, Andrén-Sandberg A (2015) Pancreatic cancer and thromboembolic disease, 150 years after Trousseau. *Hepato Biliary Surg Nutr* 4:325-335. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2015.06.08>
- Biegging KT, Mello SS, Attardi LD (2014) Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 14:359-370. <https://doi.org/10.1038/nrc3711>
- Bondori A, Bagheri A, Damalas CA, Allahyari MS (2018) Use of personal protective equipment towards pesticide exposure: Farmers' attitudes and determinants of behavior. *Sci Total Environ*, 639:1156-1163. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.203>
- Brasil (2010) Ministério da Saúde. O mapa da exposição à sílica no Brasil. Ribeiro, F.S.N. (coord). Rio de Janeiro: UERJ. http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/mapa_exposicao_silica_brasil.pdf. Accessed 06 May 2018.
- Brasil (2006) Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Pneumoconioses. http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/06_0443_M.pdf. Accessed 06 May 2018.
- Brasil (2001) Ministério do Trabalho. NR 6 - Equipamento de Proteção Individual – EPI, Portaria SIT n.º 25. <http://trabalho.gov.br/images/Documentos/SST/NR/NR6.pdf>. Accessed 28 June 2018.
- Brucker N, Moro AM, Charão MF, Durgante J, Freitas F, Baieler M, Nascimento S, Gauer B, Bulcão RP, Bubols GB, Ferrari PD, Thiesen FV, Gioda A, Duarte MMF; Castro I (2013) Biomarkers of occupational exposure to air pollution, inflammation and oxidative damage in taxi drivers. *Sci Total Environ* 463-464:884–893. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.098>.
- Carneiro PJ, Clevelario AL, Padilha GA, Silva JD, Kitoko JZ, Olsen PC, Cruz FF (2017) Bosutinib Therapy Ameliorates Lung Inflammation and Fibrosis in Experimental Silicosis. *Frontiers in Physiology* 8:1–15. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00159>.
- Carroll BL, Pulkoski-Gross MJ, Hannun YA, Obeid LM (2016) CHK1 regulates NF-κB signaling upon DNA damage in p53-deficient cells and associated tumor-derived microvesicles. *Oncotarget*, 7:159-170. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7566>
- Chau LY (2015) Heme oxygenase-1: emerging target of cancer therapy. *J Biomed Sci* 22:1-7. <https://doi.org/10.1186/s12929-015-0128-0>
- Cooks T, Harris CC, Oren M (2014) Caught in the cross fire: p53 in inflammation. *Carcinogenesis* 35:1680–1690. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu134>
- Damby DE, Murphy FA, Horwell CJ, Raftis J, Donaldson K (2016) The *in vitro* respiratory toxicity of cristobalite-bearing volcanic ash. *Environ Res* 145: 74-84. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.11.020>
- Dennery PA (2014) Heme Oxygenase in Neonatal Lung Injury and Repair. *Antioxid Redox Signal* 21:1881–1892. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5791>
- Dong C, Zheng H, Huang S, You N, Xu J, Ye X, Zhu Q, Feng Y, You Q, Miao H, Ding D, Lu Y (2015) Heme oxygenase-1 enhances autophagy in podocytes as a protective mechanism against high glucose-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 337:146-159. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.04.005>
- Dragon J, Thompson J, Macpherson M, Shukla A (2015) Differential susceptibility of human pleural and

peritoneal mesothelial cells to asbestos exposure. *J Cell Biochem* 116:1540–1552. <https://doi.org/10.1002/jcb.25095>

Driscoll KE (1997) Macrophage Inflammatory Proteins: Biology and Role in Pulmonary Inflammation. *Exp Lung Res* 20:473–490. <https://doi.org/10.3109/01902149409031733>

Feng Y, Ma X, Deng L, Yao B, Xiong Y, Wu Y, Wang L, Ma Q, Ma F (2017) Role of selectins and their ligands in human implantation stage. *Glycobiology* 27:385–391. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwx009>.

Franchin M, Freires IA, Lazarini JG, Nani BD, Da Cunha MG, Colon DF, De Alencar SM, Rosalen PL (2018) The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. *Eur J Med Chem* 153:49–55. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.050>

Gelati TR, Cezar-Vaz MR, Bonow CA, Couto AM, Costa VZ, Oliveira AMN (2018) Respiratory alterations in workers: study of single ports. *Rev Gaúcha Enferm* 38:1–8. <https://doi.org/10.1590/1983-1447.2017.04.61339>

Greenberg MI, Waksman J, Curtis J (2007) Silicosis: a review. *Dis Mon*, 54:394–416. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2007.09.020>

Griffith J, Sokol CL, Luster AD (2014) Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity. *Annu Rev Immunol* 32:659–702. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120145>

Hamaguchi Y, Nishizawa Y, Yasui M, Hasegawa M, Kaburagi Y, Komura K, Nagaoka T, Saito E, Shimada Y, Takehara K, Kadono T, Steeber DA, Tedder TF, Sato S (2002) Intercellular adhesion molecule-1 and L-selectin regulate bleomycin-induced lung fibrosis. *Am. J. Pathol* 161:1607–1618. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64439-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64439-2)

Hidalgo MA, Carretta MD, Teuber SE, Zárate C, Cárcamo L, Concha II, Burgos RA (2015) fMLP-Induced IL-8 Release Is Dependent on NADPH Oxidase in Human Neutrophils. *J Immunol Res* 2015:1–14. <https://doi.org/10.1155/2015/120348>

Hobbs SJ, Nolz JC (2017) Regulation of T Cell Trafficking by Enzymatic Synthesis of O-Glycans. *Front Immunol* 8:1–11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00600>

Huax F (2007) New developments in the understanding of immunology in silicosis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 7:168–173. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e32802bf8a5>

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

Jeong B, Kim HR, Choi NS, Park BS, Park JW, Kim JG, Lee BJ (2018) Role of thyroid transcription factor-1 in transcriptional regulation of heme oxygenase-1. *Biochem Biophys Res Commun* 496:147–152. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.014>

Jiang PR, Cao Z, Qiu ZL, Pan JW, Zhang N, Wu YF (2015) Plasma levels of TNF- α and MMP-9 in patients with silicosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 19:1716–1720. <https://doi.org/2284-0729>

Kalliny MS, Bassyouni MI (2011) Immune Response Due to Silica Exposure in Egyptian Phosphate Mines. *J Health Care Poor Underserved* 22: 91–109. <https://doi.org/10.1353/hpu.2011.0156>

Kaplan M, Wong RJ, Stevenson DK (2017) Heme oxygenase-1 promoter polymorphisms: do they modulate neonatal hyperbilirubinemia? *J Perinatol* 37: 901–905. <https://doi.org/10.1038/jp.2017.6>

Kashatus D, Cogswell P, Baldwin AS. Expression of the Bcl-3 proto-oncogene suppresses p53 activation. *Genes & Development*, v. 20, p. 225–235, 2006. <https://doi.org/10.1101/gad.1352206>

Khan K, Schneider-Poetscha T, Ishfaq M, Ito A, Yoshimoto R, Mukaidad N, Yoshidaa M. Splicing inhibition induces gene expression through canonical NF- κ B pathway and extracellular signal-related kinase activation. *FEBS Letters*, v. 588, p. 1053–1057, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.02.018>

Kobayashi Y (2008) The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci* 3:2400–2407, 2008. <https://doi.org/10.2741/2853>

Lee JS, Shin JH, Cho B-O (2015) Serum Levels of IL-8 and ICAM-1 as Biomarkers for Progressive Massive Fibrosis in Coal Workers' Pneumoconiosis. *J Korean Med Sci* 30:140–144. <https://doi.org/10.3346/jkms.2015.30.2.140>

Lee JS, Shin JH, Lee JO, Lee KM, Kim JH, Cho B-O (2010) Serum Levels of Interleukin-8 and Tumor Necrosis Factor-alpha in Coal Workers' Pneumoconiosis: One-year Follow-up Study. *Saf Health Work* 1:69–79. <https://doi.org/10.5491/SHAW.2010.1.1.69>

- Liao S, Qu Z, Li L, Zhou B, Gao M, Huang M, Li D (2018) HSF4 transcriptional regulates HMOX-1 expression in HLECs. *Gene* 655:30-34. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.02.033>.
- Liu X, Lin XJ, Wang CP, Yan KK, Zhao LY, An WX, Liu XD (2014) Association between Smoking and p53 Mutation in Lung Cancer: A Meta-analysis. *Clinical Oncology* 26:18-24. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2013.09.003>
- Lopes-Pacheco M, Bandeira E, Morales EMM (2016) Cell-Based Therapy for Silicosis. *Stem Cells Int* 2016:1-9. <https://doi.org/10.1155/2016/5091838>
- Lu Y, An J, Liu Y, Ren L, Zhang L (2018) MMP9 is involved in HO-1-mediated upregulation of apical junctional complex in Caco-2 cells under oxygen-glucose deprivation. *Biochem Biophys Res Commun* 498:125-131. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.045>
- Luna-Gomes T, Santana PT, Coutinho-Silva R (2015) Silica-induced inflammasome activation in macrophages: role of ATP and P2X7 receptor. *Immunobiology* 220: 1101-1106. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2015.05.004>
- Miao RM, Zhang XT, Guo P, He EQ, Zhou F, Zhao DK, Zhang YY (2012) Effect of oxidative stress on development of silicosis. *World J Respirol* 2:1-5. <https://doi.org/10.5320/wjr.v2.i1.1>
- Mohammadi H, Dehghan SF, Tahamtan A, Golbabaei F (2018) Evaluation of potential biomarkers of exposure to crystalline silica: A case study in an insulator manufacturer. *Toxicol Ind Health* 34:491-498. <https://doi.org/10.1177/0748233718770073>
- Mosevoll KA, Johansen S, Wendelbo O, Nepstad I, Bruserud O, Reikvam H (2018) Cytokines, Adhesion Molecules, and Matrix Metalloproteases as Predisposing, Diagnostic, and Prognostic Factors in Venous Thrombosis. *Front Med* 5:1-11. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00147>
- Nardi J, Nascimento S, Göethel G, Gauer B, Sauer E, Fão N, Cestonaro L, Peruzzi C, Souza J, Garcia SC (2018) Inflammatory and oxidative stress parameters as potential early biomarkers for silicosis. *Clin Chim Acta* 484:305–313. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.05.045>
- Pandey JK, Agarwal D (2012) Biomarkers: A potential prognostic tool for silicosis. *Indian J Occup Environ Med* 16:101-107. <https://doi.org/10.4103/0019-5278.111746>
- Qin C-C, Liu Y-N, Hu Y, Yang Y, Chen Z (2017) Macrophage inflammatory protein-2 as mediator of inflammation in acute liver injury. *World J Gastroenterol* 23:3043-3052. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i17.3043>
- Raffler NA, Rivera-Nieves J, Ley K (2005) L-selectin in inflammation, infection and immunity. *Drug Disc Today: Therap Strat* 2:213-220. <https://doi.org/10.1016/j.ddstr.2005.08.012>
- Rainer TH. L-selectin in health and disease (2002) *Resuscitation* 52:127-141. [https://doi.org/10.1016/S0300-9572\(01\)00444-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9572(01)00444-0)
- Reed SM, Quelle DE (2015) p53 Acetylation: Regulation and Consequences. *Cancers* 7:30-69. <https://doi.org/10.3390/cancers7010030>
- Rouault C, Pellegrinelli V, Schilch R, Cotillard A, Poitou C, Tordjman J, Sell H, Clément K, Lacasa D (2013) Roles of Chemokine Ligand-2 (CXCL2) and Neutrophils in Influencing Endothelial Cell Function and Inflammation of Human Adipose Tissue. *Endocrinology* 154:1069–1079. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1415>
- Sagiv A, Bar-Shai A, Levi N, Hatzav M, Zada L, Ovadya Y, Roitman L, Manella G, Regev O, Majewska J, Vadai E, Eilam R, Feigelson SW, Tsoory M, Tauc M, Alon R, Krizhanovsky V (2018) p53 in Bronchial Club Cells Facilitates Chronic Lung Inflammation by Promoting Senescence. *Cell Rep* 27:3468-3479. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.009>
- Sapkota M, Burnham EL, Devasure JM, Sweeter JM, Hunter CD, Duryee MJ, Klassen LW, Kharbanda KK, Sisson JH, Thiele GM, Wyatt TA (2017) Malondialdehyde-Acetaldehyde (MAA) Protein Adducts Are Found Exclusively in the Lungs of Smokers with Alcohol Use Disorders and Are Associated with Systemic Anti-MAA Antibodies. *Alcohol Clin Exp Res* 41:2093-2099. <https://doi.org/10.1111/acer.13509>
- Sato T, Takeno M, Honma K, Yamauchi H, Saito Y, Sasaki T, Morikubo H, Nagashima Y, Takagi S, Yamanaka K, Kaneko T, Ishigatsubo Y (2006) Heme oxygenase-1, a potential biomarker of chronic silicosis, attenuates silica-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 15:906-914. <https://doi.org/10.1164/rccm.200508-1237OC>
- Satpathy SR, Jala VR, Bodduluri SR, Krishnan E, Hegde B, Hoyle G, Fraig M, Luster AD, Haribabu B (2015) Crystalline silica-induced leukotrieneB₄-dependent inflammation promotes lung tumor growth. *Nat Commun* 6:1-25. <https://doi.org/10.1038/ncomms8064>

- Sellamuthu R, Umbright C, Roberts JR, Cumpston A, Mckinney W, Chen BT, Frazer D, Li S, Kashon M, Joseph P (2013) Molecular insights into the progression of crystalline silica-induced pulmonary toxicity in rats. *J Appl Toxicol* 33:301-312. <https://doi.org/10.1002/jat.2733>
- Sherif IO (2018) The effect of natural antioxidants in cyclophosphamide-induced hepatotoxicity: Role of Nrf2/HO-1 pathway. *Int Immunopharmacol* 61:29–36. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.05.007>
- Singh AK, Das VNR, Amit A, Dikhit MR, Mahantesh V, Singh SK, Naryan S, Pandey K, Pradeep DP, Verma N, Bimal S (2018) Cytokines and chemokines differentially regulate innate immune cell trafficking during post kala-azar dermal leishmaniasis. *J Cell Biochem* 0:1–13. <https://doi.org/10.1002/jcb.27048>
- Souto GR, Queiroz-Junior CM, Costa FO, Mesquita RA (2014) Smoking effect on chemokines of the human chronic periodontitis. *Immunobiology* 219:633-636. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.03.014>
- Souza TP, Watte G, Gusso AM, Souza R, Moreira JDS, Knorst MM (2017) Silicosis prevalence and risk factors in semi-precious stone mining in Brazil. *Am. J. Ind. Med* 60: 529–536. <https://doi.org/10.1002/ajim.22719>
- Sproston NR, Ashworth JJ (2018) Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front Immunol* 9:1-11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00754>
- Sui X, Zhu J, Tang H., Wang C, Zhou J, Han W, Wang X, Fang Y, Xu Y, Li D, Chen R, Ma J, Jing Z, Gu X, Pan H, He C (2015) p53 controls colorectal cancer cell invasion by inhibiting the NF- κ B-mediated activation of Fascin. *Oncotarget* 6:869- 879. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5137>
- Tavakol E, Azari M, Zendeheel R, Salehpour S, Khodakrim S, Nikoo S, Saranjam B (2017) Risk Evaluation of Construction Workers' Exposure to Silica Dust and the Possible Lung Function Impairments. *Tanaffos* 16:295-303. <https://doi.org/29849687>
- Tsilimigras DI, Sigala F, Karaolani G, Ntanasis-Stathopoulos L, Spartalis E, Spartalis M, Patelis N, Papalampros A, Long C, Moris D (2018) Cytokines as biomarkers of inflammatory response after open versus endovascular repair of abdominal aortic aneurysms: a systematic review. *Acta Pharmacol Sin* 39:1-12. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.212>
- Tuomi T, Linnainmaa M, Pennanen S (2018) Exposure to Quartz in Finnish Workplaces Declined during the First Six Years after the Signing of the NEPSI Agreement, but Evened out between 2013 and 2017. *Int J Environ Res Public Health* 15:1-12. <https://doi.org/10.3390/ijerph15050906>
- Uehara I, Tanaka N (2018) Role of p53 in the Regulation of the Inflammatory Tumor Microenvironment and Tumor Suppression. *Cancers* 10:1-13. <https://doi.org/10.3390/cancers10070219>
- WHO – World Health Organization (2007) The ILO-WHO Global Programme for the Elimination of Silicosis. *The Global Occupational Health Network*, 12:1-20.
- Wilson E, Lafferty JL, Thiboldeaux R, Tomasallo C, Grajewski B, Wozniak R, Meiman J (2018) Occupational Mercury Exposure at a Fluorescent Lamp Recycling Facility — Wisconsin, 2017. *Morb Mortal Wkly Rep* 67:763–766. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6727a3>
- Wu M-L, Layne MD, Yet S-F (2012) Heme oxygenase-1 in environmental toxin-induced lung disease. *Toxicology Mechanisms and Methods* 22:323–329. <https://doi.org/10.3109/15376516.2012.666685>
- Wyatt TA, Kharbanda KK, Mccaskill ML, Tuma DJ, Yanov D, Devasure J, Sisson JH (2012) Malondialdehyde-acetaldehyde-adducted protein inhalation causes lung injury. *Alcohol* 46:51-59. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2011.09.001>
- Zeljezic D, Mladinic M, Kopjar N, Radulovic AH (2016) Evaluation of genome damage in subjects occupationally exposed to possible carcinogens. *Toxicol Ind Health* 32:1570–1580. <https://doi.org/10.1177/0748233714568478>
- Zhang Z, Shen HM, Zhang QF, Ong CN (2000) Involvement of oxidative stress in crystalline silica-induced cytotoxicity and genotoxicity in rat alveolar macrophages. *Environ Res* 82:245-252. <https://doi.org/10.1006/enrs.1999.4025>
- Zhu X, Huang S, Zeng L, Ma J, Sun S, Zeng F, Kong F, Cheng X (2017) HMOX-1 inhibits TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in the MCF-7 breast cancer cell line. *Int J Mol Med* 40:411–417. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3027>
- Zhu Z (2018) Miltirone-induced apoptosis in cisplatin-resistant lung cancer cells through upregulation of p53 signaling pathways. *Oncol Lett* 15:8841-8846. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8440>

A silicose é conhecida como a doença ocupacional mais antiga do mundo, porém ainda acomete milhões de trabalhadores que desenvolvem atividades onde há exposição à sílica cristalina (SC), causando morte de muitos trabalhadores todos os anos, pois se trata de uma doença grave e sem cura (LI *et al.*, 2017; NIOSH, 2002). De fato, muitas organizações trabalham a fim de preservar e promover a saúde desses trabalhadores (KLAASSEN & WATKINS, 2012).

Normalmente a silicose se desenvolve após um longo período de exposição à SC, e é caracterizada pela formação de nódulos fibróticos (CARNEIRO *et al.*, 2017). Quando o indivíduo apresenta lesões fibróticas pulmonares, significa que a doença já está instalada e, além de não possuir cura, essa doença tem um caráter progressivo (BRASIL, 1978). A legislação brasileira determina que os trabalhadores devem realizar anualmente um exame de radiografia de tórax para diagnóstico da doença (BRASIL, 1978).

O uso de equipamentos de proteção individual (EPI) é extremamente importante para a prevenção da silicose. Com relação aos nossos resultados, observamos que todos os trabalhadores com silicose (WECS II) utilizaram menos EPI que os trabalhadores sem silicose (WECS I). Nossos achados estão de acordo com um estudo de Kalliny e Bassyouni (2011) realizado com trabalhadores expostos a SC, que mostraram que trabalhadores sem silicose (70%) relataram que utilizavam EPI com maior frequência do que trabalhadores com silicose (8%). Também demonstramos nesse estudo que os trabalhadores não utilizam corretamente, e que, somente o uso do EPI como medida de prevenção, não é eficaz para a prevenção da silicose.

Como o uso de EPI não é suficiente para prevenir o desenvolvimento de silicose, a investigação de novos biomarcadores periféricos capazes de detectar alterações precoces causadas pela SC tem extrema importância. Em relação aos biomarcadores inflamatórios, observamos uma diminuição na expressão da L-selectina, tanto na expressão proteica em linfócitos como na expressão gênica em células mononucleares. Nossos achados corroboram com nossos resultados anteriores (NARDI *et al.*, 2018), pois observamos uma regulação negativa significativa da expressão da proteína de superfície L-selectina em linfócitos em participantes com silicose (WECS II) em comparação com os trabalhadores dos outros grupos ($p < 0,001$). Além disso, no presente estudo, também avaliamos a expressão gênica da L-

selectina, e mostramos uma diminuição significativa na expressão gênica no grupo sem silicose (WECS I) em relação ao grupo controle (OUW) ($p < 0,05$). Com isso, estes resultados mostram que a L-selectina pode ser um potencial biomarcador periférico para o acompanhamento de monitorização ao longo do tempo de vida ocupacional em trabalhadores expostos à SC. De fato, mais estudos devem ser realizados sobre o envolvimento da L-selectina na toxicidade da sílica, com isso a avaliação periódica deste parâmetro poderia se tornar uma importante ferramenta para obter um diagnóstico precoce para a silicose.

A L-selectina desempenha um importante papel na inflamação aguda e crônica, pois é responsável pelo direcionamento de linfócitos para os linfonodos e por direcionar linfócitos e neutrófilos para o tecido inflamado (RAINER, 2002; RAFFLER *et al.*, 2005; HOBBS & NOLZ, 2017). Células T não ativadas expressam altos níveis de L-selectina na superfície, porém, quando são ativadas, liberam a L-selectina para o plasma, conseqüentemente, diminuindo sua expressão na superfície celular (RAFFLER *et al.*, 2005). Ainda, sua liberação da superfície dos leucócitos ocorre por um processo de clivagem e, conseqüentemente, sua expressão é diminuída em níveis de proteína e gene (RAFFLER *et al.*, 2005; HOBBS & NOLZ, 2017). Singh *et al.* (2018) também demonstraram uma diminuição na expressão de L-selectina em leucócitos, e sugeriram que possivelmente está relacionado ao processo de liberação durante a ativação de células inatas. A diminuição da expressão de L-selectina reduz a frequência de eventos de rolagem de neutrófilos, que são um passo limitante no recrutamento dessas células (RAINER, 2002). Outra explicação envolve o processo de internalização, quando uma molécula de adesão é incorporada de volta à membrana celular ou ao citoplasma (RAINER, 2002). No entanto, mais estudos devem ser realizados para elucidar este possível mecanismo.

A expressão gênica das quimiocinas CXCL2 e CXCL8/IL-8, componentes do sistema imunológico, envolvidos no recrutamento de neutrófilos para os locais inflamatórios, foram igualmente avaliados, e seus níveis foram significativamente diminuídos nos trabalhadores com silicose (WECS II) em comparação aos trabalhadores sem silicose (WECS I) ($p < 0,001$), bem como nos trabalhadores sem silicose (WECS I) em comparação ao grupo controle (OUW) ($p < 0,001$). Embora muitos estudos mostrem um aumento nos níveis desses marcadores (LEE *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2015; DRAGON *et al.*, 2015), nossos resultados sugerem um possível

mecanismo de regulação de *feedback negativo* na produção de CXCL2 e CXCL8/IL-8, e que a diminuição dessas quimiocinas pode estar associada a um pior prognóstico na exposição à SC. No estudo de Souto et al. (2014), também encontraram níveis significativamente menores de CXCL8/IL-8, sugerindo que esse mecanismo pode estar associado a uma deficiência na resposta inflamatória dos neutrófilos. Outros estudos explicam que a redução dos níveis de CXCL2 poderia estar envolvida na inibição do recrutamento de neutrófilos em processos inflamatórios, dificultando a realização da resposta imune (QIN *et al.*, 2017; ROUAULT *et al.*, 2013). Alguns estudos mostraram que a produção de CXCL8/IL-8 é regulada pelo Fator B Kappa Nuclear (NFκB) (HIDALGO *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2014). Sugerimos que essa regulação negativa poderia ser pela inibição da atividade do NFκB. Infelizmente, neste estudo, não avaliamos a expressão gênica do NFκB, mas pretendemos confirmar a possibilidade desta regulação em nossos futuros estudos.

Com relação aos marcadores de estresse oxidativo, mostramos recentemente, em um estudo publicado pelo nosso grupo, um aumento nos níveis de MDA em trabalhadores expostos à SC (NARDI *et al.*, 2018). No presente trabalho, os níveis de MDA foram inversamente associados à expressão gênica de quimiocinas CXCL2 e CXCL8/IL-8. Com isso, sabe-se que o MDA está relacionado a um aumento do estresse oxidativo causado pela inalação de SC e que, conseqüentemente, está associado à inflamação (NARDI *et al.*, 2018; ANLAR *et al.*, 2017). Portanto, sugerimos que a diminuição dessas quimiocinas inflamatórias estão associadas a altos níveis de estresse oxidativo e que podem promover dano tecidual e fibrose (XU *et al.*, 2014).

Também avaliamos os grupos antioxidantes endógenos mais importantes, os tióis não proteicos. Nossos resultados mostraram que os trabalhadores com silicose (WECS II) apresentaram níveis aumentados de tióis não proteicos quando comparados aos grupos controle (OUW) e sem silicose (WECS I). Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores que mostraram níveis elevados de tiol não-proteicos em estágios avançados de silicose (MIAO *et al.*, 2012, ZHANG *et al.*, 2000), sugerindo um mecanismo compensatório para proteger o organismo contra o acúmulo de espécies reativas (BRUCKER *et al.*, 2013).

Outro resultado relevante deste estudo foi a diminuição da expressão gênica da HO-1, uma importante enzima antioxidante contra a inflamação das vias aéreas induzida por ROS (SATO *et al.*, 2006). Encontramos uma diminuição significativa na

expressão gênica de HO-1 nos grupos expostos (WECS I e WECS II) comparado ao grupo controle (OUW) ($p < 0,05$). De fato, a supressão da HO-1 está relacionada ao aumento das respostas inflamatórias e do estresse oxidativo (SHERIF, 2018), resultando em aumento da permeabilidade da mucosa, hipersecreção de muco, enfisema e fibrose pulmonar (WU, 2012). Assim, sugere-se que níveis diminuídos dessa enzima estaria diretamente relacionada a um pior prognóstico nas doenças pulmonares causadas pela exposição à CS.

Em relação ao marcador de supressão tumoral p53, demonstramos uma regulação negativa significativa da expressão do gene p53 nos de trabalhadores expostos (WECS I e WECS II) comparado ao grupo controle (OUW) ($p < 0,05$). Sabe-se que o câncer de pulmão é uma consequência negativa da exposição crônica a SC, e nossos resultados se mostram impactantes, pois a perda dessa proteína aumenta a probabilidade do desenvolvimento de tumores. Nesse cenário, nossos resultados sugerem que a exposição ao SC pode aumentar o risco de desenvolvimento de câncer de pulmão em trabalhadores expostos ocupacionalmente à SC.

Este estudo apresenta algumas limitações, como o pequeno número de voluntários, especialmente nos grupos de indivíduos expostos. Além disso, a falta de avaliação da expressão proteica da CXCL2 e CXCL8/IL-8 e da expressão gênica do NFκB, que poderiam ter esclarecido melhor os mecanismos envolvidos na silicose, representa outra importante limitação. Outro ponto limitante é a ausência da avaliação dos exames de radiografia de tórax dos participantes como forma de confirmação do estado de saúde. Apesar disso, nossos dados geram informações relevantes que podem auxiliar no melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na toxicidade da SC em indivíduos ocupacionalmente expostos, além de demonstrar possíveis biomarcadores úteis no diagnóstico precoce da silicose e câncer de pulmão associados a essa exposição. Porém, estudos mais aprofundados são necessários para um melhor entendimento do envolvimento da CXCL2 e CXCL8/IL-8 com o NFκB, bem como, do envolvimento da L-selectina na fisiopatologia da silicose.

CONCLUSÕES

- Este estudo demonstrou que uso de equipamentos de proteção individual (EPI) não é suficiente para prevenir o desenvolvimento de silicose em trabalhadores ocupacionalmente expostos à SC;
- Também demonstramos que a avaliação da expressão proteica e gênica da L-selectina, assim como do perfil de expressão gênica das moléculas inflamatórias CXCL2 e CXCL8/IL-8 poderia ser útil na avaliação precoce em trabalhadores ocupacionalmente expostos a SC;
- Com relação a expressão gênica da p53, nossos resultados demonstram que a exposição à SC pode aumentar o risco de desenvolvimento de câncer;
- Corroborando com outros estudos encontrados na literatura, demonstramos que a exposição à SC induz o processo de estresse oxidativo, aumentando os níveis de MDA e de tióis não proteicos;
- Com relação a expressão gênica do HO-1, uma importante enzima antioxidante, demonstramos que a exposição a SC diminui os níveis dessa enzima, favorecendo um pior prognóstico nesses trabalhadores;
- Os resultados observados neste estudo corroboram o envolvimento do estresse oxidativo e da resposta inflamatória no desenvolvimento da silicose.

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar o perfil de expressão gênica do NFκB, afim de obter uma melhor compreensão do mecanismo envolvendo os genes CXCL2 e CXCL8/IL-8 na patologia da silicose;
- Avaliar outros possíveis marcadores associados ao processo inflamatório decorrente da exposição à sílica cristalina;
- Avaliar a quantidade de material particulado de tamanho inferior a 2,5 μm (PM_{2,5}) a que os trabalhadores estão expostos na região de estudo;
- Caracterizar o material particulado referente à quantidade de sílica cristalina presente;
- Avaliar a genotoxicidade, através dos ensaios cometa e micronúcleo;
- Obter resultados de radiografia de tórax dos dois grupos expostos à sílica cristalina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRERA, G.; PIZZIMENTI, S.; DAGA, M.; DIANZANI, C.; ARCARO, A.; CETRANGOLO, G.P.; GIORDANO, G.; CUCCI, M.A.; GRAF, M.; GENTILE, F. Lipid Peroxidation-Derived Aldehydes, 4-Hydroxynonenal and Malondialdehyde in Aging-Related Disorders. **Antioxidants**, v. 7, p. 1-17, 2018.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Pneumoconioses**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, p. 1-76, 2006.

BRASIL. Ministério do Trabalho. **NR 6 - Equipamento de Proteção Individual – EPI**, Portaria SIT n.º 25, 2001. Disponível em: <<http://trabalho.gov.br/images/Documentos/SST/NR/NR6.pdf>>. Acesso em: 28 jun 2018.

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

BROWN, T.P.; HARRISON, P.T. Crystalline silica in heated man-made vitreous fibres: a review. **Regul Toxicol Pharmacol**. v. 69, p. 152-9, 2014.

CARNEIRO, P.J.; CLEVELARIO, A.L.; PADILHA, G.A.; SILVA, J.D.; KITOKO, J.Z.; OLSEN, P.C.; CRUZ, F.F. Bosutinib therapy ameliorates lung inflammation and fibrosis in experimental silicosis. **Front Physiol**, v. 8, n. 159, p. 1–15, 2017.

CHAN, J.Y.W.; TSUI, J.C.C.; LAW, P.T.W.; SO, W.K.W.; LEUNG, D.Y.P.; SHAM, M.M.K.; TSUI, S.K.W.; CHAN, C.W.H. Regulation of TLR4 in silica-induced inflammation: An underlying mechanism of silicosis. **Int J Med Sci**, v. 15, p. 986-991, 2018.

COOKS, T.; HARRIS, C. C.; OREN, M. Caught in the cross fire: p53 in inflammation. **Carcinogenesis**, v. 35, p. 1680–1690, 2014.

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

DRISCOLL, K. E. Macrophage Inflammatory Proteins: Biology and Role in Pulmonary Inflammation. **Exp Lung Res**, v. 20, p. 473-90, 1997.

DUMAŃSKA-SŁOWIK M.; TOBOŁA, T.; JARMOŁOWICZ-SZULC, K.; NAGLIK, B.; DYLAĞ, J.; SZCZERBA, J. Inclusion study of hourglass amethyst from Boudi (Morocco) by Raman microspectroscopy and microthermometric measurements. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, v. 187, p. 156-162, 2017.

FENG, Y.; MA, X.; DENG, L.; YAO, B.; XIONG, Y.; WU, Y.; WANG L.; MA, Q.; MA, F. Role of selectins and their ligands in human implantation stage. **Glycobiology**, v. 27, p. 385–391, 2017.

FRANCHIN, M.; FREIRES, I.A.; LAZARINI, J.G.; NANI, B.D.; DA CUNHA, M.G.; COLON, D.F.; DE ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L. The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. **Eur J Med Chem**, v. 153, p. 49-55, 2018.

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

FUJITA, T.; YOSHIMOTO, T.; KAJIYA, M.; OUHARA, K.; MATSUDA, S.; TAKEMURA, T.; AKUTAGAWA, K.; TAKEDA, K.; MIZUNO, N.; KURIHARA, H. Regulation of defensive function on gingival epithelial cells can prevent periodontal disease. **Jpn Dent Sci Rev**, v. 54, p. 66-75, 2018.

GALLELLI, C.A.; CALCAGNINI, S.; ROMANO, A.; KOCZWARA, J.B.; CEGLIA, M.; DANTE, D.; VILLANI, R.; GIUDETTI, A.M.; CASSANO, T.; GAETANI, S. Modulation of the Oxidative Stress and Lipid Peroxidation by Endocannabinoids and Their Lipid Analogues. **Antioxidants**, v. 7, p. 1-44, 2018.

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

GRIFFITH, J.; SOKOL, C. L.; LUSTER A. D. Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* V. 32, p. 659–702, 2014.

GÜNDÜZÖZ, M.; BAL, C.; BÜYÜKŞEKERCI, M.; NEŞELIOĞLU, S.; ÖZİŞ, T.N.; İRITAŞ, S.; KARA, H.; EREL, Ö. Evaluation of Dynamic Disulphide/Thiol Homeostasis in Silica Exposed Workers. **Balkan Med J**, v. 34, p. 102-107, 2017.

HAMAGUCHI, Y.; NISHIZAWA, Y.; YASUI, M.; HASEGAWA, M.; KABURAGI, Y.; KOMURA, K.; NAGAOKA, T.; SAITO, E.; SHIMADA, Y.; TAKEHARA, K.; KADONO, T.; STEEBER, D.A.; TEDDER, T.F.; SATO S. Intercellular adhesion molecule-1 and L-selectin regulate bleomycin-induced lung fibrosis. **Am. J. Pathol**, v. 161, p. 1607–1618, 2002.

HOBBS, S.J.; NOLZ, J.C. Regulation of T Cell Trafficking by Enzymatic Synthesis of O-Glycans. **Front Immunol**, v. 8, p. 1-11, 2017.

HUAUX F. New developments in the understanding of immunology in silicosis. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v. 7, p. 168-173, 2007.

IARC - International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs. **Arsenic, metals, fibres and dusts**, v. 100 C, Lyon, France, 2009.

IVETIC A. A head-to-tail view of L-selectin and its impact on neutrophil behavior. **Cell Tissue Res**, v. 371, p. 437–453, 2018.

KEDROWSKI, B.L.; GUTOW, J.H.; STOCK, G.; SMITH, M.; JORDAN, C.; MASTERSON, D.S. Glutathione reductase activity with an oxidized methylated glutathione analog. **J Enzyme Inhib Med Chem**, v. 29, p. 491-494, 2014.

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

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

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

LI, J.; LIANG, C.; ZHANG, Z.K.; PAN, X.; PENG, S.; LEE, W.S.; ZHANG, B.T. TAK1 inhibition attenuates both inflammation and fibrosis in experimental pneumoconiosis. **Cell Discovery**, v. 3, p. 1-21, 2017.

LI, L.; DU, G.; WANG, D.; ZHOU, J.; JIANG, G.; JIANG, H. Overexpression of Heme Oxygenase-1 in Mesenchymal Stem Cells Augments Their Protection on Retinal Cells In Vitro and Attenuates Retinal Ischemia/Reperfusion Injury In Vivo against Oxidative Stress. **Stem Cells Int**, v. 2017 p. 1-13, 2017.

LIAO, S.; QU, Z.; LI, L.; ZHOU, B.; GAO, M.; HUANG, M.; LI, D. HSF4 transcriptional regulates HMOX-1 expression in HLECs. **Gene**, v. 655, p. 30-34, 2018.

LIU, X.; FANG, S.; LIU, H.; WANG, X.; DAI, X.; YIN, Q.; YUN, T.; WANG, W.; MAZUREK, J.M.; WOOD, J.M.; SCHLEIFF, P.L.; WEISSMAN, D.N. Surveillance for Silicosis Deaths Among Persons Aged 15–44 Years — United States, 1999–2015. **Morb Mortal Wkly**, v. 66, p. 747–752, 2017.

LOPES-PACHECO, M.; BANDEIRA, E.; MORALES, E.M.M. Terapia celular para silicosis. **Células-tronco Int**, v. 2016, p. 1-9, 2016.

LUNA-GOMES, T., SANTANA PT., COUTINHO-SILVA R. Silica-induced inflammasome activation in macrophages: role of ATP and P2X7 receptor. **Immunobiology**, v. 220, p. 1101-1106. 2015.

MAZUREK, J.M.; WOOD, J.M.; SCHLEIFF, P.L.; WEISSMAN, D.N. Surveillance for Silicosis Deaths Among Persons Aged 15-44 Years - United States, 1999–2015. **Morb Mortal Wkly**, v. 66, p. 747–752, 2017.

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

NIOSH - National Institute for Occupational Safety and Health. **Health effects of**

occupational exposure to respirable crystalline silica. Centers for Disease Control, April 2002.

OSHA - Occupational Safety and Health Administration. Crystalline Silica Exposure Health Hazard Information. U.S. **Department of Labor**, 2002. Disponível em: <https://www.osha.gov/OshDoc/data_General_Facts/crystalline-factsheet.pdf>.

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

PANDEY, J.K.; AGARWAL, D. Biomarkers: A potential prognostic tool for silicosis. **Indian J Occup Environ Med**, v. 16, p. 101-107, 2012.

PERKINS, T.N.; PEETERS, P.M.; SHUKLA, A.; ARIJS, I.; DRAGON, J.; WOUTERS, E.F.M.; REYNAERT, N.L.; MOSSMAN, B.T. Indications for distinct pathogenic mechanisms of asbestos and silica through gene expression profiling of the response of lung epithelial cells. **Human Molecular Genetics**, v. 24, p. 1374–1389, 2015.

POLLARD KM. Silica, Silicosis, and Autoimmunity. **Front Immunol**, v. 7, p. 1-7, 2016.

QIN, C-C.; LIU, Y-N.; HU, Y.; YANG, Y.; CHEN, Z. Macrophage inflammatory protein-2 as mediator of inflammation in acute liver injury. **World J Gastroenterol**. v. 23, p. 3043-3052, 2017.

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

RIMAL B, GREENBERG AK, ROM WN. Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding. **Curr Opin Pulm Med**, v. 11, p. 169-173, 2005.

SAGIV A., BAR-SHAI A., LEVI N., HATZAV M., ZADA L., OVADYA Y., ROITMAN L., MANELLA G., REGEV O., MAJEWSKA J., VADAI E., EILAM R., FEIGELSON SW., TSOORY M., TAUC M., ALON R., KRIZHANOVSKY V. p53 in Bronchial Club Cells Facilitates Chronic Lung Inflammation by Promoting Senescence. **Cell Rep**, v. 27, p. 3468-3479, 2018.

SELLAMUTHU, R.; UMBRIGHT, C.; ROBERTS, J.R.; CHAPMAN, R.; YOUNG, S.H.; RICHARDSON, D.; LEONARD, H.; MCKINNEY, W.; CHEN, B.; FRAZER, D. et al. Blood gene expression profiling detects silica exposure and toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 122, p. 253-264, 2011.

SENTELLAS, S.; MORALES-IBANEZ, O.; ZANUY, M.; ALBERTÍ, J.J. GSSG/GSH ratios in cryopreserved rat and human hepatocytes as a biomarker for drug induced oxidative stress. **Toxicology in Vitro**, v. 28, p. 1006-1015, 2014.

SPROSTON, N. R.; ASHWORTH, J. J. Role of C-Reactive Protein at Sites of

Inflammation and Infection. **Front Immunol**, v. 9, p. 1-11, 2018.

TSILIMIGRAS, D. I.; SIGALA, F.; KARAOLANIS, G.; NTANASIS-STATHOPOULOS, L.; SPARTALIS, E.; SPARTALIS, M.; PATELIS, N.; PAPALAMPROS, A.; LONG, C.; MORIS, D. Cytokines as biomarkers of inflammatory response after open versus endovascular repair of abdominal aortic aneurysms: a systematic review. **Acta Pharmacol Sin**, v. 39, p. 1164-1175, 2018.

TUOMI, T.; LINNAINMAA, M.; PENNANEN, S. Exposure to Quartz in Finnish Workplaces Declined during the First Six Years after the Signing of the NEPSI Agreement, but Evened out between 2013 and 2017. **Int J Environ Res Public Health**, v. 15, p. 1-12, 2018.

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

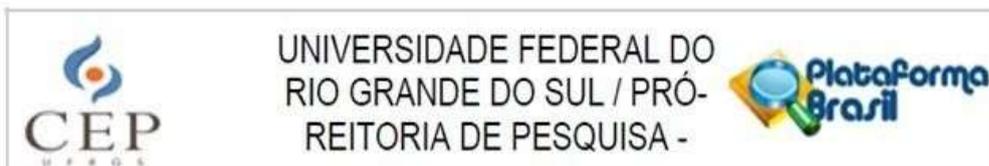
WONG, J.; MAGUN, B.E.; WOOD, L.J. Lung inflammation caused by inhaled toxicants: a review. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, v. 11, p. 1391–1401, 2016.

XU W.; SONG Y. Biomarkers for patients with trauma associated acute respiratory distress syndrome. **Mil Med Res**, v. 4, p. 2-7, 2017.

ZHU, X.; HUANG, S.; ZENG, L.; MA, J.; SUN, S.; ZENG, F.; KONG, F.; CHENG, X. HMOX-1 inhibits TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in the MCF-7 breast cancer cell line. **Int J Mol Med**, v. 40, p. 411–417, 2017.

ANEXO I

Documento de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Solange Cristina Garcia

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 3

CAAE: 60976516.7.0000.5347

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.868.122

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

PORTO ALEGRE, 15 de Dezembro de 2016

Assinado por:

MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
(Coordenador)

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

ANEXO II

Documento de aprovação na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Solange Cristina Garcia

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 4

CAAE: 60976516.7.0000.5347

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.006.409

Considerações Finais a critério da CONEP:

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

Situação: Protocolo aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

BRASILIA, 08 de Abril de 2017

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador)

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

ANEXO III

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO DE INDIVÍDUOS NÃO EXPOSTOS OCUPACIONALMENTE

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

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

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

Também será realizada a coleta de amostras biológicas (sangue, urina, células da mucosa da boca e fluido nasal). Esta coleta será realizada no seu local de trabalho, em um único dia que será agendado com você conforme sua disponibilidade. Realizaremos alguns exames que são de rotina em laboratório de análises clínicas, como hemograma, exames de avaliação dos rins e fígado, e alguns outros, como avaliação do DNA e inflamação, que somente realizamos no laboratório de Toxicologia na Faculdade de Farmácia da UFRGS. Para a realização dos exames, será necessário que você fique em jejum por pelo menos 8h, e, após os exames, vamos

fornecer um pequeno lanche para você.

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

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

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

Para a avaliação da sua função pulmonar você realizará um exame chamado espirometria, que é um teste em que se mede a quantidade de ar que entra e que sai dos pulmões. Para isso, você deverá assoprar em um equipamento chamado de espirômetro. Além deste, você realizará um Raio-X dos pulmões, que acontecerá em dia e local a ser combinado. Existem riscos de ocorrer mudanças no corpo que levem

ao desenvolvimento de câncer, pois o exame envolve radiação. Porém, a quantidade de radiação que você será exposto é muito baixa, e pesquisas científicas mostram que o risco maior acontece quando são realizados exames repetidamente, ou seja, por muitas vezes durante a vida. Todos os custos referentes ao seu deslocamento e de um acompanhante, caso seja necessário, e à realização destes exames são de responsabilidade dos responsáveis pela pesquisa.

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

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

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

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

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é

obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber nas instituições envolvidas.

Você poderá solicitar a retirada das informações e do material biológico a qualquer momento, bastando solicitar por escrito ao responsável pelo projeto.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos. Caso ocorra alguma intercorrência ou dano resultantes de sua participação na pesquisa, você tem direito à indenização e receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

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

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

Aceito que minhas amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

Não aceito que minhas amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

Nome do Participante: _____

Assinatura: _____

Nome do Pesquisador: _____

Assinatura: _____

(pesquisador que aplicou o Termo)

Local e data: _____

ANEXO IV

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO EXPOSTOS À SILICA E SILICÓTIOS

Você está sendo convidado a participar da pesquisa **“AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES PRECOSES NA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL À SÍLICA E A ASBESTO”**. Este trabalho tem como pesquisadora responsável a professora Dr^a. Solange Cristina Garcia da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Em seu ambiente de trabalho, você está diariamente exposto à sílica, um material que compõe as rochas e o solo, e é liberado sempre que se praticam atividades onde acontece a quebra das rochas (como nas pedreiras, por exemplo). A sílica é conhecida por causar diversos problemas no corpo humano, principalmente nos pulmões, inclusive câncer. Por este motivo, este trabalho pretende avaliar alguns efeitos desta exposição à sílica sobre a sua saúde. Se você aceitar participar desse estudo, você responderá um questionário sobre sua saúde, o uso de medicamentos, seus hábitos de vida e atividades exercidas no seu trabalho. Este questionário será realizado no dia da coleta e deve necessitar de aproximadamente 20 minutos para ser preenchido. Além do questionário, coletaremos amostras biológicas (sangue, urina, células da mucosa da boca e fluido nasal) e faremos exames para avaliar sua função pulmonar.

A coleta de amostras biológicas será realizada no seu local de trabalho, em um único dia que será agendado conforme sua disponibilidade. Essas amostras serão usadas para realizar alguns exames que são de rotina em um laboratório de análises clínicas, como hemograma, exames de avaliação dos rins e fígado, e alguns outros, como avaliação do DNA e inflamação, que somente realizamos no laboratório de Toxicologia na Faculdade de Farmácia da UFRGS.

Para a realização dos exames, será necessário que você fique em jejum por pelo menos 8h, e, após os exames, vamos fornecer um pequeno lanche para você. Para a coleta de sangue, o material utilizado é único para cada indivíduo. Será coletada uma amostra de aproximadamente 24 mL de sangue, cerca de 4 colheres de chá. No momento da coleta poderá haver alguma dor leve decorrente da perfuração da pele. É possível que aconteça algum tipo de mal-estar, tontura e até mesmo desmaios durante a coleta, mas essas situações são raras. Poderá aparecer algum hematoma (mancha roxa) no local da coleta do sangue, mas o mesmo desaparece

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é

obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber nas instituições envolvidas. Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo relacionado aos procedimentos envolvidos. Caso ocorra alguma intercorrência ou dano resultantes de sua participação na pesquisa, você tem direito à indenização e receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

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

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

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

Nome do Participante: _____

Assinatura: _____

Nome do Pesquisador: _____

Assinatura: _____

Local e data: _____

ANEXO V

QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO

Entrevistador: _____ Data: _____

INFORMAÇÕES PESSOAIS

Nome: _____

Código: _____

Idade: _____ Etnia: _____ Altura: _____ Peso: _____

Empresa: _____

Até que ano você estudou?

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

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

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

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

- () Rede geral de distribuição
- () Poço ou nascente
- () Outro meio

A rua da sua residência é:

- () Asfaltada/pavimentada
- () Terra/cascalho

INFORMAÇÕES SOBRE O TRABALHO

Há quanto tempo você trabalha na empresa? _____

Qual é o cargo que exerce na empresa? _____

Em qual setor da empresa trabalha? _____

Qual é sua carga horária diária de trabalho? _____

Quantos dias por semana você trabalha? _____

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

Quais Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) você utiliza?

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

Existem outros Equipamentos de Proteção Individual na empresa que você trabalha?

Se sim, quais? _____

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

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

()

()

()



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

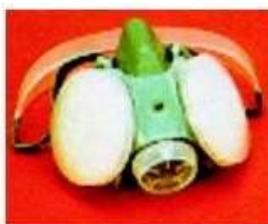


Fig. 14:
Respirador
do tipo
peça
semifacial
com filtro
P3



▲ Fig. 15:
Respirador do tipo peça
semifacial descartável PFF3

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

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

As roupas que utiliza no trabalho são lavadas em casa? () Sim () Não
Se sim, quem as lava? _____

Essa pessoa tem/teve problemas respiratórios? () Sim () Não
Se sim, qual: _____

INFORMAÇÕES DE SAÚDE E HÁBITOS DE VIDA

Na sua opinião, como está seu estado de saúde?

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

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

Tem o hábito de fumar? () Sim () Não

Se sim, fuma há quantos anos? _____

Quantos cigarros por dia? _____

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

Se sim, por quanto tempo? _____

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

Consome bebidas alcoólicas? () Sim () Não

Se sim, qual bebida e qual quantidade, aproximadamente? _____

Com que frequência?

() 4 ou mais vezes por semana

() até 3 vezes por semana

() até 2 vezes por semana

() até 2 vezes por mês

Consumiu bebidas alcoólicas nos últimos 2 dias? Qual? _____

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

Se sim, especifique quem e quais problemas: _____

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

Se sim, especifique qual: _____

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

Se sim, especifique qual: _____

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

Se sim, especifique qual: _____

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

() Sim () Não

Se sim, qual medicamento e por qual motivo: _____

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

Se sim, especifique qual: _____

Pratica atividades físicas? () Sim () Não

Se sim, especifique qual e com que frequência: _____

ALIMENTAÇÃO - Com que frequência consome os alimentos listados abaixo:

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