

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

POTENCIAIS EFEITOS TÓXICOS DE XENOBIÓTICOS AMBIENTAIS SOBRE A
SAÚDE INFANTIL NO MEIO RURAL

SABRINA NUNES DO NASCIMENTO

PORTO ALEGRE, 2017

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

POTENCIAIS EFEITOS TÓXICOS DE XENOBIÓTICOS AMBIENTAIS SOBRE A
SAÚDE INFANTIL NO MEIO RURAL

Tese apresentada por **Sabrina Nunes do Nascimento** como pré-requisito para obtenção do TÍTULO DE DOUTORA em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Solange Cristina Garcia

PORTO ALEGRE, 2017

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

Profa. Dra. Angela Maria Moro

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

Profa. Dra. Natália Brucker

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Prof. Dr. Marcelo Dutra Arbo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Diogo André Pilger (Banca Suplente)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

NUNES DO NASCIMENTO, SABRINA
POTENCIAIS EFEITOS TÓXICOS DE XENOBIÓTICOS
AMBIENTAIS SOBRE A SAÚDE INFANTIL NO MEIO RURAL /
SABRINA NUNES DO NASCIMENTO. -- 2017.
167 f.
Orientador: SOLANGE CRISTINA GARCIA.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-
RS, 2017.

1. Toxicologia . 2. Xenobióticos ambientais. 3.
Saúde infantil. 4. Efeitos adversos à saúde. I.
GARCIA, SOLANGE CRISTINA, orient. II. Título.

Agradecimentos ao CNPq, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, bem como disponibilizou os recursos financeiros necessários para a sua execução; ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) pelo fomento e estrutura disponibilizados; às Escolas do município de Agudo-RS: E.M.E.F. Três de Maio, E.M.E.F. Sete de Setembro e E.E.E.B. Dom Erico Ferrari; ao PPGCF; à Faculdade de Farmácia e ao Laboratório de Toxicologia (LATOX) desta Universidade.

“ Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende. ” (Leonardo da Vinci)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida e saúde, e por permitir que eu pudesse realizar os meus objetivos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Solange Cristina Garcia, por sempre me apoiar, incentivar e por acreditar em mim, desde a Iniciação Científica até a conclusão do Doutorado. Agradeço pelos ensinamentos e por ter colaborado no meu crescimento pessoal e científico.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituição na qual tenho muito orgulho de ter realizado toda a minha formação acadêmica.

À Faculdade de Farmácia da UFRGS, que foi a minha segunda casa durante os últimos 10 anos, bem como aos funcionários e amigos desta Unidade.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da UFRGS, pela oportunidade de realizar o Doutorado.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida durante a realização do Doutorado.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo fomento e estrutura disponibilizados para que análises deste Doutorado fossem realizadas.

Aos colaboradores deste trabalho, em especial à: Profa. Dra. Adriana Gioda, Profa. Dra. Tatiana Saint' Pierre, Profa. Dra. Jerusa Fumagalli de Salles, Dra. Tania Weber Furlanetto e ao Prof. Dr. Rafael Vaz Machry.

Ao município de Agudo-RS, especialmente às suas escolas: E.M.E.F. Três de Maio, E.M.E.F. Sete de Setembro e E.E.E.B. Dom Erico Ferrari.

Ao Laboratório de Toxicologia (LATOX) da Faculdade de Farmácia da UFRGS, aos colegas e amigos que auxiliaram na execução deste trabalho, ensinando-me o verdadeiro significado da palavra "equipe", em especial aos amigos: Gabi, Bruna, Elisa, Jé, Lari, Carol, Nury, Guilherme, Marcelo e a todos os alunos de Iniciação Científica que passaram pelo LATOX e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À minha família, pelo amor, respeito, incentivo e apoio durante toda a minha vida e formação acadêmica, especialmente à minha mãe Cristina. Ao meu noivo André, pelo amor, companheirismo, carinho, apoio e compreensão.

A todos os meus amigos, pelas palavras de incentivo e carinho, sempre muito bem-vindas.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente colaboraram para que eu chegasse até aqui, concluindo esta importante etapa da minha caminhada acadêmica. Muito obrigada!

APRESENTAÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

Nas últimas décadas, tem ocorrido, em todo o mundo, uma maior preocupação em relação ao aumento na incidência de doenças infantis antes consideradas raras, como câncer, diabetes, desordens neurocomportamentais e desregulação endócrina. Concomitantemente, há um maior reconhecimento de que agentes químicos podem estar envolvidos na fisiopatologia dessas doenças. No ambiente rural, além dos próprios agricultores, as crianças também se encontram expostas a diversos xenobióticos provenientes das atividades agrícolas, incluindo agrotóxicos, metais, nicotina e solventes. Nesta linha, o presente estudo avaliou a exposição ambiental de crianças, filhas de agricultores da região central do RS, em períodos diferentes do ano, através da quantificação de biomarcadores de exposição a metais, agrotóxicos, nicotina e solventes, biomarcadores de dano oxidativo e renal, bem como dosagens hormonais e bioquímicas. Também, possíveis alterações na tireoide foram avaliadas através de exame ultrassonográfico da glândula. No capítulo I, níveis aumentados de cromo (Cr) no sangue, cotinina urinária e microalbuminúria foram encontrados nas crianças em um período de início da aplicação de agrotóxicos, bem como observou-se aumento nos biomarcadores de dano oxidativo malondialdeído (MDA) e proteínas carboniladas (PCO), em relação ao período de colheita do tabaco. Os biomarcadores de exposição (Cr e cotinina) foram associados ao aumento do dano oxidativo. Adicionalmente, os níveis aumentados de Cr foram associados com diminuição de linfócitos e aumento de basófilos. No capítulo II, observamos que alguns metais, especialmente o manganês (Mn) e Cr, apresentavam níveis cronicamente aumentados nas crianças, uma vez que estes estavam acima dos valores de referência recomendados, tanto no sangue quanto no cabelo, nos períodos de baixa e alta exposição aos agrotóxicos. Ambos os metais foram associados a alterações nos níveis circulantes de hormônios tireoidianos (HT), sugerindo possível efeito de desregulação endócrina sobre a glândula tireoide. Os níveis de Mn no cabelo foram, também, associados ao aumento da prolactina sérica nos dois períodos estudados, sugerindo possível efeito adverso dopaminérgico do metal. Outros metais, como arsênio (As) e níquel (Ni) apresentaram níveis elevados no sangue e cabelo no período de alta exposição a agrotóxicos em comparação ao período de baixa exposição. Além do Cr e Mn,

chumbo (Pb) e mercúrio (Hg) parecem ter influência sobre os níveis de HT, estando associados ao aumento de hormônio estimulante da tireoide (TSH) e diminuição do hormônio tiroxina (T₄) livre. Adicionalmente, inibição da enzima butirilcolinesterase (BuChE) sérica foi observada no período de alta exposição aos agrotóxicos em relação ao período de baixa exposição, sugerindo exposição aos inseticidas inibidores da colinesterase. Em relação aos parâmetros bioquímicos avaliados, níveis de glicemia de jejum foram significativamente aumentados no período de alta exposição aos agrotóxicos e foram inversamente associados com a atividade da BuChE, indicando um possível efeito adverso dos inseticidas inibidores da colinesterase sobre a homeostase da glicose. As crianças também apresentaram perfil lipídico aumentado nos dois períodos estudados. Portanto, nossos dados, tomados em conjunto, sugerem que crianças residentes no meio rural, são ambientalmente expostas a diferentes xenobióticos, podendo apresentar alterações hematológicas, alterações dos hormônios tireoidianos, dano lipídico, proteico e renal. Tais alterações possivelmente estão relacionadas à co-exposição a diferentes xenobióticos envolvidos nas práticas agrícolas, especialmente metais, agrotóxicos e nicotina. Nossos resultados mostram que, de fato, os xenobióticos ambientais representam fortes determinantes de saúde infantil, podendo estar envolvidos no desenvolvimento de alterações fisiopatológicas e doenças como diabetes, câncer, desordens neurológicas, entre outras.

Palavras-chave: Crianças; xenobióticos ambientais; ambiente rural; dano oxidativo; dano renal; desregulação endócrina.

ABSTRACT

Potential toxic effects of environmental xenobiotics on children's health in the rural environment

In the last decades, there has been concern worldwide about the increasing incidence of previously rare childhood diseases such as cancer, diabetes, neurobehavioral disorders, and endocrine disruption. Concomitantly, there is greater recognition that chemical agents may be involved in the pathophysiology of these diseases. In the rural environment, in addition to the farmers themselves, children are also exposed to various xenobiotics from agricultural activities, including pesticides, metals, nicotine and solvents. In this line, the present study evaluated the environmental exposure of children, whose parents were farmers in the central region of RS, during different periods of the year, through the quantification of biomarkers of exposure to metals, pesticides, nicotine, and solvents, biomarkers of oxidative and renal damages, as well as hormones and biochemical parameters quantifications. In addition, possible alterations on thyroid was evaluated through ultrasonography examination of the gland. In the chapter I, increased blood levels of chromium (Cr), urinary cotinine and microalbuminuria were found in children at the beginning of the pesticides application period, as well as an increase in the biomarkers of oxidative damage malondialdehyde (MDA) and protein carbonyls (PCO), in relation to the tobacco harvest period, were observed. The biomarkers of exposure (Cr and cotinine) were associated with increased oxidative damage. Additionally, increased Cr levels were associated with decreased lymphocytes and increased basophils. In the chapter II, we observed that some metals, mainly manganese (Mn) and Cr, showed levels chronically elevated in children, as they were above the recommended reference values in both blood and hair in the two periods. Both metals were associated with changes in the circulating levels of thyroid hormones (TH), suggesting possible effect of endocrine disruption on the thyroid gland. The hair Mn levels were also associated with increased serum prolactin in the two studied periods, suggesting a possible dopaminergic adverse effect of this metal. Other metals, such as arsenic (As) and nickel (Ni), had high blood and hair levels in the period of high exposure to pesticides compared to the period of low exposure. In

addition to Cr and Mn, lead (Pb) and mercury (Hg) can influence TH levels, being associated with increased TSH and decreased free T₄ levels. In addition, inhibition of the enzyme butyrylcholinesterase (BuChE) was observed in the period of high exposure to pesticides in relation to the period of low exposure, suggesting exposure to cholinesterase inhibitors insecticides. Regarding the biochemical parameters evaluated, fasting blood glucose levels were significantly increased during the period of high exposure to pesticides and were inversely associated with BuChE activity, indicating a possible endocrine disrupting effect of cholinesterase inhibitors insecticides on glucose homeostasis. The children also had an increased lipid profile in both studied periods. Therefore, our data, taken together, suggest that children environmentally exposed to xenobiotics in rural areas may present hematological alterations, changes in thyroid hormones, lipid, protein and renal damage. Such alterations were related to co-exposure to different xenobiotics involved in agricultural practices, mainly metals, agrochemicals and nicotine. Our results showed that, in fact, environmental xenobiotics represent strong determinants of childhood health, and may be involved in the development of physiopathological alterations and diseases like diabetes, cancer, neuropsychological disorders, among others.

Keywords: Children; environmental xenobiotics; rural environment; oxidative damage; kidney damage; endocrine disruption.

LISTA DE FIGURAS

PARTE I

- Figura 1.** Fatores que influenciam a exposição ambiental e consequências para a saúde de crianças em áreas rurais.....28
- Figura 2.** Esquema toxicocinético e toxicodinâmico ilustrando como os xenobióticos ambientais interagem com o organismo.....32
- Figura 3.** Efeito adverso do Mn sobre a produção de prolactina que, por sua vez, tem a sua secreção modulada pelo neurotransmissor dopamina43
- Figura 4.** Controle da produção de hormônios tireoidianos (T₃ e T₄) no eixo hipotálamo-pituitária-tireoide (HPT) baseado em *feedback* negativo: o TSH produzido na hipófise estimula a produção de T₃ e T₄ na tireoide, sendo que altos níveis de T₃ e/ou T₄ circulantes suprimem a produção de TSH pela hipófise.....55
- Figura 5.** Diferentes níveis pelos quais os DEs podem agir sobre os hormônios tireoidianos. HT: hormônios tireoidianos; TR: receptores de hormônios tireoidianos; T₄-G: T₄-glicuronídeo; T₃-G: T₃-glicuronídeo; UDP-GT: difosfato de uridina glucuronosiltransferase.....56
- Figura 6.** Esquema representativo do sistema de defesa antioxidante endógeno65

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE	- Acetilcolinesterase
ALA	- Ácido δ -aminolevulinato
ALAD	- Ácido δ -aminolevulinato desidratase
Anti-TPO	- Anticorpos anti-tireoperoxidase
As	- Arsênio
ATSDR	- Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças
BuChE	- Butirilcolinesterase
CAT	- Catalase
Cd	- Cádmiio
CDC	- Centro para Controle de Doenças e Prevenção
CG	- Cromatografia gasosa
ChE	- Colinesterase
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
CNPq	- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Co	- Cobalto
Cr	- Cromo
Cu	- Cobre
DEs	- Desreguladores endócrinos
DIT	- Diodotirosina
DNA	- Ácido desorribonucleico
DP	- Doença de Parkinson
E.E.E.B	- Escola Estadual de Educação Básica
E.M.E.F	- Escola Municipal de Ensino Fundamental
EPA US	- Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
EROs	- Espécies reativas de oxigênio
ERNs	- Espécies reativas de nitrogênio
EUA	- Estados Unidos da América
Fe	- Ferro
GSH-Px	- Glutathiona peroxidase
GR	- Glutathiona redutase
GSH	- Glutathiona reduzida

GSSG	- Glutathiona dissulfeto/oxidada
GST	- Glutathiona S-transferase
HCPA	- Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HDL	- Lipoproteína de alta densidade
Hg	- Mercúrio
HPT	- Eixo Hipotálamo-hipófise-tireoide
HT	- Hormônios tireoidianos
IARC	- Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
IMC	- Índice de massa corporal
KIM-1	- Molécula de injúria renal-1
LATOX	- Laboratório de Toxicologia
LDL	- Lipoproteína de baixa densidade
mALB	- Microalbuminúria
MDA	- Malondialdeído
MeHg	- Metilmercúrio
MIT	- Monoiodotirosina
Mn	- Manganês
MN	- Micronúcleos
Mo	- Molibdênio
NAG	- N-acetil- β -D-glicosaminidase
Ni	- Níquel
Pb	- Chumbo
PBG	- Porfobilinogênio
PCO	- Proteínas carboniladas
PPGCF	- Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas
QI	- Quociente de inteligência
OFs	- Organofosforados
OMS	- Organização Mundial de Saúde
RS	- Rio Grande do Sul
Se	- Selênio
SOD	- Superóxido dismutase
T ₃	- Triiodotironina (3,5,3'-L-triiodotironina)
T ₄	- Tiroxina (3,4,3',5'-L-tetraiodotironina)

TBA	- Ácido tiobarbitúrico
TBARS	- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCEP	- Tris [2-carboxietil] hidrocloreto de fosfina
Tg	- Tireoglobulina
TPO	- Tireoide peroxidase
TR	- Receptores tireoidianos
TRH	- TSH <i>releasing hormone</i>
TSH	- Tireotrofina ou hormônio estimulante da tireoide
UFRGS	- Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Zn	- Zinco

SUMÁRIO

PARTE I	25
INTRODUÇÃO	27
1. Saúde Infantil e Ambiente Rural.....	27
2. Suscetibilidade de Crianças e Adolescentes.....	29
3. Avaliação da Exposição Ambiental a Xenobióticos.....	30
3.1 Monitoramento Ambiental e Biomonitoramento	30
3.1.1 Amostras Biológicas.....	33
4. Atividades Agrícolas e Exposição a Xenobióticos no Ambiente Rural	34
4.1 Exposição a Agrotóxicos e Efeitos sobre a Saúde Infantil	34
4.2 Exposição a Metais e Efeitos sobre a Saúde Infantil	38
4.2.1 Manganês	40
4.2.2 Arsênio	43
4.2.3 Cádmio	45
4.2.4 Chumbo	46
4.2.5 Cromo	48
4.2.6 Mercúrio.....	49
4.2.7 Níquel.....	50
4.3 Exposição à Nicotina e Efeitos sobre a Saúde Infantil.....	50
5. Desreguladores Endócrinos (DEs).....	52
5.1 Efeitos dos DEs Ambientais Sobre a Glândula Tireoide	53
6. Co-exposições a agentes químicos	58
7. Estresse Oxidativo	60
7.1 Biomarcadores do Estresse Oxidativo	62
OBJETIVOS	67
1. Objetivos Gerais	67
2. Objetivos Específicos.....	67
PARTE II	69
CAPÍTULO I	71
Environmental exposure and effects on health of children from a tobacco-producing region.....	73
CAPÍTULO II	89

Environmental chemicals exposure and endocrine disruption in children from a rural area.....	91
PARTE III.....	127
DISCUSSÃO	129
CONCLUSÕES	137
PERSPECTIVAS	139
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141
ANEXOS	163
Anexo I.....	163
Comprovante de aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).	
Anexo II.....	164
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado pelos pais/responsáveis pelos participantes do estudo.	
Anexo III.....	165
Termo de Assentimento assinado pelos participantes do estudo.	
Anexo IV.....	166
Questionário aplicado aos pais/responsáveis pelos participantes do estudo.	

PARTE I



INTRODUÇÃO

1. Saúde Infantil e Ambiente Rural

Nas últimas décadas, tem ocorrido um rápido crescimento da preocupação em relação à saúde ambiental infantil em todo o mundo, especialmente devido à contaminação do meio ambiente por agentes químicos resultantes de atividades industriais, exploração mineral e produção agrícola (MELLO-DA-SILVA e FRUCHTENGARTEN, 2005; LANDRIGAN, 2016). Esse interesse pode ser atribuído, principalmente, pelo significativo aumento na prevalência de desvios do desenvolvimento fisiológico normal e na incidência de muitas patologias pediátricas, anteriormente consideradas raras, tais como asma, câncer, autismo, déficits de atenção e hiperatividade, malformações congênitas, obesidade e diabetes. Paralelamente, houve um aumento no reconhecimento de que exposições ambientais durante a infância representam fortes determinantes de saúde e doenças (KARR, 2012; CASTRO-CORREIA e FONTOURA, 2015; LANDRIGAN, 2016).

Além de uma preocupação da sociedade atual, a consciência deste problema tem se tornado um importante tema de debate na comunidade científica internacional, que procura respostas sobre mecanismos de ação dos xenobióticos ambientais na saúde infantil e suas consequências ao longo da vida (CASTRO-CORREIA e FONTOURA, 2015). De acordo com um atlas sobre saúde infantil e ambiente publicado em 2017 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), os agentes químicos representam riscos ambientais emergentes. Novos compostos químicos como metais, asbestos, agrotóxicos e lixo eletrônico, utilizados diariamente possuem o potencial de afetar a função reprodutiva, função tireoidiana e desenvolvimento neurológico, podendo levar a câncer, desordens metabólicas, entre outras doenças. Um fator importante nesse sentido é o reconhecimento da ocorrência de exposições combinadas a diversos agentes químicos como, por exemplo, a combinação de novos agentes com contaminantes ambientais persistentes, como metais (OMS, 2017).

Crianças que vivem no meio rural estão constantemente expostas a todos os riscos inerentes às atividades agrícolas. De acordo com Marin e colaboradores (2013), os agricultores vinculados à Federação dos Trabalhadores da Agricultura no

Rio Grande do Sul (Fetag) e à Federação dos Trabalhadores da Agricultura Familiar da Região Sul (FetraF-Sul), não admitem que haja “trabalho infantil”, mas sim “ajuda” dos filhos, crianças e adolescentes, nas atividades produtivas e domésticas, como parte integrante de socialização das novas gerações. Comumente na faixa etária dos 7 aos 10 anos de idade, as crianças começam a assistir as operações agrícolas desenvolvidas pelos seus pais, o que muitas vezes é considerado um rito de passagem. De acordo com a Figura 1, os riscos físicos, biológicos e químicos ocupacionais e ambientais a que estes jovens estão expostos incluem ferimentos graves a partir do contato com maquinarias e animais, ruídos de maquinarias, além do contato com xenobióticos diversos, incluindo agrotóxicos, metais, solventes, entre outros (LANDRIGAN e ETZEL, 2014).

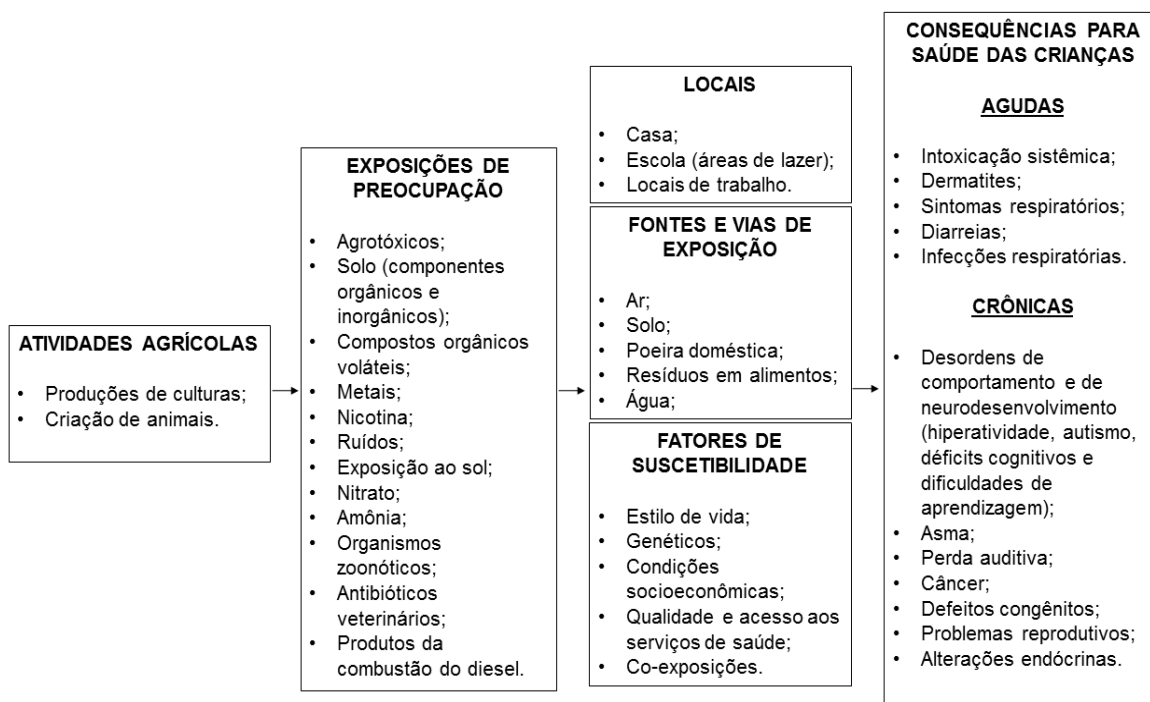


Figura 1. Fatores que influenciam a exposição ambiental e consequências para a saúde de crianças e adolescentes em áreas rurais (Adaptado de KARR, 2012).

A dificuldade de acesso aos serviços de saúde é uma realidade no meio rural, aumentando a vulnerabilidade das crianças ao adoecimento. A falta de acompanhamento do crescimento e desenvolvimento infantil torna difícil a avaliação de como o ambiente está influenciando a saúde da criança (MARIN *et al.*, 2013). A saúde ambiental de crianças em áreas rurais é ainda muito pouco explorada no Brasil, havendo carência de estudos demonstrando os riscos adversos que estas estão expostas nestes locais.

2. Suscetibilidade de Crianças e Adolescentes

Durante a vida intra-uterina e infância, diversos tecidos e sistemas estão se desenvolvendo. O desenvolvimento é um processo plástico que é sensível a perturbações ambientais incluindo a nutrição, estresse, drogas e contaminantes ambientais (HEINDEL *et al.*, 2015). Atualmente, há o reconhecimento de que fetos e crianças nos primeiros anos de vida são especialmente vulneráveis aos efeitos de contaminantes ambientais que interferem em processos do desenvolvimento. Isso, porque se sabe que exposições ambientais neste período podem causar mudanças permanentes na estrutura do organismo, fisiologia e metabolismo, levando a uma pré-disposição ao desenvolvimento de sérias patologias crônicas ao longo da vida, tais como obesidade, diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares, asma, alergias, doenças imunes e autoimunes, desordens de neurodesenvolvimento e doenças neurodegenerativas, alterações no período da puberdade, alterações endócrinas, infertilidade, câncer, depressão e desordens psiquiátricas (HEINDEL *et al.*, 2015; VRIJHEID *et al.*, 2016).

No entanto, alguns sistemas continuam a se desenvolver durante a infância até o início da vida adulta, como o sistema nervoso central e os sistemas respiratório e imunológico (HEINDEL *et al.*, 2015). Há períodos críticos do desenvolvimento humano durante a vida intra-uterina, pós-natal e puberdade, nos quais o organismo é particularmente suscetível a efeitos desreguladores, sendo que exposições a agentes químicos ambientais nesses períodos podem levar a alterações epigenéticas, resultando em efeitos adversos (CHOI *et al.*, 2017).

Adicionalmente ao reconhecimento de que exposições ambientais a agentes químicos são importantes causas de doenças e disfunções em crianças e adolescentes, maior atenção tem sido dada à prevenção destas exposições, aumentando a qualidade de vida e reduzindo os custos com saúde. Além do fato de que as crianças são mais suscetíveis aos efeitos adversos de agentes químicos devido ao seu desenvolvimento, há outros fatores que influenciam a sua vulnerabilidade, principalmente devido às suas características fisiológicas. Comparadas aos adultos, as crianças consomem mais alimentos e bebem mais água, além de respirarem mais ar por peso corporal, portanto, apresentam proporcionalmente maior exposição a agentes químicos. Além disso, as suas vias

metabólicas são imaturas e, conseqüentemente, são incapazes de rapidamente detoxificar e excretar os agentes químicos. O mesmo ocorre com o sistema imunológico que, por ainda ser imaturo, não fornece a mesma capacidade de proteção em relação aos adultos. Ainda, as crianças apresentam alguns comportamentos que ocasionam aumento no risco de exposição, como brincar próximo ao solo e levar a mão à boca frequentemente. Portanto, baseado nestes fatores, crianças e adolescentes que vivem em ambientes rurais com contaminação do solo, água, alimentos e ar estão constantemente em maior risco de exposição a agentes químicos em relação aos adultos (MELLO-DA-SILVA e FRUCHTENGARTEN, 2005; KARR, 2012; CHEN *et al.*, 2015; LANDRIGAN, 2016).

Dessa forma, é extremamente importante monitorar os níveis de exposição a esses xenobióticos nessas populações, com o intuito de minimizar o risco de efeitos adversos à saúde e doenças relacionadas (CHOI *et al.*, 2017).

3. Avaliação da Exposição Ambiental a Xenobióticos

Na Toxicologia Ambiental, estudam-se os efeitos nocivos causados pela interação de agentes químicos presentes no ambiente (água, solo, ar) com os organismos humanos. Quando se está realizando a avaliação da exposição humana a uma substância química, três etapas devem ser incluídas: 1) caracterização da fonte de exposição; 2) identificação dos meios de exposição (água, solo, ar, contato direto ou por alimentos); 3) quantificação da exposição (OGA *et al.*, 2014).

3.1 Monitoramento Ambiental e Biomonitoramento

O monitoramento é definido como uma atividade sistemática de medidas e interpretações, realizado com o objetivo de prevenir o aparecimento de efeitos adversos decorrentes de uma exposição (MOREAU e SIQUEIRA, 2016). Existem dois métodos de monitoramento para proteger a saúde humana em caso de exposição a substâncias químicas, monitoramento ambiental e biomonitoramento, sendo que ambos se complementam na avaliação total da exposição sob a qual o indivíduo encontra-se exposto (MANNO *et al.*, 2010).

No monitoramento ambiental, a exposição humana a xenobióticos pode ser indiretamente estimada através da medida da concentração do agente químico,

físico ou biológico em amostras ambientais, como ar, água, solo, etc. O monitoramento ambiental se faz necessário para identificar as fontes de exposição, facilitando a tomada de medidas para minimizar as emissões (AMORIM, 2003; ANGERER *et al.*, 2007).

O biomonitoramento consiste na medida de parâmetros químicos, bioquímicos ou biológicos, denominados indicadores biológicos ou biomarcadores, em amostras biológicas diversas, incluindo sangue, urina, entre outras (AMORIM, 2003; ANGERER *et al.*, 2007; BUDNIK e BAUER, 2009; MOREAU e SIQUEIRA, 2016; TERRY *et al.*, 2016). O principal objetivo do biomonitoramento é avaliar a exposição e os riscos à saúde, comparando os dados obtidos com valores de referência e, se necessário, realizar ações corretivas (ANGERER *et al.*, 2007). Para tanto, é importante que haja uma correlação dos biomarcadores com a exposição ou com a eventual ação do xenobiótico no organismo (MOREAU e SIQUEIRA, 2016). O biomonitoramento foi inicialmente definido como “medida de uma substância ou seus metabólitos em fluidos biológicos, incluindo sangue e urina”. No entanto, o clássico monitoramento da exposição, agora, é complementado por análises de biomonitoramento adicionais, como o estudo de aductos de DNA, alterações em atividades enzimáticas, formação de micronúcleos, entre outros (BUDNIK e BAUER, 2009).

Quando se determina a concentração do xenobiótico ou seu metabólito em amostra biológica, isto é, quando o biomarcador de exposição está sendo quantificado, é importante conhecer como a substância é absorvida pelas diferentes vias, distribuída para os diferentes compartimentos do organismo, metabolizada e excretada, ou seja, a toxicocinética do xenobiótico precisa ser conhecida (AMORIM, 2003; TERRY *et al.*, 2016). Adicionalmente, a avaliação da interação entre o xenobiótico e os diferentes órgãos se dá através da investigação de parâmetros biológicos conhecidos como biomarcadores de efeito. Idealmente, um biomarcador de efeito é aquele que mede uma alteração biológica em um estágio ainda reversível (precoce), quando ainda não representa danos à saúde (AMORIM, 2003). Portanto, biomarcadores de efeito são entendidos como alterações bioquímicas, fisiológicas ou comportamentais, que podem ser precoces e reversíveis, mensurados em amostras biológicas e que se relacionam com a ação do xenobiótico no organismo (MOREAU e SIQUEIRA, 2016). Para se avaliar tais biomarcadores, torna-se

necessário o conhecimento dos mecanismos de ação tóxica dos xenobióticos (toxicodinâmica) sobre o sistema biológico, sob os pontos de vista bioquímico e molecular (Figura 2) (OGA *et al.*, 2014).

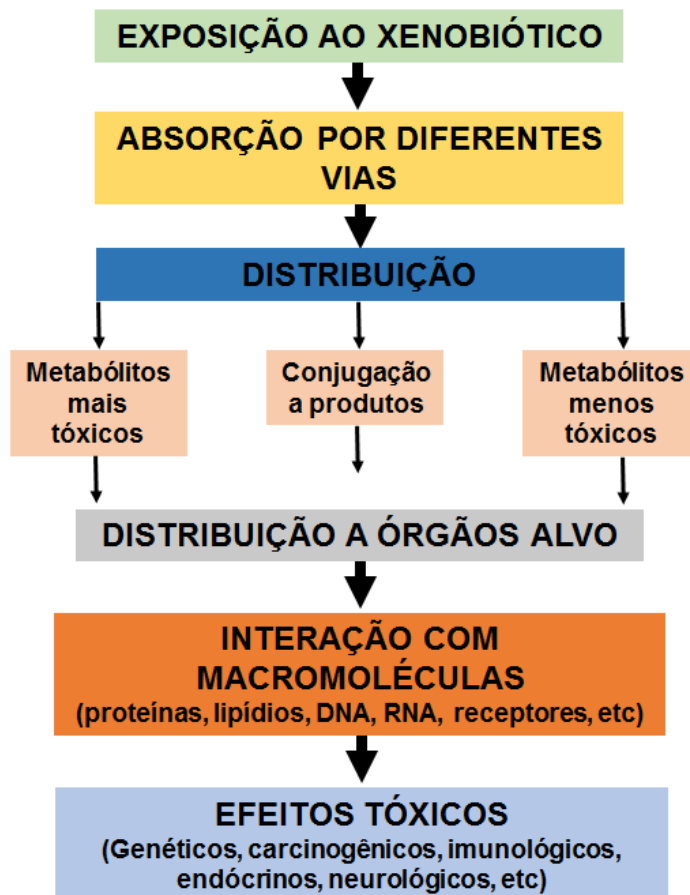


Figura 2. Esquema toxicocinético e toxicodinâmico ilustrando como os xenobióticos ambientais interagem com o organismo (Adaptado de FALCK *et al.*, 2015).

Através de diferentes biomarcadores de efeito é possível detectar, preferencialmente de forma precoce, os efeitos tóxicos provocados por diversos xenobióticos ambientais. A possível nefrotoxicidade associada a exposições ambientais, tais como a metais, pode ser avaliada através da atividade da N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG), uma enzima presente nos lisossomos das células dos túbulos proximais do sistema renal. A concentração dessa enzima na urina aumenta quando ocorre dano tubular renal (GÜNES *et al.*, 2015). Portanto, o aumento dos níveis urinários de NAG tem sido reportado como um biomarcador precoce de dano tubular proximal originado por diversas causas (MORESCO *et al.*, 2013). Outro biomarcador de dano renal precoce disponível é a microalbuminúria (mALB). A albumina é filtrada no glomérulo e reabsorvida no túbulo proximal, portanto, a

disfunção em um desses processos resulta em aumento da excreção urinária de albumina (MORESCO *et al.*, 2013). O aumento da mALB foi observado em crianças com altos níveis sanguíneos de Pb, indicando dano glomerular associado à exposição ao metal (LAAMECH *et al.*, 2014).

A habilidade individual de um organismo em responder à exposição a um xenobiótico é avaliada através de biomarcadores de suscetibilidade (MOREAU e SIQUEIRA, 2016). A suscetibilidade individual a uma substância específica, seja adquirida ou congênita, é um aspecto importante a ser considerado. Muitas pessoas exibem alterações em genes que codificam enzimas metabolizadoras de xenobióticos, ou seja, apresentam polimorfismos genéticos que aumentam ou diminuem a atividade destas enzimas explicando, em parte, diferenças individuais na sensibilidade aos efeitos tóxicos de xenobióticos. Essas variações têm sido associadas a diferenças na toxicocinética de xenobióticos, o que pode modificar a dose ativa em órgãos alvo, eventualmente resultando em um risco aumentado (ou suscetibilidade) de doenças relacionadas à exposição ambiental e ocupacional (BUDNIK e BAUER, 2009; GOMÉZ-MARTÍN *et al.*, 2015).

3.1.1 Amostras Biológicas

Para a realização do biomonitoramento, as amostras biológicas utilizadas devem, preferencialmente, ser facilmente acessíveis, em quantidade suficiente e a coleta não deve causar desconforto e risco para a saúde do indivíduo. Por esses motivos, o sangue e a urina são as amostras mais comumente utilizadas. O sangue é a principal amostra de escolha pois representa o compartimento central do organismo, estando em equilíbrio com todos os órgãos. Já a urina, por ser rapidamente disponível em grandes volumes e coletada de forma não invasiva e por ser a principal via de excreção, permite a determinação de concentrações muito baixas de xenobióticos e/ou seus metabólitos (FRIBERG e ELINDER, 1993; ANGERER *et al.*, 2007; GIL e HERNÁNDEZ, 2015).

Outras amostras de coleta menos invasiva, tais como saliva, meconônio, unha e cabelo também podem ser utilizadas durante o biomonitoramento (GIL e HERNÁNDEZ, 2015). Quando se estuda a exposição a metais, o cabelo é uma amostra valiosa, uma vez que avalia não apenas exposições atuais, mas também

permite estimar exposições passadas (POZEBON *et al.*, 2017). Muitos metais têm alta afinidade por grupos sulfidrilas de aminoácidos que constituem a queratina do cabelo sendo, portanto, incorporados à matriz. Uma vez que o cabelo cresce, em média, 1 cm por mês, os níveis de metais encontrados nessa amostra podem ser resultantes de exposições ocorridas ao longo de meses (KORDAS *et al.*, 2010; POZEBON *et al.*, 2017).

4. Atividades Agrícolas e Exposição a Xenobióticos no Ambiente Rural

Desde os primórdios, a agricultura é uma das principais bases da economia brasileira. O Brasil é um dos principais produtores agrícolas do mundo, sendo o terceiro maior exportador agrícola mundial, atrás apenas dos Estados Unidos e da União Europeia (IBAMA, 2010; SANTANA *et al.*, 2013). O Estado do Rio Grande do Sul ocupa posição de destaque na agricultura brasileira, sendo um dos principais produtores de arroz, soja e tabaco do Brasil (BENEDETTI *et al.*, 2013; SINDITABACO, 2016).

No ambiente de trabalho rural, existem diversas substâncias nocivas ao homem que podem ser incorporadas por inalação, contato dérmico, bem como pela via oral (BUDNIK e BAUER, 2009). Diferentemente das atividades da maioria das indústrias, as práticas da agricultura podem gerar riscos para a saúde de pessoas não envolvidas ativamente. Neste sentido, além dos próprios agricultores (expostos ocupacionalmente) as crianças que vivem em áreas rurais podem estar cronicamente expostas a diversos agentes químicos presentes no ambiente, oriundos das práticas agrícolas, como os agrotóxicos e outros agentes, incluindo solventes orgânicos, metais e nicotina (LANDRIGAN e ETZEL, 2014). A exposição crônica a diversos xenobióticos que persistem no ambiente está associada a vários tipos de danos com diferentes mecanismos de toxicidade, especialmente se a exposição ocorre durante os períodos de suscetibilidade especial, como a infância e adolescência (OMS, 2005).

4.1 Exposição a Agrotóxicos e Efeitos Sobre a Saúde Infantil

De acordo com o Decreto nº 4.074 de 2002, que regulamenta a Lei Federal nº 7.802 de 1989, os agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos para uso no cultivo, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas que visam alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação de seres vivos nocivos. De fato, os agrotóxicos são considerados extremamente relevantes no modelo de desenvolvimento da agricultura do Brasil, representando a principal estratégia dos agricultores para combater e prevenir as pragas agrícolas, com o intuito de garantir maior produtividade e rendimento das culturas (KUNST *et al.*, 2014; MAPA, 2017).

Existem diferentes classes de agrotóxicos, baseados no tipo de praga a ser atingida e na sua estrutura química, incluindo, entre outros: inseticidas (organoclorados, organofosforados (OFs), carbamatos, piretroides, neonicotinoides); herbicidas (cloroacetanilidas, ácidos ariloxialcanoicos, triazinas ureia e glicina substituída); e fungicidas (triazol, ditiocarbamatos, benzimidazol, dicarboximidas) (OGA *et al.*, 2014).

Anualmente, são consumidos mundialmente cerca de 2,5 milhões de toneladas de agrotóxicos, sendo que o consumo no Brasil tem sido superior a 300 mil toneladas, representando um aumento no uso destes produtos químicos de 700% nos últimos quarenta anos (EMBRAPA, 2017). Em 2008, o Brasil ultrapassou a colocação dos Estados Unidos, tornando-se o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, sendo responsável por 86% do consumo da América Latina (ANVISA, 2012; SANTANA *et al.*, 2013). O consumo varia nas diferentes regiões do Brasil, sendo que a região Sul se encontra em segundo lugar na utilização de agrotóxicos (31% do consumo), perdendo apenas para a região Sudeste, que consome cerca de 38% (EMBRAPA, 2017).

Apesar de conhecerem os danos à saúde causados por estes produtos, os agricultores fazem uso indiscriminado e sem a devida proteção individual, acarretando no aumento significativo das intoxicações agudas e crônicas por esses xenobióticos. Por conta disso, nos últimos anos tem aumentado a preocupação sobre os riscos e consequências para a saúde humana gerados pela exposição a agrotóxicos (KUNST *et al.*, 2014). Há evidências de efeitos carcinogênicos, neurológicos, reprodutivos, imunológicos e genotóxicos associados com a exposição a agrotóxicos em adultos (GONZÁLEZ-ALZAGA *et al.*, 2015). Diversos estudos têm

investigado os efeitos adversos sobre a saúde de agricultores do Rio Grande do Sul, expostos ocupacionalmente a diferentes tipos de agrotóxicos. Efeitos de genotoxicidade e citotoxicidade (BORTOLI *et al.*, 2009; BENEDETTI *et al.*, 2013; DA SILVA *et al.*, 2008, 2012, 2014), inibição da enzima butirilcolinesterase (BuChE), bem como alterações dos biomarcadores de estresse oxidativo (TBARS, MDA, PCO e GSH) (MORI *et al.*, 2015), desordens mentais (CAMPOS *et al.*, 2016) e risco aumentado de câncer de esôfago (MEYER *et al.*, 2011) têm sido relatados.

No entanto, não se deve negligenciar o fato de que não somente os agricultores se encontram expostos aos agrotóxicos no ambiente rural, mas também suas famílias, incluindo crianças e adolescentes (KUNST *et al.*, 2014). Azaroff e Neas (1999) relataram sintomas de intoxicação aguda a agrotóxicos, especialmente ao metilparation, incluindo lacrimejamento dos olhos, dor de estômago, desordens neurológicas, entre outros, em crianças que viviam próximo a lavouras em uma área rural de El Salvador, onde seus pais faziam uso intensivo desses produtos. De fato, quando se trata de exposição ambiental infantil, os agrotóxicos estão entre os xenobióticos de maior preocupação (KARR *et al.*, 2012). Apesar disso e, considerando o uso intenso de agrotóxicos no Brasil, Froes Asmus *et al.* (2016) relatam, em uma recente revisão sobre a saúde ambiental infantil no Brasil, a existência de poucos estudos na literatura sobre os efeitos da exposição a agrotóxicos na saúde de crianças brasileiras.

Além do fato de que as crianças representam um importante grupo de risco, podendo estar expostas desde o período pré-natal, o uso de agrotóxicos nas lavouras frequentemente próximo às casas e escolas acarreta na exposição crônica a baixos níveis, com efeitos tóxicos em diferentes órgãos. A exposição ocorre através de absorção dérmica e inalação, bem como pela ingestão de água e alimentos contaminados com resíduos de agrotóxicos (ALAVANJA *et al.*, 2004; FALCK *et al.*, 2015). Embora pouco se saiba sobre os efeitos adversos desses xenobióticos em crianças e adolescentes, estudos têm demonstrado um risco aumentado de efeitos reprodutivos (ESKENAZI *et al.*, 2004), bem como de neurotoxicidade (KHAN *et al.*, 2014; GONZÁLEZ-ALZAGA *et al.*, 2014).

Algumas classes de agrotóxicos, tais como os inseticidas organofosforados (OFs), carbamatos e piretroides, interferem com a função do sistema nervoso dos insetos e, em menor grau, com a de mamíferos, o que causa preocupação em

relação à saúde humana (OULHOTE e BOUCHARD, 2013). Os OFs e carbamatos são amplamente utilizados na agricultura, e suas propriedades neurotóxicas são bem conhecidas (BOUCHARD *et al.*, 2011; ROWE *et al.*, 2016). O seu mecanismo primário de toxicidade está associado à inibição enzimática causada pela exposição a altas doses, sendo a colinesterase (ChE), incluindo a acetilcolinesterase (AChE) eritrocitária e a butirilcolinesterase (BuChE) sérica ou plasmática, seu principal alvo de toxicidade. A ChE é a enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina, portanto, a inibição da sua atividade através da fosforilação pelos OFs e carbamilação pelos carbamatos ocasiona o acúmulo do neurotransmissor nas terminações nervosas, levando a uma estimulação exacerbada dos receptores (KAPKA-SKRZYPCZAK *et al.*, 2011; OGA *et al.*, 2014; ROWE *et al.*, 2016). A AChE, também chamada de verdadeira colinesterase, é encontrada no sistema nervoso central e nos eritrócitos enquanto a BuChE, conhecida como pseudocolinesterase, é sintetizada no fígado e encontra-se no soro e plasma. Embora a atividade sanguínea da AChE seja mais aproximada da atividade enzimática neuronal, a atividade de ambas as colinesterases é considerada um válido biomarcador para avaliar a exposição a agrotóxicos OFs e carbamatos (KAPKA-SKRZYPCZAK *et al.*, 2011).

No entanto, sabe-se que quando a exposição ocorre a doses menores do que o necessário para causar a inibição da colinesterase, alguns OFs apresentam outros mecanismos de neurotoxicidade, afetando diferentes alvos neuroquímicos, incluindo fatores de crescimento e diversos sistemas de neurotransmissores e segundo-mensageiros (VERMA *et al.*, 2009). Considerando a imaturidade do sistema nervoso central durante o desenvolvimento infantil, diversos estudos fornecem evidências consistentes de que a exposição pré-natal a OFs está associada a reduzidos escores de Quociente de Inteligência (QI) em crianças em idade escolar (BELLINGER *et al.*, 2013; BOUCHARD *et al.*, 2011; ESKENAZI *et al.*, 2014). Adicionalmente, a exposição pós-natal a OFs em crianças que vivem em áreas rurais também pode estar associada a alterações neurológicas, como problemas de comportamento, aprendizagem, memória, atenção e funções executivas (RUCKART *et al.*, 2004; ROHLMAN *et al.*, 2005; BUTLER-DAWSON *et al.*, 2016).

Também, a exposição crônica a baixos níveis de agrotóxicos tem sido considerada um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento de câncer. Testes de carcinogenicidade são exigidos para detectar o potencial

carcinogênico de agrotóxicos antes dos mesmos serem comercializados (MOSTAFALOU e ABDOLLAHI, 2013). De acordo com a nova lista da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA U.S.) publicada em 2015, mais de 400 agrotóxicos foram classificados como potenciais agentes carcinogênicos (EPA, 2017). As propriedades carcinogênicas dos agrotóxicos podem ser influenciadas por múltiplos fatores incluindo a idade, sexo, suscetibilidade individual, quantidade e duração da exposição, além do contato simultâneo com outros compostos carcinogênicos (MOSTAFALOU e ABDOLLAHI, 2013). Em crianças, tem sido relatada a possível associação entre a exposição a agrotóxicos e desenvolvimento de alguns tipos de câncer, incluindo leucemia (ZHANG *et al.*, 2015; HERNÁNDEZ e MENÉNDEZ, 2016) e tumores cerebrais (VAN MAELE-FABRY *et al.*, 2013). Os mecanismos carcinogênicos dos agrotóxicos são variados e incluem a inibição enzimática, indução do estresse oxidativo e alteração do perfil de expressão gênica (MOSTAFALOU e ABDOLLAHI, 2013).

A obesidade é outro efeito adverso que tem sido associado à exposição a agrotóxicos, assim como a metais e a outros agentes químicos, uma vez que muitos agentes químicos atuam como desreguladores endócrinos. A exposição a esses xenobióticos é fator de risco para outras anormalidades metabólicas, incluindo risco aumentado de desenvolvimento de síndrome metabólica, que inclui alterações em marcadores periféricos como aumento dos níveis de triglicerídeos, redução dos níveis de colesterol HDL, aumento da pressão arterial e aumento da glicemia de jejum (DE LONG e HOLLOWAY, 2017; PETRAKIS *et al.*, 2017).

Em relação às crianças, a preocupação é ainda maior, uma vez que alterações metabólicas têm aumentado nesse grupo etário em todo o mundo nos últimos anos. Esses efeitos adversos podem iniciar na infância e perdurar até a vida adulta, trazendo sérias consequências à saúde, como riscos cardiovasculares e desenvolvimento de diabetes (RUSS e HOWARD, 2016). Um estudo recente sugeriu alterações metabólicas precoces em recém-nascidos como consequência da exposição pré-natal a agrotóxicos OFs (DEBOST-LEGRAND *et al.*, 2016).

4.2 Exposição a Metais e Efeitos Sobre a Saúde Infantil

Os metais podem ser encontrados naturalmente no ambiente, estando presentes no ar, água e solo. No ambiente, os metais são naturalmente redistribuídos através de ciclos geológicos e biológicos. Adicionalmente, algumas práticas antropogênicas tais como atividades industriais, de mineração e agrícolas representam importantes fontes de exposição ambiental, contribuindo para o aumento dos níveis desses xenobióticos no ambiente (ANNANGI *et al.*, 2015). A contaminação da água por metais a partir do escoamento agrícola em fontes de água representa riscos à saúde em países em desenvolvimento (KRISHNA e MOHAN, 2014). Normalmente, em áreas rurais, reservas de água potável são encontradas na superfície e em águas subterrâneas sendo, muitas vezes, as únicas fontes de água para consumo humano nessas regiões. Portanto, a contaminação por agrotóxicos e, conseqüentemente, por metais no solo acaba fluindo para as águas superficiais e subterrâneas, colocando em risco a saúde das populações que consomem essa água (TUTIC *et al.*, 2015).

Alguns metais são considerados elementos essenciais, uma vez que são considerados nutrientes biologicamente necessários para o correto funcionamento de vários processos bioquímicos e fisiológicos do organismo humano. O grupo de elementos essenciais é composto por metais como o cobre (Cu), cobalto (Co), zinco (Zn), selênio (Se), ferro (Fe), magnésio (Mg), manganês (Mn) e molibdênio (Mo). A presença desses elementos em concentrações menores ou maiores daquelas necessárias para as funções vitais pode levar a certas patologias. Por outro lado, existem elementos que não possuem função fisiológica benéfica e cuja a presença no organismo pode estar relacionada a efeitos adversos à saúde. Esse grupo de elementos é composto por metais e/ou metaloides incluindo o chumbo (Pb), cádmio (Cd), cromo (Cr), arsênio (As), níquel (Ni) e mercúrio (Hg). Por não serem necessários e, considerando que quando presentes no organismo em qualquer concentração podem ocasionar danos à saúde, esses elementos também são chamados de metais tóxicos (ANNANGI *et al.*, 2015).

Historicamente, a toxicologia dos metais é conhecida pelos seus efeitos agudos, tais como as cólicas abdominais provocadas pela intoxicação por Pb em trabalhadores ocupacionalmente expostos. No entanto, há um interesse crescente na investigação dos efeitos da exposição a metais a longo prazo sobre a saúde, nas

quais a relação causa-efeito muitas vezes não é detectada (GOYER e CLARKSON, 1996; CAO *et al.*, 2016).

De fato, no ambiente rural, uma das principais fontes de contaminação ambiental por metais pode estar relacionada ao uso de agrotóxicos. Isso, porque alguns agrotóxicos, como os fertilizantes, contêm “micronutrientes” que são metais, incluindo Cu, Fe, Mn e Zn (GORMANNG *et al.*, 2011). Alguns fungicidas ditiocarbamatos como o mancozebe, conhecido comercialmente como Dithane®, contém aproximadamente 20% de Mn por peso, podendo constituir uma importante fonte de exposição a esse elemento (MORA *et al.*, 2014). Além disso, os fertilizantes também podem conter metais tóxicos como contaminantes, tais como As, Pb, Cr, Cd e Ni (GORMANNG *et al.*, 2011; JIAO *et al.*, 2012).

Portanto, crianças que vivem em áreas rurais podem estar cronicamente expostas a baixos níveis de metais. A exposição pode ocorrer pela ingestão de água e alimentos contaminados, bem como através do solo devido aos hábitos infantis de brincar próximo ao solo e levar a mão à boca frequentemente (BERGLUND *et al.*, 2011). Estudos epidemiológicos e toxicológicos têm demonstrado que a fase da infância representa um período crítico de suscetibilidade aos efeitos das exposições a metais, incluindo danos aos sistemas nervoso central, hematopoiético, reprodutivo e renal (AUSTIN *et al.*, 2016; CAO *et al.*, 2016).

4.2.1 Manganês

O manganês (Mn) é um elemento encontrado naturalmente em diversos tipos de rocha e no solo. Adicionalmente, é encontrado em alguns tipos de alimentos, sendo a dieta a principal fonte de Mn para o organismo. Também, é encontrado em uma ampla variedade de produtos incluindo cosméticos, tintas, fogos de artifício, pilhas e fertilizantes (ATSDR, 2012; TUSCHL *et al.*, 2013).

O Mn é considerado um elemento essencial pois é um constituinte crucial para a função de uma variedade de enzimas do organismo, tais como as envolvidas no metabolismo de proteínas e carboidratos, como a arginase e piruvato carboxilase, respectivamente. Além disso, é utilizado por várias enzimas antioxidantes do organismo, como a superóxido dismutase (SOD-Mn), e na atividade da glicosiltransferase, enzima necessária para os mucopolissacarídeos utilizados pelas

cartilagens, ossos e outros tecidos conectivos. Embora a deficiência de Mn seja rara, os sintomas se manifestam principalmente devido à inadequada atividade da glicosiltransferase causando má formações ósseas, especialmente durante o desenvolvimento (ERICKSON *et al.*, 2007; TUSCHL *et al.*, 2013).

Por outro lado, o excesso de Mn causado pela exposição ocupacional e ambiental não é considerado raro. Apesar da essencialidade, o Mn é conhecido como um potente neurotóxico há pelo menos 150 anos, devido à sua ampla acumulação no cérebro (ASCHNER *et al.*, 2007; MENEZES-FILHO *et al.*, 2014). A exposição ocupacional excessiva ao Mn, especialmente pela via respiratória em trabalhadores de mineração e indústrias de aço, solda e pilhas, leva a um conjunto de sintomas neurológicos conhecido como “manganismo”, similares àqueles apresentados na doença de Parkinson (DP) (FITSANAKIS *et al.*, 2006; TUSCHL *et al.*, 2013). Os sintomas comuns são caracterizados por alterações no sistema dopaminérgico dos gânglios da base, produzindo prejuízos de movimento e déficit cognitivo. Sabe-se que o Mn interage negativamente com a dopamina celular, promovendo a autooxidação e morte celular dopaminérgica. Por sua vez, a hipo- ou hiper-estimulação na neurotransmissão dopaminérgica leva a numerosas desordens, dentre elas, a DP (SANTOS *et al.*, 2011). No entanto, o manganismo difere da DP especialmente em relação à idade precoce em que os sintomas podem aparecer (FORDAHL *et al.*, 2012).

No que diz respeito à exposição ambiental, recentemente têm aumentado os estudos relatando efeitos adversos sobre a saúde relacionados à exposição excessiva ao Mn através do ar e água, particularmente entre crianças (MENEZES-FILHO *et al.*, 2014). Associação significativa entre níveis de Mn no cabelo e déficit de QI foram observados em crianças que vivem em uma região de mineração no nordeste do Brasil (MENEZES-FILHO *et al.*, 2011). Os mesmos autores relataram, em um estudo posterior, associações significativas entre Mn no cabelo e problemas de atenção e de comportamento (MENEZES-FILHO *et al.*, 2014). Resultados similares foram relatados em trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa, no qual observamos que os níveis aumentados de Mn no cabelo foram significativamente associados a déficit de QI em crianças, mesmo após ajustar os fatores de confusão tais como idade, nível de escolaridade dos pais e gênero (NASCIMENTO *et al.*, 2015).

A exposição ambiental infantil ao Mn tem sido associada também com capacidades cognitivas específicas, incluindo desordens de memória e aprendizagem (TORRES-AGUSTÍN *et al.*, 2013) e memória de trabalho (CARVALHO *et al.*, 2014). De fato, em um estudo recente do nosso grupo de pesquisa, associações significativamente inversas foram observadas entre os níveis de Mn no sangue, cabelo e água e funções cognitivas específicas, tais como atenção visual, percepção visual, capacidade fonológica, memória de trabalho, linguagem escrita e funções executivas em crianças. Adicionalmente, os biomarcadores de estresse oxidativo (tióis não proteicos e atividade enzimática da ALAD) foram inversamente associados com os níveis de Mn nas amostras analisadas, assim como o biomarcador de dano renal precoce, atividade enzimática da NAG, foi positivamente associado com os níveis de Mn no sangue e cabelo (NASCIMENTO *et al.*, 2016).

Conforme mencionado anteriormente, o Mn afeta áreas relacionadas ao sistema dopaminérgico, explicando as perturbações motoras observadas em trabalhadores expostos ao metal no ambiental ocupacional, como em áreas de mineração. Esse mecanismo de neurotoxicidade do Mn tem influenciado a avaliação de possíveis biomarcadores relacionados ao neurotransmissor dopamina. Um desses biomarcadores é a dosagem da prolactina sérica, que tem sido cada vez mais utilizada como um parâmetro de função neuroendócrina/dopaminérgica em estudos epidemiológicos ambientais e ocupacionais (MEEKER *et al.*, 2009; MONTES *et al.*, 2011).

A prolactina é um hormônio predominantemente sintetizado e secretado em células chamadas lactotróficas, localizadas na adenohipófise. Embora esse hormônio seja bem conhecido por estimular a lactação em humanos, é também conhecido pela sua versatilidade uma vez que está envolvido em um amplo espectro de funções relacionadas ao sistema reprodutivo, metabolismo, comportamento, imuno e osmoregulação (FITZGERALD e DINAN, 2008; MONTES *et al.*, 2011). A produção de prolactina é modulada pela dopamina, em um sistema de controle baseado em um mecanismo de *feedback*. Nas células lactotróficas, a dopamina se liga aos receptores D2, ativando-os e causando um aumento na condutância de potássio provocando hiperpolarização e inativação dos canais de cálcio voltagem-dependentes mantendo, assim, a inibição da liberação do hormônio. Inversamente, a

ausência de dopamina provoca um aumento do cálcio intracelular, aumentando o processo de secreção da prolactina (MONTES *et al.*, 2011). Uma vez que o Mn estimula a autooxidação da dopamina nos neurônios dopaminérgicos, o metal indiretamente modula a secreção de prolactina, levando a um aumento dos níveis circulantes do hormônio (SANTOS *et al.*, 2011) (Figura 3). Os níveis de prolactina sérica em um grupo de crianças, residentes em uma área de mineração rica em Mn no México, foram significativamente maiores em relação a um grupo de crianças controle, bem como foram positivamente correlacionados com os níveis de Mn no sangue e cabelo, sugerindo um efeito adverso dopaminérgico no eixo hipotálamo-hipófise (MONTES *et al.*, 2011).

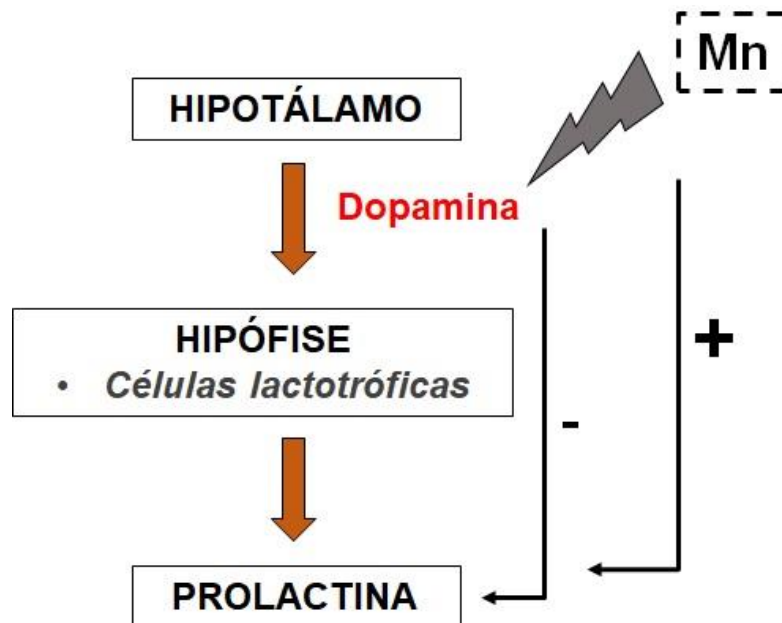


Figura 3. Efeito adverso do Mn sobre a produção de prolactina que, por sua vez, tem a sua secreção modulada pelo neurotransmissor dopamina.

4.2.2 Arsênio

O arsênio (As) é um elemento encontrado em baixas concentrações no ambiente nas formas orgânica e inorgânica, e compartilha propriedades tanto de metais quanto de não metais sendo, portanto, classificado como um metaloide (ATSDR, 2007; ANNANGI *et al.*, 2016). Uma vez que esse metaloide ocorre naturalmente no ambiente, a exposição pode ocorrer através da ingestão de alimentos e água contaminados, bem como através da respiração. Adicionalmente, as fontes mais significativas de As para o ambiente estão relacionadas a atividades

antropogênicas, tais como atividades de mineração e fundição, agrotóxicos e combustão do carvão (RODRÍGUEZ-BARRANCO *et al.*, 2013). A Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR) classifica o As como a substância número um em sua lista de 275 substâncias presentes no ambiente que representam o mais significativo potencial de risco, considerando a sua conhecida ou suspeita toxicidade para a saúde humana (ATSDR, 2016). As consequências para a saúde da exposição ao As incluem efeitos respiratórios, gastrointestinais, hematológicos, hepáticos, renais, dérmicos, neurológicos e imunológicos, bem como efeitos no sistema nervoso central e desenvolvimento cognitivo em crianças (RODRÍGUEZ-BARRANCO *et al.*, 2013).

De fato, existem evidências crescentes de que a exposição ao As causa efeitos deletérios na função intelectual de crianças (RODRÍGUEZ-BARRANCO *et al.*, 2016). A exposição ao As através da água foi associada à reduzida função intelectual em crianças de Bangladesh, mesmo após ajuste utilizando outros parâmetros que influenciam a função cognitiva infantil (WASSERMAN *et al.*, 2007). Resultados similares foram encontrados em um estudo com crianças em idade escolar em Província de Kandal no Camboja, cujos níveis de As no cabelo influenciaram significativamente os escores em testes neuropsicológicos, sugerindo que a exposição ao As parece ser associada a prejuízos no sistema nervoso central e periférico, em termos de velocidade motora, memória auditiva de curto prazo, destreza manual, memória visual, controle motor fino e velocidade de processamento (VIBOL *et al.*, 2015). Diversos mecanismos têm sido relacionados à neurotoxicidade do As, incluindo o estresse oxidativo e diminuição dos sistemas antioxidantes, indução de apoptose, prejuízo glutamatérgico, alterações na transmissão sináptica, alterações na biogênese das monoaminas, aumento da fosforilação da proteína tau, entre outros (ESCUADERO-LOURDES, 2016).

Além disso, o As tem sido classificado como carcinogênico para humanos pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), baseado em evidências de que o metaloide causa câncer de pele, pulmão e bexiga (SMITH *et al.*, 2012; GARRY *et al.*, 2015). O câncer induzido pelo As pode estar relacionado a diversos mecanismos, tais como dano oxidativo e genotoxicidade (ANNANGI *et al.*, 2016). Em uma população de Antofagasta, no Chile, exposta a altos níveis de As na água por um período de 12 anos, foram observadas altas taxas de mortalidade por

câncer de pulmão, bexiga, laringe, rim e fígado em adultos expostos ao metaloide desde a vida intrauterina e infância, comparados a um grupo com a mesma faixa etária do restante do Chile (SMITH *et al.*, 2012). Estudos como esses mostram que, de fato, doenças que se desenvolvem na vida adulta podem estar relacionadas a exposições a xenobióticos iniciadas ainda no útero e/ou durante a infância, ou seja, em um período de maior vulnerabilidade (LANDRIGAN, 2016).

4.2.3 Cádmio

O cádmio (Cd) é encontrado em toda a crosta terrestre podendo estar associado a outros metais como Zn, Pb e Cu, sendo emitido para o solo, ar e água através de atividades de mineração, fundição, fabricação e aplicação de fertilizantes fosfatados e queima de combustíveis fósseis. Adicionalmente, o elemento está presente em baterias, pigmentos, estabilizantes para plásticos e outros produtos. O metal possui a capacidade de acumulação em organismos aquáticos e culturas agrícolas, acumulando-se, por exemplo, em folhas de tabaco (ATSDR, 2012).

Para a população em geral, a principal fonte de exposição ao Cd são os alimentos (GOYER e CLARKSON, 1996). Já para indivíduos fumantes, o tabaco torna-se a fonte dominante de exposição (SANDERS *et al.*, 2015). O Cd é classificado como carcinógeno para humanos (Grupo 1) pela IARC e como provável carcinógeno (Grupo B1) pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA US), baseado em evidências do aumento de câncer de pulmão associado à exposição ao metal (ATSDR, 2012).

Porém, um dos principais efeitos tóxicos do Cd está relacionado à sua nefrotoxicidade, e o possível risco associado a doenças renais crônicas. Por isso, vários biomarcadores têm sido utilizados para avaliar os efeitos nefrotóxicos em populações expostas ao metal (WANG *et al.*, 2016). Crianças com idade entre 6 e 17 anos, residentes próximo a uma área de fundição na Pensilvânia, nos Estados Unidos, apresentaram associação entre o aumento da atividade enzimática da NAG, enzima primariamente de origem tubular renal, e níveis urinários de Cd (NOONAN *et al.*, 2002). Em outro estudo com uma população de crianças, adolescentes e adultos (2 a 86 anos de idade) da China, os níveis de Cd na urina foram positivamente associados a biomarcadores de dano tubular renal, como a NAG e a β 2-

microglobulina. Adicionalmente, associação significativa foi demonstrada entre o aumento dos níveis sanguíneos de Cd em crianças do estudo e aumento dos biomarcadores de dano tubular renal (WANG *et al.*, 2016). A função renal de crianças também foi influenciada pela exposição ambiental ao Cd em um estudo da Tailândia, onde os níveis urinários de Cd foram positivamente correlacionados com os níveis de β 2-microglobulina, mesmo após ajuste estatístico utilizando variáveis como idade, sexo e níveis sanguíneos de Pb (SWADDIWUDHIPONG *et al.*, 2015).

Embora exista evidências dos efeitos nefrotóxicos do Cd, poucos estudos têm investigado os efeitos da exposição ao Cd sobre o desenvolvimento neuropsicológico em crianças (ATSDR, 2012; RODRÍGUES-BARRANCO *et al.*, 2014). Associação significativa entre a exposição pós-natal ao Cd e dificuldades de aprendizagem foi relatada em crianças dos Estados Unidos. Segundo os autores, o Cd pode inibir o fluxo de cálcio requerido para a liberação de neurotransmissores, além de afetar a comunicação neuronal necessária para a formação sináptica durante o desenvolvimento, bem como afetar o desenvolvimento devido à influência sobre os hormônios tireoidianos (CIESIELSKI *et al.*, 2012). Em um estudo mais recente, Rodrigues-Barranco *et al.* (2014) demonstrou associação inversa entre a exposição pós-natal ao Cd e desenvolvimento neuropsicológico em meninos, mas não em meninas, demonstrando a possível diferença entre sexos na neurotoxicidade de metais.

4.2.4 Chumbo

O chumbo (Pb) é um elemento químico que ocorre naturalmente no ambiente, normalmente combinado com outros elementos formando compostos de Pb. Esses compostos são usados em pigmentos de tintas, corantes e esmaltes cerâmicos. A maioria do Pb utilizado pela indústria vem de minérios (fonte primária), ou a partir de reciclagem ou baterias (fonte secundária). O Pb possui alta capacidade de permanecer no solo por muito tempo uma vez que se adere fortemente às partículas do solo, permanecendo nas suas camadas superiores. Por isso, embora o metal não seja mais adicionado a produtos como gasolina e agrotóxicos, a sua presença no solo ainda ocorre devido ao uso no passado desses produtos contendo Pb em suas constituições (ATSDR, 2007). Além do solo, a exposição ao metal pode ocorrer

através da ingestão de água e alimentos contaminados, bem como através do ar (GOYER e CLARKSON, 1996).

O Pb é um metal cujos efeitos tóxicos resultantes da exposição afetam diversos sistemas biológicos, incluindo o sistema nervoso central, hematopoiético, renal, reprodutivo e cardiovascular (GOYER e CLARKSON, 1996; FLORA *et al.*, 2012). O estresse oxidativo é o principal mecanismo pelo qual o Pb exerce a sua toxicidade, tanto pela geração de espécies reativas quanto pela depleção das defesas antioxidantes (AHAMED e SIDDIQUI, 2007; FLORA *et al.*, 2012).

Os efeitos mais críticos estão relacionados ao sistema nervoso central, especialmente em crianças. Isso, porque o metal causa efeitos tóxicos durante o desenvolvimento neurológico, sendo que a exposição a baixos níveis de Pb afeta significativamente o QI, a capacidade de concentração e atenção em crianças (GOYER e CLARKSON, 1996; FLORA *et al.*, 2012).

Adicionalmente, o sistema hematopoiético é um dos principais sistemas afetados pela exposição ao Pb, através da restrição na síntese de hemoglobina pela inibição de enzimas chaves envolvidas na via biossintética do grupo heme, levando à anemia (AHAMED *et al.* 2011, FLORA *et al.*, 2012) O Pb afeta significativamente a síntese do grupo heme da hemoglobina através da inibição enzimática da ALAD. A ALAD é uma enzima é responsável pela condensação de duas moléculas de ácido δ -aminolevulínico (ALA) para formar o porfobilinogênio (PBG), composto monopirrólico envolvido na biossíntese do grupo heme da hemoglobina (ROCHA *et al.*, 2012) (Figura 4). A diminuição na atividade da ALAD e consequente aumento na produção do ALA correlacionam com o aumento nas concentrações sanguíneas de Pb e excreção urinária de ALA. Portanto, representam indícios bioquímicos de exposição ao Pb (GOYER e CLARKSON, 1996). Atualmente, a quantificação sanguínea da atividade da ALAD tem sido considerada um importante biomarcador clínico para exposição ao Pb (ROCHA *et al.*, 2012).

Em 1991, o Centro para Controle de Doenças e Prevenção (CDC) recomendou mudanças para prevenir a intoxicação de crianças por Pb, incluindo a redução do nível de Pb sanguíneo considerado seguro (de 25 $\mu\text{g}/\text{dL}$ para 10 $\mu\text{g}/\text{dL}$). No entanto, em 2012, o Comitê Consultivo para a Prevenção de Intoxicação por Chumbo do CDC concluiu que não existe nível sanguíneo seguro de Pb e, então, o CDC declarou que “nenhum nível de Pb no sangue é considerado seguro”, baseado

em estudos que demonstraram baixos níveis sanguíneos de Pb associados a déficits intelectuais, comportamentais e baixo desempenho acadêmico (McCLURE *et al.*, 2016).

4.2.5 Cromo

O cromo (Cr) é um metal que existe naturalmente no ambiente, presente na água, ar, rochas, plantas e solos, estando combinado a outros elementos formando vários compostos. As três mais estáveis formas do Cr encontradas no ambiente são: Cr (0), Cr (III) e Cr (VI). O Cr trivalente é considerado essencial para a saúde humana, uma vez que está envolvido no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, principalmente por aumentar a eficiência da insulina. Isso, porque o Cr (III) forma um complexo com os receptores de insulina, facilitando a ligação do hormônio aos seus sítios de ação (GOYER e CLARKSON, 1996; ATSDR, 2012; LEWICKI *et al.*, 2013). Os compostos de Cr encontrados naturalmente no ambiente são gerados no estado trivalente de valência, enquanto as fontes antropogênicas são responsáveis pela liberação da forma hexavalente (CÁRDENAS-GONZÁLEZ *et al.*, 2016).

A toxicidade do Cr está relacionada ao seu estado de valência, e o Cr hexavalente é a forma mais tóxica sendo, inclusive, considerado um possível carcinógeno humano por agências regulamentadoras (ANNANGI *et al.*, 2016). Em áreas rurais, os agrotóxicos também representam uma potencial fonte de liberação de Cr para o ambiente, já que o metal pode ser um contaminante desses produtos (GORMANN *et al.*, 2011). Um dos principais mecanismos de genotoxicidade do Cr está associado à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzida pelo metal, que podem causar dano oxidativo a macromoléculas, como ao DNA, podendo resultar em mutações genéticas levando ao câncer (LI *et al.*, 2008; NI *et al.*, 2014). Embora existem estudos avaliando biomarcadores de genotoxicidade em trabalhadores expostos ao Cr, poucos estudos avaliam os efeitos da exposição ao metal sobre a saúde de crianças (ATSDR, 2012; ANNANGI *et al.*, 2016). Apesar disso, acredita-se que as crianças podem apresentar os mesmos efeitos da exposição ao Cr observados em adultos (ATSDR, 2012). Associação significativa foi observada entre os níveis de Cr no sangue de cordão umbilical e dano ao DNA,

avaliado através do ensaio cometa, em neonatos de uma região altamente poluída por Cr devido a instalações de reciclagem de lixo eletrônico, demonstrando que o metal atravessa a placenta, podendo causar dano ao feto (LI *et al.*, 2008).

Adicionalmente, em um estudo recente foi evidenciado, pela primeira vez, a associação entre níveis urinários de Cr em crianças e o biomarcador de dano renal KIM-1. A KIM-1 consiste em uma glicoproteína transmembrana expressa por células epiteliais do túbulo proximal renal, logo no início de uma lesão, seguido de clivagem do seu ectodomínio e liberação na urina (CÁRDENAS-GONZÁLEZ *et al.*, 2016).

4.2.6 Mercúrio

O mercúrio (Hg) é um metal que ocorre naturalmente no ambiente, podendo ser encontrado no solo, ar e água, sendo o único metal encontrado no estado líquido à temperatura ambiente. O Hg existe em três estados de oxidação: Hg⁰ (metálica), Hg⁺¹ e Hg⁺² (inorgânica), sendo o Hg⁰, encontrado no estado de vapor, a forma mais tóxica em relação à forma líquida. Aproximadamente 80% do Hg liberado para o ambiente a partir de atividades humanas provém da combustão de combustíveis fósseis, mineração e fundição. Cerca de 15% do total liberado ao solo provém de fertilizantes, fungicidas e resíduos sólidos urbanos (baterias, interruptores elétricos, termômetros), e 5% é liberado a partir de efluentes industriais para a água (GOYER e CLARKSON, 1996; ATSDR, 1999).

O Hg em vapor (Hg⁰) representa a principal via de transporte do metal na atmosfera. No ambiente, o metal pode ser metilado por microrganismos presentes em peixes e água do oceano, sendo referido, então, como metilmercúrio (MeHg), que representa a forma orgânica do metal (GOYER e CLARKSON, 1996). A exposição a qualquer uma das formas do Hg (metálica, inorgânica ou orgânica) pode levar a dano cerebral, cardíaco, renal, pulmonar e imunológico em indivíduos de todas as idades, dependendo da dose, fonte de exposição e o composto de Hg. Sabe-se que a forma orgânica representa preocupação em relação à saúde, devido ao seu efeito neurotóxico (RANGEL-MÉNDEZ *et al.*, 2016).

O MeHg é um composto potencialmente neurotóxico, havendo evidências de neurotoxicidade em crianças que consumiram peixes contaminados (GRANDJEAN *et al.*, 2014). O exato mecanismo de toxicidade do Hg permanece desconhecido, no

entanto, sabe-se que o estresse oxidativo possui papel chave nos efeitos tóxicos causados pelo metal (RANGEL-MÉNDEZ *et al.*, 2016). Grotto *et al.* (2010) relataram associações entre a exposição ambiental a Hg e aumento do estresse oxidativo, evidenciado através da quantificação dos biomarcadores ALAD e antioxidantes endógenos, em populações ribeirinhas da Amazônia que, provavelmente, consomem peixes contaminados com MeHg. Adicionalmente, Rangel-Méndez *et al.* (2016) sugerem que a exposição ao Hg está associada com o aumento do biomarcador de peroxidação lipídica MDA, em crianças mexicanas.

4.2.7 Níquel

O níquel (Ni) é um metal encontrado naturalmente na crosta terrestre, normalmente associado a outros elementos. Adicionalmente, baixos níveis de Ni podem ser encontrados no ambiente a partir de atividades antropogênicas, tais como combustão de combustíveis fósseis, atividades de mineração e industriais. A população em geral é exposta ao metal especialmente através da ingestão de alimentos e água contaminados (GOYER e CLARKSON, 1996; ATSDR, 2005).

A maior preocupação em relação ao Ni está relacionada à exposição no ambiente ocupacional através do ar, uma vez que misturas de compostos de Ni podem estar presentes no solo e fumos. Adicionalmente, o contato dérmico com o metal representa preocupação para a saúde, já que pode ocasionar alergias na pele. Além disso, a exposição ocupacional ao Ni está relacionada a outros efeitos adversos, como fibrose pulmonar e câncer pulmonar (WILHELM *et al.*, 2013).

Adicionalmente, o Ni está entre os metais conhecidos como carcinógenos humanos, uma vez que causam diversos tipos de câncer e dano celular mesmo quando a exposição ocorre a baixos níveis. A sua carcinogenicidade é associada com a sua habilidade em induzir estresse oxidativo, que parece ser um dos principais mecanismos envolvidos no processo carcinogênico (PROTANO *et al.*, 2016). De acordo com Chandra *et al.* (2006), o Ni pode agravar a resposta genotóxica pela geração de espécies reativas que danificam o DNA e por inibição dos mecanismos de reparo do DNA.

4.3 Exposição à Nicotina e Efeitos Sobre a Saúde Infantil

A nicotina é um composto orgânico encontrado no tabaco, extremamente tóxico e carcinogênico, que se liga e ativa receptores nicotínicos de acetilcolina levando a diversas respostas, como aumento da pressão sanguínea e estimulação do sistema nervoso central (HOLBROOK, 2016).

Diversos estudos ao longo dos anos têm se preocupado em estudar os efeitos adversos pré e pós-natal resultantes da exposição materna à nicotina através do ato de fumar, principalmente porque a nicotina é rapidamente absorvida pela mãe, atravessando a placenta (HOFHUIS *et al.*, 2003; HOLBROOK, 2016). Os efeitos incluem complicações na gestação e nascimentos prematuros, efeitos reprodutivos/endócrinos, respiratórios, cardiovasculares e aumento de problemas cognitivos e comportamentais (TIESLER e HEINRICH, 2014; HOOLBROOK, 2016).

Adicionalmente, agricultores que cultivam folhas de tabaco estão constantemente expostos à nicotina. Durante a colheita e separação das folhas, esses trabalhadores estão expostos através de diferentes rotas de exposição, principalmente via inalação e absorção dérmica (DA SILVA *et al.*, 2014). Muitos agricultores relatam sofrer de sintomas resultantes da absorção dérmica de nicotina, a chamada doença do tabaco verde. Os sintomas incluem tonturas, dor de cabeça, náuseas, vômitos, cólicas e dores abdominais, dificuldades para respirar e, ocasionalmente, flutuações na pressão arterial e frequência cardíaca (ARCURY *et al.*, 2003). Os filhos de agricultores cultivadores de tabaco também estão expostos aos riscos de efeitos adversos da nicotina, uma vez que brincam próximo a galpões onde as folhas são armazenadas após a colheita, ou mesmo por ajudarem os pais durante a etapa de separação das folhas.

A avaliação da exposição à nicotina pode ser feita através da quantificação do biomarcador cotinina, um importante metabólito da nicotina. A concentração de cotinina na urina se correlaciona bem com a quantidade de nicotina absorvida (BUDNIK e BAUER, 2009). Existem diferentes métodos para a dosagem desse biomarcador, incluindo espectrofotometria, imunoensaios, cromatografia gasosa (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os métodos de CG e CLAE são mais específicos e seus limites de detecção são menores, portanto, são mais adequados para avaliar a exposição ambiental à nicotina (CATTANEO *et al.*, 2006).

5. Desreguladores Endócrinos (DEs)

O sistema endócrino refere-se a uma série de glândulas endócrinas localizadas em todo o corpo, que secretam hormônios diretamente no sangue para regular várias funções biológicas, incluindo o controle de açúcar no sangue (insulina), a função dos órgãos reprodutivos (testosterona e estradiol), o crescimento do corpo e produção de energia (hormônio do crescimento e hormônios tireoidianos) (OMS, 2012).

Nos últimos anos, há uma preocupação crescente, bem como um aumento no interesse científico, em relação a um grupo de substâncias presentes no ambiente que podem interferir com o sistema endócrino de animais e humanos e, com isso, afetar o crescimento, reprodução e a saúde de uma forma geral. Por afetarem o sistema endócrino, essas substâncias têm sido classificadas como “Desreguladores Endócrinos” (DEs), do inglês “*Endocrine Disruptors*” ou “*Endocrine Modulators*”, englobando uma variedade de classes estruturais de compostos naturais e sintéticos (HENLEY e KORACH, 2006; BILA e DEZOTTI, 2007; FONTENELLE *et al.*, 2010; HAMPL *et al.*, 2016).

Segundo a EPA US, um DE é “um agente que interfere com a síntese, secreção, transporte, ligação ou eliminação de hormônios naturais do organismo, que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento”. Isto é, DEs ou uma mistura de DEs interferem com a função hormonal normal, e os efeitos sobre a saúde podem se manifestar muito tempo depois que a exposição cessou (KABIR *et al.*, 2015; MONNERET, 2017). Ainda, segundo o Programa Internacional em Saúde Química da Organização Mundial da Saúde, um DE é “uma substância química exógena que causa efeitos adversos à saúde de um organismo intacto, seus descendentes e suas subpopulações, devido a mudanças na função endócrina” (NOHYNEK *et al.*, 2013). Acredita-se que possa existir uma possível relação entre a exposição a DEs e o aumento na prevalência de certos tipos de doenças em populações em crescimento, tais como diabetes, infertilidade, doenças da tireoide e alguns tipos de câncer (COSTA *et al.*, 2014).

Inicialmente, acreditava-se que os DEs exerciam suas ações apenas nos receptores nucleares de hormônios, incluindo receptores estrógenos (ERs),

receptores andrógenos (ARs), receptores tireoidianos (TRs), entre outros. No entanto, com o avanço da pesquisa básica, atualmente sabe-se que os mecanismos vão além dos descobertos originalmente. Além de agirem via receptores nucleares, os DEs podem afetar a fisiologia normal de diversas formas, através da interação com receptores estrógenos não-nucleares (ERs de membrana, por exemplo) e receptores não estrogênicos (receptores de neurotransmissores, como serotonina, dopamina e norepinefrina); afetando vias enzimáticas envolvidas na biossíntese e/ou metabolismo; via estresse oxidativo e outros mecanismos diversos (DIAMANTI-KANDARAKIS *et al.*, 2009; MAQBOOL *et al.*, 2016). Os DEs podem agir como agonistas, ao se ligarem aos receptores de hormônios naturais mimetizando a sua ação ou como antagonistas, bloqueando os receptores e impedindo a ação dos hormônios naturais (MNIF *et al.*, 2011). Por interferirem com o sistema endócrino, os DEs podem causar prejuízos reprodutivos, neurológicos, imunológicos e no desenvolvimento de humanos e animais (MONNERET, 2017).

O grupo de agentes químicos classificados como DEs é bastante heterogêneo e inclui diversos produtos químicos sintéticos, tais como agrotóxicos de diversas classes, como herbicidas, inseticidas, fungicidas e raticidas (atrazina, endosulfan, lindane, DDT, etc); compostos farmacêuticos (etinilestradiol, dietilestilbestrol, etc); compostos plásticos (bisfenóis, ftalatos, etc); produtos químicos sintéticos utilizados como solventes industriais ou lubrificantes e seus subprodutos (bifenilas policloradas (PCBs), bifenilos polibromados (PBBs) e dioxinas); metais (como As, Cd, Pb, Hg, Mn); entre outros (WESIERKA-GADEK, 2006; SOLDIN e ASCHNER, 2007; FONTENELLE *et al.*, 2010; DIECKERSON *et al.*, 2011; DE COSTER e VAN LAREBEKE, 2012; MEEKER, 2012; FANIBAND *et al.*, 2014; KABIR *et al.*, 2015; HAMPL *et al.*, 2016; MONNERET, 2017).

5.1 Efeitos dos DEs Ambientais Sobre a Glândula Tireoide

Diversas glândulas endócrinas são afetadas pelos DEs ambientais, dentre elas, a glândula tireoide (DE COSTER e VAN LAREBEKE, 2012). A tireoide é uma glândula em forma de borboleta situada na face anterior do pescoço, logo acima da traqueia (BURTIS *et al.*, 2008). Os processos fisiológicos normais do organismo humano, o controle do metabolismo e os estágios do desenvolvimento cerebral são

regulados pelos hormônios tireoidianos (HT) (DIAMANTINI-KANDARAKIS *et al.*, 2009; DE COSTER e VAN LAREBEKE, 2012; CHRISTENSEN, 2013; MAQBOOL *et al.*, 2016).

A tireoide secreta dois hormônios, triiodotironina (3,5,3'-L-triiodotironina) e tiroxina (3,4,3',5'-L-tetraiodotironina), comumente conhecidos como T₃ e T₄, respectivamente (BURTIS *et al.*, 2008; CHRISTENSEN, 2013). As células foliculares são o único tipo celular que existe na tireoide, e representam a unidade secretora da glândula. Cada folículo possui uma camada exterior de células epiteliais que engloba um material amorfo chamado coloide, sendo que os HT, após secretados, ficam armazenados no lúmen do coloide, de onde ocorre a liberação para a corrente sanguínea. A produção dos HT inicia com a síntese de tireoglobulina (Tg). O iodo é um componente indispensável dos HT, correspondendo a 65% do T₄ e 58% do T₃, sendo que após ingerido pela dieta, o elemento é absorvido no intestino delgado e transportado no plasma até a tireoide, onde é concentrado, oxidado pela tireoide peroxidase (TPO) e, finalmente, incorporado à Tg para formar os precursores dos HT, monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT) e, posteriormente, o T₃ e T₄. Os HT permanecem covalentemente ligados à Tg enquanto estão estocados no lúmen do coloide. Quando lançados para a circulação, são separados da Tg e liberados nas formas livres de T₃ e T₄ para exercerem suas funções (AHMED *et al.*, 2008; BURTIS *et al.*, 2008; TDM, 2016).

O sistema nervoso central possui um papel chave na regulação do sistema endócrino. Do hipotálamo, o TRH (TSH *releasing hormone*) é liberado e possui a propriedade de estimular ou inibir a glândula hipófise a produzir o hormônio estimulante da tireoide (TSH). Cada etapa na síntese dos HT é controlada pelo TSH. A função tireoidiana, portanto, está sob o controle hipotalâmico/hipofisário-tireoide, no modelo clássico de *feedback* negativo. Uma vez liberado do hipotálamo, o TRH estimula a hipófise a produzir o TSH, que se liga aos receptores na tireoide para estimular a produção de T₃ e T₄. O TRH é liberado de maneira pulsátil, e a sensibilidade das células tireotróficas em responder ao TRH depende do nível de T₄ circulante. Isso, porque o hormônio T₄ é o principal produto de liberação da glândula tireoide, sendo que a maioria do T₃ circulante (80%) é formado pela deiodinação periférica do T₄, ou seja, o T₃ é considerado a forma ativa dos HT. Muitas das funções conhecidas dos HT são mediadas pela interação entre o T₃ e os receptores

de T_3 (TRs) (MURK *et al.*, 2013; SANTOS-SILVA *et al.*, 2017). Os níveis dos HT circulantes são mantidos pela regulação através do mecanismo de *feedback* negativo pois, quando os níveis de T_3 e T_4 são altos, ocorre diminuição da produção de TSH pela hipófise. Contrariamente, baixos níveis de T_3 e/ou T_4 na circulação estimulam a produção de TSH na hipófise, pela ativação do TRH no hipotálamo e, assim, o organismo mantém a sua homeostase (AHMED *et al.*, 2008; GILBERT *et al.*, 2012; GUTLEB *et al.*, 2016) (Figura 4).

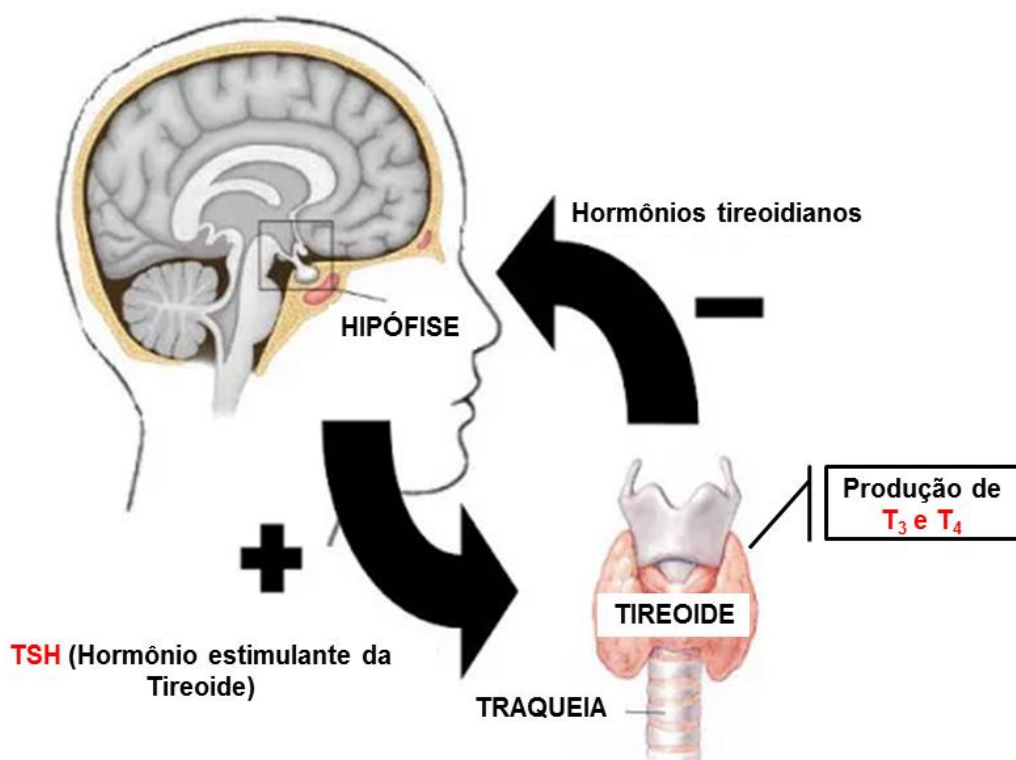


Figura 4. Controle da produção de hormônios tireoidianos (T_3 e T_4) no eixo hipotálamo-pituitária-tireoide (HPT) baseado em *feedback* negativo: o TSH produzido na hipófise estimula a produção de T_3 e T_4 na tireoide, sendo que altos níveis de T_3 e/ou T_4 circulantes suprimem a produção de TSH pela hipófise.

Mesmo pequenas perturbações nos níveis de HT circulantes já resultam em uma resposta compensatória da glândula pituitária, através da liberação de TSH, com o objetivo de manter os HT no estado normal. Dessa forma, o sinal precoce de um hipo ou hipertireoidismo consiste na alteração dos níveis de TSH circulantes, estando normalmente fora dos valores de referência enquanto os níveis de HT ainda se encontram normais. Portanto, na prática clínica, a dosagem sérica do TSH é o marcador utilizado para avaliar uma possível disfunção na tireoide (JAIN e CHOI, 2015).

A exposição a DEs ambientais pode interferir com a função normal da glândula tireoide resultando em prejuízos à homeostase. Isto, porque os DEs podem interagir com diversos componentes do eixo HPT e no funcionamento dos tecidos periféricos, interferindo: na síntese, armazenamento e liberação dos HT pela glândula tireoide; nos mecanismos de *feedback* dentro do eixo HPT; na ligação a proteínas e distribuição dos HT; na captação celular dos HT, metabolismo intracelular e *clearance* dos HT; entre outros (Figura 5) (DIAMANTINI-KANDARAKIS *et al.*, 2009; CHRISTENSEN, 2013; MURK *et al.*, 2013; GUTLEB *et al.*, 2016).

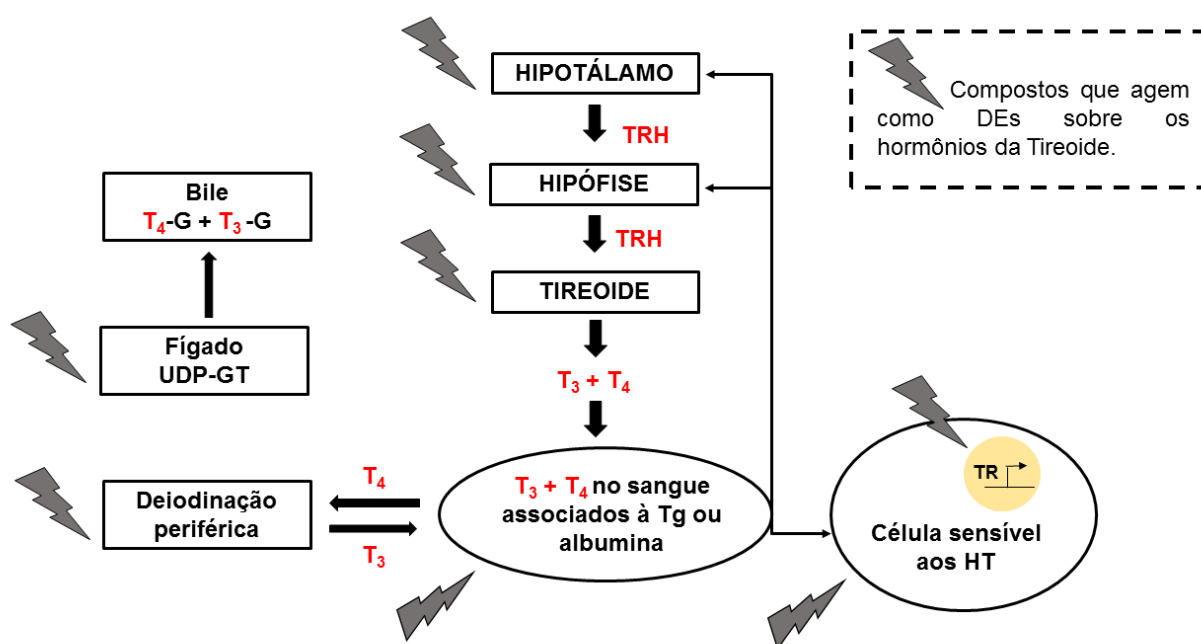


Figura 5. Diferentes sítios pelos quais os DEs podem agir sobre os hormônios tireoidianos. HT: hormônios tireoidianos; TR: receptores de hormônios tireoidianos; T_4-G : T_4 -glicuronídeo; T_3-G : T_3 -glicuronídeo; UDP-GT: difosfato de uridina glicuronosiltransferase (Adaptado de GUTLEB *et al.*, 2016).

As crianças são especialmente suscetíveis aos efeitos dos DEs sobre a função tireoidiana, pois os HT são essenciais para muitos aspectos do desenvolvimento durante a gestação e a infância. O crescimento, ganho de peso, maturação óssea e processos de neurodesenvolvimento, como a mielinização, são dependentes dos HT e, ainda não estão completos até a adolescência (FREIRE *et al.*, 2012; GUTLEB *et al.*, 2016).

Em humanos, a glândula tireoide ainda não está formada até o segundo trimestre de gestação. Por isso, durante o primeiro trimestre de gestação o feto é totalmente dependente dos HT maternos, transportados da gestante para o feto

através da placenta, tendo como principal função a regulação do desenvolvimento cerebral fetal. Portanto, quando há deficiência na oferta de HT durante o período fetal e neonatal, ou seja, durante as fases críticas de desenvolvimento cerebral, podem ocorrer alterações em diferentes regiões cerebrais com consequências permanentes no desenvolvimento da criança (AHMED *et al.*, 2008; GILBERT *et al.*, 2012; CORDIER *et al.*, 2015; GUTLEB *et al.*, 2016; SANTOS-SILVA *et al.*, 2017).

Diversos inseticidas, herbicidas e fungicidas têm sido reportados como DEs, incluindo mancozebe, acefato, aldicarb, atrazina, DTT, clorpirifós, malation, entre outros, mais especificamente como desreguladores da função tireoidiana. Os mecanismos pelos quais esses xenobióticos agem são diversos e incluem: inibição da captação de iodo pela tireoide, interferência nos receptores TRs, ligação a proteínas de transporte, aumento do *clearance* dos HT, interferência na captação celular e na expressão gênica de HT (KITAMURA *et al.*, 2006; MNIF *et al.*, 2011). Em um estudo com crianças residentes na Cidade dos Meninos, no Rio de Janeiro, em uma área altamente contaminada por agrotóxicos desde a década de 1960, foi demonstrada uma associação entre o aumento nos níveis séricos de T₃ e exposição a agrotóxicos organoclorados, avaliada através de metabólitos urinários (FREIRE *et al.*, 2012). Adicionalmente, Fortenberry *et al.* (2012) relataram associação negativa entre os níveis urinários de 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCPY), um metabólito dos organofosforados clorpirifós e metil-clorpirifós, e níveis séricos de TSH em adolescentes e adultos. Em relação ao mancozebe, reduzidos níveis de T₄ foram associados à exposição ao fungicida em ratas, demonstrando ser um potente desregulador da função tireoidiana resultando em efeitos adversos para o desenvolvimento cerebral (AXELSTAD *et al.*, 2011).

Adicionalmente, evidências emergentes sugerem que os metais, incluindo Cd, As, Hg, Pb, entre outros, podem agir como DEs, podendo afetar os níveis de diversos hormônios, incluindo o TSH (SCHUG *et al.*, 2015). O Cd é um metal conhecido como “desregulador da tireoide”, uma vez que diminui a atividade da enzima 5'-monodeiodinase (5'D-I), responsável pela conversão extra tireoidiana do T₄ na sua forma ativa, o hormônio T₃. Um dos mecanismos que levam o Cd a inibir a 5'D-I está relacionado à geração de radicais livres induzida pelo metal que, por sua vez, causam peroxidação lipídica que afeta a membrana celular e os sítios de ligação da enzima (ROSATI *et al.*, 2015). Rosati *et al.* (2015) sugerem que a

exposição atmosférica ao Cd em trabalhadores com atividades ao ar livre altera a função tireoidiana, levando a uma redução nos hormônios T₃ e T₄ livres e, conseqüentemente, a um aumento compensatório nos níveis de TSH circulantes.

De acordo com Soldin e Aschner (2007), o Mn pode afetar a homeostase dos HT e o processo de neurodesenvolvimento como um resultado de uma desregulação direta a nível da glândula tireoide e HT, ou indiretamente pela alteração no controle dopaminérgico da tireoide e o HT. A dopamina é um conhecido modulador do TSH e, adicionalmente, um dos mecanismos de neurotoxicidade do Mn está relacionado a danos nos neurônios dopaminérgicos. Portanto, o Mn pode induzir perturbações nos níveis de HT como um mecanismo secundário ao dano neuronal dopaminérgico, podendo resultar em déficits de neurodesenvolvimento.

O As é outro metal cujos efeitos sobre a glândula tireoide têm sido relatados, embora o exato mecanismo de interação entre o metal e a glândula ainda não seja bem estabelecido (ABDUL *et al.*, 2015). A exposição ambiental proveniente da dieta tem sido associada ao risco aumentado de desenvolvimento de uma variedade de doenças. Uma vez que os hormônios e seus receptores, incluindo os HT, possuem importância na fisiologia normal e na patofisiologia dessas doenças, acredita-se que a desregulação endócrina provocada pelo As pode ter papel chave no desencadeamento de tais patologias (DAVEY *et al.*, 2008). Em um estudo *in vitro* utilizando células, foi sugerido que a exposição crônica a baixos níveis de As altera a homeostase do T₃, uma vez que o metal afeta a expressão gênica do receptor (TR) responsável pela ligação do hormônio (DAVEY *et al.*, 2008). Recentemente, a exposição a baixos níveis de As através da água (0,002 a 0,022 mg/L) foi associada com hipotireoidismo entre uma população residente em uma área rural do Texas, nos Estados Unidos (GONG *et al.*, 2015).

6. Co-exposições a Xenobióticos Ambientais

O conhecimento atual sobre os riscos para a saúde humana associados a exposições ambientais e ocupacionais a xenobióticos é derivado, na grande maioria, de estudos experimentais dessas substâncias isoladas, ou seja, como agentes individuais. Certamente, esses estudos possuem grande importância pois geram informações para o entendimento dos efeitos adversos associados à exposição a um

agente, possibilitam o conhecimento dos níveis de exposição em que os efeitos são observados, bem como dos mecanismos pelos quais exercem tais efeitos (CORY-SLECHTA, 2005). No entanto, muitas vezes devido à simplicidade, os estudos continuam focados na investigação dos efeitos da exposição a um único agente, apesar do conhecimento atual de que no “mundo real” ocorrem exposições simultâneas a múltiplos xenobióticos (BELLINGER *et al.*, 2008). No ambiente em geral, são observadas exposições a misturas de agentes químicos, isto é, a exposição raramente ocorre a um composto isolado (CORY-SLECHTA, 2005).

Embora os efeitos da exposição a misturas foram primariamente relatados em estudos *in vitro* (TIFFANY-CASTIGLIONI *et al.*, 2006) e em estudos com animais (CORY-SLECHTA, 2005), atualmente existe uma maior preocupação em entender os efeitos da exposição a misturas de agentes químicos sobre a saúde humana, especialmente no sentido de proteção da saúde pública. Isso porque há um maior reconhecimento de que os seres humanos estão rotineiramente expostos simultaneamente a múltiplos xenobióticos e, ainda, há evidências de que a toxicidade de agentes químicos individuais depende da sua interação com outros xenobióticos (HENN *et al.*, 2014). Em se tratando de crianças, especialmente, há um aumento da consciência científica em relação aos impactos aditivos ou sinérgicos que essas podem sofrer a partir de co-exposições (HENDRYX e LUO, 2018).

Quando se trata de co-exposições, os metais representam os xenobióticos de preocupação particular em relação à saúde infantil, uma vez que diversos deles estão presentes simultaneamente no ambiente (HENN *et al.*, 2014). Também, porque o sistema nervoso central é um dos principais órgãos alvos para muitos metais encontrados no ambiente (SANDERS *et al.*, 2015). Embora se saiba que esses metais, tais como Pb, Cd, As, Mn e Hg, individualmente, contribuem para déficits cognitivo e comportamental em crianças, pouco se sabe sobre os efeitos combinados da exposição a múltiplos metais sobre a capacidade cognitiva e comportamento em crianças (KORDAS *et al.*, 2015). Apesar das informações serem limitadas, há evidências de que esses xenobióticos podem interagir causando efeitos adversos sinérgicos ou antagônicos para a saúde, especialmente sobre o neurodesenvolvimento (HENN *et al.*, 2014; SANDERS *et al.*, 2015). Estudos investigando os efeitos da exposição a pelo menos dois metais simultaneamente sobre a cognição sugerem que essas combinações podem afetar diferentes

aspectos da capacidade cognitiva infantil (THATCHER *et al.*, 1982), ou resultar em toxicidade aumentada (WRIGHT *et al.*, 2006). Em uma revisão, Heen *et al.* (2014) concluíram que há evidências sugestivas de que a toxicidade do Pb aumenta quando crianças são co-expostas a outros metais, tais como Mn, As, Cd e Hg. Resultados similares foram relatados por Kim *et al.* (2009), que sugeriram efeitos adversos da interação aditiva do Pb e Mn sobre a inteligência em crianças em idade escolar. Adicionalmente, nosso grupo de pesquisa avaliou os níveis de múltiplos metais em sangue e cabelo de crianças, e encontrou associações significativas entre altos níveis de Mn e Fe no cabelo de crianças e déficit cognitivo (NASCIMENTO *et al.*, 2015).

Os agrotóxicos representam outro grupo de xenobióticos de importância toxicológica para a saúde humana quando se trata de exposição a múltiplos agentes, especialmente porque frequentemente são utilizadas misturas de diversas classes de agrotóxicos nas culturas agrícolas (HERNÁNDEZ *et al.*, 2013). Devido ao grande número de agrotóxicos utilizados simultaneamente, os seres humanos estão expostos a mais de um agrotóxico ao mesmo tempo, portanto, o risco cumulativo das misturas de agrotóxicos deve ser considerado. A mistura de agrotóxicos pode levar a efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos (MWILA *et al.*, 2013). Estudos *in vitro* utilizando células animais sugerem que a exposição combinada a agrotóxicos OFs e carbamatos produz um efeito aditivo de inibição da enzima AChE (TAHARA *et al.*, 2005; MWILA *et al.*, 2013). Além disso, efeitos adversos sobre a cognição em crianças foram associados à exposição múltipla a agrotóxicos OFs e carbamatos em um estudo recente, sugerindo um efeito neurotóxico aditivo desses xenobióticos (ROWE *et al.*, 2016).

Adicionalmente, em um estudo *in vitro* de Ghisari *et al.* (2015), foi investigado o potencial efeito de desregulação endócrina sobre a tireoide de uma mistura de agrotóxicos, incluindo classes como organofosforados, ditiocarbamatos, piretroides e reguladores de crescimento. Os resultados mostraram um efeito combinado da mistura, indicando efeitos adversos aditivos sobre a função tireoidiana.

7. Estresse Oxidativo

O aumento na produção de espécies reativas oxidantes e/ou diminuição das defesas antioxidantes leva a um desequilíbrio que caracteriza o estresse oxidativo (SIES, 1997; MOSTAFALOU e ABDOLLAHI, 2013). A oxidação é parte fundamental da vida aeróbia e do metabolismo humano, portanto, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses radicais contêm um elétron desemparelhado centrado nos átomos de oxigênio (espécies reativas de oxigênio – EROs) ou nitrogênio (espécies reativas de nitrogênio – ERNs). No organismo, as espécies reativas são produzidas em um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes uma vez que estão envolvidas na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intracelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, o excesso na produção dessas espécies, causado por diversos fatores como exposição a xenobióticos, conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (BARREIROS e DAVID, 2006; BARBOSA *et al.*, 2010).

O excesso de radicais livres é combatido por antioxidantes produzidos no próprio organismo ou adquiridos através da dieta. Os antioxidantes consistem em qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, atrasa ou inibe significativamente a oxidação deste substrato de maneira eficaz (BARREIROS e DAVID, 2006; COTINGUIBA *et al.*, 2013). O sistema antioxidante é composto por antioxidantes produzidos pelo organismo, incluindo as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) e glutathione reductase (GR). Além disso, o organismo dispõe de outro importante antioxidante endógeno não-enzimático, a glutathione (GSH), um tripeptídeo que desempenha função fundamental na proteção das células contra danos oxidativos causados por radicais oxidantes, agindo como sequestradora de radicais na homeostase tiólica, na manutenção do balanço redox da célula e na defesa contra agentes eletrofílicos, como os xenobióticos (COTINGUIBA *et al.*, 2013). O sistema de defesa antioxidante não-enzimático inclui também os compostos antioxidantes de origem dietética, tais como ácido ascórbico (vitamina C), vitamina E (α -tocoferol) e vitamina A (retinol), licopeno e β -caroteno (BARBOSA *et al.*, 2010).

O estresse oxidativo, gerado a partir da indução na produção de espécies reativas, é um mecanismo de toxicidade comum a diversos xenobióticos ambientais, tais como agrotóxicos (MOSTAFALOU e ABDOLLAHI, 2013), metais (WANG *et al.*, 2016), nicotina (DA SILVA *et al.*, 2014) e solventes (MORO *et al.*, 2010). Durante o processo de instalação do estresse oxidativo, são gerados diversos marcadores biológicos que permitem identificar e quantificar os danos sofridos no organismo (MORI *et al.*, 2015). Esses marcadores são derivados, sobretudo, da oxidação de lipídios, proteínas e DNA. Adicionalmente, a avaliação do estresse oxidativo pode ser realizada indiretamente, através da medida da capacidade antioxidante (BARBOSA *et al.*, 2010).

7.1 Biomarcadores de Estresse Oxidativo

Os biomarcadores de estresse oxidativo devem, idealmente, refletir os danos causados pelas espécies reativas sobre o sistema biológico e a eficiência da defesa antioxidante de contrapartida (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

A membrana é um dos componentes celulares mais atingidos frente à ação das espécies reativas em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações nas propriedades da membrana celular tais como na sua fluidez e permeabilidade, bem como na sua atividade de ligação a proteínas, com efeitos negativos para as funções celulares (ANTUNES *et al.*, 2008; ROSSNER JR. *et al.*, 2009). O malondialdeído (MDA) é um dos produtos secundários da peroxidação lipídica e, portanto, é utilizado como um indicador de injúria à membrana celular sendo a sua quantificação nos sistemas biológicos um parâmetro importante para a avaliação do dano oxidativo celular (GROTTO *et al.*, 2007; ANTUNES *et al.*, 2008). Isso, porque o MDA possui ação citotóxica e genotóxica, encontrando-se em níveis aumentados em algumas patologias associadas ao estresse oxidativo (ANTUNES *et al.*, 2008). Existem diferentes métodos disponíveis para a quantificação do MDA em fluidos biológicos. No entanto, a quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) possibilita determinações mais específicas e sensíveis. Um método analítico para a quantificação dos níveis plasmáticos de MDA por CLAE com detector visível foi desenvolvido em nosso grupo de pesquisa, onde o plasma é submetido a uma etapa de hidrólise alcalina, desproteinização ácida, derivatização

com ácido tiobarbitúrico (TBA) e extração com n-butanol. Posteriormente, o MDA é quantificado a 532 nm por CLAE-VIS (GROTTO *et al.*, 2007).

Durante o estresse oxidativo, as proteínas também são alvo das espécies reativas. O primeiro evento é a formação de um radical centrado no carbono, por extração do hidrogênio do carbono α , em uma ligação peptídica, ocorrendo fragmentação das cadeias e oxidação de quase todos os tipos de aminoácidos, com produção frequente de compostos carbonilados. Portanto, essa modificação, ou seja, o conteúdo de proteínas carboniladas (PCO), é medida como um produto da oxidação de proteínas (VASCONCELOS *et al.*, 2007; ROSSNER JR. *et al.*, 2009). A oxidação de proteínas causa um aumento na instabilidade termodinâmica e induz mudanças na estrutura terciária, o que afeta uma variedade de funções celulares incluindo os sistemas enzimáticos e o funcionamento de receptores (BAIERLE *et al.*, 2015).

Adicionalmente, a atividade da enzima ALAD tem sido utilizada como um marcador de estresse oxidativo. A ALAD é uma metaloenzima que requer grupos tiólicos (-SH) reduzidos para a sua atividade, sendo esses altamente sensíveis à oxidação por agentes pró-oxidantes, o que leva à reduzida atividade enzimática (VALENTINI *et al.*, 2007; BAIERLE *et al.*, 2014). Além disso, a inibição da ALAD leva ao acúmulo do substrato ácido δ -aminolevulinato (ALA), exacerbando a produção de espécies reativas, uma vez que o ALA é um composto pró-oxidante. Portanto, o estresse oxidativo pode aumentar indiretamente devido ao aumento dos níveis do substrato (ROCHA *et al.*, 2012; BAIERLE *et al.*, 2014). Sabe-se que o ALA pode atravessar a barreira hematoencefálica, e acredita-se que o acúmulo do substrato gerado pela inibição enzimática da ALAD pode estar associado a efeitos neurocomportamentais (BAIERLE *et al.*, 2014). De fato, a atividade enzimática da ALAD foi positivamente associada a algumas funções neuropsicológicas em crianças, incluindo memória de trabalho, capacidade fonológica e linguagem, em um estudo recente do nosso grupo de pesquisa (NASCIMENTO *et al.*, 2016). A memória de trabalho foi também correlacionada positivamente com a atividade da enzima ALAD em idosos, em outro estudo prévio do nosso grupo de pesquisa (BAIERLE *et al.*, 2014).

A exposição contínua a espécies reativas geradas pelo estresse oxidativo, oriundo de várias fontes, leva o organismo a desenvolver mecanismos de defesa,

dentre eles, o sistema de defesa antioxidante (KOHEN e NYSKA, 2002). Esse sistema pode ser endógeno (GSH, SOD, CAT, GPx) ou exógeno, que inclui as vitaminas C (ácido ascórbico), E (α -tocoferol) e A (retinol), bem como os carotenoides como licopeno e β -caroteno (BARBOSA *et al.*, 2010; ROEHRS *et al.*, 2011).

A glutationa (GSH), existente no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) não proteico mais abundante do meio intracelular. A GSH pode ser considerada um dos mais importantes antioxidantes da célula sendo, portanto, fundamental a sua quantificação. Após a exposição ao agente oxidante, a GSH se oxida à sua forma GSSG atuando como um co-substrato para a enzima glutationa peroxidase (GSH-Px), que age combatendo os níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroperóxidos lipídicos, oriundos do ataque de espécies radicalares. A recuperação da GSH, por sua vez, é feita pela enzima glutationa redutase (GR), uma etapa essencial para manutenção da integridade do sistema de proteção celular. Essa conversão ocorre às custas da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato redutase (NADPH), proveniente da via das pentoses. Outros sistemas enzimáticos de defesa antioxidante operando em conjunto com as enzimas já citadas incluem a SOD, que catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , bem como a CAT, que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 (Figura 6). (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; ROVER JUNIOR *et al.*, 2001; COTINGUIBA *et al.*, 2013). Portanto, uma vez que as enzimas antioxidantes possuem uma função importante contra o dano mediado pelo estresse oxidativo, a determinação das suas atividades é uma forma de avaliação da capacidade antioxidante endógena (BRUCKER *et al.*, 2013).

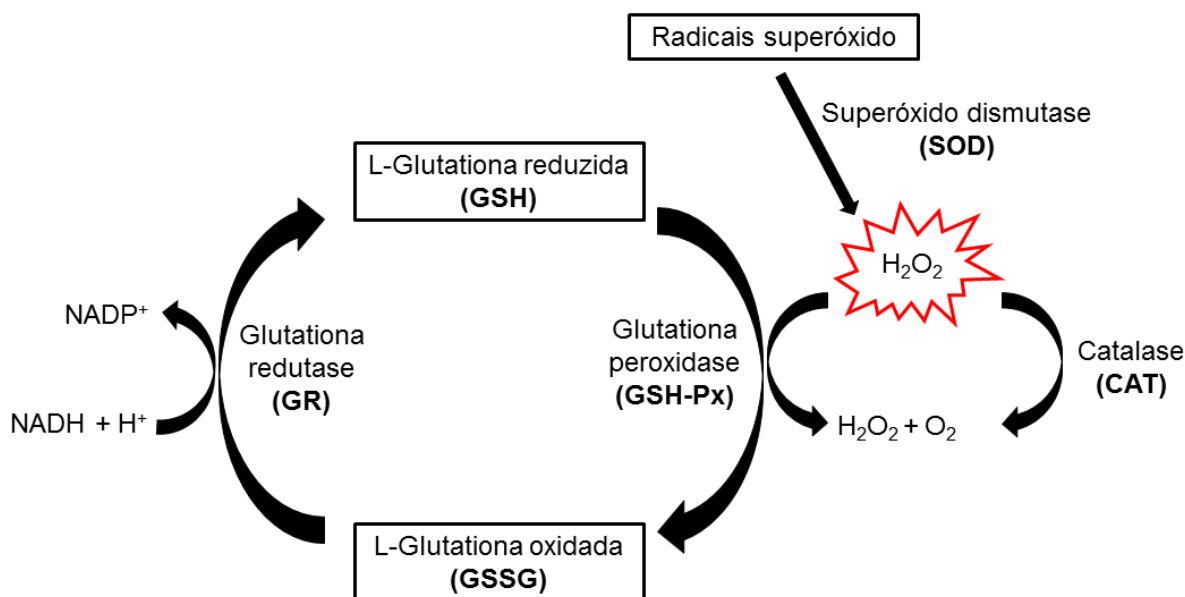


Figura 6. Esquema representativo do sistema de defesa antioxidante endógeno (Adaptado de ROVER JUNIOR *et al.*, 2001).

Além da proteção fornecida pelos antioxidantes endógenos, o organismo também dispõe dos antioxidantes exógenos provenientes da dieta para combater as espécies reativas. Entre esses compostos, estão o β -caroteno, α -tocoferol (vitamina E), retinol (vitamina A) e ácido ascórbico (vitamina C) (BARREIROS e DAVID, 2006; CHARÃO *et al.*, 2012).

A vitamina C é um dos nutrientes hidrossolúveis mais importantes da dieta humana, atuando como um importante agente redutor convertendo a maioria das EROs ou ERNs que são formadas no organismo em espécies inofensivas. Portanto, por agir como um antioxidante *in vivo*, a ingestão diária de ácido ascórbico fornece proteção contra o desenvolvimento de doenças crônicas, e a quantificação dos níveis circulantes de vitamina C é considerada um biomarcador de estresse oxidativo em humanos (BARREIROS e DAVID, 2006; BAIERLE *et al.*, 2012). Um método analítico para a quantificação sérica dos níveis de vitamina C circulantes por CLAE com detecção ultravioleta e, usando o tris [2-carboxietil] hidrocloreto de fosfina (TCEP) como agente redutor para evitar a oxidação da vitamina C *ex vivo* em amostras de sangue, foi desenvolvido em nosso grupo de pesquisa (BAIERLE *et al.*, 2012).

A vitamina E é constituída principalmente por quatro tocoferóis, sendo o α -tocoferol o mais ativo. O tocoferol é um antioxidante lipossolúvel que atua inibindo a propagação da peroxidação lipídica *in vivo* dos ácidos graxos poli-insaturados das

membranas e lipoproteínas. Adicionalmente, outros compostos que possuem importantes propriedades antioxidantes são os carotenoides, tais como o retinol (vitamina A) e o β -caroteno, que representa a principal fonte de vitamina A. Os carotenoides são pigmentos intensamente coloridos, lipossolúveis, sintetizados por plantas e microrganismos, presentes em muitos alimentos incluindo frutas, vegetais e peixes. A capacidade antioxidante desses compostos está associada com a sua habilidade de capturar radicais e outras espécies, como oxigênio singlete, em baixas concentrações e em baixa pressão parcial de oxigênio, tais como aquelas da maioria dos tecidos sob condições fisiológicas (BARREIROS e DAVID, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2007). Um método analítico para a determinação simultânea no plasma de retinol, α -tocoferol, β -caroteno e licopeno foi validado em nosso grupo de pesquisa, utilizando CLAE com detecção visível/fluorescência (CHARÃO *et al.*, 2012).

OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Estudar a potencial associação entre a exposição ambiental a xenobióticos provenientes de atividades agrícolas no meio rural, tais como agrotóxicos, metais e nicotina, e danos à saúde de crianças, que residem em uma região agrícola no centro do Estado do RS.

2. Objetivos Específicos

- ❖ Avaliar as concentrações de metais em amostras biológicas (sangue e cabelo);
- ❖ Avaliar biomarcadores de exposição a inseticidas inibidores da colinesterase;
- ❖ Avaliar biomarcador de exposição à nicotina;
- ❖ Avaliar possíveis alterações de função tecidual, através de marcadores periféricos de rotina;
- ❖ Avaliar a possível desregulação endócrina de xenobióticos ambientais sobre a glândula tireoide;
- ❖ Avaliar os níveis do hormônio prolactina;
- ❖ Avaliar biomarcadores de estresse oxidativo;
- ❖ Avaliar biomarcadores de dano renal precoce;
- ❖ Realizar avaliação clínica;
- ❖ Estudar as possíveis associações entre biomarcadores de exposição aos agentes químicos e alterações fisiopatológicas.

PARTE II



CAPÍTULO I

Environmental exposure and effects on health of children from a tobacco-producing region

Manuscrito publicado na revista *Environmental Science and Pollution Research*
(*Environ Sci Pollut Res.*, v. 24 (3), p. 2851-2865, 2017)

Environmental exposure and effects on health of children from a tobacco-producing region

Sabrina N. Nascimento^{1,2} · Gabriela Göethel^{1,2} · Marília Baierle¹ · Anelise Barth¹ · Natália Brucker¹ · Mariele F. Charão^{1,3} · Angela M. Moro¹ · Bruna Gauer^{1,2} · Elisa Sauer^{1,2} · Juliano Durgante¹ · Marcelo D. Arbo^{1,2} · Flavia V. Thiesen⁴ · Tatiana D. Saint' Pierre⁵ · Adriana Gioda⁵ · Rafael Moresco⁶ · Solange Cristina Garcia^{1,2}

Received: 29 June 2016 / Accepted: 7 November 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Children may be environmentally exposed to several hazards. In order to evaluate the health of children living in a tobacco-producing region, different biomarkers of exposure and effect, as well as hematological parameters, were evaluated. Biomarkers of exposure to the following xenobiotics were assessed: pesticides, nicotine, toxic elements, and organic solvents. Oxidative damage markers malondialdehyde (MDA) and protein carbonyls (PCO), vitamin C, microalbuminuria (mALB) levels, and *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) activity were also evaluated. Peripheral blood samples and urine were collected from 40 children (6–12 years), at two different crop periods: in the beginning of pesticide applications (period 1) and in the leaf harvest (period 2). The Wilcoxon signed-rank test for paired

data was used to evaluate the differences between both periods. Biomarkers of exposure cotinine in urine and blood chromium (Cr) levels were increased in period 1 when compared to period 2. Moreover, a significant reduced plasmatic activity of butyrylcholinesterase (BuChE) was observed in period 2 in relation to period 1. Blood Cr levels were above the recommended by WHO in both evaluations. The biomarkers MDA and PCO as well as the kidney dysfunction biomarker, mALB, presented levels significantly increased in period 1. Additionally, decreased lymphocytes and increased basophils were also observed. Cotinine was positively associated with PCO, and Cr was positively associated with PCO and MDA. The increased Cr levels were associated with decreased lymphocytes and increased basophils. Our findings demonstrate that children environmentally exposed to xenobiotics in rural area may present early kidney dysfunction, hematological alterations, as well as lipid and protein damages, associated with co-exposure to different xenobiotics involved in tobacco cultivation.

Communicated by: Philippe Garrigues

✉ Solange Cristina Garcia
solange.garcia@ufrgs.br

¹ Laboratory of Toxicology (LATOX), Department of Analyses, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Ipiranga 2752, Santa Cecília, Porto Alegre, RS CEP: 90610-000, Brazil

² Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

³ Institute of Health Sciences, Feevale University, Novo Hamburgo, RS, Brazil

⁴ Faculty of Pharmacy, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

⁵ Department of Chemistry, Pontifical Catholic University of Rio de Janeiro (PUC-Rio), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

⁶ Laboratory of Clinical Biochemistry, Department of Clinical and Toxicological Analyses, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

Keywords Tobacco · Chromium · Children · Hematological alterations · Microalbuminuria · Oxidative damage · Environmental health

Introduction

Children living in rural settings may encounter environmental hazards derived from agricultural production activities including metals, solvents, and pesticides (Perry 2003; Karr 2012; Miller et al. 2016). The use of chemical substances in agriculture has increased significantly, and Brazil is considered the largest consumer of pesticides worldwide (Benedetti et al. 2013; Pan American Health Organization 2012).

Consequently, the concern regarding the risks to human health generated by exposure to pesticides has increased (Da Silva et al. 2008; Kunst et al. 2014).

Tobacco is among the crops that use pesticides in a large scale. Brazil is currently the world's second largest tobacco producer (Fiori et al. 2015). The state of Rio Grande do Sul, located in the southern region of the country, is the major Brazilian producer (Santos et al. 2015), and this activity is undertaken by more than 220,000 families (Fiori et al. 2015). Therefore, in the tobacco-producing region, it is not only the agricultural workers who are exposed but also all their families, including children living in agricultural communities (Kunst et al. 2014).

To recognize whether a subject is suffering from integrated exposure to a hazardous substance, or even accidental intoxication, and to precociously prevent damage caused by exposure to toxic substances, standardized analytical procedures for the diagnostic investigation of biological materials have become established and these are subsumed under the term "biomonitoring" (Budnik and Baur 2009). Biomonitoring is the preferred approach to assess human exposure to environmental pollutants through several biological media, such as blood and urine. These biological parameters are called biomarkers (Kunst et al. 2014; González-Alzaga et al. 2015). Biomarkers are generally used in health surveillance to monitor chemical exposure (Kim et al. 2010). The most widely used biomarkers include determination of the presence of xenobiotic metabolites, measurements of the activity of specific enzymes, and measurements of damage to the genetic material or macromolecules (Kapka-Skrzypczak et al. 2015). In this context, human biomonitoring studies are needed to evaluate the exposure to multiple environmental chemicals in people living in many regions located near to urban industrial areas, mining, and agricultural areas (Ochoa-Martínez et al. 2016).

Organophosphorous compounds (OPs) and carbamates are among the most common insecticides used in agricultural activities. These pesticides are cholinesterase inhibitors, including human acetylcholinesterase (AChE, specific or true cholinesterase) and butyrylcholinesterase (BuChE, non-specific or pseudocholinesterase). AChE enzyme is found in the human red blood cells (RBCs), in the nervous central system and skeletal muscles, while BuChE is found in liver, smooth muscle, adipocytes, serum, and plasma (Kutty 1980; Kapka-Skrzypczak et al. 2011). Changes in the activity of these enzymes due to exposure to pesticides may be used as a valid biomarker of exposure (Kapka-Skrzypczak et al. 2011, 2015).

In addition to the health risks due to the exposure to a large amount of pesticides, populations living in tobacco-producing regions are in contact with high amounts of other xenobiotics, such as nicotine that is absorbed through the skin from the tobacco leaf (Kunst et al. 2014; González-Alzaga et al. 2015). Cotinine, a nicotine metabolite, is widely used as a biomarker of exposure to tobacco. Its concentration in urine

correlates well with the quantity of nicotine absorbed (Budnik and Baur 2009; Machado et al. 2014). Other relevant xenobiotics ubiquitous in the environment are the solvents. The most common solvents and solvent mixtures are found in the rural environment by several sources as pesticides, fuels, and cigarette smoke (Perry 2003; Falck et al. 2015). Exposure to these xenobiotics can occur via transdermal absorption, ingestion, or inhalation (Falck et al. 2015). Quantification of the metabolites of solvents in urine has been used as biomarker of exposure to these xenobiotics (Moro et al. 2010).

Moreover, metals could be present at highly varying concentrations in the environment from sources as manufacturing products. Some pesticides, such as fertilizers, may contain trace element contaminants including arsenic (As), lead (Pb), cadmium (Cd), chromium (Cr), and nickel (Ni) (Gorman et al. 2011; Jiao et al. 2012). According to Zoffoli et al. (2013), fertilizers account for the highest toxic element loads to tobacco fields due to the amount used, as well as the highest levels of these elements in these products. Although several adverse health effects of toxic elements have been known for a long time, such as nephrotoxicity and genotoxicity, exposure to these xenobiotics might be significant, in particular in less developed countries, where the general population is exposed to them via air, soil, food, and water (Järup 2003; Berglund et al. 2011).

Several studies have suggested that oxidative stress (OS) may be involved in the toxicity of pesticides and nicotine (Da Silva et al. 2008; Muniz et al. 2008; Prakasam et al. 2001; Wafa et al. 2013). Moreover, the unifying factor in determining toxicity and carcinogenicity of toxic elements, such as As, Cd, Cr, Ni, and Pb, is the generation of free radicals and OS (Wang et al. 2015). Oxidative stress is an imbalance between the levels of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant mechanisms of the organism (Muniz et al. 2008; Rossner et al. 2009). ROS production may arise from exogenous sources (e.g., diet and environmental factors) as well as from endogenous sources (e.g., metabolic processes) (Rossner et al. 2009). Increased ROS production and/or decreased capacity of antioxidant defense can disrupt oxidative balance and result in damaging to all components of cells including lipids, proteins, and DNA (Muniz et al. 2008; Mostafalou and Abdollahi 2013). Oxidative stress causes peroxidation of lipids, which, in turn, changes the properties of cellular membranes, such as their fluidity and activity of membrane-bound proteins, with negative effects on cellular functions (Rossner et al. 2009). Malondialdehyde (MDA) is one of the better-known secondary products of lipid peroxidation, and it can be used in biomaterials as an indicator of cell membrane injury (Grotto et al. 2007). Protein carbonyls (PCO) are a major product of protein oxidation. Oxidation of proteins causes their inactivation, failure to fold correctly, or proteolysis (Rossner et al. 2009), affecting signal transduction mechanisms, transport and enzymatic systems, and receptor functioning (Kapaki et al. 2007).

Several studies from Brazil have evidenced toxic effects to the health of tobacco farmers (Da Silva et al. 2008, 2012, 2014; Fiori et al. 2015; Alves et al. 2016; Kahl et al. 2016). However, exposure assessment studies on children are scarce (Kunst et al. 2014). Children have been exposed to xenobiotics when parents bring contaminated clothing to home, use agricultural products from work at home (Miller et al. 2016), and when children play near to crops. Children absorb toxicants via the respiratory and gastrointestinal systems more readily than adults, and accumulated xenobiotics are more slowly removed despite their higher metabolic rates (Kapka-Skrzypczak et al. 2015). Furthermore, the period of infant development is remarkably susceptible to environmental hazardous substances. Toxic exposures during early development could cause even subtle changes that may lead to important functional deficits and increased risks of disease later in life (Grandjean et al. 2008). Therefore, children constitute a population group that is particularly vulnerable to the environmental exposure to xenobiotics, being advisable to evaluate the effect of these substances in children living in rural areas with intensive use of agrochemicals (Kapka-Skrzypczak et al. 2015; Miller et al. 2016).

In tobacco cultivation, the simultaneous use of pesticides with different formulations is common, and the applications vary over the months of the year. In this line, the purpose of this study was to evaluate—in two different periods of tobacco cultivation—the biomarkers of exposure to OPs and carbamate pesticides, nicotine, organic solvents, and toxic elements, in children living in a tobacco-producing region of Southern Brazil. For this, the possible changes in enzymatic activity of BuChE, the urinary levels of cotinine and metabolites of solvents, and the blood concentrations of toxic elements were assessed. In addition, we aimed to study the extent of oxidative stress and antioxidant status and to quantify the early dysfunction kidney biomarkers and hematological parameters in such children.

Material and methods

Study population and sample collection

Forty children aged 6–12 years, who lived in the rural area from Agudo (in the central region of the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil), participated in this work. The most prevalent economic activity in this area is agriculture, and the main crop practiced by children's parents is tobacco, with intense use of several types of pesticides. Our research group contacted two schools, whose principals helped us with a formal invitation for all children aged 6–12 years. A total of 66 children accepted to participate of our research. Biological sample collections were performed twice in the same year: in the month of June (period 1), in a period immediately after

the storage of tobacco leaves and at the beginning of the period of pesticide application in the region, and in December (period 2), in the period of leaf harvest. These periods were chosen to evaluate if there were differences in biomarkers of exposure and effect in children between these two crop periods, according to demonstrated in Fig. 1. For the present study, just children who participated of the two sample collections were selected totalizing 40 children, 61% of all children participants. Children's parents provided written consent and answered a questionnaire to assess general children's health, lifestyle of children and parents, parents' education data, and pesticides used in the agricultural activities. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (Registry CAAE no. 11340912.4.0000.5347).

Children's venous blood samples were obtained by venipuncture using sodium-EDTA vacuum tube (2 mL). Aliquots from EDTA tubes were immediately used for hemograms. After, plasma samples were obtained from EDTA tubes by centrifugation at $1500\times g$ for 10 min at room temperature to quantify MDA and PCO levels. A blood vacuum tube with heparin (4 mL) was collected, and aliquots of 500 μL were separated to determine toxic elements: Al, As, Cd, Cr, Hg, Ni, and Pb. Afterwards, these tubes were immediately centrifuged at $1500\times g$ for 10 min at room temperature to obtain plasma for BuChE activity determination. Another blood collection tubes without anticoagulant (2 mL) were centrifuged at $1500\times g$ for 10 min at room temperature. The serum was removed and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for vitamin C determination. Urine samples (20 mL) were collected for quantification of cotinine, hippuric (HA), methylhippuric (mHA), phenylglyoxylic (PGA), and mandelic acids (MA), creatinine levels, microalbuminuria (mALB), and *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) activity.

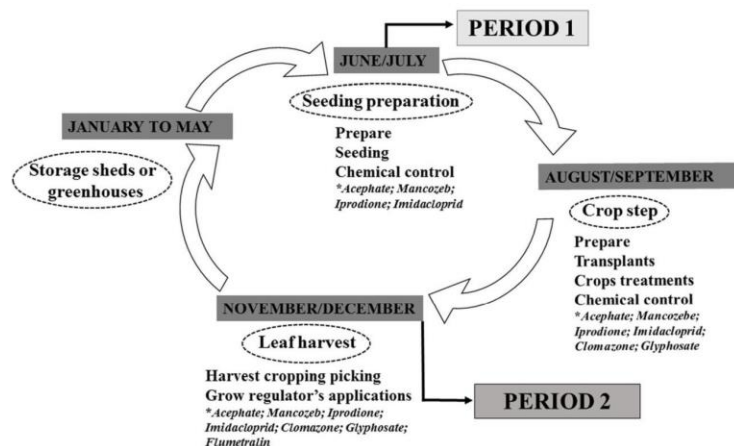
A single person performed all height and weight measurements. Children took off their shoes and kept their clothes for both assessments. Height was taken using a measuring board. Weight was measured with an upright scale (Plenna Sport® MEA07420, Plenna digital and analog scales, São Paulo, SP, Brazil), with a capacity to weigh 150 kg in 100 g increments. Body mass index (BMI) was calculated by dividing the weight, in kilograms, by the square of the height in meters.

Biomarkers of exposure to xenobiotics

Butyrylcholinesterase activity

The activity of BuChE was determined in plasma by spectrophotometry, using commercial laboratory kits (Doles reagents, Goiânia, GO, Brazil). The reaction is based in the hydrolysis of propioniltiocolina by plasmatic cholinesterase (BuChE) with the release of a free sulfhydryl group in thiocoline levels. The free SH group reacts with 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic

Fig. 1 Tobacco crop cycle in Southern Brazil. Asterisks indicate some of the main pesticides commonly used by children's parents during tobacco cultivation. Adapted from Almeida (2005) and Souza Cruz (2016)



acid) (DTNB) leading to formation of a yellow compound with maximum absorption at 410 nm. BuChE activity assay was performed in duplicates, and the results were expressed as $UI L^{-1}$.

Cotinine urinary levels

Cotinine levels determination was performed in urine samples using a high-performance liquid chromatographic equipped with a UV detector (HPLC-UV), adapted from Cattaneo et al. (2006). The chromatographic equipment was purchased from Shimadzu® (Kyoto, Japan). The separation was achieved with a reverse-phase C18 column. The mobile phase was a mixture of Milli-Q water/methanol/sodium acetate $0.1 mol L^{-1}$ /acetonitrile (50:15:25:10, v/v), adding 1 mL of citric acid $0.034 mol L^{-1}$ and 5.0 mL of trimethylamine for each liter of solution, adjusting to pH 4.4. The flow rate was maintained isocratically at $0.5 mL min^{-1}$. The absorbance of the eluent was monitored at 260 nm; the total run time was 10 min. The 2-phenylimidazole was used as internal standard. The detection limit of the method was $5.0 ng mL^{-1}$. For sample, a volume of $25 \mu L NaOH 10 M$ and $100 \mu L 2$ -phenylimidazole ($1.0 \mu g mL^{-1}$), used as internal standard, were added to 2 mL urine previously centrifuged. After, the extraction was performed with 4.0 mL dichloromethane by rotatory mixer for 40 min and centrifuged at $300 \times g$ for 15 min. Then, 2 mL organic phase was dried under compressed air at ambient temperature. Following, 200 μL mobile phase was added, and 20 μL was injected into the HPLC. Cotinine assay was performed in duplicates, and cotinine levels were expressed as $ng mL^{-1}$. Moreover, cotinine levels were adjusted by urinary creatinine excretion and were also expressed as $\mu g g^{-1}$ creatinine.

Quantification of toluene, xylene, styrene, and ethylbenzene metabolites

Urinary levels of HA (metabolite of toluene), mHA (metabolite of xylene), PGA, and MA (metabolites of styrene and ethylbenzene, respectively) were determined simultaneously by HPLC-UV using a Knauer® column (150 nm, 4 mm, 5 μm), according to the method optimized and validated in our laboratory (Bulcão et al. 2008). Results were expressed as $g g^{-1}$ creatinine.

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were, respectively, 0.001 and 0.003 $g g^{-1}$ creatinine for HA, 0.003 and 0.008 $g g^{-1}$ creatinine for mHA, 0.001 and 0.004 $g g^{-1}$ creatinine for phenylglyoxylic acid, and 0.009 and 0.020 $g g^{-1}$ creatinine for MA.

Blood toxic elemental concentrations

For the measurement of toxic elements (Al, As, Cd, Cr, Hg, Ni, and Pb) in blood samples, 1 mL 65% ultrapure nitric acid was added to 500 μL of whole blood in a polypropylene digestion tube. Afterwards, the mixture was digested by heating at 95 °C for 4 h. Extracts were cooled at room temperature, and the volume was made up to 10 mL with ultrapure water. Toxic element concentrations were determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) using a NexIon 300X spectrometer (PerkinElmer-Sciex, USA) (Mateus et al. 2013). An Rh ($400 \mu g L^{-1}$) acidified aqueous solution (1% HNO_3) was added in line as internal standard, and the calibration curve ranged from 5 to 80 $\mu g L^{-1}$. Calibration solutions were prepared using a 10 $mg L^{-1}$ stock solution (PerkinElmer 29). The LOD and LOQ were calculated based on the standard deviation of the calibration blanks ($n = 10$): three times the standard deviation

for the LOD (or ten times for the LOQ), divided by the slope of the calibration curve. Precision and accuracy of the analytical method were monitored with reference standards that were analyzed in intervals of 15 samples. For differences greater than 10%, a new calibration was applied.

Oxidative damage biomarkers

Malondialdehyde levels

Lipid peroxidation was determined through the MDA quantification in plasma by HPLC with VIS detection (Knauer®, Berlin, Germany), according to Grotto et al. (2007). The levels of MDA were expressed as mmol L⁻¹.

Protein carbonyls

PCO levels were determined using a non-competitive ELISA method following Buss et al. (1997), with modifications. Total protein concentration in plasma was measured by Bradford method using bovine serum albumin as standard. Plasma samples were diluted with PBS buffer (4 mg protein mL⁻¹) and derivatized with 2,4-dinitro-phenylhydrazine (DNPH). After, samples were incubated in Maxisorb multiwall plates (Nunc Immuno 96 Microwell™ Maxisorp) overnight at 4 °C in the dark. PCO levels were detected using a dinitrophenyl rabbit IgG antiserum (Sigma, St. Louis, MO, USA) as the primary antibody and a monoclonal anti-rabbit immunoglobulin G peroxidase conjugate (Sigma, St. Louis, MO, USA) as the secondary antibody. Color development was performed with *o*-phenylenediamine and H₂O₂. After incubation at 37 °C for 15 min, the reaction was stopped with H₂SO₄. Absorbance was measured using a microplate reader (SpectraMax M2e, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) at 492 nm in triplicates. PCO concentration was expressed as nmol carbon-yl mg⁻¹ protein.

Exogenous antioxidant

Serum vitamin C concentration

Determination of serum vitamin C concentrations was performed according to Baierle et al. (2012), by HPLC-UV using tris[2-carboxy-ethyl]phosphine hydrochloride (TCEP) as a reducing agent. Firstly, a deproteinization process of the sample was made with perchloric acid 10% (v/v). Then, the supernatant obtained after centrifugation was injected into the chromatographic system. The results of vitamin C concentrations were expressed as mg L⁻¹.

Early kidney dysfunction biomarkers: microalbuminuria and *N*-acetyl-β-D-glucosaminidase

The determination of mALB levels was performed by the immunoturbidimetric method using the Cobas® MIRAs (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) automated analyzer, through commercial kits (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brazil). Results were expressed as mg g⁻¹ creatinine. The NAG enzymatic activity was assessed by spectrophotometry, following the method of Maruhn (1976), and the results were expressed as U g⁻¹ creatinine.

Creatinine concentrations

Urinary creatinine concentration was determined by spectrophotometry according to Jaffé (1886), with commercial kits (Doles reagents, Goiânia, GO, Brazil).

Hematological parameters

Analyses were carried out using an ABX Pentra XL 80 Hematology analyzer (ABX Horiba®, France). Red blood parameters (number of red blood cells, hemoglobin, and hematocrit) were assessed. White blood parameters (total number of leukocytes and total number and percentage of neutrophils, lymphocytes, eosinophils, monocytes, and basophils) were also determined.

Statistics

Data were analyzed using IBM SPSS Statistics software (version 22). A normality test was used to check the data distribution, and each variable was assessed by Shapiro-Wilk test. The non-parametric Wilcoxon rank-sum test was used to compare differences between the two different periods evaluated. For comparison of values of the same subjects at period 1 and at period 2, the Wilcoxon signed-rank test was applied. Multiple linear regression analysis was applied to verify the influence of Cr blood levels and urinary cotinine levels on oxidative damage to proteins. The results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) or mean ± standard deviation (SD). Spearman's rank correlation analysis was carried out to evaluate the associations between pairs of variables. Values of $p \leq 0.05$ were considered significant.

Results

Sample characteristics

A summary of sociodemographic and anthropometric characteristics, and the data obtained from the questionnaire, is

presented in Table 1. Children were from 34 families; most parents were agricultural workers and had primary school (72.9%) as education level. In addition, most parents were non-smokers (68.4%). The house of 84.2% of children was near to tobacco crops (<10 km). Table 2 shows the most common pesticides used in the tobacco crops of the region. Of these products, three contain active ingredients classified as “extremely toxic,” one as “highly toxic,” seven as “moderately toxic,” and two as “slightly toxic” according to the Brazilian Health Regulatory Agency (Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)) (ANVISA 2016).

Biomarkers of exposure to xenobiotics

The biomarkers used to evaluate the level of exposure to organophosphates and carbamate pesticides, as well as exposure to nicotine, were BuChE activity in plasma and cotinine in urine, respectively. As shown in Fig. 2a, BuChE activity was significantly inhibited in period 2 ($9211.51 \pm 231.0 \text{ UI L}^{-1}$) in relation to period 1 ($9810.2 \pm 312.5 \text{ UI L}^{-1}$) ($p < 0.05$). In addition, Spearman’s rank correlation was found between BuChE activity and BMI ($r = 0.266; p = 0.017; n = 80$).

The urinary levels of cotinine were significantly higher in period 1 ($23.17 \pm 3.68 \text{ ng mL}^{-1}$) in comparison to period 2 ($13.53 \pm 1.89 \text{ ng mL}^{-1}$) ($p < 0.05$) (Fig. 2b). Additionally, when cotinine levels were adjusted by urinary creatinine excretion, the significant difference was maintained: 28.41 ± 4.16 (period 1) vs. 15.94 ± 2.26 (period 2) $\mu\text{g g}^{-1}$ creatinine ($p < 0.05$).

Table 1 Sociodemographic and anthropometric characteristics of children

	Number	Mean	SD	Min	Max
Age (years)	40	8.60	0.29	6	12
Height (cm)	40	136.70	16.70	117.0	165.0
Weight (kg)	40	32.15	1.50	20.40	59.10
BMI (kg m^{-2})	40	17.03	0.42	13.50	28.50
Boys	23				
Girls	17				
Parents’ education					
Primary school	27 (72.9%)				
Secondary school	10 (27.1%)				
Parents’ smoking habits					
Smokers	12 (31.6%)				
Non-smokers	26 (68.4%)				
House near to tobacco crops					
Yes	32 (84.2%)				
No	6 (15.8%)				

SD standard deviation, Min minimum, Max maximum, BMI body mass index

Regarding to levels of urinary metabolites of organic solvents, it should be noted that only HA was found in the urine of children in the two evaluations. No significant difference was found in urinary HA levels, although increased levels were observed in period 1 ($0.45 \pm 0.05 \text{ g g}^{-1}$ creatinine) when compared to period 2 ($0.36 \pm 0.07 \text{ g g}^{-1}$ creatinine).

Concentrations of blood elements were determined as biomarkers of exposure to the following toxic elements: Al, As, Cd, Cr, Hg, Ni, and Pb (Table 3). Significant differences were found in samples between the two periods for As, Hg, Ni, and Pb, whose levels were lower in period 1 in relation to period 2 ($p < 0.05$). For Cr blood levels, there was an increase in period 1 when compared to period 2 ($p < 0.01$). Despite the differences in concentrations between the two samples, only Cr presented mean above the recommended levels by FAO/WHO/IAEA (1996) in both evaluations. The As concentration in period 2 was upcoming of maximal recommended level by WHO, and the mean Ni concentration was above such recommended level in the second sample.

Additionally, Spearman’s correlation test showed that Cr blood levels were positively correlated with HA urinary levels ($r = 0.362; p < 0.01; n = 80$).

Biomarkers of oxidative damage and exogenous antioxidant

Results of oxidative damage markers are presented in Table 4. The biomarkers MDA and PCO presented levels significantly increased in period 1 when compared to period 2 ($p < 0.01$). Though vitamin C concentrations were significantly higher in period 1 in relation to period 2 ($p < 0.01$), they were within the reference values in both periods ($4.0\text{--}15.0 \text{ mg L}^{-1}$) (Burtis et al. 2008).

Additionally, PCO levels were positively correlated with cotinine urinary levels ($p < 0.001$) (Fig. 3). Moreover, increased PCO and MDA levels were correlated with increased Cr blood levels (Fig. 4a, b, respectively) ($p < 0.05$).

Multiple linear regression analysis

For the multiple regression analysis (Table 5), factors that may influence the increase of PCO plasmatic levels were selected. This model accounted for approximately 45% of the increased PCO levels, and among independent variables analyzed, Cr blood levels (β estimate = 0.593; $p = 0.000$) and urinary cotinine levels (β estimate = 0.253; $p = 0.011$) had a greater influence. Once β estimate for Cr was higher than that found for cotinine, the toxic metal seems to have more influence on increase of oxidative damage to proteins than nicotine, in this model.

Table 2 List of the most commonly pesticides used by children’s parents during tobacco cultivation

Pesticides	Commercial name	Active ingredient	Chemical class	Hazard classification ^a
Fungicides	Dithane® NT	Mancozeb	Dithiocarbamate	Class III
	Infinito®	Propamocarb/fluopicolide	Carbamate/benzamide pyridine	Class III
Insecticides	Rovral®	Iprodione	Dicarboximide	Class IV
	Confidor® S	Imidacloprid	Neonicotinoid	Class III
	Decis® 25EC	Deltamethrin	Pyrethroid	Class III
	Evidence® 700WG	Imidacloprid	Neonicotinoid	Class III
	Gamit® 360CS	Clomazone	Isoxazolidinone	Class III
	Orthene® 750BR	Acephate	Organophosphate	Class III
	Talstar® 100EC	Bifenthrin	Pyrethroid	Class II
Herbicides	Boral® 500SC	Sulfentrazone	Triazolone	Class I
	Gramoxone® 200	Paraquat	Bipyridylum	Class I
	Roundup®	Glyphosate	Glycine replaced	Class IV
Growth regulator	Primeplus® BR	Flumetralin	Dinitroaniline	Class I

^a According to Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): extremely toxic (Class 1), highly toxic (Class II), moderately toxic (Class III), and slightly toxic (Class IV) (ANVISA 2016)

Early kidney dysfunction biomarkers: microalbuminuria and N-acetyl-β-D-glucosaminidase

The mALB levels were significantly increased in period 1 when compared to period 2: 19.16 ± 8.4 mg g⁻¹ creatinine vs. 11.39 ± 1.49 U g⁻¹ creatinine (*p* < 0.05). However, no significant difference was found for the NAG activity between the two samples, being 4.75 ± 0.55 U g⁻¹ creatinine in period 1 and 5.14 ± 0.44 U g⁻¹ creatinine in period 2.

Hematological parameters

Hematological parameters from children were within the reference values for the age range in the two evaluations, according to Table 6. Despite that, significant increases were found for hemoglobin concentration (g dL⁻¹) (*p* < 0.01), for the number (×10³ mm⁻³) and percentage of monocytes (*p* < 0.05) and basophils (*p* < 0.01), as well as for the percentage of neutrophils in period 1 in relation to period 2. However, the number (×10³ mm⁻³) and percentage of lymphocytes were significantly decreased in period 1 when compared with period 2 (*p* < 0.01).

Correlations among biomarkers of exposure, markers of oxidative damage, and hematological parameters

The number of lymphocytes (×10³ mm⁻³) was negatively correlated with Cr (*r* = -0.232; *p* < 0.05), MDA (*r* = -0.340; *p* < 0.01), and PCO (*r* = -0.247; *p* < 0.01). Also, the

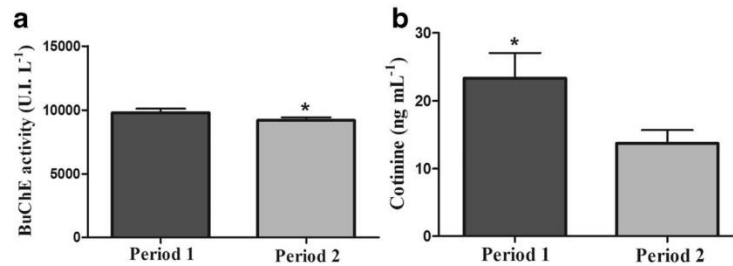
percentage of lymphocytes was inversely correlated with Cr (*r* = -0.325; *p* < 0.01), MDA (*r* = -0.339; *p* < 0.01), and PCO (*r* = -0.332; *p* < 0.01).

In addition, the number of basophils (×10³ mm⁻³) was positively correlated with cotinine (*r* = 0.318; *p* < 0.01), Cr (*r* = 0.596; *p* < 0.01), and PCO (*r* = 0.658; *p* < 0.01). Also, the percentage of basophils was positively correlated with Cr (*r* = 0.575; *p* < 0.01), MDA (*r* = 0.261; *p* < 0.01), and PCO (*r* = 0.651; *p* < 0.01).

Discussion

In recent years, concern has been increasing in relation to the unique vulnerability of children to toxic substances present in the environment (Landrigan and Goldman 2011; Tuakuila et al. 2015). Children’s bodies are still developing and may be more susceptible to environmental chemicals. The sexual and cognitive process developments, for example, are particularly vulnerable (Tuakuila et al. 2015). Moreover, it is known that children living in rural areas are exposed to multiple hazards including toxic chemicals released to the environment from the anthropogenic activities, such as agriculture. Therefore, the present study aims to perform a health assessment in children living in a tobacco-producing area in two different periods of the year, considering the different moments of the tobacco crop in Brazil (Fig. 1). According to Da Silva et al. (2014), the tobacco crops require most of the pesticide applications during 30–150 days/year, the tobacco

Fig. 2 **a** BuChE activity (U.L L⁻¹) and **b** urinary cotinine levels (ng mL⁻¹) from children in period 1 (*n* = 40) and period 2 (*n* = 40). Data are expressed as mean ± SEM. **p* < 0.05



leaf harvest occurs during 80–100 days/year, and during the leaf harvest, the pesticides are not much used. During about the 100 days/year when tobacco leaves are sold, the manipulation and pesticide application to the tobacco leaf are reduced (off-season). For our investigation, collection of biological samples (blood and urine) from children was performed in two different months: at the beginning of the pesticide applications (period 1) and in a month where the use of pesticides is lower (leaf harvest) (period 2).

Currently, OPs are the most commonly pesticides used in the world (Rohlman et al. 2011). The toxicity induced by OPs and carbamate pesticides has been attributed mainly to their potent anticholinesterase activity in the nervous system (Gonzalez et al. 2012). The inhibition of brain cholinesterase by these pesticides causes accumulation of acetylcholine, inducing hyperactivity of cholinergic pathways (Selmi et al. 2012). During development, neurologic effects of OP exposure, even at low levels, may be detrimental because neurotransmitters, such as acetylcholine, play essential roles in the cellular and architectural development of the brain (Muñoz-Quezada et al. 2013). Biomarkers routinely used to assess pesticide exposure provide information in relation to exposure at the time of sampling and are not likely to reflect exposure occurring even several days prior (Rohlman et al. 2011). In order to evaluate the exposure to OPs and carbamates, the enzymatic activity of BuChE in plasma samples of children

was determined in the two periods since human plasma is ideal for assessing the inhibition of BuChE by recent exposure to these xenobiotics (Kim et al. 2010). Although BuChE activities were within the reference values (5000 to 12,100.0 UI L⁻¹) in both periods, a little, but significant, decrease was observed in period 2 when compared to period 1 (*p* < 0.05) (Fig. 1a) using the Wilcoxon rank test for paired data. This finding suggests an inhibition in the plasmatic activity of BuChE after a period of intensive use of several pesticides, including OPs and carbamates, agents known to be cholinesterase inhibitors. Similar results were found by Kapka-Skrzypczak et al. (2015), who demonstrated a significant decrease in BuChE activity of children living in areas of intense use of pesticides in relation to a control group (*p* < 0.05). AChE is found in both nervous system and red blood cell membranes, being the AChE activity in blood closer to neuronal AChE activity. Despite that, both AChE and BuChE activities can be assessed in blood samples as a surrogate for neuronal AChE activity (Kapka-Skrzypczak et al. 2015).

BuChE is a multifunction protein (Kutty 1980; Gonzalez et al. 2012). Previous studies have shown significant associations between BuChE activity and measures of obesity, such as BMI, in children (Gonzalez et al. 2012) and adults (Calderon-Margalit et al. 2006). In the present study, a positive significant association was found between BuChE and

Table 3 Concentrations of toxic elements in children blood samples in the two different periods assessed

Element	Period 1 (<i>n</i> = 40)	Period 2 (<i>n</i> = 40)	Recommended limits ^a
Al (µg L ⁻¹)	3.19 ± 1.48 (1.0–52.0)	3.88 ± 1.75 (1.0–61.0)	2–8
As (µg L ⁻¹)	16.17 ± 0.29** (12.0–22.0)	19.47 ± 0.50 (10.0–25.0)	2–20
Cd (µg L ⁻¹)	1.0 ± 0.0 (N.D.–1.0)	1.0 ± 0.0 (N.D.–1.0)	0.3–1.2
Cr (µg L ⁻¹)	21.59 ± 0.42** (14.9–34.0)	16.35 ± 0.23 (13.47–20.0)	<5
Hg (µg L ⁻¹)	3.22 ± 0.36* (1.0–15.0)	6.88 ± 1.04 (1.0–31.0)	2–20
Ni (µg L ⁻¹)	4.22 ± 0.17* (3.0–8.0)	5.18 ± 0.25 (3.0–9.0)	1–5
Pb (µg dL ⁻¹)	1.27 ± 0.12* (N.D.–4.4)	1.62 ± 0.13 (0.6–3.8)	5–15

Results are expressed as mean ± SEM (minimum–maximum)

N.D. not detected

^a According to FAO/WHO/IAEA (1996)

**p* < 0.05 compared with period 2

***p* < 0.01 compared with period 2

Table 4 Oxidative damage biomarkers and exogenous antioxidant from children in the two evaluations

	Period 1 (n = 40)	Period 2 (n = 40)
MDA ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	$9.46 \pm 0.42^*$	7.72 ± 0.33
PCO (nmol carbonyl mg^{-1} protein)	$0.34 \pm 0.006^*$	0.20 ± 0.002
Vitamin C (mg L^{-1})	$11.49 \pm 0.70^*$	8.34 ± 0.97

Results are expressed as mean \pm SEM
 $*p < 0.01$ compared with period 2

BMI, agreeing with those studies. In a previous animal study, BuChE knockout mice had normal weight when received a standard (5%) fat diet; however, they presented an exaggerated obesity in comparison to their wild-type counterparts when put on a high-fat (11%) diet (Li et al. 2008). This finding suggest that BuChE activity could be increased to improve lipid utilization when fat consumption increases, suggesting that BuChE may have a role in fat utilization (Gonzalez et al. 2012).

Agricultural workers may absorb nicotine through the skin by contact with tobacco plants during the cultivation (Da Silva et al. 2014). In this line, children from the current study could be exposed to nicotine by playing near to tobacco crops or working with their parents and/or as a secondhand smoker (SHS). Previous studies revealed that exposure as SHS during childhood leads to behavioral and developmental impairments (Martin et al. 2006), lower lung function level (Merghani and Saeed 2013), chronic and allergic rhinitis (Higgins and Reh 2012), and higher blood pressure (Simonetti et al. 2011). According to the answers to our questionnaire, approximately 68% of children parents' were non-smokers and 84% of children lived near to tobacco crops (Table 1). Cotinine, which is an important breakdown product of nicotine (Budnik and Baur 2009), is used as biomarker of environmental exposure to nicotine, being found in blood, saliva, and urine after nicotine exposure (Desouky et al. 2016). Herein, cotinine was quantified in urine, showing significant difference between the two periods of tobacco crops (Fig. 1b, $p < 0.05$). Higher cotinine levels were observed in period 1. The mean urinary

cotinine from period 1 was almost two times higher ($28.11 \pm 4.26 \mu\text{g g}^{-1}$ creatinine) than the reference value, which is $16 \mu\text{g g}^{-1}$ creatinine (Budnik and Baur 2009), and it was in the limit of this reference value in period 2 ($16.28 \pm 2.36 \mu\text{g g}^{-1}$ creatinine). However, the urinary cotinine levels were lower than previously reported by Desouky et al. (2016) in urine of SHS children, which was $58.60 \pm 104.64 \text{ ng mL}^{-1}$. After the leaf harvest, the farmers store the tobacco leaves in sheds on their properties until the sell to tobacco companies. Although the contact with the leaf by agricultural workers is higher in the leaf harvest period, we suppose that the increased cotinine levels found in period 1 could be due to the exposure to nicotine by playing near to those sheds in the period of leaf storage. This period coincides

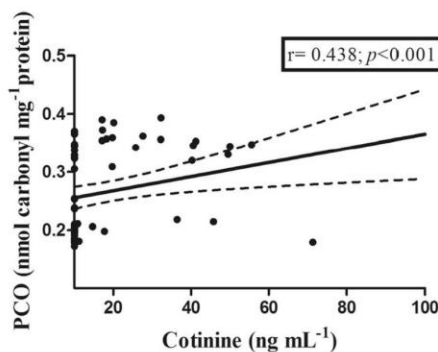


Fig. 3 Spearman's correlation test between urinary cotinine levels (ng mL^{-1}) and PCO plasmatic levels ($\text{nmol carbonyl mg}^{-1}$ protein) ($n = 80$)

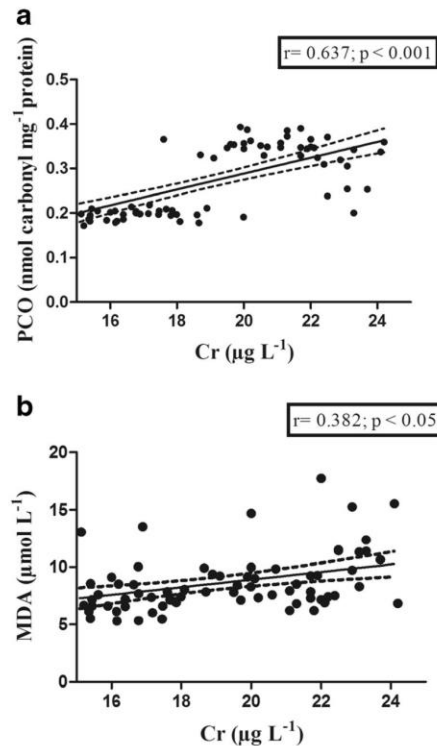


Fig. 4 Spearman's rank correlations between **a** blood Cr concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) and PCO plasmatic levels ($\text{nmol carbonyl mg}^{-1}$ protein) and **b** blood Cr concentrations ($\mu\text{g L}^{-1}$) and MDA plasmatic levels ($\mu\text{mol L}^{-1}$) ($n = 80$)

Table 5 Multiple linear regression analysis of factors affecting the protein oxidation biomarker PCO, adjusted for biomarkers of exposure and other oxidative stress biomarkers

	PCO levels (nmol carbonyl mg ⁻¹ protein)	
	<i>R</i> square = 0.446	
	<i>β</i>	<i>p</i> values
Blood Cr levels (μg L ⁻¹)	0.593	0.000
Urinary cotinine levels (ng mL ⁻¹)	0.253	0.011
BuChE activity (UI L ⁻¹)	0.071	0.475
Hippuric acid (g g ⁻¹ creatinine)	-0.085	0.392
Vitamin C (mg L ⁻¹)	0.101	0.316

with the summer vacation of children (December to March). Therefore, children stay more time at home, which increases the risk of environmental exposure to nicotine in this period. Indeed, the first collection of biological samples was performed in the beginning of pesticide applications, right after the store of leaves in the production cycle of tobacco.

The use of pesticides, such as insecticides, can also contribute to air contamination with many volatile organic compounds (VOCs) (Quirós-Alcalá et al. 2016). Environmental exposure to benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) can occur during pesticide applications (ATSDR 2015), since solvents are present in pesticide formulations (Chin et al. 2014). In order to evaluate the exposure to solvents, the urinary metabolites of toluene, xylene, styrene, and ethylbenzene were assessed in the present study. HA, a metabolite of toluene, was the only metabolite found in urine samples of children in both periods. Though no significant difference was found between the two periods, our findings

showed higher HA levels in the period of pesticide applications (period 1) in relation to period 2. Indeed, toluene is among the substances added as inert ingredients in pesticide products (U.S. EPA 2016). Children’s exposure occurs through inhalation and by oral and dermal contact with toluene present in soil. It is believed that the adverse effects of toluene in children are the same observed in the brain and nervous system of adults (ATSDR 2015). Although HA is the primary metabolite of toluene, it can be found as a normal urine constituent, derived from food, drinks, and drugs containing benzoic acid or benzoates, which can impair the use of this metabolite in the biomonitoring of low levels of toluene exposure (Moro et al. 2010).

Metals are ubiquitous elements present in the environment (Annangi et al. 2016). Due to the special vulnerability of children to the effects of metal exposure, and considering the well-established adverse effects from this exposure, several biomonitoring studies have investigated multiple toxic element

Table 6 Hematological parameters (means ± SEM) of children in the two evaluations

	Period 1 (<i>n</i> = 40)	Period 2 (<i>n</i> = 40)	Reference values ^a
Hb (g dL ⁻¹)	13.28 ± 0.10**	12.81 ± 0.10	11.4–15.0
Htc (%)	38.82 ± 0.33	38.63 ± 0.35	35–45
RBC (million mm ⁻³)	4.74 ± 0.04	4.75 ± 0.05	4.0–5.2
Leukocytes (×10 ³ mm ⁻³)	13.45 ± 6.0	7.25 ± 0.31	5.0–13.5
Neutrophils (×10 ³ mm ⁻³)	4.14 ± 0.35	3.49 ± 0.27	1.5–8.0
Neutrophils (%)	52.61 ± 2.14*	47.09 ± 1.71	
Lymphocytes (×10 ³ mm ⁻³)	2.40 ± 0.16**	2.90 ± 0.13	1.5–6.5
Lymphocytes (%)	32.83 ± 1.92**	40.70 ± 1.67	
Eosinophils (×10 ³ mm ⁻³)	0.29 ± 0.04	0.30 ± 0.03	0–0.6
Eosinophils (%)	4.18 ± 0.57	4.31 ± 0.48	
Monocytes (×10 ³ mm ⁻³)	0.56 ± 0.03*	0.52 ± 0.03	0–0.8
Monocytes (%)	8.06 ± 0.41*	7.15 ± 0.30	
Basophils (×10 ³ mm ⁻³)	0.09 ± 0.005**	0.03 ± 0.002	0–0.2
Basophils (%)	1.42 ± 0.14**	0.50 ± 0.03	

Hb hemoglobin, Htc hematocrit, RBC red blood cell count

^a According to McPherson and Pincus (2013)

**p* < 0.05 compared with period 2

***p* < 0.01 compared with period 2

levels in children (Kordas et al. 2010; Sanders et al. 2014; Do Nascimento et al. 2015). Some of these elements are included among the active ingredients of pesticides, such as in the case of the fungicide mancozeb, which contains approximately 20% Mn by weight (Mora et al. 2014). In our previous study, we suggested associations between increased levels of Mn in blood and hair of children, as well as higher Mn levels in drinking water from environmental exposure to this pesticide and impairments in specific cognitive functions (Nascimento et al. 2016). In the current study, only Cr presented blood levels significantly increased in the pesticide application period (Table 3, $p < 0.01$). Besides, Cr blood levels were above the recommended limits by WHO in both samples. These could be related to the environmental exposure to agrochemicals containing Cr in the rural area. Indeed, Cr is released to the environment from anthropogenic activities (ATSDR 2012), and the amount of toxic elements, such as Cr as contaminant in pesticides, might be high. A study of Zoffoli et al. (2013) showed Cr content levels above or very close to the Brazilian established limits in agrochemicals used in tobacco fields. Among these chemicals, there were some of the pesticides most used by children's parents according to the questionnaires, such as the insecticides Orthene® 750BR and Talstar® 100EC. Despite of the increased Cr levels in the two evaluations, the mean Cr blood concentrations from children in this study were lower than that observed in children living in a heavily Cr-polluted region in China due to informal electronic waste (e-waste) recycling activities (Xu et al. 2015). Chromium naturally exist in the earth's crust in varying oxidation states; however, the hexavalent chromium (Cr^{+6}) is the most toxic form. Additionally, Cr^{+6} is classified as possible human carcinogen by regulatory and non-regulatory agencies (ATSDR 2012; Annangi et al. 2016). Sughis et al. (2012) demonstrated a positive significant association between Cr urinary levels in children and urinary levels of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), a biomarker of DNA oxidative damage. In addition, a significant positive Spearman's correlation was found between Cr blood levels and HA urinary levels in our study ($p < 0.01$). Studying multiple environmental xenobiotics is relevant since combinations of chemicals may sometimes be traced to a common source of exposure. In this line, it is possible to suppose that the exposure to Cr and toluene might have a common source, which possibly is the pesticides.

Still regarding toxic elements, As blood levels obtained from period 2 were upcoming of maximal recommended levels by FAO/WHO/IAEA (1996). Although As blood concentrations were significantly increased in the second sample compared to the first one (Table 3, $p < 0.01$), the levels from both periods were high. Arsenic is an important carcinogen that is naturally present in low concentrations in the environment. Additionally, chemical fertilizers contain trace amounts of heavy metals and metalloids. Continuous application of

contaminated fertilizers may contribute to increase toxic elements such as As in the soil and groundwater (Jayasumana et al. 2015). In the rural area in which the studied children live, groundwater obtained from wells is drunk by most of the families. Therefore, in addition to the drinking water contaminated that represents a possible source of exposure, the significant As concentration increased in period 2 can be attributed to the use of As-containing pesticides in this period, such as fertilizers. Previous studies have discussed the risks of diseases and implications of children's cognitive and psychological development by prolonged drinking of contaminated water in rural areas (Asadullah and Chaudhury 2011; Ahmed et al. 2013). In addition, researchers have suggested the possible association between the chronic kidney disease of unknown etiology in Sri Lanka and exposure to As-containing pesticides (Jayasumana et al. 2015). Therefore, children could be exposed to As following pesticide application through inhalation of dusts, ingestion of As in drinking water and food (fruits, vegetables, grains), or dermal contact with contaminated soil, water, or plants (ATSDR 2007).

Since the OS is among the mechanisms of toxicity of the environmental xenobiotic pesticides, nicotine, and toxic elements (Muniz et al. 2008; Wang et al. 2015), it is of interest to study the oxidative and antioxidant status in children with long-term exposure to such substances. In the current study, oxidative damage to lipids and proteins was assessed through the quantification of plasmatic levels of the biomarkers MDA and PCO, respectively (Table 4). The results showed a significant higher level of MDA and PCO in the pesticide application period (period 1) when compared to the period of leaf harvest (period 2). Such results suggest that children are more susceptible to oxidative damage when in contact with a large amount of xenobiotics. Our findings agree with other studies, in which MDA levels were increased among farmers exposed to pesticides (Muniz et al. 2008; Wafa et al. 2013). In corroboration, Kunst et al. (2014) investigated the OS in children of tobacco farmers from the Southern Brazil through the measure of dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), concerning the rate of free radicals, and micronucleus (MN) test, a biomarker of DNA damage. The results showed that such children presented high rate of abnormal cells in the MN test and high production of free radicals in comparison to children from an urban area. Additionally, we found a significant positive Spearman's correlation between PCO and cotinine (Fig. 2, $p < 0.001$). Although cotinine levels were not determined in all studies, several observational works have demonstrated association between exposure to environmental tobacco smoke and OS (Kosecic et al. 2005; Aycicek et al. 2005). On the other hand, Yeh et al. (2008) found no significant association between cotinine urinary levels and PCO. In addition, PCO and MDA plasmatic levels were positively associated with Cr blood levels (Fig. 3, $p < 0.05$). It is known that Cr^{+6} is rapidly reduced to Cr^{+5} , Cr^{+4} , and then Cr^{+3} after being

transported across mammalian cell membranes with a concomitant mass production of ROS. These excessive ROS cause damage to cells due to its injury to cellular proteins and lipids (Shrivastava et al. 2002; Wang et al. 2006). Multiple linear regression analysis also confirmed that the increase of Cr levels in blood and cotinine in urine could lead to oxidation of proteins. Since the β estimated in multiple linear regression analysis for Cr was higher than that found for cotinine, we can suppose that the metal exerts more influence on oxidative damage to proteins than nicotine (Table 5).

To be protected against oxidative damage, the organism has an elaborate antioxidant defense system consisting of enzymes and numerous non-enzymatic antioxidants, including vitamin C (Paniz et al. 2007). Vitamin C or ascorbic acid is an exogenous antioxidant acquired through diet that acts efficiently against reactive species (Vasconcelos et al. 2007). Although vitamin C concentrations were within the reference values in both periods (4.0–15.0 mg L⁻¹) (Burtis et al. 2008), children had serum vitamin C levels significantly higher in the period of the beginning of pesticide application (period 1) when compared to the period of leaf harvest (period 2) (Table 4, $p < 0.01$). This finding suggests that, despite the higher oxidative stress observed in period 1, the children's organism has a higher defense against the oxidative damage in this period. This can be suggested due to an increased consumption of fruits containing vitamin C such as orange and tangerine during the winter, season in which there is greater offer of these fruits in Southern Brazil. It can be hypothesized that if children did not have these vitamin C concentrations in period 1, the oxidative damage markers (MDA and PCO) could be higher. Contrary to our results, Aycicek et al. (2005) showed lower plasmatic vitamin C levels accompanied by high oxidative stress in passive smoking children when compared to a control group.

It is known that some toxic elements such as Cd, Hg, and Pb are nephrotoxic agents, causing kidney damage in children (Bose-O'Reilly et al. 2010; Chaumont et al. 2012). In the current study, biomarkers of early renal damage (mALB levels and NAG activity) were assessed. Although no association was found between such markers and biomarkers of exposure, significant higher levels were found for mALB in period 1 when compared to period 2 ($p < 0.01$). The mALB excretion is an early indicator of primary and secondary glomerular diseases and is associated with several risk factors such as hypertension, hyperlipidemia, and obesity (Bose-O'Reilly et al. 2010; Wu et al. 2014). In addition, the mALB levels found here in the two different times were increased when compared to the mean mALB levels found for children of the same age range (6–12 years old) from China: 7.95 ± 0.21 mg g⁻¹ creatinine (Wu et al. 2014).

With regard to hematological parameters, all of them were within reference values for age range in the two samples. However, the number and percentage of lymphocytes were

significantly decreased in period 1 related to period 2. On the other hand, the number and percentage of basophils were significantly higher in the first sample than in the second one (Table 6, $p < 0.05$). Moreover, Spearman's rank correlations showed that the number and percentage of lymphocytes were negatively associated with Cr blood levels and the number and percentage of basophils were positively associated with Cr. Among the adverse health effects from Cr exposure by inhalation are the breathing problems, including asthma (ATSDR 2012). In such allergic disorders, basophils can be activated to release histamine (Lie et al. 1999). Additionally, the alterations in such hematological parameters were associated with the increase of the biomarkers of oxidative damage (MDA and PCO). The long-term exposure to Cr can give rise to cytotoxic and genotoxic reactions that affect the immune system of the body (Shrivastava et al. 2002). Several studies have investigated the mechanisms of Cr on immune system cells, with the common theory that ROS plays important role in the pathogenesis of Cr-induced diseases (Wang et al. 2010; Deb et al. 2012). The positive associations found in the current study, and mentioned above, between Cr blood levels and plasmatic levels of MDA and PCO corroborate these findings. As previously mentioned, Cr⁺⁶ can easily penetrate cell membrane and undergo intracellular reduction to Cr⁺³ through a series of redox reactions, with the formation of free radicals as intermediates (Deb et al. 2012).

Our study has certain limitations. The most relevant was the small number of children who participated in the two biological sample collections. As we made the second collection in December (period 2), some children that participated in the first collection (period 1) were not going to school since they had already been on vacation. As our goal was to compare children in two different periods, we selected only children whose biological samples were collected in both periods; therefore, we have a reduced number of participants. The lack of measure of the more specific cholinesterase, AChE in erythrocytes, and biomarkers of other pesticides used in the rural area as well as DNA damage biomarkers are among the limitations of this study. Moreover, the nutritional status of children could be evaluated by measuring other vitamins, such as vitamins A, E, and carotenoids. In addition, as we did not have knowledge of the metal levels present in the main pesticides used by children's parents in the studied area, we intend to quantify the metals in these products in our future investigations. Nevertheless, all these limitations will be considered to improve the future studies of our research group.

Conclusion

In summary, children presented significant higher urinary cotinine and Cr blood levels in the period of the beginning of pesticide applications (period 1) in relation to the period of

leaf harvest (period 2). BuChE activity was decreased in period 2, after pesticide applications, suggesting an inhibition caused by OPs and/or carbamates. In addition, Cr blood levels were above the recommended levels by WHO in the two evaluations. Moreover, increased levels were also found for the plasmatic MDA and PCO levels, as well as for mALB levels in period 1. In relation to hematological parameters, decreased lymphocytes and increased basophils were also observed in period 1. The increased urinary cotinine levels were correlated with higher PCO levels, and Cr blood levels were positively associated with the oxidative damage biomarkers MDA and PCO, suggesting a potential health risk from the environmental exposure to these xenobiotics. Positive significant association was also found between Cr blood levels and the HA (toluene metabolite), suggesting a common source of exposure. Additionally, significant associations were found among Cr blood levels, changes in the number and percentage of lymphocytes and basophils, and oxidative damage markers, suggesting an involvement of free radicals produced by Cr into the cells of immune system. Taken together, we observed that the co-exposure to multiple environmental chemicals might result in toxicity, probably in an interactive form, to children who live near to tobacco-producing regions. Therefore, our data revealed the importance to perform a bio-monitoring program in children living in agricultural communities, considering that they represent a special group of risk to develop diseases associated to environmental exposures to chemical hazards. This is especially relevant in Southern Brazil because this is an important tobacco producer in the world.

Acknowledgments The authors would like to thank all the participants of this study. In addition, the authors thank the Reference Center for Occupational Health (CEREST) of Santa Maria, RS, Brazil, especially the physician Rosa Maria Wolff, for their excellent technical assistance. This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Brazil and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), through the grants provided to S.C. Garcia. CNPq provided a PhD research fellowship to S. Nascimento. 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

Ahmed S, Rekha RS, Ahsan KB et al (2013) Arsenic exposure affects plasma insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in children in rural Bangladesh. *PLoS One* 8:1–12
 Almeida GEG (2005) Fumo: servidão moderna e violação de direitos humanos. *Terra de Direitos*, Curitiba

Alves JS, Da Silva FR, Da Silva GD et al (2016) Investigation of potential biomarkers for the early diagnosis of cellular stability after the exposure of agricultural workers to pesticides. *Ann Braz Acad Sci* 88: 349–360
 Annangi B, Bonassi S, Marcos R, Hernández A (2016) Biomonitoring of humans exposed to arsenic, chromium, nickel, vanadium, and complex mixtures of metals by using the micronucleus test in lymphocytes. *Mut Res*. doi:10.1016/j.mrrev.2016.03.003
 Asadullah MN, Chaudhury N (2011) Poisoning the mind: arsenic contamination of drinking water wells and children’s educational achievement in rural Bangladesh. *Econ Educ Review* 30:873–888
 ATSDR (2007) Toxicological profile for arsenic. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp2.pdf>. Accessed 25 May 2016
 ATSDR (2012) Toxicological profile for chromium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp7.pdf>. Accessed 25 May 2016
 ATSDR (2015) Toxicological profile for toluene. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp56.pdf>. Accessed 25 May 2016
 Aycicek A, Erel O, Kocyigit A (2005) Increased oxidative stress in infants exposed to passive smoking. *Eur J Pediatr* 164:775–778
 Baierle M, Bairos A, Moreira AP et al (2012) Quantificação sérica de vitamina C por CLAE-UV e estudo de estabilidade. *Quim Nova*. 35: 403–407
 Benedetti D, Nunes E, Sarmento M et al (2013) Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. *Mut Res* 752:28–33
 Berglund M, Lindberg AL, Rahman M et al (2011) Gender and age differences in mixed metal exposure and urinary excretion. *Environ Res* 111:1271–1279
 Bose-O’Reilly S, McCarty KM, Steckling N, Lettmeier B (2010) Mercury exposure and children’s health. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 40:186–215
 Budnik LT, Baur X (2009) The assessment of environmental and occupational exposure to hazardous substances by biomonitoring. *Dtsch Arztebl Int* 106:91–97
 Bulcão R, Santa Maria L, Charão M et al (2008) Quantificação simultânea de Indicadores Biológicos de Exposição a solventes. *Quim Nova*. 31:1343–1348
 Burtis C, Ashwood E, Bruns DE (2008) *Tietz Fundamentals of clinical chemistry*. Elsevier, St Louis
 Buss H, Chan TP, Sluis KB et al (1997) Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radic Biol Med* 23:361–366
 Calderon-Margalit R, Adler B, Abramson JH, Gofin J, Kark JD (2006) Butyrylcholinesterase activity, cardiovascular risk factors, and mortality in middle-aged and elderly men and women in Jerusalem. *Clin Chem* 52:845–852
 Cattaneo R, Alegretti AP, Sagebin FR et al (2006) Validação de método para determinação de cotinine em urina por cromatografia líquida de alta eficiência. *Rev Bras Toxicol* 19:25–31
 Chaumont A, Nickmilder M, Dumont X et al (2012) Associations between proteins and heavy metals in urine at low environmental exposures: evidence of reverse causality. *Toxicol Lett* 210:345–352
 Chin JY, Godwin C, Parker E et al (2014) Levels and sources of volatile organic compounds in homes of children with asthma. *Indoor Air* 24:403–415
 Da Silva J, Moraes CR, Heuser VD et al (2008) Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. *Mutagenesis* 23:415–422

- Da Silva FR, Da Silva J, Allgayer MC et al (2012) Genotoxic biomonitoring of tobacco farmers: biomarkers of exposure, of early biological effects and of susceptibility. *J Haz Mat* 225-226:81–90
- Da Silva FR, Kvitko K, Rohr P et al (2014) Genotoxic assessment in tobacco farmers at different crop times. *Sci Total Environ* 490: 334–341
- Deb DD, Parimala G, Devi SS, Chakrabarti T (2012) Role of *Carum copticum* seeds in modulating chromium-induced toxicity on human bronchial epithelial cells and human peripheral blood lymphocytes. *Exp Toxicol Pathol* 64:889–897
- Desouky DS, Elnemr G, Alnawawy A, Taha AA (2016) The relation between exposure to environmental tobacco smoke and the quantity of cotinine in the urine of school children in Taif City, Saudi Arabia. *Asian Pac J Cancer Prev* 17:139–145
- Do Nascimento SN, Barth A, Göethel G et al (2015) Cognitive deficits and ALA-D-inhibition in children exposed to multiple metals. *Environ Res* 136:387–395
- Falck AJ, Mooney S, Kapoor SS et al (2015) Developmental exposure to environmental toxicants. *Pediatr Clin N Am* 62:1173–1197
- FAO/WHO/IAEA (1996) Trace Elements in Human Nutrition and Health. World Health Organization, Geneva, Switzerland
- Fiori NS, Fassa ACG, Faria NMX et al (2015) Wheezing in tobacco farm workers in southern Brazil. *Am J Ind Med* 58:1217–1228
- Gonzalez V, Huen K, Venkat S et al (2012) Cholinesterase and paraoxonase (PON1) enzyme activities in Mexican-American mothers and children from an agricultural community. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 22:641–648
- González-Alzaga B, Hernández AF, Rodríguez-Barranco M et al (2015) Pre- and postnatal exposures to pesticides and neurodevelopmental effects in children living in agricultural communities from south-eastern Spain. *Environ Int* 85:229–237
- Gorman NM, Stjernberg E, Koehoorn M et al (2011) Exposure to pesticides and metal contaminants of fertilizer among tree planters. *Ann Occup Hyg* 55:752–763
- Grandjean P, Bellinger D, Bergman A et al (2008) The faroes statement: human health effects of developmental exposure to chemicals in our environment. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 102:73–75
- Grotto D, Santa Maria LD, Boeira S et al (2007) Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *J Pharm Biomed Anal* 43:619–624
- Higgins TS, Reh DD (2012) Environmental pollutants and allergic rhinitis. *Cur Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 20:209–214
- Jaffé M (1886) Über den Niederschlag welchen Pikrinsäure in normalen Ham erzeugt und Über eine neue Reaktion des kreatinins. *Z Physiol Chem* 10:391–400
- Järup L (2003) Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull* 68: 167–182
- Jayasumana C, Fonseka S, Fernando A et al (2015) Phosphate fertilizer is a main source of arsenic in areas affected with chronic kidney disease of unknown etiology in Sri Lanka. *Springerplus* 4:90–97
- Jiao W, Chen W, Chang AC, Page AL (2012) Environmental risks of trace elements associated with long-term phosphate fertilizers applications: a review. *Environ Pollut* 168:44–53
- Kahl VFS, Simon D, Salvador M et al (2016) Telomere measurement in individuals occupationally exposed to pesticide mixtures in tobacco fields. *Environ Mol Mut* 57:74–84
- Kapaki E, Liappas I, Lyras L et al (2007) Oxidative damage to plasma proteins in patients with chronic alcohol dependence: the effect of smoking. *In Vivo* 21:523–528
- Kapka-Skrzypczak L, Cyranka M, Skrzypczak M, Kruszewski M (2011) Biomonitoring and biomarkers of organophosphate pesticides exposure—state of the art. *Ann Agric Environ Med* 18:294–303
- Kapka-Skrzypczak L, Sawicki K, Czajka M et al (2015) Cholinesterase activity in blood and pesticide presence in sweat as biomarkers of children's environmental exposure to crop protection chemicals. *Ann Agric Environ Med* 22:478–482
- Karr C (2012) Children's environmental health in agricultural settings. *J Agromedicine* 17:127–139
- Kim JH, Stevens RC, MacCoss MJ et al (2010) Identification and characterization of biomarkers of organophosphorus exposures in humans. *Adv Exp Med Biol* 660:61–71
- Kordas K, Queirolo EI, Ettinger AS et al (2010) Prevalence and predictors of exposure to multiple metals in preschool children from Montevideo, Uruguay. *Sci Total Environ* 408:4488–4494
- Kosecik M, Erel O, Sevinc E, Selek S (2005) Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. *Int J Cardiol* 100:61–64
- Kunst LR, Garcia MV, Machado AK et al (2014) Otoacoustic emissions and biomarkers of oxidative stress in students of a tobacco-producing region. *CoDas* 26:219–225
- Kutty KM (1980) Review: biological function of cholinesterase. *Clin Biochem* 13:239–243
- Landrigan PJ, Goldman LR (2011) Children's vulnerability to toxic chemicals: a challenge and opportunity to strengthen health and environmental policy. *Health Aff (Millwood)* 30:842–850
- Li B, Duysen EG, Lockridge O (2008) The butyrylcholinesterase knock-out mouse is obese on a high-fat diet. *Chem Biol Interact* 175:88–91
- Lie WJ, Knol EF, Mul FP et al (1999) Basophils from patients with allergic asthma show a primed phenotype. *J Allergy Clin Immunol* 104:1000–1007
- Machado JB, Chatkin JM, Zimmer AR et al (2014) Cotinine and polycyclic aromatic hydrocarbons levels in the amniotic fluid and fetal cord at birth and in the urine from pregnant smokers. *PLoS One* 9:1–12
- Martin RP, Dombrowski SC, Mullis C et al (2006) Smoking during pregnancy: association with childhood temperament, behavior, and academic performance. *J Pediatr Psychol* 31:490–500
- Maruhn D (1976) Rapid colorimetric assay of beta-galactosidase and n-acetyl-beta-glucosaminidase in human urine. *Clin Chim Acta* 73: 453–461
- Mateus VL, Monteiro ILG, Rocha RCC et al (2013) Study of the chemical composition of particulate matter from the Rio de Janeiro metropolitan region, Brazil, by inductively coupled plasma-mass spectrometry and optical emission spectrometry. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc* 86:131–136
- McPherson RA, Pincus MR (2013) Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods. Elsevier, Philadelphia
- Merghani TH, Saeed AM (2013) The relationship between regular second-hand smoke exposure at home and indicators of lung function in healthy school boys in Khartoum. *Tob Control* 22:315–318
- Miller MD, Marty MA, Landrigan PJ (2016) Children's environmental health. *Pediatr Clin N Am* 63:149–165
- Mora AM, van Wendel de Joode B, Mergler D et al (2014) Blood and hair manganese concentrations in pregnant women from infants' environmental health study (ISA) in Costa Rica. *Environ Sci Technol* 48: 3467–3476
- Moro AM, Charão M, Brucker N et al (2010) Effects of low-level exposure to xenobiotics present in paints on oxidative stress in workers. *Sci Total Environ* 408:4461–4467
- Mostafalou S, Abdollahi M (2013) Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicol Appl Pharmacol* 268:157–177
- Muniz JF, McCauley L, Scherer J et al (2008) Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot study. *Toxicol Appl Pharmacol* 227:97–107
- Muñoz-Quezada MT, Lucero BA, Barr DB et al (2013) Neurodevelopmental effects in children associated with exposure to organophosphate pesticides: a systematic review. *Neurotoxicology* 39:158–168
- Nascimento S, Baierle M, Göethel G et al (2016) Associations among environmental exposure to manganese, neuropsychological

- performance, oxidative damage and kidney biomarkers in children. *Environ Res* 147:32–43
- Ochoa-Martinez AC, Orta-Garcia ST, Rico-Escobar EM et al (2016) Exposure assessment to environmental chemicals in children from Ciudad Juarez, Chihuahua, Mexico. *Arch Environ Contam Toxicol* 70:657–670
- Pan American Health Organization (2012) *Health in the Americas*. PAHO, Washington, DC
- Paniz C, Bairos A, Valentini J et al (2007) The influence of the serum vitamin C on oxidative stress biomarkers in elderly women. *Clin Biochem* 40:1367–1372
- Perry MJ (2003) Children's agricultural health: traumatic injuries and hazardous inorganic exposures. *Summer* 19:269–278
- Prakasam A, Sethupathy S, Lalitha S (2001) Plasma and RBCs antioxidant status in occupational male pesticide sprayers. *Clin Chim Acta* 310:107–112
- Quiros-Alcalá L, Wilson S, Witherspoon N et al (2016) Volatile organic compounds and particulate matter in child care facilities in the district of Columbia: results from a pilot study. *Environ Res* 146:116–124
- Rohlman DS, Anger WK, Lein PJ (2011) Correlating neurobehavioral performance with biomarkers of organophosphorus pesticide exposure. *Neurotoxicology* 32:268–276
- Rossner P Jr, Milcova A, Libalova H et al (2009) Biomarkers of exposure to tobacco smoke and environmental pollutants in mothers and their transplacental transfer to the fetus. Part II. Oxidative damage. *Mut Res* 669:20–26
- Sanders AP, Miller SK, Nguyen V et al (2014) Toxic metal levels in children residing in a smelting craft village in Vietnam: a pilot bio-monitoring study. *BMC Public Health* 14:114–121
- Santos VCF, Ruiz ENF, Riquinho DL, Mesquita MO (2015) Saúde e ambiente nas políticas públicas em municípios que cultivam tabaco no sul do Brasil. *Rev Gaúcha Enferm* 36:215–223
- Selmi S, El-Fazaa S, Gharbi N (2012) Oxidative stress and cholinesterase inhibition in plasma, erythrocyte and brain of rats' pups following lactational exposure to malathion. *Environ Toxicol Pharmacol* 34:753–760
- Shrivastava R, Upreti RK, Seth PK, Chaturvedi UC (2002) Effects of chromium on the immune system. *FEMS Immunol Med Microbiol* 34:1–7
- Simonetti GD, Schwertz R, Klett M et al (2011) Determinants of blood pressure in preschool children: the role of parental smoking. *Circulation* 123:292–298
- Sughis M, Nawrot TS, Haufroid V, Nemery B (2012) Adverse health effects of child labor: high exposure to chromium and oxidative DNA damage in children manufacturing surgical instruments. *Environ Health Perspect* 120:1469–1474
- The ANVISA Website (2016) <http://portal.anvisa.gov.br/>. Accessed 17 June 2016
- The Souza Cruz Website(2016) <http://www.souzacruz.com.br/>. Accessed 10 June 2016
- The U.S. EPA Website(2016) <https://www.epa.gov/>. Accessed 15 May 2016
- Tuakuila J, Kabamba M, Mata H, Mbuyi F (2015) Tentative reference values for environmental pollutants in blood or urine from the children of Kinshasa. *Chemosphere* 139:326–333
- Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF et al (2007) Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos para sua determinação. *Quim Nova*. 30:1323–1328
- Wafa T, Nadia K, Amel N et al (2013) Oxidative stress, hematological and biochemical alterations in farmers exposed to pesticides. *J Environ Sci Health B* 48:1058–1069
- Wang XF, Xing ML, Shen Y, Zhu X, Xu LH (2006) Oral administration of Cr (VI) induced oxidative stress, DNA damage and apoptotic cell death in mice. *Toxicology* 228:16–23
- Wang BJ, Sheu HM et al (2010) Hexavalent chromium induced ROS formation, Akt, NF-kappaB, and MAPK activation, and TNF-alpha and IL-1alpha production in keratinocytes. *Toxicol Lett* 198:216–224
- Wang T, Feng W, Kuang D et al (2015) The effects of heavy metals and their interactions with polycyclic aromatic hydrocarbons on the oxidative stress among coke-oven workers. *Environ Res* 140:405–413
- Wu D, Yang H, Luo J et al (2014) Age- and gender-specific reference values for urine albumin/creatinine ratio in children of Southwest China. *Clin Chim Acta* 20:239–243
- Xu X, Yekeen TA, Liu J et al (2015) Chromium exposure among children from an electronic waste recycling town of China. *Environ Sci Pollut Res Int* 22:1778–1785
- Yeh CC, Barr RG, Powell CA et al (2008) No effect of cigarette smoking dose on oxidized plasma proteins. *Environ Res* 106:219–225
- Zoffoli HJO, Amaral-Sobrinho NMB, Zonta E et al (2013) Inputs of heavy metals due to agrochemical use in tobacco fields in Brazil's southern region. *Environ Monit Assess* 185:2423–2437

CAPÍTULO II

**Environmental chemicals exposure and endocrine disruption in children from a
rural area**

Manuscrito a ser submetido à revista *Archives of Toxicology*

Environmental chemicals exposure and endocrine disruption in children from a rural area

Nascimento, S.^{1,2}; Göethel, G.^{1,2}; Gauer, B.^{1,2}; Sauer, E.^{1,2}; Nardi, J.^{1,2}; Cestonaro, L.^{1,2}; Correia, D.¹; Mota, L.³; Machry, R.V.⁴; Furlanetto, T.W.⁵; Saint' Pierre, T.⁶; Gioda, A.⁶; Arbo, M.D.^{1,2}; Garcia, S.C.^{1,2,*}

¹ Laboratory of Toxicology (LATOX), Department of Analyses, Pharmacy College, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga 2752, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Graduate Program of Pharmaceutical Sciences (PPGCF), Pharmacy College, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga 2752, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ University Hospital of Santa Maria (HUSM), Federal University of Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS, Brazil.

⁴ Department of Clinical Medicine, Federal University of Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS, Brazil.

⁵ Hospital of Clinics of Porto Alegre (HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁶ Department of Chemistry, Pontifical Catholic University of Rio de Janeiro (PUC-Rio), Marquês de São Vicente 225, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

*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

Endocrine disrupting chemicals (EDCs), including pesticides and metals, are present in rural areas, endangering the health of exposed populations. This work aimed to investigate the possible association between the exposure to these xenobiotics and thyroid dysfunction in children living in a rural community of Southern Brazil. Fifty-four children aged 5-16 years participated of this study. Peripheral biomarkers and ultrasound evaluations were performed in two different agricultural moments: periods of low and high exposure to pesticides. In the low exposure period, correlations were found between increased blood chromium (Cr), manganese (Mn), mercury (Hg), and lead (Pb) levels, as well as increased hair Pb levels, and increased thyroid stimulating hormone (TSH) and decreased free thyroxine (fT₄) levels. Prolactin was positively associated with hair Mn in both periods. In ultrasound, the majority of children presented a normal echogenicity of thyroid. Glucose was inversely associated with the biomarker of cholinesterase inhibitor insecticides, butyrylcholinesterase (BuChE). Lipid profile was above the recommended levels in both periods. In summary, our results demonstrated that children environmentally exposed to a mixture of xenobiotics in an agricultural community may have health impairments, especially on thyroid function, dyslipidemia, and glucose homeostasis disruption.

Keywords: Children; environmental disrupting chemicals; thyroid; prolactin; glucose; dyslipidemia.

Introduction

Agriculture is the main source of economy in developing countries, like Brazil. Since 2008, Brazil is the major global consumer of pesticides. Among the impacts from the use of these xenobiotics, those of greater relevance are to the health of farmers and population as well as to the environment (Pignati et al. 2014; Uyemura et al. 2017). Children living in rural areas are constantly exposed to risks inherent to agricultural activities, including chemical hazards. Pesticides, metals and nicotine are chemicals/toxicants likely to occur in agricultural environments, and their huge contamination in these areas in soil, water and air represent a concern due to diverse health risks from these multiple/combined exposures to children's health (Landrigan and Etzel 2014; Uwizeyimana et al. 2017).

Many of these xenobiotics have been classified as endocrine disrupting chemicals (EDCs), which are compounds that have the ability to interfere in the endocrine system function. They mimic hormones or block their receptors, altering the normal function of glands and affecting the whole body, potentially inducing to many chronic diseases like diabetes, obesity, reproductive abnormalities, thyroid disorders, and various homeostatic imbalances (Schug et al. 2011; Boas et al. 2012; Maqbool et al. 2016; Russ and Howard 2016). An important concern related to EDCs is the developmental exposure – adverse effects may be most pronounced in developing organisms and occur at the chemicals concentrations that are far below those considered harmful to an adult (Schug et al. 2011; Russ and Howard 2016).

Thyroid secretes two major hormones, T₃ (triiodothyronine) and T₄ (thyroxine), which are required for the normal operation of a variety of physiological processes, affecting every organ system in the organism. Thyroid hormones (TH) are crucial for normal growth and development, being, therefore, of extreme importance during infancy and childhood (Kirsten 2000). A finely tuned negative feedback mechanism involving TSH (thyroid stimulating hormone) and the circulating TH at the hypothalamic and pituitary levels control the thyroid function (Boas et al. 2012; Christensen 2013). The thyrotropin-releasing hormone (TRH) from the hypothalamus stimulates the pituitary gland to release TSH in the bloodstream, stimulating T₃ and T₄ production in the thyroid. Low blood levels of T₃ and T₄ stimulate the production of TSH, and conversely, higher circulating TH suppress the production of TSH at

pituitary level, maintaining the body homeostasis (Zoeller et al. 2007; Christensen 2013). Disruption of thyroid activity is a concern for human health (Wegner et al. 2016). Metabolic syndrome, with insulin resistance and dyslipidemia as causative factors, is associated with thyroid dysfunction (Iwen et al. 2013; Wegner et al. 2016).

Several pesticides are recognized for their endocrine-disrupting properties on thyroid gland, such as organophosphates (OPs), dithiocarbamates and pyrethroids (Campos and Freire 2016). In addition, numerous studies have described the impact of cholinesterase inhibitor insecticides on disturbance of glucose metabolism and risk of type 2 diabetes (DM2), with involvement of several mechanisms including insulin resistance, inflammation, and oxidative stress (Akyildiz et al. 2009; Lasram et al. 2014). DM2 results from interactions between genetic susceptibility, environmental factors, and lifestyle choices (Lasram et al. 2014). Therefore, glucose homeostasis may be affected indirectly by thyroid dysfunction and/or by the direct action of EDCs. Moreover, while some studies have suggested the association between alterations in TH levels and exposure to metals including cadmium (Cd), lead (Pb), and mercury (Hg) in humans (Christensen 2013), the effects of metals on human thyroid are poorly studied, furthermore, no data are available regarding the influence of some metals in this system (Vigneri et al. 2016).

Children's environmental exposure to metals has been widely investigated by our research group (Nascimento et al. 2014, 2015, 2016, 2017). In two of our recent studies, we suggested the possible neurotoxic effects of manganese (Mn) exposure in children living in a rural area with intensive use of agrochemicals (Nascimento et al. 2015, 2016). It is known that the neurotoxicity of Mn is linked to the ability of this metal, at high levels, to alter different dopaminergic processes (Aschner et al. 2007). This mechanism of Mn neurotoxicity has influenced the assessment of possible biomarkers of effect related to dopamine neurotransmission (Montes et al. 2011). An indirect marker of dopaminergic functioning that has been used in studies evaluating neurotoxic effects of Mn in humans is serum prolactin (PRL), a polypeptide hormone which is synthesized and secreted from the lactotrophs of anterior pituitary gland, and whose production is controlled by dopamine (Ben-Jonathan et al. 2008; Montes et al. 2011; Tutkun et al. 2014).

Therefore, taking into account the well documented special vulnerability of children to adverse effects from environmental chemicals exposure (Mello-da-Silva

and Fruchtengarten 2005; Karr 2012; Landrigan 2016), and the existence of few studies investigating the effects of EDCs in children, the current study aimed to evaluate the association between biomarkers of exposure to cholinesterase inhibitor insecticides and metals and thyroid function of children from a rural area of Southern Brazil. In addition, the possible indirect adverse effects of the EDCs on glucose and lipid metabolism were also evaluated.

Material and methods

Study population

Fifty-four children aged 5 to 16 years old (mean \pm SEM: 10.5 \pm 0.43 years), who lived in the rural area of Agudo, in the central region of the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil, were included in this study. In this region, agriculture is the main economic activity, the most common cultivation is tobacco, and several classes of agrochemicals are used in these crops. Biological samples were collected from children in two agricultural periods in the same year: low exposure (March-April 2016), when tobacco leaves are stored in sheds until be sold to tobacco companies, and high exposure (September-October 2016), when pesticides were used regularly in the region, according to Fig. 1. All children who accepted to participate and whose parents agreed with their participation were included in the study. A total of 83 children fulfilled these criteria; however, for the present investigation we selected only 54 children, which had biological samples collected in both periods and were submitted to thyroid ultrasonography.

Children's parents provided written consent and answered a questionnaire to assess children's general health, family lifestyle, parents' education data, and pesticides used in the agricultural activities. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEP UFRGS/ CAAE: 51920115.2.0000.5347) and the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA, number 160052).

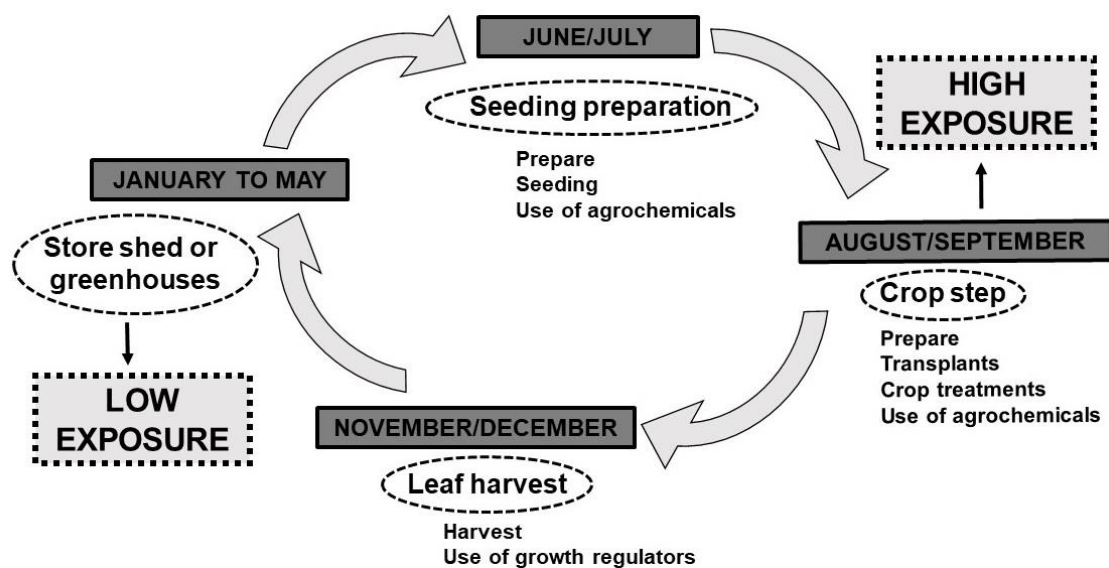


Fig. 1 Tobacco crop cycle in Southern Brazil and selected periods for biological samples collection (low and high exposure periods)

Samples collection

Approximately 8 mL of fasting venous blood samples were collected from children in tubes containing sodium heparin for trace elements, EDTA-containing tubes, and tubes without anticoagulant, in both periods. For metals concentration analysis, whole blood was collected with heparin. Plasma was obtained by whole blood centrifugation at 1500 \times g for 10 minutes at 4 °C, and it was used to measure high-sensitive C reactive protein (hs-CRP). Whole blood with EDTA was used for erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) activity determination. Serum was obtained by centrifugation at 1500 \times g for 10 minutes at 4 °C, and it was used to determine butyrylcholinesterase (BuChE) activity, glucose, total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL-c), triglycerides (TG), prolactin (PRL), thyroid stimulating hormone (TSH) and TH levels (total triiodothyronine (T₃) and free thyroxine (fT₄)). Thyroid peroxidase antibody (TPOAb) was also measured in serum samples, which were stored at - 80 °C until analysis.

Urine samples (10 mL) were collected in the two studied periods for quantification of cotinine levels into polypropylene tubes.

Hair samples for metals quantification were collected in both periods. Approximately 0.250 g of hair from the occipital region, just above the neck, was collected with stainless steel scissors previously decontaminated with acetone. Samples were stored in polyethylene bags identified with each child's data.

Pubertal stage and anthropometric measurements

Tanner stages of sexual maturity were determined by an endocrinologist (Tanner and Whitehouse, 1976). The same person performed weight and height measurements in both periods. 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. Body mass index (BMI) was calculated as body mass divided by height squared (kg m^{-2}).

Biomarkers of exposure

Determination of erythrocyte (AChE) and serum (BuChE) cholinesterase activity

AChE and BuChE activities were determined in erythrocytes and serum samples, respectively. Erythrocyte AChE activity was measured by Ellman's method (1961) with some modifications. Firstly, 20 μL of whole blood were added to 12 mL of 0.1 M phosphate buffer pH 8.0 in conical tubes (Falcon[®]) at a dilution of 1:10 (10 mL of phosphate buffer and 90 mL of reagent water), for hemolysis. After that, 3 mL of this dilution were transferred to another tube, 20 μL of 0.5% quinidine sulfate and 20 μL of 0.01 M 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) were added. Then, 1.5 mL of the solution was transferred to a semimicro cuvette and it was used as blank at 412 nm. The cuvette was then removed from the equipment and 10 μL of 0.075 M acetylcholine iodide were added, homogenized quickly and placed back in the spectrophotometer SpectraMax[®] M2e - Molecular Devices (Sunnyvale, CA, EUA), at 412 nm, to determine the first measure. Simultaneously, the timer was triggered and absorbance was measured every minute, during 4 minutes, totalizing five measures. Then, the mean absorbance was calculated. The enzyme activity was determined by the following equation:

$$\text{AChE activity (kU/L)} = \Delta A \times 132.35$$

where ΔA is the mean absorbance. Considering that $1 \text{ kU L}^{-1} = 1000 \text{ U L}^{-1}$, AChE activity was expressed as U L^{-1} .

BuChE activity was determined by kinetic enzymatic method using BS-120 Chemistry Analyzer (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co Ltd, Shenzhen, China), with commercial kits (Bioclin[®], Belo Horizonte, Brazil). In this method, the

substrate butyrylthiocoline is hydrolyzed to thiocoline and butyrate. The thiocoline reduces the hexacyanoferrate (III), yellow, to hexacyanoferrate (II), colorless. The decrease in absorbance was measured at 405 nm. Controls were quantified with samples and only two standard deviations of the reference value were accepted. BuChE activity was expressed as U L⁻¹.

Determination of blood elemental concentrations

Concentrations of the elements arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr), mercury (Hg), manganese (Mn), lead (Pb), and nickel (Ni) were determined in blood of children in the two periods by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) using a Nexlon 300X spectrometer (PerkinElmer-Sciex, USA) according to Mateus et al. (2013). Firstly, 1 mL of 65% ultrapure nitric acid was added to 500 µL of whole blood collected with heparin in a polypropylene digestion tube. After, the mixture was digested by heating at 95 °C for 4 h. Extracts were cooled at room temperature, and the volume was made up to 10 mL with ultrapure water. A rhodium (Rh) (400 µg L⁻¹) acidified aqueous solution (1% HNO₃) was added in line as internal standard, and the calibration curve ranged from 5 to 80 µg L⁻¹. Calibration solutions were prepared using a 10 mg L⁻¹ stock solution (PerkinElmer 29). The LOD and LOQ were calculated based on the standard deviation of the calibration blanks (n = 10): three times the standard deviation for the LOD (or ten times for the LOQ), divided by the slope of the calibration curve. Precision and accuracy of the analytical method were monitored with reference standards that were analyzed in intervals of 15 samples. For differences greater than 10%, a new calibration was applied. The average (n= 3) measured and certified concentrations (in parenthesis) were, in mg/L, as follows: As: 0.025 ± 0.004 (0.0241); Cd: 0.008 ± 0.0 (0.0087); Cr: 0.013 ± 0.003 (0.0129); Hg: 0.008 ± 0.001 (0.0085); Mn: 0.023 ± 0.002 (0.025); Pb: 0.353 ± 0.013 (0.357); Ni: 0.016 ± 0.001 (0.015).

Determination of hair elemental concentrations

Concentrations of the elements As, Cd, Cr, Hg, Mn, Pb and Ni were determined in children's hair in the two periods by ICP-MS using a Nexlon 300X spectrometer (PerkinElmer-Sciex, USA) following the conditions of analysis described by Carneiro et al. (2002). Hair samples were successively washed with a

solution of acetone/EXTRANS (1% v/v)/Milli-Q water in an ultrasound bath to eliminate exogenous elements. Afterwards, a digestion process was performed as following: approximately 0.250 g of sample were weighed in polypropylene tube and added 2.5 mL HNO₃, and the tube was left overnight at room temperature. Then, the decomposition process was followed by a further 2 h in hot plate at 80 °C. After, 1 mL hydrogen peroxide was added and samples were heated for 15 min. Finally, samples were diluted to a final volume of 25 mL with ultrapure water and analyzed by ICP-MS. The precision and accuracy of the analytical method were monitored through the use of reference standards analyzed after every 15 samples. A new calibration curve was applied when a difference greater than 10% was determined. The average measured and certified concentrations (in parenthesis) were, in µg/g, as follows: As: 0.40 (0.28 ± 0.05); Cd: 0.069 (0.07 ± 0.01); Cr: 0.52 (0.41 ± 0.12); Hg: 0.61 (0.67 ± 0.1); Mn: 1.99 (2.0 ± 0.3); Pb: 5.37 (5.7 ± 0.5); Ni: 0.33 (0.43 ± 0.12).

Determination of cotinine levels

Cotinine levels were measured in urine samples by high-performance liquid chromatography, using a UV detector (HPLC-UV), according to the method of Cattaneo et al. (2006). The cotinine levels were expressed as ng mL⁻¹.

Hormones levels determination

Hormones measured in serum include T₃ (reported in ng dL⁻¹) and fT₄ (reported in ng dL⁻¹) by electrochemiluminescence (ECLIA), TSH (reported in mIU L⁻¹) by ECLIA sandwich, and PRL by ECLIA (reported in ng mL⁻¹) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). TPOAb was measured using chemiluminescent microplate immunoassay (CMIA) (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA).

Thyroid ultrasound examination

Thyroid ultrasonography was performed in the high exposure period by the same radiologist with ultrasound experience, using a Toshiba instrument with a 7.5-MHz transducer. By ultrasound, thyroid volume and echogenicity (homogenous or non-homogenous), and the presence of nodules and cysts were determined. The volume of each thyroid lobe was calculated according to the formula anteroposterior x transversal x longitudinal diameters x 0.52. The results for each lobe and isthmus

were summed to obtain the total volume. The ratio of thyroid volume (mL) to body surface area (m²) for each child was determined to obtain the echo body index (mL/m²).

Biochemical assays

Biochemical parameters were quantified in fasting serum collected in the first hour in the morning using a Mindray[®] BS-120 Chemistry Analyzer (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co Ltd, Shenzhen, China), with commercial kits (Bioclin[®], Belo Horizonte, Brazil). Glucose, TC, HDL-c, and TG were determined by enzymatic colorimetric tests. Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) fraction was calculated according to the Friedewald equation (Friedewald et al., 1972). The hs-CRP was measured by immunoturbidimetry method. Controls were carried out with samples and only two standard deviations of the reference interval were accepted.

Statistical analysis

Data were analyzed using IBM SPSS Statistics software (version 22.0). A normality test was applied to check the data distribution, and each variable was assessed by the Shapiro-Wilk test. The non-parametric Wilcoxon rank-sum test was used to compare differences between the two different periods evaluated. Variables with a non-normal distribution were log transformed. Spearman's rank correlation analysis and partial correlation analysis with a log link were carried out to evaluate the associations between pairs of variables for each period of the study controlling for age, gender, BMI, and pubertal stage. The results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM), mean \pm standard deviation (SD), mean (interquartile range), or confidence interval (CI) 95%. Values of $p \leq 0.05$ were considered significant.

Results

Characteristics of the study participants

Table 1 presents a summary of the main characteristics of children. The mean age was 10.20 ± 0.43 years, 26 boys and 28 girls participated of this study. Comparing the BMI for each age obtained in each exposure period with the critical values of BMI defined for Brazilian population aged 2 to 19 years (Conde and Monteiro, 2006), our data showed that in the low exposure period, 7 girls (25%)

presented overweight, while 7 girls (25%) were classified as obese, according to their individual BMI. In the high exposure period, 5 girls (18%) were overweight and 8 girls (29%) were obese. Among boys, 6 (23%) presented overweight and 2 (8%) showed obesity in the low exposure period, while in the high exposure period, 5 boys (19%) were overweight and 2 boys (8%) were obese.

Most of children's parents were farmers and their educational level was middle school. Only 4 parents (9%) were smokers. In addition, no child was diabetic according to parents' answers in the questionnaire. In addition, most children lived near crops (0 to 1 km of distance).

Table 1 Characteristics of the studied children

	N	Children (N= 54)	CI (95%)
Age (years)	54	10.20 ± 0.43	9.33–11.01
Boys	26		
Girls	28		
BMI low exposure (kg m⁻²)^a			
<i>Boys (5-10 years)</i>	14	16.87 (15.57–18.34)	15.77–17.97
<i>Girls (5-10 years)</i>	18	17.62 (15.83–20.17)	16.05–19.55
<i>Boys (11-16 years)</i>	12	20.34 (16.73–24.97)	17.35–26.24
<i>Girls (11-16 years)</i>	10	24.98 (16.59–30.11)	19.56–28.67
BMI high exposure (kg m⁻²)^a			
<i>Boys (5-10 years)</i>	14	17.04 (15.51–17.59)	15.85–17.85
<i>Girls (5-10 years)</i>	18	17.64 (15.03–18.27)	15.80–19.13
<i>Boys (11-16 years)</i>	12	20.73 (16.57–25.44)	17.41–26.45
<i>Girls (11-16 years)</i>	10	24.56 (17.43–31.97)	19.37–29.43
Parents' education			
<i>Middle school</i>		32 (62%)	
<i>High school</i>		14 (27%)	
<i>Undergraduate school</i>		6 (11%)	
Parents' occupation			
<i>Farmers</i>		41 (80%)	
<i>Others</i>		10 (20%)	
Parental smoking			
Yes		4 (9%)	
No		43 (91%)	
Diabetic child			
Yes		0	
No		52 (100%)	
Distance between house and crops			

0-1 km	43 (88%)
>1-5 km	2 (4%)
>5 km	4 (8%)

Type of crops cultivated by children's parents

Tobacco	30 (65%)
Rice	11 (24%)
Corn	30 (65%)
Others	20 (44%)

Results are expressed as mean \pm SEM, mean (interquartile range), or N (%). ^a Overweight: Girls: BMI > 22.96 kg m⁻², Boys: BMI > 24.41 kg m⁻²; Obesity: Girls: BMI > 28.34 kg m⁻², Boys: BMI > 29,20 kg m⁻² (Conde and Monteiro, 2006)

Biomarkers of exposure

Fig. 2 shows the mean values obtained for AChE and BuChE activities in the two periods: 12,049.5 \pm 254.8 U L⁻¹ and 12,011.8 \pm 317.3 U L⁻¹ for AChE at the periods of low and high exposure, respectively; 8,582.1 \pm 192.0 U L⁻¹ and 5,660.2 \pm 402.3 U L⁻¹ for BuChE in the low and high exposure periods, respectively. As can be seen in Fig. 2, while no significant difference was observed for AChE activity between the two studied periods (Fig. 2A), a significant decrease was found for BuChE activity in the high exposure period when compared to the low exposure period (Fig. 2B; $p < 0.001$).

Concentrations of metals in blood and hair are presented in Tables 2 and 3, respectively. Blood levels of Cr and Mn were higher than those recommended by the World Health Organization (WHO, 1996) in both periods. Blood Ni levels were only above the recommended in the period of high exposure to pesticides. In addition, in the high exposure period, As, Mn, and Ni blood levels were significantly increased in comparison to the low exposure period ($p < 0.05$). On the other hand, blood Hg levels were significantly increased in the low exposure period, when compared to the high exposure period ($p < 0.001$).

Similarly to observed in blood, Cr and Mn hair levels were higher than reference values in both periods (Carneiro et al., 2002). Hair concentrations of Cr, Hg, Ni, and Pb have significant higher levels in the high exposure period compared to low exposure period ($p < 0.001$).

Additionally, higher blood As levels were associated with lower erythrocyte AChE activity in the low exposure period ($r = -0.504$; $p < 0.001$). Moreover, in the high

exposure period, blood As was negatively associated with serum BuChE activity ($r = -0.322$; $p < 0.05$).

Cotinine urinary levels were significantly increased in the high exposure period ($320.8 \pm 106.1 \text{ ng mL}^{-1}$) in comparison to the low exposure period ($73.5 \pm 17.3 \text{ ng mL}^{-1}$) ($p < 0.05$).

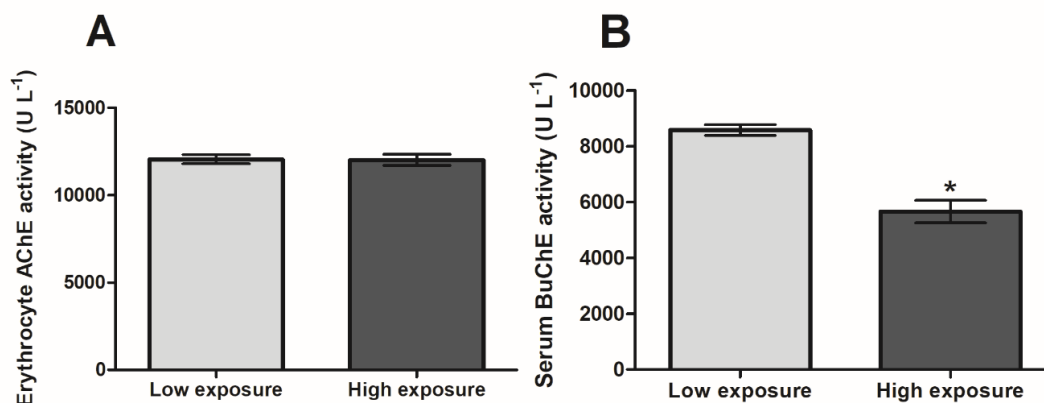


Fig. 2 (A) AChE and (B) BuChE activities in erythrocytes and serum samples, respectively, from children (N= 54) in the low and high exposure periods. Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.001$ compared to the low exposure period. *Abbreviations:* AChE: acetylcholinesterase; BuChE: butyrylcholinesterase

Table 2 Blood concentrations of metals from children in the low vs. high exposure period

Metal	Low exposure (N= 54)	High exposure (N= 54)	Reference levels ^a
As ($\mu\text{g L}^{-1}$)	7.6 ± 2.6 (1.0 – 10.5)	13.1 ± 1.1 (10.3 – 14.5)**	2.0 – 20.0
Cd ($\mu\text{g L}^{-1}$)	N.D.	N.D.	-
Cr ($\mu\text{g L}^{-1}$)	15.7 ± 6.3 (10.9 – 29.4)	13.2 ± 0.9 (11.2 – 15.9)	< 5.0
Hg ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1.2 ± 0.4 (1.0 – 2.7)	1.0 ± 0.0 (1.0 – 1.0)**	2.0 – 20.0
Mn ($\mu\text{g L}^{-1}$)	15.9 ± 13.9 (1.0 – 57.8)	19.9 ± 1.9 (16.9 – 25.4)*	8.0 – 12.0
Ni ($\mu\text{g L}^{-1}$)	3.0 ± 1.0 (1.0 – 5.4)	8.3 ± 3.8 (6.0 – 34.0)**	1.0 – 5.0
Pb ($\mu\text{g dL}^{-1}$)	3.6 ± 3.8 (0.5 – 12.3)	1.6 ± 0.8 (0.7 – 4.5)	5.0 ^b

Data are expressed as mean \pm SEM (minimum-maximum). ^a According to WHO (1996) and ^b CDC (2017). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ compared to the low exposure period. N.D.: not detected

Table 3 Hair concentrations of metals from children in the low vs. high exposure period

Metal	Low exposure (N= 54)	High exposure (N= 42)	Reference levels ^a
As ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0.07 \pm 0.05 (0.02 – 0.3)	0.09 \pm 0.08 (0.02 – 0.4)	< 0.10
Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0.06 \pm 0.06 (0.01 – 0.4)	0.05 \pm 0.04 (0.01 – 2.0)	< 0.27
Cr ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0.4 \pm 0.09 (0.3 – 0.8)	0.6 \pm 0.2 (0.4 – 1.6)**	< 0.32
Hg ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0.2 \pm 0.2 (0.05 – 1.2)	0.9 \pm 0.6 (0.4 – 3.7)**	< 2.4
Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	2.6 \pm 3.9 (0.3 – 21.6)	5.1 \pm 10.9 (0.4 – 54.6)	0.15 – 1.0
Ni ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0.2 \pm 0.2 (0.04 – 1.2)	0.3 \pm 0.2 (0.09 – 0.8)**	< 0.7
Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0.8 \pm 0.7 (0.1 – 3.5)	1.2 \pm 1.0 (0.3 – 4.8)*	< 9.3

Data are expressed as mean \pm SEM (minimum-maximum). ^a According to Carneiro et al. (2002). * p <0.05 and ** p <0.01 compared to the low exposure period

Hormone levels determination

TSH, TH and PRL levels quantified in both periods are presented in Table 4. In a general way, TSH was higher as well as T_3 and fT_4 were lower in the high exposure period compared to the low exposure period. However, significant differences between the periods were found only for children aged 7 to 11 years (for fT_4) and for children with age range between 12 and 16 years (for TSH, T_3 , and fT_4) (p <0.05). Levels of fT_4 were slightly higher than reference ranges in the low exposure period in all age ranges. Furthermore, increased TSH levels were strongly associated with decreased fT_4 concentrations in the low exposure period ($r = -0.720$; $p < 0.001$).

Moreover, as showed in Table 5, according to each age range, TSH levels were above the reference ranges in 4 (7.5%) and 5 (9.5%) children in the low and high exposure periods, respectively. In such children, fT_4 concentrations were within the reference ranges, i.e., they showed a condition known as subclinical hypothyroidism (elevated TSH with normal fT_4 levels). Regarding to fT_4 , 25 (47.1%) children had levels above the reference ranges in the low exposure period, while in the high exposure period only 3 (5.7%) children presented alterations in circulating levels, among that 2 children (3.8%) from the age group of 7-11 years had fT_4 below the reference range.

Regarding to TPOAb, all children presented negative results (<1 IU mL^{-1}) in the low exposure period and two children had positive results for the antibody (>1 IU mL^{-1}) with a mean \pm SEM of 1.69 ± 0.6 IU mL^{-1} in the high exposure period.

No significant differences were found for PRL levels between the periods, for all age ranges ($p>0.05$).

Table 4 Concentrations of TSH, total T₃, fT₄, and PRL in children (N= 54) from two periods, according to age range

Age range [years]	N	TSH (mIU L ⁻¹)		T ₃ (ng dL ⁻¹)		fT ₄ (ng dL ⁻¹)		Prolactin (ng dL ⁻¹)	
		Low exposure	High exposure	Low exposure	High exposure	Low exposure	High exposure	Low exposure	High exposure
5–6	5	2.4 ± 0.4	2.6 ± 0.3	168.7 ± 15.6	163.2 ± 8.9	1.9 ± 0.6	1.3 ± 0.04	10.3 ± 1.7	14.3 ± 3.2
7–11	28	2.8 ± 0.5	3.1 ± 0.3	170.6 ± 4.7	158.3 ± 4.1	2.2 ± 0.2	1.3 0.03**	11.4 ± 1.1	11.3 ± 1.0
12–16	21	1.8 ± 0.2	3.0 ± 0.5**	163.9 ± 5.2	148.0 ± 4.7*	2.2 ± 0.2	1.2 ± 0.03*	12.5 ± 1.4	11.9 ± 1.2

Data are expressed as mean ± SEM. **p*<0.05 and ***p*<0.01 compared to the low exposure period. Reference values according to the age range (Roche Diagnostics Ltd, 2008) – For TSH (mIU L⁻¹): 5 to 6 years: 0.7–5.97; 7 to 11 years: 0.6 –4.84; 12 to 16 years: 0.51–4.3. For T₃ (ng dL⁻¹): 5 to 6 years: 92–248; 7 to 11 years: 93–231; 12 to 16 years: 91–218. For fT₄ (ng dL⁻¹): 5 to 6 years: 0.96–1.77; 7 to 11 years: 0.97–1.67; 12 to 16 years: 0.98–1.63. For prolactin (ng mL⁻¹): 5 to 6 years: 0.8–16.9; 7 to 11 years: 0.3–12.9; 12 to 16 years: 0.9–18.4

Table 5 Prevalence of altered TSH and fT₄ levels in studied children in both periods (N= 54)

Age range [years]/N	High TSH (mIU L ⁻¹)		High fT ₄ (ng dL ⁻¹)	
	Low exposure	High exposure	Low exposure	High exposure
5–6/5	0 (0%)	0 (0%)	1 (1.9%)	0 (0%)
7–11/28	3 (5.6%)	2 (3.8%)	12 (22.6%)	1 (1.9%)
12–16/21	1 (1.9%)	3 (5.7%)	12 (22.6%)	2 (3.8%)
Total/54	4 (7.5%)	5 (9.5%)	25 (47.1%)	3 (5.7%)

Data are expressed as N (%).

Thyroid ultrasound examination

An index correcting thyroid volume (in mL) for body size (in m² of body surface area) best expresses thyroid size over the childhood age range (Lisbôa et al., 1996). Therefore, the means for echo body index (mL/m²), determined in the high exposure period, are shown in Table 6. Five children (9%) presented cysts and one child had nodules. In the same line, while 48 children (89%) presented homogenous echogenicity (Fig. 3A), 6 children (11%) had non-homogenous echogenicity (Fig. 3B).

In order to compare the echo body index (mL/m²) between children with alteration in some thyroid parameter (altered TH levels, positive TPOAb, presence of cysts or nodules, and non-homogenous echogenicity) and children with all normal thyroid parameters assessed (normal TH levels, TPOAb negative, absence of cysts or nodules, and homogenous echogenicity), we divided children in two groups. Our data showed no significant difference between the groups, being that children with some thyroid parameter altered presented a mean \pm SD for echo body index of 4.34 ± 0.99 mL/m² while children with no alterations in thyroid parameters had a mean \pm SD of 4.21 ± 0.84 mL/m² for echo body index ($p > 0.05$).

Table 6 Echo body index (mL/m²) obtained from the ratio between thyroid volume (mL) and body surface area (m²) of the studied children in the high exposure period (N= 54)

Age (years)	N	Body surface area (m ²)	Thyroid volume (mL)	Echo body index (mL/m ²)
5-6	5	0.88 \pm 0.11	3.60 \pm 0.44	4.12 \pm 0.64
7-8	12	1.06 \pm 0.19	4.61 \pm 0.96	4.32 \pm 0.41
9-10	15	1.23 \pm 0.13	4.45 \pm 1.03	3.63 \pm 0.80
11-12	2	1.52 \pm 0.15	6.35 \pm 1.77	4.14 \pm 0.74
13-14	14	1.65 \pm 0.21	7.71 \pm 1.80	4.71 \pm 1.10
15-16	6	1.75 \pm 0.26	8.17 \pm 1.81	4.67 \pm 0.62

Data are expressed as mean \pm SD

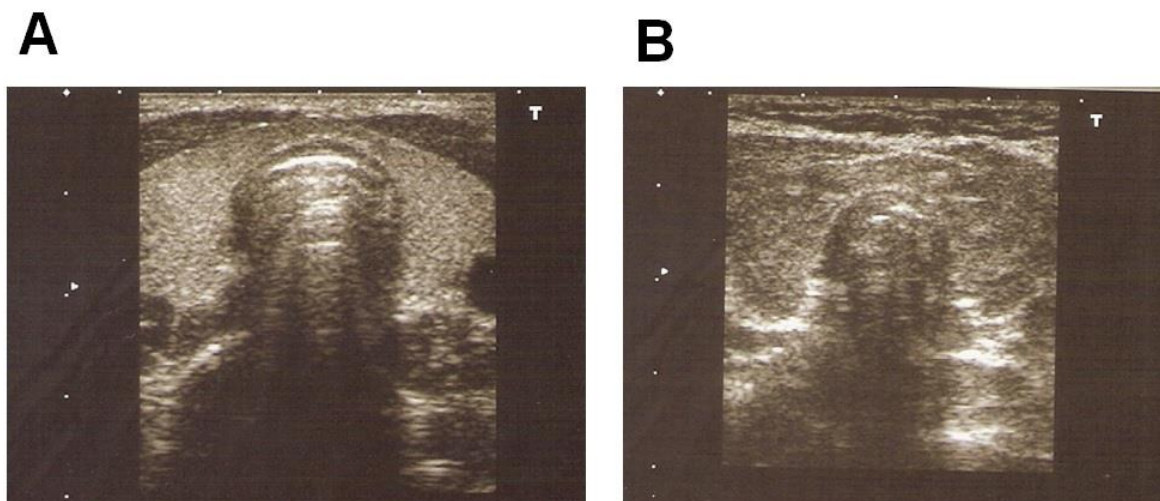


Fig. 3 Ultrasound images obtained from children (N= 54) with (A) homogenous echogenicity (normal thyroid) and (B) thyroid with non-homogenous echogenicity

Associations among biomarkers of exposure and thyroid hormones

Significant associations were observed between TSH and fT_4 concentrations and metals levels in the low exposure period, as shown in Table 7. After adjustment for covariates, log TSH was positively associated with blood concentrations of log-transformed Cr, Mn, and Pb ($p < 0.05$). In addition, the log-transformed fT_4 was negatively associated with blood levels of log-transformed Cr, Hg, Mn, and Pb ($p < 0.05$). Elevated log-transformed Pb hair levels were also positively associated with increased log-transformed TSH levels and inversely correlated with log-transformed fT_4 levels ($p < 0.05$).

Table 7 Correlations between thyroid hormones and metals in the low exposure period (N= 54)

	Log TSH ($\mu\text{UI mL}^{-1}$)	Log fT_4 (ng dL^{-1})
Log B-Cr ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$r = 0.476^{**}$	$r = -0.514^{**}$
Log B-Mn ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$r = 0.355^*$	$r = -0.410^*$
Log B-Pb ($\mu\text{g dL}^{-1}$)	$r = 0.376^*$	$r = -0.512^{**}$
Log B-Hg ($\mu\text{g L}^{-1}$)	#	$r = -0.450^{**}$
Log H-Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$)	$r = 0.363^*$	$r = -0.333^*$

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; # $p > 0.05$. Partial correlations adjusted for age, gender, BMI, and pubertal stage. *Abbreviations:* B-Cr: blood chromium; B-Mn: blood manganese; B-Pb: blood lead; H-Pb: hair lead; B-Hg: blood mercury

Associations between biomarkers of exposure to Mn and serum PRL levels

Fig. 4 shows the results of Spearman's correlation analysis among Mn in hair and PRL serum levels in both evaluated periods. Increased PRL levels were accompanied by increased hair Mn levels in the low (Fig. 4A; $p < 0.05$) and in the high exposure (Fig. 4B; $p < 0.01$) periods.

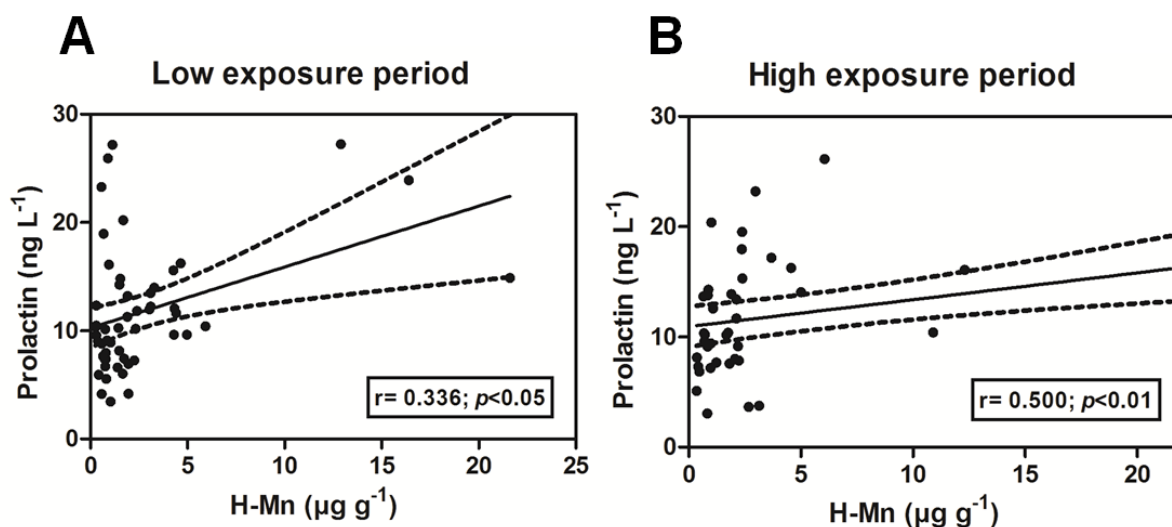


Fig. 4 Spearman's rank correlations between PRL levels (ng L⁻¹) and hair Mn levels (H-Mn; µg g⁻¹) in the low exposure period (A; N= 52) and in the high exposure period (B; N= 41). *Abbreviations:* H-Mn: hair manganese

Biochemical analyses

In Table 8, significant differences were observed for glucose, total cholesterol (TC), HDL-c, and LDL-c ($p < 0.01$). Children presented blood fasting glucose levels significantly increased in the high exposure period, when compared to those found in the low exposure period ($p < 0.001$). Moreover, while in the low exposure period just two children presented glucose levels above 100 mg dL⁻¹, 18 children (33%) had glucose levels ≥ 100 mg dL⁻¹ in the high exposure period, with values ranging from 100 to 108 mg dL⁻¹. Additionally, as it is possible to observe in Fig. 5, the increase in glucose levels was significantly accompanied by the decrease in BuChE activity in the high exposure period ($r = -0.509$; $p < 0.001$), suggesting a negative involvement of the cholinesterase inhibitor insecticides on glucose homeostasis of children.

According to Brazilian reference ranges for lipid profile markers, children presented significant elevated mean of TC (≥ 150 mg dL⁻¹) and LDL-c levels

(>100 mg dL⁻¹), as well as HDL-c levels were significantly decreased in the low exposure period in comparison to the high exposure period ($p<0.01$). Our data showed that 44 children (81%) and 40 children (75%) in the low and high exposure periods, respectively, presented TC levels above 150 mg dL⁻¹. For LDL-c, 33 children (62%) and 24 children (44%) had serum levels higher than 100 mg dL⁻¹ in the low and high exposure periods, respectively. Regarding to triglycerides levels, 22 children (40%) and 20 children (38%) demonstrated serum levels above 100 mg dL⁻¹ in the low and high exposure periods, respectively. Significant inverse associations adjusted by age were found between HDL-c and log BMI in the low exposure period ($r= -0.496$; $p<0.0001$) and in the high exposure period ($r= -0.548$; $p<0.001$). Log transformed TG was also positively correlated with log BMI in the low exposure period ($r= 0.317$; $p<0.05$), as well as was inversely associated with log fT₄ in the high exposure period ($r= -0.286$; $p<0.05$). Negative association was also found between log fT₄ and TC ($r= -0.302$; $p<0.05$) in the high exposure period.

No significant difference was found for hs-CRP between the exposure periods. However, log transformed hs-CRP was positively correlated with log BMI in the low exposure ($r= 0.579$; $p<0.001$) and in the high exposure period ($r= 0.338$; $p<0.05$). In addition, log hs-CRP was positively associated with LDL-c in the low exposure period ($r= 0.283$; $p<0.05$).

Table 8 Biochemical features of studied children (N= 54)

	Low exposure	High exposure	Reference values
Glucose (mg dL ⁻¹)	87.3 ± 0.83	96.1 ± 0.84**	65 – 99
Total cholesterol (mg dL ⁻¹)	195.3 ± 7.0	184.2 ± 7.3*	< 150
HDL cholesterol (mg dL ⁻¹)	53.8 ± 1.6	60.1 ± 1.7*	> 45
LDL cholesterol (mg dL ⁻¹)	120.2 ± 5.8	101.9 ± 6.3**	< 100
Triglycerides (mg dL ⁻¹)	106.9 ± 9.7	101.6 ± 9.6	< 100
hs-CRP (mg L ⁻¹)	1.4 ± 2.55	2.1 ± 4.1	< 1.0

Data are expressed as mean ± SEM. *Abbreviations*: HDL: high-density lipoprotein, LDL: low-density lipoprotein; hs-CRP: high-sensitivity C reactive protein. * $p<0.01$ compared with the low exposure period; ** $p<0.001$ compared with the low exposure period

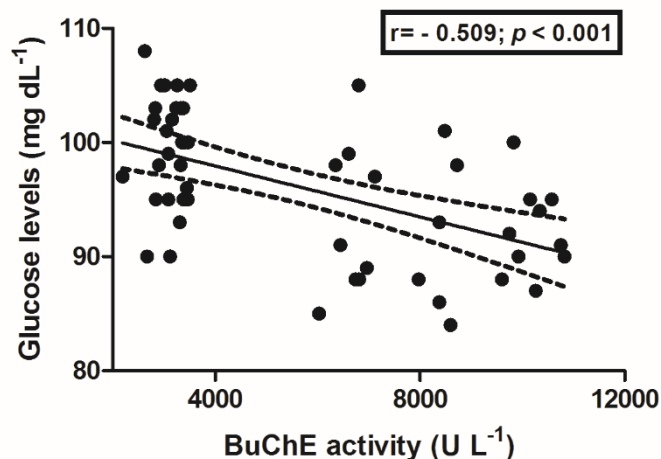


Fig. 5 Partial correlation test between glucose levels (mg L^{-1}) and log BuChE activity (U L^{-1}) in children in the high exposure period ($N= 54$), adjusted by sex, age, BMI and pubertal stage. *Abbreviations:* BuChE: butyrylcholinesterase

Discussion

The present data suggest that children living in a rural area of Southern Brazil were chronically exposed to environmental xenobiotics, including pesticides and metals. Significant associations between biomarkers of exposure to multiple metals (As, Cr, Hg, Mn and Pb), and alterations in circulating TSH and fT_4 levels may suggest that such xenobiotics act as EDCs. Moreover, we described association between children's environmental exposure to cholinesterase inhibitors insecticides and glucose levels, as well as between increased Mn levels and elevated prolactin, and observed dyslipidemia possibly related to thyroid dysfunction. Since studies with children environmentally exposed to xenobiotics are scarce, especially in developing countries, our study provides relevant information regarding the adverse effects of these chemicals on children's health and, consequently, the possible negative consequences of such exposures throughout their lives.

Cholinesterase inhibitor insecticides, i.e., OPs and carbamates, are widely used in developing countries, such as Brazil. In our study, 33% of children's parents reported the use of such chemicals. These compounds strongly affect the nervous system of the insects and, in a smaller degree, they also affect the mammals, which causes concern regarding human health

(Oulhote and Bouchard, 2013). When absorbed, they bind to the active site of cholinesterase, leading to enzyme phosphorylation and carbamylation, respectively (Linares et al., 2005; Linhares et al., 2013). Therefore, they are considered cholinesterase inhibitors. According to Butler-Dawson et al. (2016), OPs have the potential to cause adverse health effects and affect negatively the neurodevelopment of children living in agricultural communities. Our findings are in agreement with García-García et al. (2016), who showed significant reduced BuChE activity in the high exposure period to pesticides in relation to the low exposure period, while no significant difference was found for AChE between the exposure periods in greenhouse workers from Spain. Although less specific, BuChE is more sensitive to assess exposure to cholinesterase inhibitor insecticides in biomonitoring studies (Kapka-Skrzypczak et al., 2011). Moreover, BuChE activity represents recent exposure, while AChE activity remains inhibited for longer than BuChE, representing chronic exposure (Linhares et al., 2013; García-García et al., 2016). Indeed, in the high exposure period, children were probably more exposed to cholinesterase inhibitors than in the low exposure period, by direct contact through helping parents in their agricultural practices or indirectly by playing in sheds where pesticides are stored, and through inhalation or ingestion of contaminated drinking water and food. Moreover, in this period, children were at risk of exposure to nicotine, considering that tobacco is the main agricultural cultivation in the studied region. Because of this, we performed cotinine urinary levels determination. Cotinine, the major metabolite of nicotine, is used as biomarker of tobacco exposure (Desouky et al., 2016). Our data showed increased cotinine levels in the high exposure period in relation to the low exposure period.

Additionally, metals can be released to the environment in rural areas from agricultural activities, since certain pesticides may contain some of these elements, including As, Cd, Pb, Cr, and Ni, as contaminants (Gorman et al., 2011; Jiao et al., 2012; Gundert-Remy et al., 2015). In addition, mancozeb, an ethylene bisdithiocarbamate (EBDC) fungicide used in the studied region, contain almost 20% Mn by weight, constituting a potential source of exposure to this element (Mora et al., 2014). Our data showed that Cr and Mn were above the recommended levels in blood and hair in both periods, suggesting chronic exposures. In addition, we found significant increased blood levels of As, Mn

and Ni in the high vs. low exposure period. Results for blood As and Ni levels are in agreement with our previous findings, in which these two elements were also higher in a period of tobacco leaves harvest, after pesticides applications, than in a period of low exposure to pesticides in the same rural region (Nascimento et al., 2017). In hair, As, Cr, Hg, Mn, Ni and Pb were increased in the high exposure period when compared to the low exposure period. Metals can deposit in keratin, a component of hair (Kordas et al., 2010); therefore, our findings suggest a prolonged exposure of several months, with metals as probable pesticide contaminants (Pecegueiro, 1990; Nziguheb and Smolders, 2008). Furthermore, blood As levels were inversely associated with AChE and BuChE in the low and high exposure periods, respectively, suggesting co-exposure. The main source of human environmental exposure to As is through the ingestion of contaminated water, resulting in toxicological risks (Gundert-Remy et al., 2015). In addition, anthropogenic sources including pesticides (herbicides, insecticides, rodenticides, fungicides) might also contribute to environmental exposure to this xenobiotic. Therefore, groundwater contamination with As and use of cholinesterase inhibitor insecticides in agriculture practices represent a serious problem in today's scenario mainly because the environmental co-exposure to such toxic agents can lead to several hazards to human health (Dwivedi & Flora, 2011; Flora, 2016).

Thyroid system can be affected by EDCs at different levels considering the number and complexity of the mechanisms involved in thyroid homeostasis. Such mechanisms include thyroid cell damage, interference with the hypothalamic-pituitary thyroid axis or alterations of the peripheral metabolism of TH (Vigneri et al. 2016). To our knowledge, this is the first study demonstrating the adverse effects on thyroid function of children caused by environmental exposure to metals. Among the investigated metals, Cr was the one that most associated with increased TSH and decreased fT4. Cr toxicity on thyroid has not been thoroughly studied (Rana, 2014). Unlike other metals, such as Pb and Cd, little or almost nothing has been reported concerning the adverse effects of Cr on thyroid gland structure or its secretions (Qureshi and Mahmood, 2010). Animal studies have showed the same associations found by the present study: fT4 decreased and TSH increased significantly with Cr exposure (Mahmood et al., 2008; ElBakry and Tawfik, 2014; Mohamed and El-Twab, 2016).

Moreover, very little is known about the interrelationships between thyroid function and Mn exposure in humans (Soldin and Aschner, 2007; Maouche et al., 2015; Memon et al., 2015; Hutchens et al., 2017). It was reported that Mn might affect TH homeostasis as a result of both direct dysregulation of the thyroid gland control or interfering with the activity of deiodinases, as well as affecting indirectly via alterations in the dopaminergic control of the thyroid (Soldin and Aschner, 2007; Maouche et al., 2015). In a recent study, Hutchens and colleagues (2017) reported that Mn toxicity induced severe hypothyroidism (increased TSH and decreased T₄ levels) in mice. According to the authors, it is important to determine the thyroid status of Mn-exposed children, as performed in the current study, since decreased TH levels may cause, contribute to, or exacerbate the neurotoxic effects of Mn. Memon and colleagues (2015) found similar results, i.e., decreased fT₄ and increased TSH significantly associated with blood Mn levels in hypothyroid females. As we proposed, the authors also suggested that environmental anthropogenic sources, especially extensive pesticide use, may contribute to increased Mn levels in the population.

In relation to Pb, both blood and hair levels were associated with increased TSH and decreased fT₄ in the current study. While we not found reports of association between human hair Pb levels and thyroid dysfunction, few studies have investigated associations of B-Pb <10 µg dL⁻¹ with TH levels (Chen et al., 2013). Dundar et al. (2006) found results similar to ours with low B-Pb levels (mean of 7 µg dL⁻¹) associated with decreased fT₄ levels in adolescents, and suggest that this is probably secondary to toxic effects of Pb on pituitary-thyroid axis and/or early findings of primary hypothyroidism due to impaired production of peripheral TH. Similar to our data, the rising TSH was associated with B-Pb in an occupational study of Singh et al. (2000). Recently, Nie et al. (2017) found positive association between B-Pb and TSH in Chinese adults, suggesting that Pb was disrupting thyroid function, corroborated these findings.

Furthermore, B-Hg was negatively associated with fT₄, and it was not correlated with TSH. Our data are in agreement with the study of Chen and colleagues (2013), who also not found association of TSH with Hg in adolescents and adults, only between Hg and T₃ and T₄, suggesting that the

exposure to this xenobiotic may not affect pituitary function. Although some mechanisms of Hg-related TH disruption were proposed, including binding to sulfhydryl (SH)-containing ligands in the thyroid, reduced TSH production, and inhibition of deiodination, the effects of exposure to Hg on human thyroid function still require more investigations (Chen et al., 2013; Li et al., 2016).

In our study, the prevalence of subclinical hypothyroidism (SH) (elevated TSH with normal fT₄) in the period of low exposure to pesticides was 7.5%, TSH was strongly and negatively associated with fT₄, showing an appropriate response of TSH to TH levels. Interestingly, 47.1% of the children had increased fT₄ levels in this period, which suggests an increase in TH carrier proteins or a resistance to TH in the hypothalamic-hypophysis area. This prevalence of SH is increased when compared to the 2.9% described by Lazar et al. (2009). In the high exposure period, the prevalence of SH was similar at 9.5%. As TSH, in this period, was positively associated with blood Cr, Mn, Hg, as well as blood and hair Pb, a complex interaction between these chemicals are probably related to these alterations. Interestingly, the prevalence of high fT₄ decreased from 47.5% in the low exposure period to 5.7% in the high exposure period, suggesting an acute effect on TH carrier proteins or on TH the hypothalamus-hypophysis axis.

Most children with SH have no symptoms. However, neuropsychological disorders, growth problems, effects on BMI, metabolic parameters and cardiovascular (CV) risk were described in children and adolescents with SH (Lazarus et al., 2014). It is known that dyslipidemia (high TC and LDL-c) is common in patients with thyroid dysfunction, especially hypothyroidism, and the association of dyslipidemia with SH has been described (Mehran et al., 2017; Unal et al., 2017). In the current study, fT₄ was inversely correlated with both TG and TC. Our data also showed associations between BMI and lipid profile parameters (decreased HDL-c and increased TG). Indeed, most children were overweight/obese in the current study, and an abnormal lipid profile could be associated with obesity (Dos Santos et al., 2007). Furthermore, since it is recognized that alterations in serum levels of lipids in childhood can be a risk factor for CV diseases in adulthood (Ramos et al., 2011), we investigated an inflammatory marker to CV risk, the hs-CRP. Values of hs-CRP between 1.0 and 3.0 mg dL⁻¹ are considered as medium risk to CV diseases. Although no

significant difference was found between the periods, mean hs-CRP levels were within this interval in both periods. Moreover, hs-CRP was positively associated with LDL-c and BMI. In fact, obesity is also an important predictor of CV diseases (Dos Santos et al., 2007).

It is known that exposure to multiple classes of pesticides may represent risk factors for diabetes. Some active ingredients of pesticides affect neurotransmission and/or ion channel systems, which regulate pancreatic function, including acetylcholine (e.g., organophosphate, carbamate, neonicotinoids), sodium channels (e.g., pyrethroids), among others. As consequence, these compounds might affect glucose homeostasis (Thayer et al., 2012). Our data are enough to suggest that, in fact, these chemicals might affect glucose homeostasis, since we found a negative association between blood fasting glucose levels and BuChE activity in the period of high exposure to pesticides. Additionally, 18 children (34%) had fasting glucose levels ≥ 100 mg dL⁻¹ in the high exposure period, a condition that can be classified as pre-diabetes by the Brazilian Society of Diabetes, which represents a risk factor for diabetes mellitus (SBD, 2016). Indeed, case reports, cohort, and animal experimental studies have provided evidence that cholinesterase inhibitor insecticides induce disruption of glucose homeostasis (Rathish et al., 2016; Ribeiro et al., 2016). The molecular mechanisms involved are diverse and include alteration of insulin signaling pathways, lipotoxicity, inflammation and oxidative stress (Lasram et al., 2014). Hyperglycemia and hyperinsulinemia after acute and subchronic exposure to various doses of malathion, a common OP, were found in rats suggesting the diabetic potential of OPs (Panahi et al., 2006). Insulin resistance and pancreatic β -cells dysfunction characterize DM2. Initially, there is a compensation by increased insulin production. Over time, pancreas fails to produce sufficient insulin to stimulate adequate glucose uptake, leading to hyperglycemia and DM2 (Montgomery et al., 2008; Fénichel and Chevalier, 2017). Pancreatic β -cells contain muscarinic acetylcholine receptors, which are involved in the glucose-dependent production of insulin. OPs and carbamates insecticides inhibit cholinesterase leading to acetylcholine accumulation, potentially causing overstimulation and subsequent down regulation of muscarinic receptors and reducing insulin production (Montgomery et al., 2008; Rathish et al., 2016).

For our knowledge, this is the first study reporting association between exposure to cholinesterase inhibitor insecticides and increased risk to DM2 development in children environmentally exposed. The prevalence of DM2 has drastically increased worldwide during last few decades, including in children. In parallel, there is accumulating evidence suggesting that EDCs may play a pathophysiological role in the occurrence of metabolic diseases, together with lifestyle factors and genetic susceptibility (Fénichel and Chevalier, 2017). In addition, the high prevalence of overweight and obesity observed in the current study could contribute to the risk of DM development.

In our previous works, we have reported the possible neurotoxic effects from environmental exposure to Mn in children living in a rural area of Southern Brazil, where their parents use pesticides containing Mn, such as the fungicide mancozeb (Nascimento et al., 2015; 2016). When at high levels in body, this metal can interact negatively with cellular dopamine, leading to dopamine autoxidation and causing dopaminergic cell death (Santos et al., 2011). Dopamine, in turn, regulates the release of PRL, a protein hormone with many functions in humans, including synthesis/maintenance of milk secretion, metabolism, reproduction, and maintenance of homeostasis in immune responses and osmotic balance (Tutkun et al. 2014). This regulation is based on dopamine binding to D2-receptors on specific pituitary cells (lactotrophs) which are responsible for the secretion of PRL, inhibiting both the release and the synthesis of this neurohormone (Santos et al., 2011). Due to the neurotoxicity of Mn on the dopaminergic system and the relationship between dopamine and PRL release and synthesis control, the measurement of PRL has been used as a sensitive indirect marker of Mn exposure in occupational studies (Montes et al., 2008). In the present study, serum PRL was positively correlated with hair Mn in both periods assessed. Our findings are in agreement with those found by Montes et al. (2011), who also reported positive Spearman's correlation between PRL and hair Mn in children, although their association was weaker than ours. Similarly, Takser and colleagues (2003) showed, for the first time, positive relation between cord blood Mn and PRL levels. Therefore, as mentioned in previous studies, Mn-induced dopamine decrease can lead to rise in serum PRL levels in children environmentally exposed to elevated Mn levels.

Our study has some limitations; the most important is the small number of participants, with a missing of approximately 35% of children from the low exposure period to the high exposure period. Moreover, the lack of evaluation of biomarkers of exposure for other pesticides used in the studied region is also an important limitation. Due to the collinearity between the levels of metals in blood and hair, was not possible to perform an analysis of multiple regression. Nevertheless, our data provide important information as high frequency of SH in a small number of children chronically exposed to a mixture of xenobiotics in an agricultural community, as well as the possible endocrine-disrupting effects of metals on thyroid function and the negative consequences from this disturbance, as dyslipidemia and risk to CV diseases. In addition, we showed consistent data about the effects of Mn and cholinesterase inhibitors insecticides on PRL levels and glucose homeostasis, respectively.

Conclusion

In summary, the present study showed that children living in a rural area from Brazil were chronically exposed to metals, especially Cr and Mn. These metals, together with Pb and Hg, may affect the thyroid function. Almost 10% of the children presented SH and showed alterations in lipid profile in both periods. The majority of children had glucose levels above 100 mg dL^{-1} in the high pesticide exposure period, and, for the first time, the association between serum glucose levels and BuChE activity, a biomarker of recent exposure to cholinesterase inhibitor insecticides, suggested a disruption on glucose homeostasis, which might lead to DM2. The high prevalence of children with overweight/obesity could be associated to thyroid disruption, being another important risk factor to DM2 development. In addition, the association between hair Mn and PRL suggest dopaminergic damage as a result of the exposure to this metal. Given the intense use of pesticides in Brazil and the special susceptibility of children to its adverse effects, as well as to the exposure to metals and other xenobiotics, future research should target the effects on children's health, and preventing and/or minimizing these exposures.

Acknowledgments

The authors would like to thank the volunteers who participated in this study. This work was partially supported by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE, project number 0016052). S.N. Nascimento had a CNPq PhD research fellowship and S.C. Garcia is a recipient of CNPq research fellowship.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Akyildiz BN, Kondolot M, Kurtoglu S et al (2009) Organophosphate intoxication presenting as diabetic keto-acidosis. *Ann Trop Paediatric* 29(2):155-158
- Aschner M, Guilarte TR, Schneider JS et al (2007) Manganese: recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 221(2):131-147
- Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW (2008) What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev* 29(1):1-41
- Boas M, Feldt-Rasmussen U, Main KM (2012) Thyroid effects of endocrine disrupting chemicals. *Mol Cell Endocrinol* 355(2):240-248
- Butler-Dawson J, Galvin K, Thorne PS et al (2016) Organophosphorus pesticide exposure and neurobehavioral performance in Latino children living in an orchard community. *Neurotoxicology* 53:165-172
- Campos É, Freire C (2016) Exposure to non-persistent pesticides and thyroid function: systematic review of epidemiological evidence. *Int J Hyg Environ Health* 219(6):481-497
- Carneiro MTWD, Porto da Silveira CL, Miekeley N et al (2002) Intervalos de referência para elementos menores e traço em cabelo humano para a população da cidade do Rio de Janeiro – Brasil. *Quím Nova* 25:37-45
- Cattaneo R, Alegretti AP, Sagebin FR et al (2006) Validação de método para determinação de cotinine em urina por cromatografia líquida de alta eficiência. *Rev Bras Toxicol* 19:25–31
- Chen A, Kim SS, Chung E, et al (2013) Thyroid hormones in relation to lead, mercury, and cadmium exposure in the National Health and Nutrition Examination Survey, 2007-2008. *Environ Health Perspect* 121(2):181-186
- Christensen YKL (2013) Metals in blood and urine, and thyroid function among adults in the United States 2007-2008. *Int J Hyg Environ Health* 216(6):624-632
- Conde WL, Monteiro CA (2006) Body mass index cutoff points for evaluation of nutritional status in Brazilian children and adolescents. *J Pediatr (Rio J)* 82(4):266-272
- Desouky DS, Elnemr G, Alnawawy A, Taha AA (2016) The relation between exposure to environmental tobacco smoke and the quantity of cotinine in the urine of school children in Taif City, Saudi Arabia. *Asian Pac J Cancer Prev* 17:139–145

Dos Santos MG, Pegoraro M, Sandrini F et al (2008) Fatores de risco no desenvolvimento da aterosclerose na infância e adolescência. *Arq Bras Cardiol* 90(4):301-308

Dundar B, Oktem F, Arslan MK et al (2006) The effect of long-term low-dose lead exposure on thyroid function in adolescents. *Environ Res* 101(1):140-145

Dwivedi N, Flora SJ (2011) Concomitant exposure to arsenic and organophosphates on tissue oxidative stress in rats. *Food Chem Toxicol* 49(5):1152-1159

EIBakry RH, Tawfik SM (2014) Histological study of the effect of potassium dichromate on the thyroid follicular cells of adult male albino and the possible protective role of ascorbic acid (vitamin C). *J Microsc and Ultrastruct* 2(2):137-150

Ellman GL et al (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88-95

Fénichel P, Chevalier N (2017) Environmental endocrine disruptors: new diabetogens? *C R Biol* 340(9-10):446-452

Flora SJ (2016) Arsenic and dichlorvos: Possible interaction between two environmental contaminants. *J Trace Elem Med Biol* 35:43-60

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18:499-502

García-García CR, Parrón T, Requena M et al (2016) Occupational pesticide exposure and adverse health effects at the clinical, hematological and biochemical level. *Life Sci* 145:274-283

Gorman NM, Stjernberg E, Koehoorn M et al (2011) Exposure to pesticides and metal contaminants of fertilizer among tree planters. *Ann Occup Hyg* 55:752-763

Gundert-Remy U, Damm G, Foth H et al (2015) High exposure to inorganic arsenic by food: the need for risk reduction. *Arch Toxicol* 89(12):2219-2227

Hutchens S, Liu C, Jursa T et al (2017) Deficiency in the manganese efflux transporter SLC30A10 induces severe hypothyroidism in mice. *J Biol Chem* 292(23):9760-9773

Iwen KA, Schroder E, Brabant G (2013) Thyroid hormones and the metabolic syndrome. *Eur Thyroid J* 2(2):83-92

Jiao W, Chen W, Chang AC et al (2012) Environmental risks of trace elements associated with long-term phosphate fertilizers applications: a review. *Environ Pollut* 168:44-53

Kapka-Skrzypczak, Cyranka M, Skrzypczak M et al (2011) Biomonitoring and biomarkers of organophosphate pesticides exposure – state of the art. *Ann Agric Environ Med* 18(2):294-303

Karr, C (2012) Children's environmental health in agricultural settings. *J Agromedicine* 17:127-139

Kirsten D (2000) The thyroid gland: physiology and pathophysiology. *Neonatal Netw* 19(8):11-26

Kordas K, Queirolo EI, Ettinger AS et al (2010) Prevalence and predictors of exposure to multiple metals in preschool children from Montevideo, Uruguay. *Sci Total Environ* 408:4488–4494

Landrigan JP, Etzel RA (2014) *Children's environmental health*. Oxford, United States

Landrigan PJ (2016) Children's environmental health: a brief history. *Acad Pediatr* 16(1):1-9

Lasram MM, Dhouib IB, Annabi A et al (2014) A review on the molecular mechanisms involved in insulin resistance induced by organophosphorus pesticides. *Toxicology* 322:1-13

Lazar L, Frumkin RB, Battat E et al (2009) Natural history of thyroid function tests over 5 years in a large pediatric cohort. *J Clin Endocrinol Metab* 94(5):1678-1682

Lazarus J, Brown RS, Daumerie C et al (2014) 2014 European thyroid association guidelines for the management of subclinical hypothyroidism in pregnancy and in children. *Eur Thyroid J* 3(2):76-94

Li J, Liu Y, Kong D et al (2016) T-screen and yeast assay for the detection of the thyroid-disrupting activities of cadmium, mercury, and zinc. *Environ Sci Pollut Res Int* 23(10):9843-9851

Linares CEB, Dagios G, Carati MR et al (2005) Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase plasmatic levels in farmers from Frederico Westphalen – RS. *Saúde* 31(1-2):47-51

Linhares AG, Assis CRD, Siqueira MT et al (2013) Development of a method for extraction and assay of human erythrocyte acetylcholinesterase and pesticide inhibition. *Human Exp Toxicol* 32(8):837-845

Lisbôa HR, Gross JL, Orsolin A et al (1996) Clinical examination is not an accurate method of defining the presence of goitre in schoolchildren. *Clin Endocrinol (Oxf)* 45(4):471-475

Mahmood T, Qureshi Z, Nadeem MS et al (2008) Hexavalent chromium toxicity in pituitary and thyroid glands. *Pakistan J Zool* 40(2):91-97

Maouche N, Meskine D, Alamir B et al (2015) Trace elements profile is associated with insulin resistance syndrome and oxidative damage in thyroid disorders: manganese and selenium interest in Algerian participants with dysthyroidism. *J Trace Elem Med Biol* 32:112-121

Maqbool F, Mostafalou S, Bahadar H et al (2016) Review of endocrine disorders associated with environmental toxicants and possible involved mechanisms. *Life Sci* 145:265-273

Mateus VL et al (2013) Study of the chemical composition of particulate matter from the Rio de Janeiro metropolitan region, Brazil, by inductively coupled plasma-mass spectrometry and optical emission spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B At Spectrosc* 86:131-136

Mehran L, Amouzegar A, Bakhtiyari M et al (2017) Variations in serum free thyroxine concentration within the reference range predicts the incidence of metabolic syndrome in non-obese adults: a cohort study. *Thyroid* 27(7):886-893

Mello-da-Silva CA, Fruchtengarten L (2005) Environmental chemical hazards and child health. *J Pediatr (Rio J.)* 81(5):S207-S211

Memon NS, Kazi TG, Afridi HI et al (2015) Correlation of manganese with thyroid function in females having hypo- and hyperthyroid disorders. *Biol Trace Elem Res* 167(2):165-171

Mohamed HM, Abd El-Twab SM (2016) Gallic acid attenuates chromium-induced thyroid dysfunction by modulating antioxidant status and inflammatory cytokines. *Environ Toxicol Pharmacol* 48:225-236

Montes S, Riojas-Rodríguez H, Sabido-Pedraza E et al (2008) Biomarkers of manganese exposure in a population living close to a mine and mineral processing plant in Mexico. *Environ Res* 106(1):89-95

Montes S, Schilman A, Riojas-Rodríguez H et al (2011) Serum prolactin rises in Mexican school children exposed to airborne manganese. *Environ Res* 111(8):1302-1308

Montgomery MP, Kamel F, Saldana TM et al (2008) Incident diabetes and pesticide exposure among licensed pesticide applicators: agricultural health study, 1993-2003. *Am J Epidemiol* 167(10):1235-1246

Mora AM, van Wendel de Joode B, Mergler D et al (2014) Blood and hair manganese concentrations in pregnant women from infants' environmental health study (ISA) in Costa Rica. *Environ Sci Technol* 48:3467-3476

Nascimento SN, Charão MF, Moro AM (2014) Evaluation of toxic metals and essential elements in children with learning disabilities from a rural área of Southern Brazil. *Int J Environ Res Public Health* 11(10):10806-10823

Nascimento SN, Barth A, Göethel G et al (2015) Cognitive deficits and ALA-D-inhibition in children exposed to multiple metals. *Environ Res* 136:387-395

Nascimento SN, Baierle M, Göethel G et al (2016) Associations among environmental exposure to manganese, neuropsychological performance, oxidative damage and kidney biomarkers in children. *Environ Res* 147:32-43

Nascimento SN, Göethel G, Baierle M et al (2017) Environmental exposure and effects on health of children from a tobacco-producing region. *Environ Sci Pollut Res Int* 24(3):2851-2865

Nie X, Chen Y, Chen Y et al (2017) Lead and cadmium exposure, higher thyroid antibodies and thyroid dysfunction in Chinese women. *Environ Pollut* 230:320-328

Nziguheba G, Smolders E (2008) Inputs of trace elements in agricultural soils via phosphate fertilizers in Europe countries. *Sci Total Environ* 390(1):53-57

Oulhote Y, Bouchard M (2013) Urinary metabolites of organophosphate and pyrethroid pesticides and behavioral problems in Canadian children. *Environ Health Perspec* 121(11-12):1378-1384

Panahi P, Vosough-Ghanbari S, Pournourmohammadi S et al (2006) Stimulatory effects of malathion on the key enzymes activities of insulin secretion in Langerhans islets, glutamate dehydrogenase and glucokinase. *Toxicol Mech Methods* 16(4):161-167

Pecegueiro M (1990) Contact dermatitis due to nickel in fertilizers. *Contact Dermatitis* 22:114-115

Pignati W, Oliveira NP, da Silva AM (2014) Surveillance on pesticides: quantification of use and prediction of impact on health, work and the environment for Brazilian municipalities. *Clin Saude Colet* 19(12):4669-4678

Qureshi Z, Mahmood T (2010) Prospective role of ascorbic acid (vitamin C) in attenuating hexavalent chromium-induced functional and cellular damage in rat thyroid. *Toxicol Ind Health* 26(6):349-359

Ramos AT, Carvalho DF, Gonzaga NC et al (2011) Perfil lipídico em crianças e adolescentes com excesso de peso. *Ver Bras de Cresc Desenv Hum*, 21(3):780-788

Rana SV (2014) Perspectives in endocrine toxicity of heavy metals – a review. *Biol Trace Elem Res* 160(1):1-14

Rathish D, Agampodi SB, Jayasumana MACS et al (2016) From organophosphate poisoning to diabetes mellitus: the incretin effect. *Med Hypotheses* 91:53-55

Ribeiro TA, Prates KV, Pavanello A et al (2016) Acephate exposure during a perinatal life program to type 2 diabetes. *Toxicology* 372:12-21

Russ K, Howard S (2016) Developmental exposure to environmental chemicals and metabolic changes in children. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 46(8):255-285

Santos AP, Lopes Santos M, Batoréu MC et al (2011) Prolactin is a peripheral marker of manganese neurotoxicity. *Brain Res* 1382:282-290

SBD, Sociedade Brasileira de Diabetes. [<http://www.diabetes.org.br/publico/>] Accessed 15 Oct 2017

Schug TT, Janesick A, Blumberg B et al (2011) Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol* 127:204-215

Singh B, Chandran V, Bandhu HK et al (2000) Impact of lead exposure on pituitary-thyroid axis in humans. *Biometals* 13(2):187-192

Soldin OP, Aschner M (2007) Effects of manganese on thyroid hormones homeostasis: potential links. *Neurotoxicology* 28(5):951-956

Takser L, Mergler D, Hellier G et al (2003) Manganese, monoamine metabolite levels at birth, and child psychomotor development. *Neurotoxicology* 24(4-5):667-674

Tanner JM, Whitehouse RH (1976) Clinical longitudinal standards for height, weight, height velocity, weight velocity, and stages of puberty. *Arch Dis Child* 51(3):170-179

Thayer KA, Heindel JJ, Bucher JR et al (2012) Role of environmental chemicals in diabetes and obesity: a National Toxicology Program workshop review. *Environ Health Perspect* 120(6):779-789

Tutkun E, Abusoglu S, Yilmaz H et al (2014) Prolactin levels in manganese-exposed male workers. *Pituitary* 17(6):564-568

Unal E, Akin A, Yidirim R et al (2017) Association of subclinical hypothyroidism with dyslipidemia and increased carotid intima-media thickness in children. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 9(2):144-149

Uyemura SA, Stopper H, Martin FL et al (2017) A perspective discussion on rising pesticide levels and colon cancer burden in Brazil. *Front Public Health* 5(273):1-8

Uwizeyimana H, Wang M, Chen W, K Kifayatullah (2017) The eco-toxic effects of pesticide and heavy metal mixtures towards earthworms in soil. *Environ Toxicol Pharmacol* 55:20-29

Vigneri R, Malandrino P, Giani F et al (2016) Heavy metals in the volcanic environment and thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol* 457:73-80

Wegner S, Brown P, Dix D (2016) Identifying reference chemicals for thyroid bioactivity screening. *Reprod Toxicol* 65:402-413

WHO, World Health Organization. Trace Elements in Human Nutrition and Health, WHO, Geneva, Switzerland, 1996

Zoeller RT, Tan SW, Tyl RW (2007) General background on the hypothalamic-pituitary thyroid (HPT) axis. *Crit Rev Toxicol* 37(1-2):11-53

PARTE III



DISCUSSÃO

A vulnerabilidade especial das crianças aos efeitos tóxicos de xenobióticos ambientais quando comparadas aos adultos é bem relatada na literatura (LANDRIGAN e GOLDMAN, 2011). Essa suscetibilidade está associada, principalmente, à imaturidade dos órgãos e sistemas infantis, especialmente os sistemas nervoso central, imune, endócrino e respiratório. Nos últimos anos, a saúde ambiental infantil tem sido motivo de preocupação crescente em relação ao aumento na incidência de doenças resultantes de riscos ambientais, tanto tradicionais quanto novos (MELLO-DA-SILVA e FRUCHTENGARTEN, 2005; FROES ASMUS *et al.*, 2016). Estima-se que, entre 2005 e 2015, houve um aumento de 25 para 100 milhões de novas substâncias químicas utilizadas na agricultura, medicamentos, cosméticos, etc. Esses agentes químicos têm sido classificados como “desreguladores endócrinos”, uma vez que possuem a capacidade de alterar a função hormonal normal de humanos (DE LONG e HOLLOWAY, 2017).

Considerando a suscetibilidade infantil, Kunst *et al.* (2014) investigaram os efeitos da exposição a agrotóxicos e nicotina em crianças, filhas de fumicultores da região central do Estado do RS. Em relação a um grupo de crianças controle, que não residiam na área rural, foi observado que as crianças da área rural apresentaram uma menor capacidade auditiva, sendo sugerida ototoxicidade possivelmente associada à exposição ambiental a agrotóxicos OFs. Além disso, as crianças da área rural apresentaram frequência de células alteradas no teste de MN significativamente aumentada em relação às crianças controle. Estudos como esse mostram a importância de se investigar os efeitos adversos de xenobióticos ambientais no meio rural sobre a saúde infantil. Apesar do amplo consumo de agrotóxicos pelos Estados brasileiros e, principalmente pelo RS, não existem estudos suficientes no Brasil sobre os efeitos de agrotóxicos e outros xenobióticos envolvidos com as práticas agrícolas sobre a saúde infantil (FROES ASMUS *et al.*, 2016).

Da Silva *et al.* (2014) investigaram os efeitos genotóxicos em agricultores da região central do RS, expostos a agrotóxicos e nicotina através do cultivo do tabaco. As coletas das amostras biológicas foram realizadas em períodos diferentes do cultivo do tabaco, considerando que a aplicação de

agrotóxicos e o contato com a nicotina variam ao longo do ano. De fato, existem meses do ano em que os agrotóxicos são mais utilizados, especialmente no início dos cultivos, enquanto o uso desses xenobióticos é menor ou ausente em outros meses, como no período de colheita.

Portanto, levando-se em conta a escassez de estudos investigando os efeitos adversos de xenobióticos ambientais no meio rural sobre a saúde infantil e, considerando que a exposição varia ao longo dos meses do ano, o presente estudo objetivou avaliar a saúde de filhos de agricultores da região central do RS, em diferentes períodos agrícolas do ano.

No capítulo I, observamos níveis aumentados de biomarcadores de exposição à nicotina (cotinina urinária), solventes (ácido hipúrico na urina) e metais (Cr sanguíneo), bem como de biomarcadores do estresse oxidativo (MDA e PCO) e de dano renal precoce (microalbuminúria) em crianças, filhas de agricultores, em um período de maior contato com xenobióticos ambientais (junho) em relação a um período de colheita (dezembro). Associações significativas foram observadas entre os biomarcadores de exposição (cotinina e Cr) e marcadores de dano oxidativo a lipídios e proteínas (MDA e PCO, respectivamente), sugerindo o envolvimento do processo de estresse oxidativo na toxicidade desses xenobióticos. Alterações hematológicas, especialmente em relação à diminuição do número de linfócitos, também foram associadas à exposição ambiental ao Cr.

No capítulo II, escolhemos dois períodos do ano diferentes daqueles do capítulo I, porém, escolhendo um período de baixa exposição aos agrotóxicos e outro período de alta exposição. A primeira coleta de amostras biológicas foi realizada entre os meses de março e abril (baixa exposição) e a segunda coleta entre os meses de setembro e outubro, período logo após a fase de transplante das mudas de tabaco nas lavouras, época em que há uso intenso de diferentes tipos de agrotóxicos na região estudada (alta exposição).

Como biomarcadores de exposição aos inseticidas inibidores da colinesterase, foram avaliadas as atividades das colinesterases sérica (BuChE) e eritrocitária (AChE). Os resultados revelaram diminuição significativa da atividade da enzima sérica, BuChE, no período de alta exposição aos agrotóxicos em comparação ao período de baixa exposição, sugerindo uma exposição recente aos inseticidas. Nossos dados vão ao encontro aos achados

de Kapka-Skrzypczak e colaboradores (2015), que também demonstraram baixa atividade da BuChE em crianças que viviam em uma região de intenso uso de agrotóxicos na Polônia, em relação a um grupo de crianças controle.

Uma vez que os metais podem estar presentes como contaminantes na formulação de agrotóxicos, níveis no sangue e cabelo (Mn, As, Cd, Cr, Hg, Ni e Pb) foram quantificados. No período de alta exposição aos agrotóxicos, observou-se aumento significativo de As, Mn e Ni no sangue em relação ao período de baixa exposição. No cabelo, Cr, Hg, Ni e Pb apresentaram níveis significativamente superiores no período de alta exposição em relação ao período de baixa exposição. Os níveis de Cr e Mn no sangue e cabelo foram superiores aos valores de referência nos dois períodos estudados, sugerindo que a exposição ambiental a estes metais ocorre cronicamente.

Em relação ao Mn, estudos prévios do nosso grupo de pesquisa sugeriram que a exposição infantil a este elemento na área rural pode ser proveniente do uso do fungicida ditiocarbamato, conhecido comercialmente como Dithane[®], cujo princípio ativo é o mancozebe, em que o Mn representa 20% da sua constituição (NASCIMENTO *et al.*, 2015, 2016). Esse fungicida é utilizado pelos agricultores da região estudada. Portanto, o fungicida pode ser uma provável fonte de exposição ao metal na região. Os níveis sanguíneos de Mn encontrados em um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa foram positivamente associados aos níveis do metal encontrados na água, sugerindo uma provável fonte de exposição. De fato, os resíduos de fungicida podem se acumular na água de consumo da região, muitas vezes proveniente de poços superficiais, contaminando a população local através do consumo da água. O Mn, quando em excesso no organismo, representa preocupação em relação à neurotoxicidade que pode causar. Em um estudo de Bouchard *et al.* (2007), os resultados obtidos indicaram que os níveis de Mn na água da torneira foram associados com altos níveis de Mn no cabelo de crianças avaliadas, e os níveis de Mn no cabelo foram significativamente associados com o aumento nos níveis de distúrbios comportamentais. Similarmente, nossos achados prévios mostraram que os níveis de Mn na água se correlacionaram positivamente com os níveis de Mn no cabelo, e estes foram inversamente associados com o QI em crianças, filhos de agricultores, da região central do RS (NASCIMENTO *et al.*, 2015). Funções cognitivas específicas, tais como memória de trabalho e

linguagem, também foram afetadas pelo aumento da exposição ao Mn em nossas investigações (NASCIMENTO *et al.*, 2016).

Sabe-se que a exposição ambiental crônica ao Mn resulta em déficits na função do sistema dopaminérgico (LUCCHINI *et al.*, 2014). Nesta linha, a dosagem da prolactina sérica tem sido utilizada como um biomarcador indireto de dano dopaminérgico em exposições ao Mn, uma vez que o elemento causa autooxidação da dopamina. Na hipófise anterior, a dopamina serve como um inibidor da liberação de prolactina. Nas células lactotróficas, produtoras de prolactina, a dopamina ativa os receptores D2 promovendo a hiperpolarização e a inativação de canais de cálcio dependentes, mantendo a inibição da liberação do hormônio. A ausência de dopamina induz um aumento do cálcio intracelular, aumentando a produção de prolactina (BEN-JONATHAN *et al.*, 2008). Nossos resultados mostraram que os níveis de Mn no cabelo das crianças nos dois períodos foram associados com o aumento de prolactina sérica, sugerindo dano dopaminérgico causado pelo metal. Montes e colaboradores (2011) encontraram resultados similares em crianças residentes em uma comunidade próxima a uma mina no México, expostas ambientalmente ao Mn.

Além disso, associações significativas foram observadas entre o aumento nos níveis de As no sangue e menor atividade eritrocitária da AChE, no período de baixa exposição, e com uma menor atividade da colinesterase sérica, BuChE, no período de alta exposição aos agrotóxicos. As atividades das enzimas AChE eritrocitária e BuChE sérica representam biomarcadores válidos para monitorar a exposição a agrotóxicos OFs e carbamatos (GONZALEZ *et al.*, 2012). Portanto, as associações observadas nos sugerem uma co-exposição aos xenobióticos As e agrotóxicos OFs e/ou carbamatos. O estresse oxidativo resultante do aumento da produção de espécies reativas e diminuição das defesas antioxidantes é um dos principais mecanismos de toxicidade causado por esses xenobióticos. Dwivedi e Flora (2011) investigaram os efeitos da co-exposição ao As e OFs em ratos e, de fato, notaram aumento do estresse oxidativo associado à exposição a esses xenobióticos, porém, segundo os autores, a co-exposição não necessariamente produz efeitos sinérgicos.

Adicionalmente, nos últimos anos há uma preocupação crescente em relação aos efeitos de xenobióticos ambientais, incluindo muitos tipos de agrotóxicos e alguns metais, sobre o sistema endócrino humano (MNIF *et al.*, 2011). Considerando que a tireoide é uma das principais glândulas cujas funções são afetadas pelos DEs, a sua função foi avaliada no presente estudo através das dosagens dos hormônios TSH, T₃ total e T₄ livre, bem como pela dosagem dos anticorpos anti-TPO e pela realização de ultrassonografia da glândula. De uma forma geral, os níveis de TSH foram significativamente superiores no período de alta exposição, bem como os níveis de T₃ total e T₄ livre foram significativamente reduzidos, em relação ao período de baixa exposição ($p < 0,05$). Com relação à avaliação ultrassonográfica da tireoide, nenhuma alteração de volume foi observada, porém, algumas crianças apresentaram cistos e tireoide com textura heterogênea.

Associações significativas foram observadas entre os níveis de metais no sangue (Cr, Mn, Pb e Hg) e no cabelo (Pb) com alterações nos níveis circulantes de HT: aumento de TSH e diminuição de T₄ livre. O Cr foi o metal que mais fortemente se associou com tais alterações. Atualmente, pouco se sabe sobre os efeitos tóxicos do Cr sobre a glândula tireoide (VIGNERI *et al.*, 2016). Uma vez que o Cr (VI) é altamente tóxico, induzindo o estresse oxidativo pela formação de EROs, estudos experimentais têm demonstrado que o metal causa efeitos tóxicos nas células foliculares da tireoide, provocando hipotireoidismo (aumento de TSH e diminuição do T₃ e T₄ livre). Paralelamente, estes estudos têm demonstrado que a administração de antioxidantes, como o ácido gálico e a vitamina C, têm o potencial de atenuar os efeitos oxidativos do Cr (VI) sobre a tireoide (ELBAKRY e TAWFIF, 2014; MOHAMED e EL-TWAB, 2016).

Em relação aos efeitos do Mn sobre a tireoide, um estudo com uma espécie de peixe (*Rutilus rutilus caspicus*) investigou os efeitos da contaminação aquática por Mn sobre a função tireoidiana, demonstrando que os níveis de T₃ total foram aumentados no grupo que recebeu a maior concentração de Mn. Segundo os autores, altas concentrações de Mn podem afetar a enzima 5'-monodeiodinase, que converte o T₄ na sua forma biologicamente ativa, o hormônio T₃, porém, mais estudos são necessários para a melhor compreensão de como exatamente o Mn afeta os HT (HOSEINI

et al., 2014). Outro mecanismo proposto para o efeito de desregulação endócrina do Mn sobre a tireoide está relacionado com o dano que o metal causa, quando em excesso no cérebro, aos neurônios dopaminérgicos. Uma vez que a dopamina é um modulador da secreção do TSH, prejuízos ocasionados nesse neurotransmissor levam a alterações na síntese de HT na tireoide, devido a mudanças no TSH (ASCHNER e SOLDIN, 2007).

O Pb foi o único metal cujos níveis no sangue e cabelo se correlacionaram com diminuição do TSH e aumento de T₄ livre. Em um estudo com adolescentes, expostos cronicamente a baixos níveis de Pb, Dundar e colaboradores (2006) demonstraram associação inversa entre níveis sanguíneos de Pb e T₄ livre, porém, sem significativas alterações no TSH e T₃. Em relação ao Hg, nossos dados mostraram associação dos níveis sanguíneos do metal apenas com diminuição de T₄ livre, sem associação com alterações no TSH. Um dos mecanismos propostos para a toxicidade do Hg sobre a tireoide é inibição da enzima que promove a deiodinação, ou seja, provavelmente, a inibição enzimática leva a um aumento de T₄ livre, uma vez que não ocorre conversão deste para T₃ (CHEN *et al.*, 2013).

Sabe-se que os xenobióticos ambientais têm sido relacionados também ao aumento de desordens metabólicas. Devido às suas propriedades de desregulação endócrina, xenobióticos como agrotóxicos, metais e ftalatos podem induzir anormalidades na regulação metabólica afetando o metabolismo da glicose, a secreção de insulina e a lipogênese (DEBOST-LEGRAND *et al.*, 2016). Os DEs podem contribuir no desenvolvimento de síndrome metabólica através de processos inflamatórios. A síndrome metabólica refere-se à obesidade, resistência à insulina/intolerância à glicose, dislipidemia (aumento de colesterol LDL e triglicerídeos e redução do colesterol HDL), pressão arterial elevada e disfunções endoteliais e aterogênese (PETRAKIS *et al.*, 2017).

Em vista disto, parâmetros bioquímicos, incluindo glicemia de jejum, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL e triglicerídeos, foram dosados em nosso estudo. Os resultados mostraram que as crianças apresentaram níveis significativamente superiores de glicose sérica no período de alta exposição aos agrotóxicos em relação ao período de baixa exposição, embora a média dos níveis estava dentro dos valores de referência. Além disso, os níveis glicêmicos foram inversamente associados com a atividade enzimática

da BuChE, sugerindo um efeito dos inseticidas sobre a homeostase da glicose. Velmerugan e colaboradores (2017) mostraram, em um estudo recente, uma alta prevalência de diabetes em uma população rural diretamente exposta a inseticidas OFs. A natureza diabetogênica dos OFs foi recentemente descoberta, porém, o exato mecanismo molecular ainda é incerto e diversos mecanismos têm sido propostos em estudos experimentais, incluindo resistência glicêmica através da degradação da microbiota pelos OFs (VELMERUGAN *et al.*, 2017), resistência insulínica (LASRAM *et al.*, 2014), entre outros. Quanto ao perfil lipídico, embora nenhuma associação tenha sido observada com os biomarcadores de exposição aos xenobióticos, nossos dados demonstraram que as crianças apresentavam altos níveis séricos de colesterol total, colesterol LDL e triglicérides nos dois períodos estudados.

Ainda, de acordo com o IMC determinado nas crianças, muitas delas apresentaram sobrepeso. Adicionalmente, o IMC foi positivamente associado à diminuição dos níveis de colesterol HDL e aumento nos níveis de triglicérides. Atualmente, a obesidade é uma epidemia global de origem multifatorial, sendo frequentemente associada a comorbidades, como hipertensão, dislipidemia, resistência à insulina e doenças cardíacas.

Diversos fatores têm sido atribuídos ao aumento da obesidade tais como sedentarismo, ingestão de dieta hipercalórica, e o aumento de agentes químicos parecem estar entre os fatores de risco (SANTOS-SILVA *et al.*, 2017). Por influenciarem no aumento da obesidade, por mecanismos diversos que incluem prejuízos na regulação da proliferação e diferenciação de adipócitos, esses xenobióticos têm sido denominados de “obesogênicos” (GRÜN e BLUMBERG, 2009). Estudos têm demonstrado que a obesidade infantil pode, inclusive, ser associada à exposição *in utero* da mãe a agentes químicos (HEINDEL, 2003).

De forma geral, nossos resultados mostraram que o estresse oxidativo parece ser um dos principais mecanismos envolvidos na toxicidade dos xenobióticos avaliados nesse estudo. O aumento na produção de EROs e/ou diminuição na capacidade das defesas antioxidantes podem afetar o balanço oxidativo e resultar em danos em todos os componentes das células, incluindo os lipídios, proteínas e DNA (MOSTAFALOU e ABDOLLAHI, 2013). Conseqüentemente, o dano oxidativo excessivo pode ser sugerido como um

fator de risco para o desenvolvimento de patologias infantis antes consideradas raras, como o câncer, diabetes, etc.

Adicionalmente, nosso estudo mostrou que crianças que vivem em uma área rural, ambientalmente expostas a uma mistura de xenobióticos, podem ter a sua função tireoidiana normal afetada pela desregulação endócrina provocada por esses agentes, especialmente os metais, o que pode representar em fator de risco para diversos efeitos adversos resultantes da desregulação tireoidiana, especialmente sobre o desenvolvimento neurológico. Ainda, nossos resultados mostraram associação entre níveis glicêmicos e o biomarcador de exposição aos inseticidas inibidores da colinesterase, sugerindo que tais xenobióticos podem afetar a homeostase da glicose, representando risco para desenvolvimento de diabetes. O perfil lipídico das crianças também se mostrou alterado nos dois períodos, assim como algumas crianças apresentaram sobrepeso. Esses dados, quando analisados em conjunto, alertam para possível síndrome metabólica nessas crianças, representando risco de desenvolvimento de doenças que podem ter consequências na sua vida adulta, como doenças cardíacas, diabetes e obesidade.

Apesar da importância dos dados gerados, nosso estudo apresenta algumas limitações, tais como o baixo número de crianças participantes. Além disso, os valores de referência para metais em sangue preconizados pela OMS são indicados para uma população adulta e, além disso, foram publicados há 20 anos (OMS, 1996). Apesar de a literatura descrever que os principais efeitos tóxicos de metais relatados para adultos são também esperados em crianças, a escassez de valores de referência apropriados para a população de estudo pode ser considerada uma importante limitação. No entanto, estudos como o nosso, que evidenciam efeitos sobre a saúde infantil mesmo a baixos níveis de exposição a metais tóxicos e a elevados níveis de metais essenciais, como o Mn, podem colaborar para o estabelecimento de valores de referência para metais em amostras biológicas para crianças.

CONCLUSÕES

- ❖ Há associação entre a exposição a xenobióticos ambientais no ambiente rural, especialmente metais, e danos à saúde em crianças e adolescentes;
- ❖ Dano renal e diminuição das células de defesa, como linfócitos, parecem estar relacionados à exposição a metais em crianças e adolescentes no meio rural;
- ❖ O estresse oxidativo parece ser o principal mecanismo envolvido nos efeitos tóxicos provocados por xenobióticos ambientais, como metais, agrotóxicos e nicotina;
- ❖ A exposição ambiental infantil a metais, como Mn, Cr, Pb e Hg, parece estar relacionada à desregulação endócrina da tireoide, afetando os níveis dos hormônios tireoidianos;
- ❖ Alterações metabólicas, como aumento da glicemia, alterações do perfil lipídico e obesidade podem ser associadas a exposições a múltiplos xenobióticos em crianças e adolescentes que vivem no meio rural.

PERSPECTIVAS

- ❖ Realizar análises de expressão de genes envolvidos no desenvolvimento de câncer, como o gene supressor tumoral, p53, investigando a possível carcinogenicidade dos xenobióticos ambientais sobre a saúde infantil;
- ❖ Avaliar a expressão de genes que codificam a metalotioneína, envolvida na detoxificação de metais;
- ❖ Avaliar polimorfismos de genes, como da glutatona S-transferase (GGTM1 e GGTT1);
- ❖ Avaliar possíveis associações entre os biomarcadores de genotoxicidade e biomarcadores de exposição;
- ❖ Avaliar a possível associação entre testes de neuropsicologia e alterações dos hormônios tireoidianos, bem como com os biomarcadores de exposição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL, K.S. et al. Arsenic and human health effects: a review. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 40, n. 3, p. 828-846, 2015.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol.**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AHAMED, M.; SIDDIQUI, M.K.J. Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. **Clinica Chimica Acta**, v. 383, p. 57-64, 2007.
- AHAMED, M. et al. Environmental lead exposure as a risk for childhood aplastic anemia. **BioScience Trends**, v. 5, n. 1, p. 38-43, 2011.
- AHMED, A.M. et al. Thyroid hormones states and brain development interactions. **Int. J. Devl. Neuroscience**, v. 26, p. 147-209, 2008.
- ALAVANJA, M.C.R. et al. Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. **Annu. Rev. Public Health**, n. 25, p. 155-97, 2004.
- AL-SALEH, I. et al. Effect of mercury (Hg) dental amalgam fillings on renal and oxidative stress biomarkers in children. **Science of the Total Environment**, v. 431, p. 188-196, 2012.
- ALI-OSMAN, F. et al. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 15, p. 10004-100012, 1997.
- AMORIM, L.C.A. O uso de biomarcadores na avaliação da exposição ocupacional a substâncias químicas. **Rev. Bras. Med. Trab.**, v. 1, n.2, p. 124-132, 2003.
- ANNANGI, B. et al. Biomonitoring of humans exposed to arsenic, chromium, nickel, vanadium, and complex mixtures of metals by using the micronucleus test in lymphocytes. **Mutation Research, In press**. DOI:10.1016/j.mrrev.2016.03.003, 2016.
- ANGERER, J. et al. Human biomonitoring: state of the art. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 210, p. 201-228, 2007.
- ANTUNES, M.V. et al. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 279-286, 2008.
- ARAIN, M.B. et al. Hazardous impact of toxic metals on tobacco leaves grown in contaminated soil by ultrasonic assisted pseudo-digestion: multivariate study. **Journal of Hazardous Materials**, v. 155, p. 216-224, 2008.

ARCURY, T.A. et al. Prenatal nicotine exposure and child behavioural problems. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 5, p. 315–321, 2003.

ASADULLAH, M.N.; CHAUDHURY, N. Poisoning the mind: Arsenic contamination of drinking water wells and children's educational achievement in rural Bangladesh. **Economics of Education Review**, n. 30, p. 873– 888, 2011.

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological Profile for Arsenic**. Atlanta, Georgia: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2007.

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological Profile for Cadmium**. Atlanta, Georgia: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2012.

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological Profile for Chromium**. Atlanta, Georgia: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2012.

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological Profile for Lead**. Atlanta, Georgia: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2007.

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological Profile for Manganese**. Atlanta, Georgia: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2012.

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological Profile for Mercury**. Atlanta, Georgia: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1999.

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological Profile for Nickel**. Atlanta, Georgia: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2005.

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **The priority list of hazardous substances that will be the candidates for toxicological profiles**. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/spl/>>. Acessado em 22 jul. 2016.

AUSTIN, E. et al. Multielemental bioimaging of tissues in children's environmental health research. **Curr. Opin. Pediatr.**, v. 28, n. 2, p. 216-220, 2016.

AZAROFF, L.S.; NEAS, L.M. Acute health effects associated with nonoccupational pesticide exposure in rural El Salvador. **Environ. Res.**, v. 80, p. 158-164, 1999.

AXELSTAD, M. et al. Exposure to the widely used fungicide mancozeb causes thyroid hormone disruption in rat dams but no behavioral effects in the offspring. **Toxicological Sciences**, v. 120, n. 2, p. 439-446, 2011.

BAIERLE, M. et al. Possíveis efeitos do cobre sanguíneo sobre parâmetros hematológicos em idosas. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 46, n. 6, p. 463-470, 2010.

BAIERLE, M. et al. Quantificação sérica de vitamina C por CLAE-UV e estudo de estabilidade. **Química Nova**, v. 35, n. 2, p. 403-407, 2012.

BAIERLE, M. et al. Are delta-aminolevulinic acid dehydratase inhibition and metal concentrations additional factors for the age-related cognitive decline? **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 11, n. 10, p. 10851-10867, 2014.

BAIERLE, M. et al. Relationship between inflammation and oxidative stress and cognitive decline in the institutionalized elderly. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, DOI: 10.1155/2015/804198, 2015.

BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARCELOS, G.F.M. et al. Polymorphisms in glutathione-related genes modify mercury concentrations and antioxidant status in subjects environmentally exposed to methylmercury. **Science of the Total Environment**, v. 463–464, p. 319–325, 2013.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BELLINGER, D. et al. Attentional correlates of dentin and bone in adolescents. **Arch. Environ. Health.**, v. 49, n. 2, p. 98-105, 1994.

BELLINGER, D.C. Late neurodevelopmental effects of early exposures to chemical contaminants: reducing uncertainty in epidemiological studies. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 102, p. 237-244, 2008.

BELLINGER, D.C. Prenatal exposures to environmental chemicals and children's neurodevelopment: an update. **Saf Health Work**, v. 4, p. 1-11, 2013.

BENEDETTI, D. et al. Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assay. **Mutation Research**, v. 752, p. 28-33, 2013.

BERGLUND, M. et al. Gender and age differences in mixed metal exposure and urinary excretion. **Environmental Research**, v. 111, p. 1271–1279, 2011.

BILA, M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.

BORTOLI, G.M. et al. Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers. **Mutation Research**, v. 675, p. 1–4, 2009.

BOUCHARD, M.; et al. Hair manganese and hyperactive behaviors: pilot study of school-age children exposed through tap water. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 1, p. 122–127, 2007.

BOUCHARD, M.F. et al. Prenatal exposure to organophosphate pesticides and IQ in 7-year-old children. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, n. 8, p. 1189-1195, 2011.

BRUCKER, N. et al. Biomarkers of occupational exposure to air pollution, inflammation and oxidative damage in taxi drivers. **Sci. Total Environ.**, v. 463, p. 884-893, 2013.

BRÜNING, C.A. et al. Disubstituted diaryldiselenides inhibit δ -ALA-D and Na⁺, K⁺-ATPase activities in rat brain homogenates *in vitro*. **Mol. Cell. Biochem**, v. 332, p. 17–24, 2009.

BUDNIK, L.T.; BAUER, X. The assessment of environmental and occupational exposure to hazardous substances by biomonitoring. **Dtsch. Arztebl. Int.**, v. 106, n. 6, p. 91-97, 2009.

BURTIS, C. et al. **Fundamentos de Química Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

BUTLER-DAWSON, J. et al. Organophosphorus pesticide exposure and neurobehavioral performance in Latino children living in an orchard community. **NeuroToxicology**, v. 53, p.165–172, 2016.

CAMPOS, E. et al. Exposure to pesticides and mental disorders in a rural population of Southern Brazil. **NeuroToxicology, In press**, DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.neuro.2016.06.002>, 2016.

CÁRDENAS-GONZÁLEZ, M. et al. Environmental exposure to arsenic and chromium in children is associated with kidney injury molecule-1. **Environmental Research, In press**. DOI: [10.1016/j.envres.2016.06.032](https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.06.032), 2016.

CARNEIRO, M.T.W.D. et al. Intervalos de referência para elementos menores e traço em cabelo humano para a população da cidade do Rio de Janeiro – Brasil. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 37-45, 2002.

CARVALHO, C.F. et al. Elevated airborne manganese and low executive function in school-aged children in Brazil. **NeuroToxicology**, v. 45, p. 301-308, 2014.

CATTANEO, R. et al. Validação de método para determinação de cotinina em urina por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 19, n.1, p. 25-31, 2006.

CAO, S. et al. Health risks of children's cumulative and aggregative exposure to metals and metalloids in a typical urban environment in China. **Chemosphere**, v. 147, p. 404-411, 2016.

CASTRO-CORREIA, C.; FONTOURA, M. A influência da exposição ambiental a disruptores endócrinos no crescimento e desenvolvimento de crianças e adolescentes. **Rev. Port. Endocrinol. Diabetes Metab.**, v. 10, n. 2, p. 186-192, 2015.

CHANDRA, S. et al. In vivo genotoxic effects of industrial waste leachates in mice following oral exposure. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 47, p. 325-333, 2006.

CHARÃO, M.F. et al. Simultaneous quantification of Lycopene, β -Carotene, Retinol and α -Tocopherol in plasma after a simple extraction procedure: stability study and application to human volunteers. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n. 8, p. 1441-1449, 2012.

CHEN, M. et al. Residential exposure to pesticide during childhood and childhood cancers: a meta-analysis. **Pediatrics**, v. 136, n. 5, p. 719-729, 2015.

CHIPKEVITCH, E. Avaliação clínica da maturação sexual na adolescência. **Jornal de Pediatria**, v. 77, n. 2, p. S135-S141, 2001.

CHOI, I. et al. Identification of exposure to environmental chemicals in children and older adults using human biomonitoring data sorted by age: results from a literature review. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 220 (2 Pt A), p. 282-298, 2017.

CHOWDHURY, S. et al. Arsenic contamination of drinking water and mental health. **DEF – Discussion Papers on Development Policy**, n. 222. Disponível em: SSRN: <<http://ssrn.com/abstract=2811583>>, 2016.

CHRISTENSEN, K.L.Y. Metals in blood and urine, and thyroid function among adults in the United States 2007-2008. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 216, p. 624-632, 2013.

CIARROCCA, M. et al. Exposure to arsenic in urban and rural areas and effects on thyroid hormones. **Inhal. Toxicol.**, v. 24, n. 9, p. 589-598, 2012.

CIESIELSKI, T. et al. Cadmium exposure and neurodevelopmental outcomes in U.S. children. **Environ. Health Perspect.**, v. 120, n. 5, p. 758-763, 2012.

CORDIER, S. et al. Perinatal exposure to chlordecone, thyroid hormone status and neurodevelopment in infants: the Timoun cohort study in Guadeloupe (French West Indies). **Environmental Research**, v. 138, p. 271–278, 2015.

CORY-SLECHTA, D.A. Studying toxicants as single chemicals: does this strategy adequately identify neurotoxic risk? **NeuroToxicology**, v. 26, p. 491–510, 2005.

COSTA, E.M.F. et al. Effects of endocrine disruptors in the development of the female reproductive tract. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 2, p. 153-161, 2014.

COTINGUIBA, G.G. et al. Método de avaliação da defesa antioxidante: uma revisão de literatura. **Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, v. 15, n. 3, p. 231-237, 2013.

DA SILVA, J. et al. Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. **Mutagenesis**, v. 23, n. 5, p. 415-422, 2008.

DA SILVA, F.R. et al. Genotoxic biomonitoring of tobacco farmers: biomarkers of exposure, of early biological effects and of susceptibility. **Journal of Hazardous Materials**, v. 225– 226, p. 81– 90, 2012.

DA SILVA, F.R. et al. Genotoxic assessment in tobacco farmers at different crop times. **Science of the Total Environment**, v. 490, p. 334–341, 2014.

DAVEY, J.C. et al. Arsenic as an endocrine disruptor: arsenic disrupts retinoid acid receptor-and thyroid hormone receptor-mediated gene regulation and thyroid hormone-mediated amphibian tail metamorphosis. **Environ. Health Perspectives**, v. 116, n. 2, p. 165-172, 2008.

DE COSTER, S.; VAN LAREBEKE, N. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. **Journal of environmental and public health**, v. 2012, 2012.

DEBOST-LEGRAND, A. et al. Prenatal exposure to persistent organic pollutants and organophosphate pesticides, and markers of glucose metabolism at birth. **Environmental Research**, v. 146, p. 207-217, 2016.

DE LONG, N.E.; HOLLOWAY, A.C. Early-life chemical exposures and risk of metabolic syndrome. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity**, v. 10, p. 101-109, 2017.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E. et al. Endocrine-disrupting chemicals: na Endocrine Society scientific statement. **Endocr. Rev.**, v. 30, n. 4, p. 293-342, 2009.

DICKERSON, E.H. et al. Endocrine disruptor & nutritional effects of heavy metals in ovarian hyperstimulation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 28, p. 1223-1228, 2011.

DIKILITAS, M. et al. Effect of lead on plant and human DNA damages and its impact in the environment. **Plant Metal Interaction**. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803158-2.00003-5>>, 2016.

DWIVEDI, N.; FLORA, S.J.S. Concomitant exposure to arsenic and organophosphates on tissue oxidative stress in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p.1152–1159, 2011.

EL-HABIT, O.H.; MONEIM, A.E.A. Testing the genotoxicity, cytotoxicity, and oxidative stress of cadmium and nickel and their additive effect in male mice. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 159, p. 364–372, 2014.

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 82, p. 70–77, 1959.

ELLMAN, G.L.; et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 7, p. 88-95, 1961.

EMBRAPA – Agência Embrapa de Informação Tecnológica. **Agrotóxicos no Brasil**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_40_210200792814.html>. Acessado em 30 nov. 2017.

EPA U.S. – Environmental Protection Agency. **About Pesticide Registration**. Disponível em: <<https://www.epa.gov/pesticide-registration/about-pesticide-registration>>. Acessado em: 01 dez. 2017.

ERICKSON, K.M. et al. Manganese neurotoxicity: A focus on the neonate. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 113, p. 369–377, 2007.

ESCUDEIRO-LOURDES, C. Toxicity mechanisms of arsenic that are shared with neurodegenerative diseases and cognitive impairment: role of oxidative stress and inflammatory responses. **NeuroToxicology**, v. 53, p. 223–235, 2016.

ESKENAZI, B. et al. Association of *in utero* organophosphate pesticide exposure and fetal growth and length of gestation in an agricultural population. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 10, p. 1116-1124, 2004.

ESKENAZI, B. et al. Organophosphate pesticide exposure, PON1, and neurodevelopment in school-age children from the CHAMACOS study. **Environmental Research**, v. 134, p. 149–157, 2014.

FALCK, A.J. et al. Developmental exposure to environmental toxicants. **Pediatr. Clin. North Am.**, v. 62, n. 5, p. 1173-1197, 2015.

FANIBAND, M.; LINDH, C.H.; JÖNSSON, B.A.G. Human biological monitoring of suspected endocrine-disrupting compounds. **Asian Journal of Andrology**, v. 16, p. 5-16, 2014.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FITSANAKIS, V.A. et al. The use of magnetic resonance imaging (MRI) in the study of manganese neurotoxicity. **NeuroToxicology**, v. 27, p. 798–806, 2006.

FITZGERALD, P.; DINAN, T.G. Prolactin and dopamine: what is the connection? A review article. **J. Psychopharmacol.**, v. 22, n.2, p. 12-19, 2008.

FLORA, G. et al. Toxicity of lead: a review with recent updates. **Interdiscip. Toxicol.**, v. 5, n. 2, p. 47–58, 2012.

FONTENELLE, E. G. P. et al. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 54, n. 1, p. 6-16, 2010.

FORDAHL, S. et al. Waterborne manganese exposure alters plasma, brain, and liver metabolites accompanied by changes in stereotypic behaviors. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 34, p. 27–36, 2012.

FORTENBERRY, G.Z. et al. Association between urinary 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol, a metabolite of chlorpyrifos and chlorpyrifos-methyl, and serum T4 and TSH in NHANES 1999–2002. **Science of the Total Environment**, v. 424, p. 351–355, 2012.

FREIRE, C. et al. Long term exposure to organochlorine pesticides and thyroid function in children from Cidade dos Meninos, Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Research**, v. 117, p. 68-74, 2012.

FRIBERG, L.; ELINDER, C.G. Biological monitoring of toxic metals. **Scand. J. Work Environ. Health**, v. 1, p.7-13, 1993.

FROES ASMUS, C.I.R. et al. A systematic review of children's environmental health in Brazil. **Annals of Global Health**, v. 82, n. 1, p. 132-148, 2016.

GAJSKI, G. et al. Cytogenetic status of healthy children assessed with the alkaline comet assay and the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Mutation Research**, v. 750, p. 55-62, 2013.

GARRY, M.R. et al. *In utero* arsenic exposure in mice and early life susceptibility to cancer. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, 378-390, 2015.

GHISARI, M. et al. Effects of currently used pesticides and their mixtures on the function of thyroid hormone and aryl hydrocarbon receptor in cell culture **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 284, p. 292–303, 2015.

GILBERT, M.E. et al. Developmental thyroid hormone disruption: Prevalence, environmental contaminants and neurodevelopmental consequences. **NeuroToxicology**, v. 33, p. 842–852, 2012.

GÖETHEL, G. et al. Evaluation of genotoxicity in workers exposed to benzene and atmospheric pollutants. **Mutation Research**, v. 770, p. 61-65, 2014.

GÓMEZ-MARTÍN et al. Polymorphisms of pesticide-metabolizing genes in children living in intensive farming communities. **Chemosphere**, v. p. 534–540, 2015.

GONG, G. et al. Association of hypothyroidism with low-level arsenic exposure in rural West Texas. **Environmental Research**, v. 138, p. 154–160, 2015.

GONZALEZ, V. et al. Cholinesterase and paraoxonase (PON1) enzyme activities in mexican-american mothers and children from an agricultural community. **Expo. Sci. Environ. Epidemiol.**, v. 22, n. 6, p. 641–648, 2012.

GONZÁLEZ-ALZAGA, B. et al. A systematic review of neurodevelopmental effects of prenatal and postnatal organophosphate pesticide exposure. **Toxicology Letters**, v. 230, p. 104–121, 2014.

GONZÁLEZ-ALZAGA, B. et al. Pre- and postnatal exposures to pesticides and neurodevelopmental effects in children living in agricultural communities from South-Eastern Spain. **Environment International**, v. 85, p. 229–237, 2015.

GORMANNING, M. et al. Exposure to pesticides and metal contaminants of fertilizer among tree planters. **Ann. Occup. Hyg.**, v. 55, n. 7, p. 752–763, 2011.

GOYER, R.A.; CLARKSON, T.W. **Toxic effects of metals**. In Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. New York: McGraw-Hill, 1996.

GRANDJEAN, P. et al. Neurotoxicity from prenatal and postnatal exposure to methylmercury. **Neurotoxicol. Teratol.**, v. 43, p. 39-44, 2014.

GROTTO D. et al. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. **J Pharm Biom Anal**, v. 43, p. 619-24, 2007.

GROTTO, D. et al. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 806–811, 2010.

GRÜN, F.; BLUMBERG, B. Endocrine disrupters as obesogens. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 304 (1-2), p. 19-29, 2009.

GUTLEB, A.C. et al. Impact of endocrine disruptors on the thyroid hormone system. **Horm. Res. Paediatr.**, *In press*, DOI: 10.1159/000443501, 2016.

GÜNES, A. et al. Urinary kidney injury molecules in children with iron-deficiency anemia. **Med. Sci. Monit.**, v. 21, p. 4023-4029, 2015.

HABIG, W.E. et al. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.**, v. 249, p.7130–7139, 1974.

HAMPL, R. et al. Steroids and endocrine disruptors - history, recent state of art and open quesntions. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 155 (pt B), p. 217-223, 2016.

HEINDEL, J.J. et al. Developmental origins of health and disease: integrating environmental influences. **Endocrinology**, v. 156, n. 1, p. 3416-3421, 2015.

HEINDEL, J.J. Endocrine disruptors and the obesity epimedic. **Toxicological Sciences**, v. 76, p. 247-249, 2003.

HENLEY, D.V.; KORACH, K.S. et al. Endocrine-disrupting chemicals use distinct mechanisms of action to modulate endocrine system function. **Endocrinology**, v. 147, n. 6, p. S25-S32, 2006.

HENN, B.C. et al. Chemical mixtures and children's health. **Curr. Opin. Pediatr.**, v. 26, n. 2, p. 223-229, 2014.

HERNÁNDEZ, A.F. et al. Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: Their relevance to human health. **Toxicology**, v. 307, p. 136– 145, 2013.

HERNÁNDEZ, A.F.; MENÉNDEZ, P. Linking pesticide exposure with pediatric leukemia: potential underlying mechanisms. **Int. J. Mol. Sci**, v. 17, n. 461, p. 1-16, 2016.

HOFHUIS, W. et al. Adverse health effects of prenatal and postnatal tobacco smoke exposure on children. **Arch. Dis. Child.**, v. 88, n. 12, p. 1086-1090, 2003.

HOLBROOK, B.D. The effects of nicotine on human fetal development. **Birth Defects Res. C. Embryo. Today**, v. 108, n. 2, p. 181-192, 2016.

HOSEINI, S.M. et al. Plasma metabolites, ions and thyroid hormones levels, and hepatic enzymes' activity in Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) exposed to waterborne manganese. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 107, p. 84-89, 2014.

HUO, X. et al. ALAD genotypes and blood lead levels of neonates and children from e-waste exposure in Guiyu, China. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 21, p. 6744–6750, 2014.

IARC – International Agency for Research on Cancer. **Tobacco smoke and involuntary smoking**, v. 83, France: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2004.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental**. Brasília: Ibama, 2010.

JANUZZI, A.T.; ALPERTUNGA, B. Evaluation of DNA damage and DNA repair capacity in occupationally lead-exposed workers. **Toxicol. Ind. Health**, DOI: 10.1177/0748233715590919, 2015.

JASSO-PINEDA, Y. et al. DNA damage in Mexican children living in high-risk contaminated scenarios. **Science of the Total Environment**, v. 518–519, p. 38–48, 2015.

JIAO, W. et al. Environmental risks of trace elements associated with long-term phosphate fertilizers applications: A review. **Environmental Pollution**, v. 168, p. 44-53, 2012.

KABIR, E.R. et al. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 40, n. 1, p. 241-258, 2015.

KAPKA-SKRZYPCZAK, L. et al. Biomonitoring and biomarkers of organophosphate pesticides exposure – state of the art. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 8, n. 2, p. 294-303, 2011.

KARR, C. Children's environmental health in agricultural settings. **J. Agromedicine**, v. 17, n. 2, p. 127-139, 2012.

KHAN, K. et al. Longitudinal assessment of chlorpyrifos exposure and self-reported neurological symptoms in adolescent pesticide applicators. **BMJ Open**, v. 4, n. 3, p. 1-11, 2014.

KIM, Y. et al. Co-exposure to environmental lead and manganese affects the intelligence of school-aged children. **NeuroToxicology**, v. 30, p. 564–571, 2009.

KIM, S.O. et al. An overview of carcinogenic heavy metal: molecular toxicity mechanism and prevention. **Journal of Cancer Prevention**, v. 20, n. 4, 232-240, 2015.

KITAMURA, S. et al. Endocrine disruption by organophosphate and carbamate pesticides. **Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds**, Elsevier, 2016.

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

KOHEN, R; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicologic Pathology**, v. 30, n. 6, p. 620-650, 2002.

KORDAS, K. et al. Prevalence and predictors of exposure to multiple metals in preschool children from Montevideo, Uruguay. **Sci. Total Environ.**, v. 408, n. 20, p. 4488-4494, 2010.

KORDAS, K. et al. Patterns of exposure to multiple metals and associations with neurodevelopment of preschool children from Montevideo, Uruguay. **Journal of Environmental and Public Health**, v. 2015, p. 1-9, 2015.

KRISHNA, A.K.; MOHAN, K.R. Risk assessment of heavy metals and their source distribution in waters of a contaminated industrial site. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, n. 21, p. 3653–3669, 2014.

KUNST, L.R. et al. Emissões otoacústicas e biomarcadores do estresse oxidativo em escolares de região fumicultora. **CoDAS**, v. 26, n. 3, p. 219-25, 2014.

LAAMECH, J. et al. Blood lead, cadmium and mercury among children from urban, industrial and rural areas of Fez Boulemane Region (Morocco): relevant factors and early renal effects. **Int. J. Occup. Med. Environ. Health**, v. 4, p. 641-659, 2014.

LANDRIGAN, P.J.; GOLDMAN, L.R. Children's vulnerability to toxic chemicals: a challenge and opportunity to strengthen health and environmental policy. **Health Aff. (Millwood)**, v. 30, n. 5, p. 842-850, 2011.

LANDRIGAN, P.J.; ETZEL, R.A. **Textbook of children's environmental health**. Nova Iorque: Oxford University Press, 2014.

LANDRIGAN, P.J. Children's environmental health: a brief history. **Acad. Pediatr.**, v. 16, n. 1., p. 1-9, 2016.

LEE, J-Y. et al. Association of glutathione S-transferases M1, T1 and P1 gene polymorphisms with attention deficit and hyperactivity disorder in Korean children. **Gene** **586**, p. 228–233, 2016.

LEWICKI, S. et al. The role of chromium III in the organism and its possible use in diabetes and obesity treatment. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 21, n. 2, p. 331–335, 2014.

LI, Y. et al. The hazard of chromium exposure to neonates in Guiyu of China. **Science of the Total Environment**, v. 403, p. 99-104, 2008.

LI, J. et al. Effects of nickel chloride on the erythrocytes and erythrocyte immune adherence function in broilers. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 161, p. 173–179, 2014.

LOMBARDI, P.E. et al. ALA-D and ALA-D reactivated as biomarkers of lead contamination in the fish *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 1704–1711, 2010.

MANNO, M. et al. Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). **Toxicol. Lett.**, v. 192, v. 1, p. 3-16, 2010.

MAPA - Ministério da Agricultura. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/legislacao>>. Acessado em 01 de dez. 2017.

MAQBOOL, F. et al. Review of endocrine disorders associated with environmental toxicants and possible involved mechanisms. **Life Sciences**, v. 145, p. 265–273, 2016.

MARIN, J.O.P. et al. O problema do trabalho infantil na agricultura familiar: o caso da produção de tabaco em Agudo-RS. **RESP, Piracicaba-SP**, v. 50 (4), p. 763-786, 2012.

MARTIN-CHOULY, C. et al. Inorganic arsenic alters expression of immune and stress response genes in activated primary human T lymphocytes. **Molecular Immunology**, v. 48, p. 956–965, 2011.

MARUHN, D. Rapid colorimetric assay of beta-galactosidase and n-acetyl-beta-glucosaminidase in human urine. **Clin. Chim. Acta**, v. 73, p. 453–461, 1976.

MATEUS, V.L. et al. Study of the chemical composition of particulate matter from the Rio de Janeiro metropolitan region, Brazil, by inductively coupled plasma-mass spectrometry and optical emission spectrometry. **Spectrochim. Acta Part B At Spectrosc.**, v. 86, p. 131-136, 2013.

MATTOS, R.C.O.C. et al. Avaliação dos fatores de risco relacionados à exposição ao chumbo em crianças e adolescentes do Rio de Janeiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 14, n. 6, p. 2039-2048, 2009.

McCLURE, L.F. et al. Blood lead levels in young children: US, 2009-2015. **J. Pediatr.**, v. 175, p. 173-181, 2016.

MEEKER, J.D. et al. Multiple metals predict prolactin and thyrotropin (TSH) levels in men. **Environmental Research**, v. 109, p. 869–873, 2009.

MEEKER, J. D. Exposure to environmental endocrine disruptors and child development. **Archives of pediatrics & adolescent medicine**, v. 166, n. 10, p. 952-958, 2012.

MELLO-DA-SILVA, C.A.; FRUCHTENGARTEN, L. Environmental chemical hazards and child health. **Jornal de Pediatria**, v. 81, n. 5, p. S205-S2011, 2005.

MENEZES-FILHO, J.A. et al. Elevated manganese and cognitive performance in school-aged children and their mothers. **Environmental Research**, v. 111, p. 156–163, 2011.

MENEZES-FILHO, J.A. et al. Elevated manganese exposure and school-aged children's behavior: a gender-stratified analysis. **Neurotoxicology**, v. 45, p. 293-300, 2014.

MEYER, A. et al. Esophageal cancer among Brazilian agricultural workers: Case-control study based on death certificates. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, p. 151-155, 2011.

MNIF, W. et al. Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. **International journal of environmental research and public health**, v. 8, n. 6, p. 2265-2303, 2011.

MONNERET, C. What is an endocrine disruptor? **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, p. 403-405, 2017.

MONTES, S. et al. Biomarkers of manganese exposure in a population living close to a mine and mineral processing plant in Mexico. **Environmental Research**, v. 106, p. 89-95, 2008.

MORA, A.M., et al. Blood and hair manganese concentrations in pregnant women from the infants' environmental health study (ISA) in Costa Rica. **Environmental Science & Technology**, v. 46, p. 3467-3476, 2014.

MORÁN-MARTINEZ, J. et al. Genotoxicity in oral epithelial cells in children caused by nickel in metal crowns. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 3178-3185, 2013.

MOREAU, R.L.M.; SIQUEIRA, M.E.P.B. **Toxicologia analítica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

MORESCO, R.N. et al. Diabetic nephropathy: traditional to proteomic markers. **Clin. Chim. Acta**, v. 421, p. 17-30, 2013.

MORI, N.C. et al. Alterações bioquímicas e toxicológicas de agricultores familiares da região do Alto Jacuí, Rio Grande do Sul. **Scientia Medica**, v. 25, n. 3, p. 1-7, 2015.

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

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 268, p. 157-177, 2013.

MURK, A.J. et al. Mechanism-based testing strategy using in vitro approaches for identification of thyroid hormone disrupting chemicals. **Toxicology in Vitro**, v. 27, p. 1320-1346, 2013.

MWILA, K. et al. The effect of mixtures of organophosphate and carbamate pesticides on acetylcholinesterase and application of chemotris to identify pesticides in mixtures. **Environ. Monit. Assess.**, v. 185, n. 3, p. 2315-2327, 2013.

NASCIMENTO, S. et al. Cognitive deficits and ALA-D-inhibition in children exposed to multiple metals. **Environmental Research**, v. 136, p. 387–395, 2015.

NASCIMENTO, S. et al. Associations among environmental exposure to manganese, neuropsychological performance, oxidative damage and kidney biomarkers in children. **Environmental Research**, v. 147, p. 32-43, 2016.

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

NOHYNEK, G.J. et al. Endocrine disruption: Fact or urban legend? **Toxicology Letter**, v. 223, p. 295-305, 2013.

NOONAN, C.W. et al. Effects of exposure to low levels of environmental cadmium on renal biomarkers. **Environ. Health Perspectives**, v. 110, n. 2, p. 151-155, 2002.

OGA, S. et al. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 2014.

OMS – Organização Mundial de Saúde. **Trace elements in human nutrition and health**. Geneva: World Health Organization, 1996.

OMS – Organização Mundial da Saúde. **Children's health and the environment: a global perspective: a resource manual for the health sector**. World Health Organization: Geneva, 2005.

OMS – Organização Mundial de Saúde. **Guidelines for drinking-water quality**. Switzerland: World Health Organization, 2011.

OMS – Organização Mundial de Saúde. **Possible developmental early effects of endocrine disrupters on child health**. Geneva: World Health Organization, 2012.

OMS – Organização Mundial de Saúde. Disponível em: < <http://www.who.int/en/>>. Acessado em 01 de dez. 2017.

OSTROSKY-WEGMAN, P. et al. Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. **Mutation Research**, v. 250, p. 477-482, 1991.

OULHOTE, Y.; BOUCHARD, M. Urinary metabolites of organophosphate and pyrethroid pesticides and behavioral problems in Canadian children. **Environmental Health Perspectives**, v. 121, n. 11-12, p. 1378-1384, 2013.

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

PALAZZOLO, D.L.; JANSEN, K.P. The minimal arsenic concentration required to inhibit the activity of thyroid peroxidase activity in vitro. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 126, p. 49–55, 2008.

PAWLAS, N. et al. Modification by the genes ALAD and VDR of lead-induced cognitive effects in children. **NeuroToxicology**, v. 33, p. 37–43, 2012.

PÉREZ-BRAVO, F. et al. Association between aminolevulinic acid dehydratase genotypes and blood lead levels in children from a lead-contaminated area in Antofagasta, Chile. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 47, n. 2, p. 276-280, 2004.

PETRAKIS, D. et al. Endocrine disruptors leading to obesity and related diseases. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14 (10), p. 1-18, 2017.

POZEBON, D. et al. Elemental hair analysis: a review of procedures and applications. **Analytica Chimica Acta**, v. 992, 1-23, 2017.

PROTANO, C. et al. Urinary levels of trace elements among primary school-aged children from Italy: The contribution of smoking habits of family members. **Science of the Total Environment**, v. 557–558, p. 378–385, 2016.

RAHMAN, A. et al. Association of arsenic exposure during pregnancy with fetal loss and infant death: a cohort study in Bangladesh. **American Journal of Epidemiology**, v. 165, n. 12, p. 1389-1396, 2007.

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

RANGEL-MÉNDEZ, J.A. et al. Mercury levels assessment and its relationship with oxidative stress biomarkers in children from three localities in Yucatan, Mexico. **Science of the Total Environment**, v. 543, p. 187–196, 2016.

ROCHE DIAGNOSTICS LTD. **Reference ranges for adults and children**. Switzerland: Roche Diagnostics Ltd, 2008.

RODRÍGUEZ-BARRANCO, M. et al. Association of arsenic, cadmium and manganese exposure with neurodevelopment and behavioural disorders in children: A systematic review and meta-analysis. **Science of the Total Environment**, v. 454–455, p. 562–577, 2013.

ROEHRS, M. et al. The relationships between exogenous and endogenous antioxidants with the lipid profile and oxidative damage in hemodialysis patients. **BMC Nephrology**, v. 12, p. 1-9, 2011.

ROHLMAN, D.S. et al. Neurobehavioral performance in preschool children from agricultural and non-agricultural communities in Oregon and North Carolina. **NeuroToxicology**, v. 26, p. 589–598, 2005.

ROSATI, M.V. et al. Correlation between urinary cadmium and thyroid hormones in outdoor workers exposed to urban stressors. **Toxicol. Ind. Health**, DOI: 10.1177/0748233715602833, 2015.

ROSSNER JR., P. et al. Biomarkers of exposure to tobacco smoke and environmental pollutants in mothers and their transplacental transfer to the fetus. Part II. Oxidative damage. **Mutation Research**, v. 669, p. 20–26, 2009.

ROVER JUNIOR, L. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

ROWE, C. et al. Residential proximity to organophosphate and carbamate pesticide use during pregnancy, poverty during childhood, and cognitive functioning in 10-year-old children. **Environmental Research**, v. 150, p. 128–137, 2016.

RUCKART, P.Z. et al. Long-term neurobehavioral health effects of methyl parathion exposure in children in Mississippi and Ohio. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 1, p. 46-51, 2004.

RUSS, K.; HOWARS, S. Developmental exposure to environmental chemicals and metabolic changes in children. **Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care**, v. 46, n. 8, p. 255-285, 2016.

SABOLIC, I. Common mechanisms in nephropathy induced by toxic metals. **Nephron. Physiol.**, v. 104, p. 107–114, 2006.

SAFARINEJAD, M.R. et al. Glutathione S-transferase gene polymorphisms (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and prostate cancer: a case-control study in Tehran, Iran. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, n. 14, p. 105–113, 2011.

SANDERS, A. et al. Perinatal and childhood exposure to cadmium, manganese, and metal mixtures and effects on cognition and behavior: a review of recent literature. **Curr. Envir. Health Rpt.**, v. 2, p. 284–294, 2015.

SANTANA, V.S. et al. Mortalidade por intoxicação ocupacional relacionada a agrotóxicos, 2000-2009. **Revista Brasileira de Saúde Pública**, v. 47, n. 3, p. 598-606, 2013.

SANTOS, A.P.M. et al. Prolactin is a peripheral marker of manganese neurotoxicity. **Brain Research**, n. 1382, p. 282-290, 2011.

SANTOS-SILVA, A.P. et al. Frontiers in endocrine disruption: impacts of organotin on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, DOI: 10.1016/j.mce.2017.07.038.

SASSA, S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. **Enzyme**, v. 28, p. 133-45, 1982.

SHUG, T.T. et al. Elucidating the links between endocrine disruptors and neurodevelopment. **Endocrinology**, v. 156, n.6, p. 1941–1951, 2015.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, p. 291-295, 1997.

SILVA DE PAULA, E. et al. Protective effects of niacin against methylmercury-induced genotoxicity and alterations in antioxidant status in rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2015.1137264>, 2016.

SINDITABACO – Sindicato Interestadual da Indústria do Tabaco. Disponível em: <<http://sinditabaco.com.br/>>. Acessado em 01 de jul. 2016.

SMITH, A.H. et al. Mortality in young adults following *in utero* and childhood exposure to arsenic in drinking water. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 11, p. 1527-1531, 2012.

SMITH, E.A. et al. Increased whole blood manganese concentrations observed in children with iron deficiency anaemia. **J. Trace Elem. Med. Biol.**, v. 27, n. 1, p. 65-69, 2013.

SOLDIN, O. O.; ASCHNER, M. Effects of manganese on thyroid hormone homeostasis: potential links. **Neurotoxicology**, v. 28, p. 951-956, 2007.

SONG, Z. et al. Association of glutathione S-transferase T1, M1, and P1 polymorphisms in the breast cancer risk: a meta-analysis. **Ther. Clin. Risk Manag.**, v. 12, p. 763-769, 2016.

SOUTO, R. et al. O teste de micronúcleo como ferramenta qualitativa de dano genético: aspectos citotécnicos. **Estudos, Universidade Católica de Goiás**, v. 37, n.3/4, p. 297-307, 2010.

SOUZA CRUZ. **Plantio: fases da produção de fumo**. Disponível em: <http://www.souzacruz.com.br/group/sites/sou_7uvf24.nsf/vwPagesWebLive/D07V9KLC?opendocument>. Acesso em 02 ago. 2016.

SUTRIS, J.M. et al. Genotoxicity following organophosphate pesticides exposure among Orang Asli children living in an agricultural island in Kuala

Langat, Selangor, Malaysia. **Int. J. Occup. Environ. Med.**, v. 7, n. 1, p. 42-51, 2016.

SWADDIWUDHIPONG, W. et al. Renal and blood pressure effects from environmental cadmium exposure in Thai children. **Environmental Research**, v. 136, p. 82–87, 2015.

TAHARA, M. et al. Use of cholinesterase activity as an indicator for the effects of combinations of organophosphorus pesticides in water from environmental sources. **Water Research**, v. 39, p. 5112–5118, 2005.

TANNER, J.M. **Growth at adolescence**. Oxford: Blackwell, 1962.

TASMIN, S. et al. Delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) polymorphism in lead exposed Bangladeshi children and its effect on urinary aminolevulinic acid (ALA). **Environmental Research**, v. 136, p. 318–323, 2015.

TDM – Thyroid Disease Manager. **Thyroid hormone synthesis and secretion**. Disponível em: <<http://www.thyroidmanager.org/>>. Acessado em 06 jul. 2016.

TERRY, C. et al. Implementing a framework for integrating toxicokinetics into human health risk assessment for agrochemicals. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 75, p. 89-104, 2016.

THATCHER, R. W. et al. Effects of low levels of cadmium and lead on cognitive functioning in children. **Arch. Environ. Health.**, v. 37, n. 3, p. 159-166, 1982.

TIESLER, C.M.T.; HEINRICH, J. Prenatal nicotine exposure and child behavioural problems. **Eur Child Adolesc Psychiatry**, v. 23, p. 913–929, 2014.

TIFFANY-CASTIGLIONI, E. et al. In vitro models for assessing neurotoxicity of mixtures. **NeuroToxicology**, v. 27, p. 835–839, 2006.

TORRES-AGUSTÍN, R. et al. Effect of environmental manganese exposure on verbal learning and memory in Mexican children. **Environmental Research**, v. 121, p. 39–44, 2013.

TUSCHL, K. et al. Manganese and the brain. **International Review of Neurobiology**, v. 110, p. 277-312, 2013.

TUTIC, A. et al. The heavy metals in agrosystems and impact on health and quality of life. **OA Maced J Med Sci.**, v. 3, n. 2, p. 345-355, 2015.

VALENTINI, J. et al. Human erythrocyte δ -aminolevulinic acid dehydratase activity and oxidative stress in hemodialysis patients. **Clinical biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 591-594, 2007.

VAN MAELE-FABRY, G. et al. Parental occupational exposure to pesticides as risk factor for brain tumors in children and young adults: A systematic review and meta-analysis. **Environment International**, v. 56, p. 19–31, 2013.

VASCONCELOS, S.M.L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1328, 2007.

VERMA, S.K. et al. Role of muscarinic signal transduction and CREB phosphorylation in dichlorvos-induced memory deficits in rats: An acetylcholine independent mechanism. **Toxicology**, n. 256, p. 175–182, 2009.

VIBOL, S. et al. Neurobehavioral effects of arsenic exposure among secondary school children in the Kandal Province, Cambodia. **Environmental Research**, v. 137, p. 329–337, 2015.

VIZCAYA-RUIZ, A. et al. Biomarkers of oxidative stress and damage in human populations exposed to arsenic. **Mutation Research**, v. 674, p. 85–92, 2009.

VRIJHEID, M. et al. Environmental pollutants and child health – a review of recent concerns. **Int. J. Hyg. Environ. Health**, v. 219, 331-342, 2016.

WANG, D. et al. Tubular and glomerular kidney effects in the Chinese general population with low environmental cadmium exposure. **Chemosphere**, v. 147, p. 3-8, 2016.

WASSERMAN, G.A et al. Water arsenic exposure and intellectual function in 6-year-old children in Arai hazar, Bangladesh. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 2, p. 285,289, 2007.

WESIERKA-GADEK, J. Endocrine disruptor contaminants in water and their adverse effects in humans. **Ecohydrology & Hydrobiology**, v. 6, n. 1-4, p. 233-242, 2006.

WILHELM, M. et al. Levels and predictors of urinary nickel concentrations of children in Germany: results from the German environmental survey on children (GerES IV). **Int. J. Hyg. Environ. Health**, v. 216, n. 2, p. 163-169, 2013.

WONG, R-H. et al. Increased levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine attributable to carcinogenic metal exposure among schoolchildren. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 10, p. 1386-1390, 2005.

WRIGHT, R.O. Neuropsychological correlates of hair arsenic, manganese, and cadmium levels in school-age children residing near a hazardous waste site. **NeuroToxicology**, v. 27, n. 2, p. 210-216, 2006.

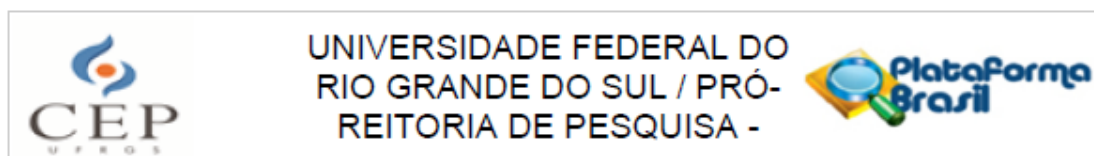
ZHANG, Y. et al. Household pesticide exposure and the risk of childhood acute leukemia in Shanghai, China. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 22, p. 11755–11763, 2015.

ZHENG, W. et al. Biomarkers of manganese intoxication. **NeuroToxicology**, v. 32, p. 1-8, 2011.

ZOFFOLI, H.J.O. et al. Inputs of heavy metals due to agrochemical use in tobacco fields in Brazil's Southern Region. **Environ. Monit. Assess.**, v. 185, p. 2423–2437, 2013.

ANEXOS

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: POTENCIAIS DESREGULADORES ENDÓCRINOS E SEUS EFEITOS SOBRE A SAÚDE DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS AMBIENTALMENTE.

Pesquisador: Solange Cristina Garcia

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 51920115.2.0000.5347

Instituição Proponente: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Patrocinador Principal: CNPQ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.397.031

Apresentação do Projeto:

Trata-se do projeto de pesquisa que tem como pesquisador responsável Solange Cristina Garcia, intitulado "POTENCIAIS DESREGULADORES ENDÓCRINOS E SEUS EFEITOS SOBRE A SAÚDE DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS AMBIENTALMENTE" a ser executado de 2016/1 a 2018/2 e que pretende estudar a potencial associação entre a exposição a agrotóxicos e metais e anormalidades dos hormônios tireoidianos em crianças expostas ambientalmente, inseridas no âmbito da agricultura familiar no centro do Estado do RS.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 28 de Janeiro de 2016

Assinado por:
MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
(Coordenador)

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

ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: “POTENCIAIS DESREGULADORES ENDÓCRINOS E SEUS EFEITOS SOBRE A SAÚDE DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS AMBIENTALMENTE”

A criança _____, pela qual você é responsável, está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo principal é avaliar a possível relação entre a exposição a alguns agentes químicos, como metais e agrotóxicos, e problemas nos níveis de hormônios no sangue. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Laboratório de Toxicologia (LATOX), da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Se você concordar com a participação da criança na pesquisa, os procedimentos envolvidos são os seguintes: será realizada uma coleta de amostras de água da sua residência (torneira da cozinha), assim como de poços superficiais e artesianos, caso existam próximo a sua casa; também serão coletadas amostras de sangue (cerca de 10 mL), urina (cerca de 20 mL), uma mecha cabelo (cerca de 250 mg) e células da boca do participante, sendo estas amostras coletadas pela manhã, para realizar alguns exames de laboratório, como hemograma e análises bioquímicas, assim como para realizar análises que não costumam ser realizadas em laboratórios de análises clínicas, como a quantificação de metais. Além destes exames, será realizada a aplicação de uma bateria de testes que irão avaliar a capacidade cognitiva da criança, bem como um questionário sobre hábitos de vida, uso de medicamentos e o estado de saúde da criança, que será respondido por você.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são: podem ocorrer manchas roxas na pele por conta da coleta de sangue; tempo de resposta ao questionário e aos testes de neuropsicologia pode ser prolongado; constrangimento e desconforto, considerando o elevado número de perguntas dos questionários.

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são: a realização de exames de laboratório, que poderão detectar algum problema de saúde desconhecido precocemente, que poderá ser tratado ou resolvido de forma precoce, com acompanhamento médico, caso necessário.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse Termo, não haverá nenhum prejuízo ao participante da pesquisa.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e não haverá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, os nomes não aparecerão na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável, Professora Dra Solange Cristina Garcia, pelo telefone (51) 3308-5297, com a pesquisadora Sabrina Nunes do Nascimento, pelo telefone (51) 9999-6376 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo telefone (51) 3308-3738.

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

Nome do responsável

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

ANEXO III – Termo de Assentimento.

TERMO DE ASSENTIMENTO

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “POTENCIAIS DESREGULADORES ENDÓCRINOS E SEUS EFEITOS SOBRE A SAÚDE DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS AMBIENTALMENTE”. Seus pais permitiram que você participe. Queremos saber se existe relação entre a exposição a alguns agentes químicos, como metais e agrotóxicos, e problemas nos níveis de hormônios no sangue. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Laboratório de Toxicologia (LATOX), da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

As crianças que irão participar dessa pesquisa têm idade entre 6 e 14 anos de idade. Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu, não terá nenhum problema se desistir.

A pesquisa será feita na sua escola, onde serão coletadas amostras de sangue, urina, uma mecha de cabelo e células da boca, e também serão realizadas uma avaliação com psicólogos e outra avaliação com médicos.

Os possíveis riscos ou desconfortos que podem ocorrer durante a sua participação na pesquisa são: manchas roxas na pele por conta da coleta de sangue; tempo de resposta ao questionário e aos testes de neuropsicologia pode ser prolongado; constrangimento e desconforto, considerando o elevado número de perguntas dos questionários.

Caso aconteça algo errado, você poderá nos procurar pelo telefone (51) 3308-5297 das pesquisadoras Sabrina N. do Nascimento e Solange C. Garcia. Mas há coisas boas que podem acontecer com a sua participação, como a realização de exames de laboratório, que poderão detectar algum problema de saúde desconhecido precocemente, que poderá ser tratado ou resolvido de forma precoce, com acompanhamento médico, caso necessário.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos passar. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar as crianças que participaram da pesquisa. Quando terminarmos a pesquisa, os seus pais/responsáveis receberão os resultados dos seus exames sem custo.

Se você tiver alguma dúvida, você pode nos perguntar. O telefone está escrito na parte de cima do texto.

Eu, _____, aceito participar da pesquisa “POTENCIAIS DESREGULADORES ENDÓCRINOS E SEUS EFEITOS SOBRE A SAÚDE DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS AMBIENTALMENTE”. Entendi as coisas boas e ruins que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar bravo. Os pesquisadores tiraram as minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

Assinatura do menor

Assinatura da pesquisadora responsável

Local e Data: _____

ANEXO IV – Questionário de Avaliação.

Questionário de Avaliação

Data: ___/___/___

Código da criança: _____
Telefone: _____
Idade: _____ Data de nascimento: ___/___/___ Sexo: () FEM. () MASC.
Endereço: _____
Cidade: _____ Zona urbana () Zona rural ()
Entrevistador: _____ Etnia: _____

DADOS GERAIS

Nomes dos pais/responsáveis:

Escolaridade dos pais:

- () ENSINO FUNDAMENTAL INCOMPLETO
() ENSINO FUNDAMENTAL COMPLETO
() ENSINO MÉDIO INCOMPLETO
() ENSINO MÉDIO COMPLETO
() ENSINO SUPERIOR INCOMPLETO
() ENSINO SUPERIOR COMPLETO

Profissão dos pais:

() AGRICULTORES () OUTRA: Pai: _____ Mãe: _____

Se pais agricultores, o que cultiva na lavoura? () FUMO () ARROZ () MILHO
() MORANGO () OUTROS:

Se fumo, qual o período de tempo em que está em contato com o cultivo de fumo?

- () 1 a 10 anos
() 11 a 20 anos
() 21 a 30 anos
() 31 a 40 anos
() 41 a 50 anos

Se mulher: Trabalhou na lavoura durante a gravidez? () SIM () NÃO

Teve alguma dificuldade para engravidar? () SIM () NÃO

Teve algum aborto? () SIM () NÃO Se sim, quantos? _____

Tem algum histórico de câncer na família? () SIM () NÃO Se sim, que tipo (s) de câncer (es)?

Alguma pessoa da família tem problema na tireoide ou papo? Quem?

Quando trabalha na lavoura, utiliza algum tipo de equipamento de proteção individual (EPI)? () SIM () NÃO Quais? Máscaras Respiradoras () Óculos de Segurança () Calçados de Segurança () Luvas () Aventais Impermeáveis ()

Há quanto tempo mora nesse município? _____ anos

Qual a distância aproximada entre a sua casa e as lavouras? _____ km

Quem realiza as atividades relacionadas à produção na lavoura:

- () PAI () MÃE () FILHOS (6 a 16 anos de idade) () FILHOS (16 a 18 anos de idade)
() TODOS NA FAMÍLIA

É fumante? (Para os pais): () SIM () NÃO Há quantos anos? _____
Que tipo de agrotóxicos utiliza?

DADOS DA CRIANÇA

Escola: _____

Série: _____

Há quantos anos frequenta a escola? _____ anos

Turno em que vai para a escola: () MANHÃ () TARDE () NOITE

Frequenta a escola de segunda a sexta-feira? () SIM () NÃO Se não, quantos dias por semana? _____

Repetiu alguma série? () SIM () NÃO Se sim, quantas vezes? _____

Você acha que seu filho possui dificuldades de aprendizagem na escola? () SIM () NÃO

Para meninas: Já menstrua? () SIM () NÃO Idade da menarca: _____

Apresenta alguma alteração/problema em relação à menstruação? Qual?

Trabalha junto com os pais ajudando no cultivo do fumo? () SIM () NÃO () ÀS VEZES Se sim, com que frequência? _____

DADOS DE DIAGNÓSTICO

Faz uso de medicamentos? () SIM () NÃO

Quais? _____

Se sim, por quanto tempo? _____

Faz uso de Polivitamínicos? () SIM () NÃO

Apresenta alguns destes sintomas?

- () dor de cabeça () tontura () dor de estômago () dor pernas
() irritação olhos () irritação nariz () irritação pele () palpitações
() bronquite () falta de ar () rinite alérgica () dor coluna
() cansaço () problemas auditivos () dor muscular () sonolência
() alteração salivação () tremores () insônia () alteração humor

Outros sintomas:

ESTADO DE SAÚDE DA CRIANÇA

Apresenta ou já apresentou anemia? () SIM () NÃO

Caquexia (perda de peso e apetite, fraqueza)? () SIM () NÃO

Apatia (falta de motivação, entusiasmo)? () SIM () NÃO

Apresenta alguma doença aguda ou crônica? () SIM () NÃO Se sim, qual?

É diabético? () SIM () NÃO

Apresenta algum problema hormonal que você saiba, como problemas de tireoide?

() SIM () NÃO

Se sim, quais? _____