



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL de LONDRINA

---

ELIEL MARCIO PEDRO

**AVALIAÇÃO DE METAIS ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA À  
INSULINA EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO  
SISTÊMICO**

ELIEL MARCIO PEDRO

**AVALIAÇÃO DE METAIS ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA À  
INSULINA EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO  
SISTÊMICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Josefa Santos Yabe.

Coorientadora: Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão.

Londrina  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Pedro, Eliel Marcio.

Avaliação de metais envolvidos na resistência à insulina em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico / Eliel Marcio Pedro. - Londrina, 2018.  
125 f. : il.

Orientador: Maria Josefa Santos Yabe.

Coorientador: Andréa Name Colado Simão.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Sistema imunológico - Tese. 2. Doenças automimunes - Tese. 3. Lúpus Eritematoso Sistêmico - Tese. 4. Resistência à insulina - Tese. I. Yabe, Maria Josefa Santos . II. Simão, Andréa Name Colado . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

ELIEL MARCIO PEDRO

**AVALIAÇÃO DE METAIS ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA À  
INSULINA EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Maria Josefa Santos  
Yabe  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Marcela Maria Baracat  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Tiago Severo Peixe  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 04 de maio de 2018.

Dedico este trabalho à minha esposa Dolores e aos filhos Maria Fernanda e João Vitor, pelo apoio incondicional nos momentos mais difíceis.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, que me deu condições para realizar este trabalho, e a presença de grandes amigos, que me encorajaram e me fizeram acreditar no meu potencial para concluir mais esta etapa importante cientificamente.

À minha orientadora, Dra. Maria Josefa Santos Yabe, a quem tenho profundo respeito, carinho e admiração pela grande sabedoria, que sempre teve postura e conduta admiráveis como professora e orientadora, e que possibilitou o desenvolvimento e a conclusão desta dissertação. E, também, pela disposição e pelo entusiasmo em realizar um estudo em conjunto com outras áreas do conhecimento, envolvendo a Química, a Imunologia e a Toxicologia.

À minha coorientadora, Andréa Name, pelo apoio, incentivo e por ter contribuído para que este estudo se realizasse.

Ao professor Tiago e demais docentes e funcionários do laboratório de Toxicologia, pelo apoio e por terem cedido o espaço para o preparo das amostras.

Aos docentes do laboratório de Imunologia, pelo suporte necessário na realização dos marcadores imunológicos.

Aos funcionários do laboratório de Imunologia, em especial às colegas Cintia e Rosélia, pelo profissionalismo e pela responsabilidade no suporte técnico, na minha ausência, para que este estudo fosse realizado.

Aos alunos do grupo de pesquisa do Laboratório LAPA, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste projeto, pelo apoio na quantificação dos metais, em especial a Bruna Fabrin, a Emilli Frachini e o Dr. Leonel Constantino.

Às amigas Daniela Alfieri, Tamires Flauzino, Lorena, Nicole Stadlober e Bruna Miglioranza.

À minha família, pelo apoio e pelo carinho com os filhos; à minha mãe Eunice, por ter me ensinado as primeiras letras do alfabeto.

E também ao grande amigo e companheiro Vinícius Marcondes, pelas contribuições científicas.

**Muito obrigado a todos!!!**

*Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes.*  
(Marthin Luther King)

PEDRO, Eliel Marcio. **Avaliação de metais envolvidos na resistência à insulina em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico**. 2017. 125 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

A exposição por elementos químicos presentes no ambiente pode afetar a saúde humana de formas distintas. Os metais contribuem para o surgimento de doenças autoimunes, inclusive o lúpus eritematoso sistêmico (LES), doença autoimune inflamatória crônica de origem multifatorial. Estudos têm demonstrado que os oligoelementos, como o zinco e o cobre, podem ajudar a manter a função ideal do sistema imunológico e desempenham mecanismos fisiológicos e bioquímicos essenciais à vida, enquanto os metais tóxicos, como o chumbo, podem aumentar a autoimunidade sistêmica. No entanto, o consumo ou a exposição elevada a determinados elementos pode desencadear eventos patológicos. Nesse aspecto, o biomonitoramento humano tem sido utilizado para avaliar a exposição por produtos químicos ambientais. O presente estudo teve como objetivo avaliar a relação entre a concentração sérica de lítio (Li), vanádio (V), cobre (Cu), cobalto (Co), zinco (Zn), molibdênio (Mo), cádmio (Cd), chumbo (Pb) e ferro (Fe) e o diagnóstico de LES, a atividade da doença medida pelo índice de atividade da doença de LES (SLEDAI) e a resistência à insulina (RI). Este estudo de caso-controle, transversal, incluiu 225 pacientes, 120 controles saudáveis e 105 pacientes com LES. As amostras de soro diluídas 1:20 em HNO<sub>3</sub> 1% foram filtradas em membranas hidrofílicas ester de celulose 0,22 µm e os metais Li, V, Co, Cu, Zn, Mo, Cd e Pb quantificados pelo método de espectrômetro de massas ICP-MS. O Fe, a glicose e a creatinina foram mensurados por autoanalisador bioquímico. A insulina foi quantificada por imunoenensaio de micropartículas com quimioluminescência. A proteína C reativa, os complementos séricos C3 e C4, por nefelometria. Os anticorpos contra o DNA de dupla fita (anti-dsDNA) foram quantificados por ensaio imunoenzimático (ELISA). Foi utilizada a análise das componentes principais (ACP) e análise hierárquica de agrupamento (HCA). *Odds ratio* (OR), intervalo de confiança (IC) de 95% foram calculados; a significância estatística foi definida como  $p < 0,05$ . As componentes principais (CP) explicaram a variância dos dados em 24,1% para CP1, 16,3% para CP2 e 12,9% na CP3, formando os agrupamentos correspondentes nos dois grupos analisados (LES e controle), fato que indica que fatores intrínsecos afetam o perfil dos elementos químicos. Concentrações séricas de V ( $p < 0,001$ ), Zn ( $p < 0,001$ ) e Pb ( $p < 0,001$ ) foram menores e Mo ( $p < 0,001$ ) e Li ( $p < 0,001$ ) foram maiores em pacientes com LES. O diagnóstico de LES foi associado com maior concentração de Li sérica ( $p < 0,001$ ) e menor V ( $p < 0,001$ ), Zn ( $p = 0,003$ ) e Pb ( $p = 0,020$ ). Metais tóxicos e oligoelementos não foram associados à atividade da doença. Os níveis de Cd foram maiores em pacientes com RI ( $p = 0,042$ ). Não houve associação significativa entre RI e os outros metais. As análises de ACP e as análises estatísticas indicaram existir características distintas no comportamento de alguns metais entre os grupos LES e controle. Os resultados indicam que os pacientes com LES têm diferentes perfis de oligoelementos e metais tóxicos em comparação com controles saudáveis. Embora alguns metais e oligoelementos tóxicos tenham sido associados ao diagnóstico de LES, eles não tiveram efeito sobre a atividade da doença e a RI.

**Palavras-chave:** Metais. Biomonitoramento. LES. ICP-MS. HOMA-IR.

PEDRO, Eliel Marcio. **Evaluation of metals involved in insulin resistance in patients with systemic lupus erythematosus**. 2017. 125 p. Dissertation (Master's Degree in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## ABSTRACT

Exposure by chemical elements present in the environment can affect human health in different ways. Metals contribute to arise of autoimmune diseases, including systemic lupus erythematosus (SLE), a chronic inflammatory autoimmune disease of multifactorial origin. Studies have shown that trace elements, such as zinc and copper, can help maintain the optimal function of the immune system and perform essential physiological and biochemical mechanisms of life, while toxic metals such as lead may increase systemic autoimmunity. However, consumption or exposure to certain elements can trigger pathological events. In this regard, human biomonitoring has been used to assess the population exposure to environmental chemicals. The current study aimed to assess the relationship between serum concentration of lithium (Li), vanadium (V), copper (Cu), Co (cobalt), zinc (Zn), molybdenum (Mo), cadmium (Cd), lead (Pb), iron (Fe) and SLE diagnosis, disease activity measured by SLE disease activity index (SLEDAI) and insulin resistance (IR). This case-control, cross-sectional study included 225 patients, 120 healthy controls and 105 SLE patients. Patient serological samples diluted 1:20 in 1% nitric acid were filtered in 0.22  $\mu\text{m}$  cellulose ester membrane and quantified to metals (Li, V, Cu, Co, Zn, Mo, Cd, Pb, Fe) by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Fe, glucose, and creatinine measured by biochemical autoanalyzer. Insulin quantified by immunoassay of microparticles with chemiluminescence. C-reactive protein, serum complement C3 and C4 by nephelometry. Antibodies to double-stranded DNA (anti-dsDNA) were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) were used. Odds ratio (OR), 95% confidence interval (CI) were calculated, statistical significance was defined as  $p < 0.05$ . The main components (CP) explained the data variance in 24.1% for CP1, 16.3% for CP2 and 12.9% in CP3, forming the corresponding groupings in the two analyzed groups (SLE and control), fact that indicates that intrinsic factors affect the profile of the chemical elements. Serum concentrations of V ( $p < 0.001$ ), Zn ( $p < 0.001$ ), and Pb ( $p < 0.001$ ) were lower in patients with SLE and Mo ( $p < 0.001$ ) and Li ( $p < 0.001$ ). The diagnosis of SLE was associated with a higher concentration of serum L ( $p < 0.001$ ) and lower V ( $p < 0.001$ ), Zn ( $p = 0.003$ ) and Pb ( $p = 0.020$ ). Toxic metals and trace elements were not associated with disease activity. Cd levels were higher in patients with IR ( $p = 0.042$ ). There was no significant association between IR and the other metals. The analysis of PCA and statistical analyzes indicated that there are distinct characteristics in the behavior of some metals between the SLE and control groups. Results indicate that SLE patients have different profiles of trace elements and toxic metals compared to healthy controls. While some toxic metals and trace elements were found to be associated with SLE diagnosis, they had no effect on disease activity and IR.

**Keywords:** Metals. Biomonitoring. SLE. ICP-MS. HOMA-IR.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Critérios de classificação de LES do <i>American College of Rheumatology</i> revisados em 1997.....	27
<b>Figura 2</b> – Estrutura da insulina e as pontes dissulfeto entre as cadeias A e B .....	36
<b>Figura 3</b> – Diagrama esquemático de um plasma indutivamente acoplado ao espectrômetro de massas.....	39
<b>Figura 4</b> – Dispersão das amostras nas CP1 e CP2 para pacientes com LES e grupo controle .....	65
<b>Figura 5</b> – Dispersão das amostras nas CP1 e CP3 para pacientes com LES e grupo controle .....	66
<b>Figura 6</b> – Variáveis dispersas nos quadrantes das CP1, CP2 e CP3.....	67
<b>Figura 7</b> – Dispersão das amostras nas CP1 e CP2 para pacientes com LES sem RI.....	68
<b>Figura 8</b> – Dispersão das amostras nas CP1 e CP3 para pacientes com LES sem RI.....	69
<b>Figura 9</b> – Dispersão das amostras nas CP1 e CP2 para pacientes com LES com RI.....	70
<b>Figura 10</b> – Dispersão das amostras nas CP1 e CP3 para pacientes com LES com RI.....	71
<b>Figura 11</b> – Dispersão das amostras nas CP1 e CP2 para pacientes LES com e sem RI. As esferas em vermelho representam pacientes com RI .....	72
<b>Figura 12</b> – Dispersão das amostras nas CP1 e CP3 para pacientes com LES com e sem RI.....	72
<b>Figura 13</b> – Dispersão das amostras nas CP1 e CP4 para pacientes com LES com e sem RI.....	73
<b>Figura 14</b> – Agrupamento hierárquico determinado pelo Método de Ward – distância reescalada para as variáveis dos grupos LES e controle .....	96
<b>Figura 15</b> – Agrupamento hierárquico determinado pelo Método de Ward – distância reescalada para as amostras dos grupos LES e controle .....	97

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Condições operacionais na quantificação dos metais ICP-MS .....	61
<b>Tabela 2</b> – Concentração dos metais e marcadores laboratoriais com seus respectivos desvios padrão e valores de referência nos grupos controle e LES.....	64
<b>Tabela 3</b> – Dados sociodemográficos e biomarcadores em pacientes com LES e grupo controle .....	74
<b>Tabela 4</b> – Regressão Logística Binária usando LES como variável dependente (e controle como referência) e as variáveis explanatórias.....	76
<b>Tabela 5</b> – Dados sociodemográficos e biomarcadores em pacientes com LES divididos em dois grupos: SLEDAI<10 e SLEDAI≥10.....	76
<b>Tabela 6</b> – Correlação de Spearman entre metais e atividade da doença e resistência à insulina em pacientes com LES e indivíduos controle .....	78
<b>Tabela 7</b> – Dados demográficos, clínicos e laboratoriais de pacientes com LES na presença ou ausência de resistência à insulina (RI) .....	79
<b>Tabela 8</b> – Níveis séricos de elementos-traço em pacientes com LES na presença ou ausência de resistência à insulina .....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS

$(\text{MoO}_4^{2-})$	Molibdato
•NO	Espécie reativa óxido nítrico
•O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
•O <sub>2</sub> <sup>2-</sup>	Peróxido
•OH	Espécie reativa hidroxila
[Pb(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> )]	Acetato de chumbo
1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	1,25-dihidroxicolecalciferol
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio <i>singlet</i>
ACP	Análise de Componentes Principais
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ADC	Anemia de Doença Crônica
AI	Autoimune
AIFD	Doença autoinflamatória
Akt	Proteína quinase serina/treonina
ALT	Alanina aminotransferase
ANA	Anticorpos antinúcleo
Anti-SM	<i>Anti-Smith</i>
AQP2	Aquaporina 2
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
ATSDR	<i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>
AVC	Acidente vascular cerebral
BEOV	<i>bis(ethylmaltolato)oxovanadium (IV)</i>
C3	Complemento C3
C4	Complemento C4
Ca <sup>2+</sup>	Cátion de Cálcio
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CAR	Colégio Americano de Reumatologia
CAT	Catalase
Cd	Cádmio
CD	Células dendríticas

Cd <sup>2+</sup>	Cátion Cádmio
CD4	<i>Cluster differentiation 4</i>
CD4 <sup>+</sup> Th	Célula T <i>helper Cluster Differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster differentiation 8</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
cm	Centímetro
Co <sup>2+</sup>	Cátion de Cobalto 2+
Co <sup>3+</sup>	Cátion de Cobalto 3+
CP	Componente Principal
CP1	Componente Principal 1
CP2	Componente Principal 2
CP3	Componente Principal 3
CPs	Componentes Principais
Cu	Cobre
Cu <sup>+</sup>	Cátion de Cobre 1+
Cu <sup>2+</sup>	Cátion de Cobre 2+
DC	Dieno Conjugado
DHEA	Desidroepiandrosterona
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DM T1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM T2	Diabetes <i>mellitus</i> Tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DT1	Diabetes tipo 1
DT2	Diabetes tipo 2
EAA	Espectrometria de absorção atômica
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay</i>
ENac	Canal de sódio epitelial
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ER	Espécie reativa
ERN	Espécie reativa de Nitrogênio
ERO	Espécie reativa de Oxigênio
FAN	Fator antinúcleo
Fe(OH) <sub>3</sub>	Hidróxido de Ferro III
Fe <sup>2+</sup>	Cátion de Ferro 2

G6PD	Glicose 6 fosfato desidrogenase
GLUT	Transportador de glicose
GLUT 1	Transportador de glicose 1
GLUT 3	Transportador de glicose 3
GLUT 4	Transportador de glicose 4
GPower	<i>statistical power analysis program</i>
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSH-Px	Glutaciona peroxidase
GSH-Rd	Glutaciona redutase
GSK-3	Glicogênio sintase quinase 3
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HCA	Análise Hierárquica de Agrupamento
HIF	<i>Hypoxia-inducible Factor</i>
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible Factor 1</i>
HNO <sub>3</sub>	Ácido nítrico
HOMA-IR	Modelo de avaliação da Homeostase que mensura a resistência à insulina
HOO•	Hidroperoxila
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC	Intervalo de confiança
ICP	<i>Inductively coupled plasma</i>
ICP-MS	<i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
IFN-α	Interferon do tipo alfa
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-10	Interleucina 10
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível

IRS	Substrato receptor de insulina
IRS-1	Substrato 1 do receptor de insulina
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
JAK/STAT	<i>Janus quinase/signal transducers and activators of transcription</i>
K	Potássio
kg	Quilograma
Kps	Constante de solubilidade
LD	Limite de detecção
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
Li	Lítio
LPS	Lipopolissacarídeo
m	Metro
m/z	Razão massa/carga
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCP	Proteína quimioatraente de monócitos
MDA	Malondialdeído
mEq/L	miliequivalente por Litro
mg dL <sup>-1</sup>	Miligrama por decilitro
Mg <sup>2+</sup>	Cátion de Magnésio
Moco	Cofator de molibdênio
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Óxido nitroso
Na	Sódio
Na <sup>+</sup>	Cátion de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF-κB	Fator nuclear kappa B
ng L <sup>-1</sup>	Nanograma por litro
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	Metavanadato de Amônio
NK	Células naturais <i>killer</i>
NLRs	Nod-like Receptor
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
NOD	Domínio de oligomerização de nucleotídeo

OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
OR	<i>Odds ratio</i>
Pb	Chumbo
Pb <sup>2+</sup>	Cátion de Chumbo
PCR	Proteína C Reativa
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinase
PMNs	Polimorfonucleares
RF	Radiofrequência
RI	Resistência à insulina
rpm	Rotação por minuto
SDHEA	Sulfato de desidroepiandrosterona
SH	Sulfidril
SLEDAI	Índice de atividade da doença de Lúpus Eritematoso Sistêmico
SOD	Superóxido dismutase
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TB	Transtorno Bipolar
TCD4	Células T <i>cluster differentiation 4</i>
TCD8	Células T <i>cluster differentiation</i>
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
TCR	Receptores de células T
Th1	Células T <i>helper 1</i>
Th2	Células T <i>helper 2</i>
TLR	Receptores <i>Toll like</i>
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral do tipo alfa
UI	Unidades internacionais
um	Micrômetro
umol L <sup>-1</sup>	Micromol por Litro
V	Vanádio
V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Peróxido de vanádio
VCAM	Molécula de adesão celular vascular
WHO	<i>World Health Organization</i>

Zn

Zinco

$\delta$ -ALAD

Ácido delta-aminolevulínico desidratase

$\mu\text{g L}^{-1}$

Micrograma por litro

$\omega$ -3

Ômega 3

$\omega$ -6

Ômega 6

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1</b>	<b>SISTEMA IMUNOLÓGICO</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Imunidade Inata</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Imunidade Adaptativa</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2</b>	<b>DOENÇAS AUTOIMUNES</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)</b> .....	<b>26</b>
<b>2.2.2</b>	<b>LES e Estresse Oxidativo</b> .....	<b>28</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Lúpus Eritematoso Sistêmico e Metais</b> .....	<b>30</b>
<b>2.2.4</b>	<b>LES e Dietas</b> .....	<b>31</b>
<b>2.2.4.1</b>	<b>Aspectos gerais</b> .....	<b>31</b>
<b>2.2.4.2</b>	<b>Proteínas</b> .....	<b>32</b>
<b>2.2.4.3</b>	<b>Lipídios</b> .....	<b>32</b>
<b>2.2.4.4</b>	<b>Vitamina A</b> .....	<b>33</b>
<b>2.2.4.5</b>	<b>Vitamina D</b> .....	<b>33</b>
<b>2.2.4.6</b>	<b>Complexo B</b> .....	<b>34</b>
<b>2.2.4.7</b>	<b>Vitamina C</b> .....	<b>34</b>
<b>2.2.4.8</b>	<b>Fibras</b> .....	<b>35</b>
<b>2.3</b>	<b>ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM PACIENTES COM LES</b> .....	<b>35</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Insulina</b> .....	<b>35</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Diabetes e Resistência à Insulina (RI)</b> .....	<b>37</b>
<b>2.4</b>	<b>QUANTIFICAÇÃO DOS METAIS</b> .....	<b>38</b>
<b>2.4.1</b>	<b>Espectrômetro de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado</b> .....	<b>38</b>
<b>2.5</b>	<b>METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS</b> .....	<b>41</b>
<b>2.5.1</b>	<b>Chumbo (Pb)</b> .....	<b>41</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Cádmio (Cd)</b> .....	<b>44</b>
<b>2.5.3</b>	<b>Cobalto (Co)</b> .....	<b>46</b>
<b>2.5.4</b>	<b>Cobre (Cu)</b> .....	<b>46</b>
<b>2.5.5</b>	<b>Zinco (Zn)</b> .....	<b>49</b>
<b>2.5.6</b>	<b>Ferro (Fe)</b> .....	<b>50</b>

2.5.7	Molibdênio (Mo).....	52
2.5.8	Vanádio (V).....	53
2.5.9	Lítio (Li).....	54
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	56
3.1	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	56
3.2	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	56
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	57
4.1	<b>ASPECTOS ÉTICOS</b> .....	57
4.2	<b>PACIENTES (POPULAÇÃO DE ESTUDO)</b> .....	57
4.3	<b>CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO</b> .....	57
4.4	<b>MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS</b> .....	58
4.5	<b>COLETA DE AMOSTRAS</b> .....	58
4.6	<b>MARCADORES LABORATORIAIS</b> .....	58
4.6.1	<b>Marcadores Bioquímicos</b> .....	58
4.6.2	<b>Marcadores Imunológicos</b> .....	59
4.6.3	<b>Avaliação da Resistência à Insulina</b> .....	60
4.7	<b>CURVA DE CALIBRAÇÃO</b> .....	60
4.7.1	<b>Quantificação de Metais por ICP-MS</b> .....	60
4.8	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	61
4.8.1	<b>Seleção das Variáveis</b> .....	63
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	64
	<b>Parâmetros Demográficos, Clínicos e Laboratoriais</b> .....	74
	<b>Diferenças nos Elementos-traço e Metais Tóxicos entre Pacientes com LES e Controle</b> .....	75
	<b>Influência de Oligoelementos e Metais Tóxicos no Diagnóstico de LES</b> .....	75
	<b>Influência de Oligoelementos e Metais Tóxicos na Atividade da Doença entre Pacientes com LES e Controle</b> .....	76
	<b>Correlação entre os Metais e a Atividade da Doença e Resistência à Insulina</b> .....	77
	<b>Influência de Oligoelementos e Metais Tóxicos na Homeostase da Glicose</b> .....	78

HOMA-IR e Insulina .....	80
Glicose .....	83
Lítio.....	84
Ferro .....	85
Zinco.....	86
Chumbo.....	88
Cobalto.....	89
Cádmio .....	90
Cobre .....	92
Ferro e Molibdênio .....	93
Vanádio .....	93
6 <b>CONSIDERAÇÕES</b> .....	95
7 <b>CONCLUSÃO</b> .....	102
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	103

## 1 INTRODUÇÃO

Os metais são definidos como substâncias que apresentam elevada condutividade elétrica, calor, maleabilidade e brilho, que perdem elétrons para formar cátions e que podem formar óxidos básicos (DUFFUS, 2002; JAISHANKAR et al., 2014; KHLIFI; HAMZA-CHAFFAI, 2010). Muitas vezes, na literatura, o termo “metais pesados” tem sido utilizado de maneira inconsistente com relação à legislação associada aos riscos químicos, causando conflitos e mal-entendidos. Além disso, é um termo que nunca foi definido pela União Internacional da Química Pura e Aplicada (IUPAC), sendo mais adequado utilizar íons metálicos ou elementos metálicos (GIL; HERNÁNDEZ, 2015). A nomenclatura “metais pesados” não tem base científica coerente, pois refere-se também aos não metais e a todos os seus compostos, implicando que todos eles têm as mesmas propriedades físico-químicas, biológicas e toxicológicas, sendo, portanto, uma afirmação inadequada (DUFFUS, 2002; GIL; HERNÁNDEZ, 2015).

A contaminação por metais em decorrência de ações antropogênicas é, na maioria das vezes, um processo cíclico, formado por indústria, atmosfera, solo, água, alimentos e humanos. Os indivíduos podem ser expostos a substâncias químicas de maneira ocupacional, ambiental e dietética. Entre estas, a ingestão alimentícia e a água constituem formas extremamente relevantes de exposição na população como um todo (GIL; HERNÁNDEZ, 2015).

A exposição a substâncias químicas presentes no ambiente desencadeiam alterações funcionais na expressão de genes e provocam modificações proteicas, com isso favorecem o surgimento de doenças no indivíduo exposto (HEINDEL et al., 2015; ZELIGER, 2014). Os danos causados no organismo podem estar associados à geração das espécies químicas reativas em decorrência da presença de xenobióticos, mesmo que estejam presentes em baixa concentração (LANGIE et al., 2015).

Atualmente, os aspectos envolvendo a contaminação ambiental têm sido motivo de preocupação por possíveis danos à saúde humana em longo prazo. Algumas propriedades tóxicas têm sido atribuídas a certos elementos metálicos: efeitos neurotóxicos, mutagênicos, cancerígenos e alterações endócrinas. Grande parte do conhecimento sobre os elementos tóxicos na saúde humana, ao longo dos

anos, tem sido obtida pela observação de como se apresentam em trabalhadores que os manuseiam ou em pessoas que residem próximas a ambientes altamente poluídos. Estudos de biomonitoramento humano têm advertido, apenas nos últimos anos, sobre possíveis efeitos à saúde decorrentes da baixa exposição crônica por misturas de contaminantes, englobando a população geral em países industrializados (INTERDONATO et al., 2014).

Evidências científicas apontam que indivíduos expostos a partículas finas presentes no ar, independentemente do tempo de contato, podem desencadear doenças pulmonares, morte prematura e outros efeitos prejudiciais aos demais sistemas do organismo humano, como ataque cardíaco, acidente vascular cerebral (AVC) e diabetes *mellitus* tipo 2 (DM T2). É imprescindível entender a patogenia das doenças que podem ser influenciadas por fatores ambientais e os processos biológicos envolvidos na estratégia para prevenção e tratamento de doenças sistêmicas (HEINDEL et al., 2015).

Os estudos envolvendo biomonitoramento têm se destacado como importante ferramenta da saúde pública para avaliar doses internas de substâncias nocivas e alterações nas populações expostas por um contaminante ambiental. Para quantificar os níveis das substâncias de interesse, as amostras biológicas devem ser obtidas de forma fácil e que não acarrete riscos à saúde do indivíduo. Para esta finalidade, amostras de sangue total, soro, plasma e urina têm sido amplamente empregadas (GIL; HERNÁNDEZ, 2015).

Nos estudos de biomonitoramento ambiental, os biomarcadores são muito utilizados; eles são definidos como substâncias que podem ser avaliadas, caracterizadas como um produto genético, biológico, bioquímico ou molecular, em decorrência das alterações provocadas no organismo que se correlacionam com a patogênese ou as manifestações da doença (KIM; JUNG; SUH, 2015).

A insulina é um biomarcador importante, responsável pela manutenção dos níveis de glicose sanguínea (VINTHER et al., 2013). No entanto, ela pode ter suas funções diminuídas no organismo por diversos fatores, inclusive por agentes oxidantes e estresse oxidativo. Indivíduos com doenças autoimunes podem desencadear um fenômeno conhecido como resistência à insulina (RI), um desequilíbrio fisiológico relacionado com a resposta alterada em tecidos sensíveis à insulina (LOZOVYOY et al., 2013).

As doenças autoimunes são desencadeadas por falha no sistema imunológico quanto ao reconhecimento de antígenos. Constituem um grupo muito variado de doenças, estando associadas a diversos fatores, como predisposição genética, etnia, idade e gênero, o que tem despertado a atenção nos estudos (POLLARD, 2015). As doenças autoimunes podem evoluir para formas mais graves em virtude do local onde o indivíduo vive ou ao qual é exposto (HEINDEL et al., 2015).

Entre as doenças autoimunes, os indivíduos com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) apresentam prevalência mais elevada na resistência à insulina (RI) quando comparados com a população em geral. O estresse oxidativo e as medicações são alguns dos fatores que contribuem para o aumento desta resistência (LOZOVY et al., 2013). O zinco e o cobre são metais importantes com propriedades antioxidantes e ambos atuam na defesa das células contra os danos oxidativos (SAHEBARI et al., 2014).

A análise de elementos-traço tem sido utilizada para verificar a toxicidade de exposição externa ambiental, ocupacional e deficiência nutricional aos elementos denominados essenciais. Na quantificação de elementos químicos a espectrometria de absorção atômica (EAA) foi amplamente utilizada. No entanto, a Espectrometria de Massas com Plasma de Argônio Indutivamente Acoplado (ICP-MS) tem se destacado como método de escolha, devido às vantagens como baixo limite de detecção, análise simultânea multielementar e desenvolvimento de sistemas de remoção de interferências (GROMBONI, 2012).

Os oligoelementos, muitas vezes chamados de micronutrientes ou elementos-traço, desempenham ações relevantes em doenças autoimunes, como o LES; pelo fato de esta doença ser de natureza heterogênea e complexa, os biomarcadores são fundamentais para a avaliação clínica dos pacientes (SAHEBARI et al., 2014). No entanto, elementos químicos essenciais presentes em concentrações elevadas podem causar efeitos prejudiciais no organismo (NASCIMENTO et al., 2014). Nesse aspecto, este estudo busca quantificar elementos-traço por ICP-MS, construindo um painel de biomarcadores laboratoriais, composto por metais, para diagnóstico e monitoramento em pacientes com LES com resistência à insulina e em indivíduos saudáveis.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 SISTEMA IMUNOLÓGICO

O sistema imune em mamífero pode ser dividido em dois tipos de resposta: a resposta imune inata e a imune adaptativa. Esses dois tipos de resposta no sistema imunológico atuam em conjunto para eliminar agentes agressores de forma mais eficaz (KAWAI; AKIRA, 2009).

#### 2.1.1 Imunidade Inata

Imunidade inata, ou natural, é o sistema responsável pela resposta inicial, consistindo a primeira linha de proteção contra os agentes patogênicos (KAWAI; AKIRA, 2009). As moléculas de reconhecimento envolvidas no sistema imune inato são altamente expressas em muitas células. Desse modo, o sistema está pronto para agir imediatamente frente à ameaça de invasão por patógeno ou toxina (CHAPLIN, 2010).

A imunidade inata tem funções importantes nas doenças inflamatórias (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002). Após a exposição a um agente patogênico, alguns minutos são suficientes para gerar uma resposta inflamatória. Outro fator característico na imunidade inata é o papel de ativar subsequentemente a resposta imune adaptativa. O sistema de defesa na imunidade inata é constituído por células hematopoiéticas, que são as células naturais *killer* (NK), células apresentadoras de antígenos (células dendríticas), eosinófilos, macrófagos, mastócitos, neutrófilos, e células T NK. As células não hematopoiéticas que fazem parte da imunidade inata são as epiteliais que revestem o sistema respiratório, gastrointestinal e geniturinário (TURVEY; BROIDE, 2010; HAASE; RINK, 2014).

A imunidade inata conta com componente humoral com elementos bem caracterizados, que inclui as proteínas do complemento, proteína de ligação de lipopolissacarídeo (LPS), proteína C reativa, pentraxinas, colectinas e peptídios antimicrobianos, incluindo defensinas (TURVEY; BROIDE, 2010).

A resposta inata pode ser induzida por receptores conhecidos como tipo *Toll* (*Toll like receptors* – TLR), presentes na parte externa da célula como membrana plasmática e endossomos de diversas células, que reconhecem um padrão de substâncias geradas por microrganismos (KAWAI; AKIRA, 2009).

Outro receptor importante na resposta imune inata é o domínio de oligomerização de nucleotídeo contendo proteína (*nucleotide-binding oligomerization domain* – NOD), um grupo específico de proteínas intracelular situado no citosol e que exerce funções importantes na regulação da resposta imune inata (FRANCHI et al., 2009).

### 2.1.2 Imunidade Adaptativa

O sistema imune adaptativo é composto por células com especificidade para qualquer microrganismo, toxina ou outra substância estranha. Uma característica importante nesta resposta é a memória<sup>1</sup> imunológica na fase tardia em um processo infeccioso (CHAPLIN, 2010). A imunidade adaptativa pode ser dividida em imunidade humoral<sup>2</sup> e celular (TURVEY; BROIDE, 2010).

O sistema imune adaptativo é composto por um pequeno número de células com especificidade para qualquer patógeno individual, toxina ou alérgeno. As células envolvidas nesse tipo de resposta proliferam, encontram o antígeno atingindo quantidade suficiente para montar uma resposta efetiva contra o microrganismo ou a toxina (CHAPLIN, 2010).

A resposta imune humoral está relacionada aos linfócitos B, células responsáveis pela produção de anticorpos contra um antígeno, mecanismo de defesa importante contra microrganismos extracelulares e suas toxinas. Já a resposta imune celular ocorre pela ativação de outras células do sistema imune, como os linfócitos T *helper* e os citotóxicos, cuja característica é atuar na proteção contra patógenos intracelulares (BONAVENTURA et al., 2015).

---

<sup>1</sup> Memória imunológica é a capacidade do sistema imunológico de responder de forma mais rápida e efetiva aos agentes patogênicos encontrados anteriormente e reflete a preexistência de uma população expandida clonalmente de linfócitos específicos do antígeno (JANEWAY et al., 2001).

<sup>2</sup> A imunidade humoral refere-se a respostas imunes mediadas por anticorpos (HUMORAL IMMUNITY, 2017).

O sistema imunológico possui mecanismos efetores potentes, capazes de destruir células microbianas e de eliminar substâncias tóxicas e alergênicas. A resposta imune pode evitar mecanismos autodestrutivos contra os tecidos do hospedeiro por um processo denominado autotolerância. As doenças autoimunes podem se manifestar devido a falha na autotolerância. Os mecanismos para evitar a reação contra autoantígenos são expressos em partes da resposta imune inata e adaptativa (CHAPLIN, 2010).

## **2.2 DOENÇAS AUTOIMUNES**

Doenças autoimunes fazem parte de um grupo heterogêneo de doenças desencadeadas pela falha no sistema imunológico, no qual o organismo reconhece substâncias do metabolismo do próprio indivíduo como agente estranho. As moléculas e as proteínas produzidas pelo organismo acabam sendo consideradas como uma ameaça ao sistema imunológico, que desencadeia uma série de respostas, causando lesão celular e dano tecidual (SCHMIDT, 2011).

É um grupo de doenças nem sempre fáceis de identificar, pois os sintomas ou as manifestações clínicas iniciais muitas vezes são pouco evidentes com doenças de origem autoimune (CAMPBELL, 2014). Uma das manifestações nas doenças autoimunes é a produção de autoanticorpos, os quais, na maioria das vezes, podem ser detectados por exames laboratoriais (POLLARD; HULTMAN; KONO, 2010).

Existem mais de oitenta doenças autoimunes; algumas são conhecidas, como: Esclerose Múltipla, Artrite Reumatoide, Esclerodermia, Diabetes Tipo 1, Doença de Graves, Tireoidite de Hashimoto, Psoríase, Vitiligo, Síndrome de Sjögren e LES (CAMPBELL, 2014). Acredita-se que essas doenças possam ser provocadas por diversos tipos de fatores como estresse emocional, ambiental, ou mesmo por agentes químicos orgânicos ou inorgânicos externos, aos quais o indivíduo é exposto (SCHMIDT, 2011).

Doenças autoimunes<sup>3</sup> e autoinflamatórias<sup>4</sup> estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, e dependendo da área geográfica, sua prevalência aumenta. As mudanças geoepidemiológicas podem ser explicadas por fatores ambientais e susceptibilidade genéticas. Indivíduos que apresentam maior predisposição genética podem desenvolver uma doença autoimune ou autoinflamatória (AI/AIFD) quando expostos a fatores ambientais (SHOENFELD; AGMON-LEVIN, 2011).

Os hormônios são substâncias químicas (mensageiros) produzidas pelas glândulas, tecidos especializados e neurônios; quando lançados na corrente sanguínea, exercem funções biológicas no metabolismo, no crescimento, na sexualidade e em outras ações (CHIGHIZOLA; MERONI, 2012). Interferentes endócrinos ou estrogênios ambientais são substâncias químicas capazes de alterar o sistema hormonal em animais e humanos. Esses compostos podem ser de origem antrópica, denominados xenoestrogênios, e de origem natural, chamados de fitoestrogênios (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Entre os compostos químicos, os hormônios sexuais podem causar efeitos intensos em qualquer tipo de célula no organismo humano. No sistema imunológico podem modular a produção de citocinas, expressão de receptores e regular respostas de células efetoras. O estrogênio endógeno é uma importante fonte hormonal; no entanto, o sistema imunológico em algum momento pode entrar em contato com diferentes produtos químicos ou moléculas presentes no ambiente, conhecidos como estrogênios ambientais, e podem desencadear efeito sinérgico/aditivo com moléculas endógenas, podendo influenciar as respostas imunes (CHIGHIZOLA; MERONI, 2012).

Outra condição que pode deixar o organismo vulnerável e desencadear alterações no sistema imune é a amálgama, constituída por uma mistura de substâncias químicas (mercúrio, prata, estanho, cobre e zinco). Apesar dos debates sobre o uso de metais tóxicos, ainda é um material bastante utilizado em implantes dentários (EYESON et al., 2010; HEMDAN; ABU EL-SAAD; SACK, 2013).

---

<sup>3</sup> Doenças autoimunes são desordens sistêmicas originadas no sistema imune adaptativo. Ocorre a perda da tolerância imunológica central ou periférica de linfócitos T ou B e a consequente formação de autoanticorpos, com lesão tecidual anticorpo específico (MENDONÇA et al., 2017).

<sup>4</sup> Doenças autoinflamatórias são geradas a partir de desregulação na imunidade inata. Inexistência de linfócitos T autorreatores e de anticorpos tecido-específicos (MENDONÇA et al., 2017).

Os metais podem induzir a autoimunidade quando interagem com proteínas e alteram a apresentação peptídica das células T. Íons metálicos que possuem alto potencial redox, como ouro ( $\text{Au}^{3+}$ ), paládio ( $\text{Pd}^{4+}$ ) e platina ( $\text{Pt}^{4+}$ ), desnaturam as cadeias laterais de aminoácidos das proteínas que contêm enxofre. Íons como mercúrio ( $\text{Hg}^{2+}$ ), platina ( $\text{Pt}^{2+}$ ) e ouro ( $\text{Au}^+$ ) formam ligações fortes com cadeias laterais em proteínas, formando complexos estáveis (proteína-metal) e podem alterar o desdobramento da proteína no processamento de antígeno. Ainda, os íons metálicos podem induzir uma alteração na especificidade do perfil proteolítico das células apresentadoras de antígeno (HULTMAN, 2007).

### **2.2.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)**

O LES é uma doença inflamatória crônica, multissistêmica, de natureza autoimune e etiologia desconhecida (OATES, 2010). A combinação de fatores genéticos e ambientais com alterações na imunidade inata e disfunções na imunidade adaptativa está relacionada com a produção de autoanticorpos, e estes, consequentemente, estão envolvidos na progressão da doença (HEMDAN et al., 2007; SOMERS; RICHARDSON, 2014).

Os indivíduos com maior tendência a desenvolver LES são aqueles que possuem maior predisposição genética: mulheres em idade fértil e indivíduos sujeitos a exposições ambientais ou ocupacionais (KAMEN, 2014). A maioria dos casos de LES está entre indivíduos de 16 e 50 anos de idade, e em determinados grupos étnicos, como, afrodescendentes, asiáticos e hispânicos (KAMEN, 2014; URAMOTO et al., 1999). Casos de histórico familiar de LES têm chance quatorze vezes maior de desenvolver a doença nos filhos (SOMERS; RICHARDSON, 2014).

Outros fatores, como medicações, infecções, tabagismo, agentes químicos, pesticidas, sílica, poluentes industriais, solventes orgânicos e metais são considerados riscos potenciais para desencadear o LES (KAMEN, 2014).

Mulheres apresentam maior proporção de LES em relação a homens (9 mulheres para cada homem) (D'CRUZ; KHAMASHTA; HUGHES, 2007). Embora os mecanismos não estejam elucidados, os fármacos de reposição hormonal, os altos níveis de estrogênio e baixas concentrações de testosterona, dihidrotestosterona,

desidroepiandrosterona (DHEA) e sulfato de DHEA (SDHEA) sugerem estar cada vez mais associados ao LES nas mulheres (CHIGHIZOLA; MERONI, 2012).

Estudos epidemiológicos confirmam que, entre os agentes infecciosos (vírus, bactérias e parasitas), o vírus Epstein-Barr, causador da mononucleose infecciosa, é o principal contribuinte para doenças autoimunes, mais especificamente o LES, resultando em surgimento e positividade de anticorpos antinúcleo (KAMEN, 2014).

No diagnóstico do LES são utilizados os critérios propostos pelo *American College of Rheumatology* (ACR), revisado em 1997 (HOCHBERG, 1997). Os critérios abrangem sinais e sintomas clínicos, exames laboratoriais e de imagem (BELTRÃO, 2010). Diversos exames laboratoriais hematológicos, bioquímicos e imunológicos são realizados e fazem parte dos critérios estabelecidos. Dentre os exames imunológicos estão os anticorpos antinúcleo ou Fator Antinúcleo (FAN) utilizando como substrato as células Hep-2; o anti-DNA nativo, anti-SM, anticardiolipinas IgG e IgM e anticoagulante lúpico (D'CRUZ; KHAMASHTA; HUGHES, 2007). O diagnóstico de LES fundamenta-se pelo menos em quatro dos onze critérios estabelecidos pelo ACR, descritos na Figura 1.

**Figura 1** – Critérios de classificação de LES do *American College of Rheumatology* revisados em 1997

- |                              |
|------------------------------|
| 1. Eritema malar             |
| 2. Lesão discoide            |
| 3. Fotossensibilidade        |
| 4. Úlceras da mucosa oral    |
| 5. Artrite                   |
| 6. Serosite                  |
| 7. Doença renal              |
| 8. Alterações neurológicas   |
| 9. Alterações hematológicas  |
| 10. Alterações imunológicas  |
| 11. Anticorpos antinucleares |

Fonte: ACR (HOCHBERG, 1997).

Quanto aos sinais e sintomas, vários são os que se manifestam nas pessoas portadoras de LES, devido ao fato de os anticorpos estarem presentes nos tecidos e na circulação sanguínea. Dessa forma, podem alcançar o corpo todo, podendo afetar, inclusive, um ou mais órgãos internos. A doença apresenta sinais gerais como cansaço, desânimo, febre baixa, emagrecimento e falta de apetite, inflamação de pele, articulações, rins, nervos, cérebro e pleuras pulmonares (SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, 2011).

Quanto à metodologia para avaliar a atividade da doença, diversos índices foram criados e têm sido utilizados de acordo com o objetivo de cada estudo. No Brasil, é amplamente utilizado o Índice de Atividade da Doença de Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLEDAI), atribuído ao acompanhamento do paciente já diagnosticado e que avalia a atividade da doença (BORBA et al., 2008).

Pelo fato de o LES ser uma doença crônica, o tratamento dependerá de sua atividade ou remissão, de forma individualizada de um paciente a outro. O tratamento farmacológico inclui os anti-inflamatórios não hormonais, corticoides, antimaláricos, imunossupressores, imunoglobulina endovenosa, anticorpos anti-CD-20, plasmaférese e transplante de células tronco (TELLES et al., 2007).

### **2.2.2 LES e Estresse Oxidativo**

Os danos causados pelos radicais livres e o estresse oxidativo têm sido considerados fatores de risco associados cada vez mais à patogenia e à desregulação no sistema imunológico em doenças autoimunes como o LES (JAFARI et al., 2016). O estresse oxidativo favorece a instalação de doenças cardiovasculares, fazendo parte de uma das principais causas de morbidade e mortalidade no LES (PERL, 2013). É causado pelo desequilíbrio entre as proporções de agentes antioxidantes e oxidantes, desencadeados por radicais livres (KOCA et al., 2009).

A denominação de radicais livres é dada a qualquer átomo ou molécula que apresenta número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Esse desemparelhamento de elétrons é a característica principal pela alta reatividade apresentada por essas espécies químicas (HALLIWELL, 1992). A geração dos radicais livres é um processo fisiológico extremamente necessário e faz parte de funções biológicas importantes (BARBOSA et al., 2010).

O termo radical livre embora seja muito utilizado, não é a maneira adequada para denominar agentes reativos patogênicos, pelo fato de existirem algumas espécies químicas reativas que não apresentam elétrons desemparelhados na última camada. Os termos preferencialmente empregados são espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN). Alguns exemplos de ERO são: superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), peróxido ( $\cdot\text{O}_2^{2-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), oxigênio *singlet* ( $^1\text{O}_2$ ), hidroperoxila ( $\text{HOO}\cdot$ ), hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). E os exemplos de ERN são: óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ) e o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

As espécies químicas ERO e ERN são moléculas de curta duração e altamente instáveis; são formadas por reações químicas como parte de processos metabólicos celulares; podem assumir funções benéficas ou prejudiciais, dependendo de suas concentrações no organismo (SHAH et al., 2014). São espécies reativas capazes de desencadear modificações em meio biológico, atuando na sinalização e em outras funções celulares (OATES, 2010). As moléculas dessas espécies reativas são desativadas por quebra na reação da cadeia pelo sistema antioxidante enzimático ou não enzimático, para evitar que outros compostos biológicos sejam danificados (JAFARI et al., 2016).

Um antioxidante pode ser entendido como uma molécula estável disponível para doar um elétron a uma espécie reativa para que ocorra a neutralização e, conseqüentemente, diminuindo a capacidade da molécula de gerar danos no organismo (PAGLIUSO et al., 2006). Os antioxidantes funcionam como um sistema de defesa para a célula e são compostos por duas vias: a primeira, com a finalidade de proteção antes de a lesão ocorrer, é constituída pela glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona peroxidase (GSH-Px) e a vitamina E. O segundo esquema de defesa tem como função reparar a lesão ocorrida formada pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

As ERO, quando estão presentes em excesso, como  $\cdot\text{O}_2^-$  ou  $\cdot\text{OH}$ , podem potencialmente causar danos em lipídios, proteínas e DNA (GRIMSRUD et al., 2008). Outro processo, denominado peroxidação lipídica, consiste na degeneração oxidativa de ácidos graxos pelas ERO. Nele ocorre a formação de aldeídos extremamente reativos, como malondialdeído (MDA), que faz ligação covalente com

proteínas e modificam sua estrutura, prejudicando funções biológicas importantes. Todos esses processos são associados ao LES (WANG et al., 2007).

As ERN também estão relacionadas à patogênese do LES. O  $\cdot\text{NO}$  é produzido no organismo pela ação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) a partir do aminoácido arginina. O  $\cdot\text{NO}$ , em uma reação com  $\cdot\text{O}_2^-$ , leva à formação de  $\text{ONOO}^-$ , que reage com resíduos do aminoácido tirosina e forma a nitrotirosina, utilizada como um marcador de dano celular (WANG et al., 2007). Além disso, o  $\text{ONOO}^-$  pode mediar modificações em proteínas endógenas e no DNA, desencadeando alterações em sua imunogenicidade e ruptura na tolerância imune (HABIB; MOINUDDIN, 2006).

Antioxidantes em baixas proporções e aumento das ERO e ERN influenciam o estado redox, elevando a expressão de diversas moléculas inflamatórias (COSTA, 2009). O aumento de LES em humanos tem sido remetido aos danos oxidativos em proteínas séricas e, como consequência, ocorre o processo inflamatório e a lesão tecidual (GARDNER et al., 2010).

As células T são afetadas (sinalização celular e desenvolvimento celular) pelo estresse oxidativo em pacientes com LES em diversos níveis; as alterações desencadeadas nas células T conduzem ao aumento das respostas imunes somado a outros produtos do processo oxidativo, resultando no estado inflamatório. Os autoantígenos sofrem modificação oxidativa e levam à autoimunidade (PERL, 2013).

### **2.2.3 Lúpus Eritematoso Sistêmico e Metais**

Os metais apresentam mecanismos de ação de diversas maneiras no organismo humano, sendo que os efeitos no sistema imunológico incluem supressão, estimulação inespecífica, hipersensibilidade e autoimunidade. Imunossupressão é a diminuição da função ou da eficiência do sistema imunológico, e estudos demonstraram que os metais podem suprimir as células do sistema imune, incluindo células T, B e os macrófagos (COLOMBO et al., 2004; GALLAGHER; NOELLE; MCCANN, 1995; SAKURAI et al., 2006).

Metais também podem estimular células no sistema imune em um processo denominado imunoestimulação não específica, quando não há indução

primária de reações antígeno-específicas ou geração de linfócitos metal-específicos. Diversos metais como níquel, crômio, mercúrio e cobalto, podem interagir com o sistema imune e provocar a ativação imunitária específica, provocando lesões nos tecidos do corpo, podendo a resposta ser exagerada ou inadequada em relação à situação, desencadeando o processo conhecido por hipersensibilidade (HULTMAN, 2007).

A exposição a metais como ouro, prata, mercúrio, cádmio, cobre, zinco, chumbo, lítio, manganês, níquel e outros, em produtos utilizados na indústria, tem a capacidade de induzir alterações no sistema autoimune, promovendo a autoimunidade (SUZUKI; INOUE; RA, 2011). Principalmente a exposição por metais tóxicos pode elevar a autoimunidade sistêmica e a coexposição a determinados xenobióticos elevando o risco associado a outras exposições anteriormente (GILBERT et al., 2011). Indivíduos expostos em decorrência da atividade mineradora pelo mercúrio mostraram prevalência elevada a anticorpos antinúcleo (ANA) em níveis detectáveis quando comparados a outros trabalhadores expostos ocupacionalmente na ausência de mercúrio (SILVA et al., 2004).

## **2.2.4 LES e Dietas**

### **2.2.4.1 Aspectos gerais**

O consumo de nutrientes presentes na alimentação ou por suplementos constitui o estado nutricional com atribuições indispensáveis no equilíbrio do sistema imunológico, mantendo a saúde de pessoas saudáveis em uma condição normal, e também dos indivíduos portadores de LES. Uma dieta equilibrada contribui de forma benéfica para o prognóstico de doenças imunológicas, evita o avanço de doenças cardiovasculares e melhora um estado infeccioso (KLACK; BONFA; BORBA NETO, 2012).

As dietas utilizadas em pacientes com LES têm sido descritas na literatura e há algumas orientações básicas quanto ao consumo adequado de certas substâncias: a ingestão de alimentos com baixo teor calórico deve ser estimulada; além disso, dietas ricas em ácidos graxos saturados precisam ser evitadas. Preferencialmente, fazer uso de dietas ricas em vitaminas A e E e nos minerais selênio

e cálcio. Quanto aos suplementos, devem conter óleo de peixe, cálcio e vitamina. Alimentos com alto teor de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 ( $\omega$ -3), geralmente presentes em peixes e óleo vegetais como canola e soja, também têm sido orientados (ROSSONI, 2009).

#### **2.2.4.2 Proteínas**

O consumo proteico elevado em pacientes com LES juvenil pode desencadear perda mineral nos ossos (KLACK; BONFA; BORBA NETO, 2012). No entanto, uma dieta hipoproteica não é aconselhável na nefrite lúpica, para não ocorrerem balanço nitrogenado negativo e estados de desnutrição (HULL; GOLDSMITH, 2008; KODNER, 2009).

#### **2.2.4.3 Lipídios**

Os lipídios são importantes por fornecerem gorduras poli-insaturadas aos tecidos para que os linfócitos possam desempenhar as funções fisiológicas adequadas. É aconselhável a restrição de gorduras saturadas e elevação do consumo das insaturadas; estas exercem funções essenciais no sistema imune, atuando na resposta aos tumores cancerígenos e infecciosos (KLACK; BONFA; BORBA NETO, 2012). Pacientes com LES devem consumir dietas contendo baixo teor de lipídios (CUTOLO; OTSA, 2008).

O óleo de peixe é uma fonte importante de ácido graxo poli-insaturado  $\omega$ -3; tem efeitos anti-inflamatórios e antiautoimune (pela inibição de linfócitos T e B). Outra função relacionada ao  $\omega$ -3 é a de supressor da atividade de macrófagos; (SELMÍ; TSUNEYAMA, 2010).

O ácido eicosapentaenoico (EPA) possui efeitos anti-inflamatórios pela diminuição da produção de interleucinas (IL-1 $\beta$  e IL-6) e o TNF- $\alpha$  pela alteração fosfolipídica na membrana celular, comprometendo a interação receptora de citocinas inflamatórias (PESTKA, 2010). Outro componente importante é a linhaça que, consumida na forma integral, pode atuar na diminuição da creatinina sérica nos

quadros de nefrite lúpica, diminuir o colesterol total e a lipoproteína de baixa densidade (do inglês *low density lipoprotein* – LDL) (PATAVINO; BRADY, 2001).

O ácido graxo poli-insaturado ômega-6 ( $\omega$ -6), através da indução de mediadores inflamatórios, pode agravar o LES (MINAMI et al., 2003).

#### **2.2.4.4 Vitamina A**

A ingestão de vitamina A nos pacientes com LES é orientada, por aumentar a citotoxicidade celular dependente de anticorpo, a atividade da célula NK e a resposta da IL-2 (KLACK; BONFA; BORBA NETO, 2012). No entanto, o consumo elevado de vitamina A (acima de 100.000 UI) pode provocar diversos efeitos colaterais e evoluir para o óbito. Em casos de deficiência, os sintomas também podem ser graves. Esses danos mais severos podem estar relacionados a outras condições, como a hipergamaglobulinemia e à presença de autoanticorpos (BROWN, 2000).

O tratamento com retinoides (grupo natural e sintético de vitamina A) melhora os níveis de proteinúria, de anti-dsDNA e complementos baixos. Reforçando os efeitos dos retinoides, pode apresentar contribuições importantes no tratamento da nefrite lúpica (KINOSHITA; FUNAUCHI, 2012).

#### **2.2.4.5 Vitamina D**

A vitamina D é outro nutriente importante, pois exerce efeitos imunomoduladores; sua produção ocorre na pele e é obtida através da alimentação. Sua forma ativa  $1,25(OH)_2D_3$  atua no sistema imune inibindo a proliferação do linfócito T (Th1). O uso de  $1,25(OH)_2D_3$  em células T CD4 inibe a proliferação da célula Th1 e a produção de citocinas, diminui a secreção de IL-2 e de IFN- $\gamma$  pelas células T CD4, favorece a geração de IL-5 e de IL-10 e desencadeia alteração na resposta de células T em direção ao domínio de Th2 (CUTOLO; OTSA, 2008).

Estudos recentes apontam evidências quanto à função da vitamina D no desenvolvimento de doenças autoimunes. Baixos níveis de vitamina D têm sido associados com a atividade do LES, devido ao desequilíbrio na geração de proteínas como as citocinas envolvidas na doença e à fotossensibilidade, sendo orientado o uso

de protetor solar para evitar a exposição, e esses fatores influenciam nos níveis da vitamina D (CUTOLO; OTSA, 2008; LIMA, 2015). O uso de determinados fármacos no tratamento do LES também pode contribuir para a diminuição da vitamina D nesses indivíduos (CUTOLO; OTSA, 2008).

#### **2.2.4.6 Complexo B**

As vitaminas B6, B12 e o folato têm sido orientados no LES pelo fato de serem cofatores importantes no metabolismo da homocisteína e contribuem para sua diminuição no organismo (MINAMI et al., 2011; VARELA-MOREIRAS; MURPHY; SCOTT, 2009). A homocisteína é um aminoácido contendo um grupo tiol (SH) formado a partir da desmetilação da metionina ou de dietas ou de seu metabolismo (NEVES; MACEDO; LOPES, 2004). Outros marcadores inflamatórios, como as citocinas e a proteína C reativa (PCR), podem ser influenciados por essas vitaminas (MINAMI et al., 2011).

#### **2.2.4.7 Vitamina C**

É uma vitamina com propriedades antioxidantes. Está envolvida na modulação das funções imunológicas e na liberação dos mediadores inflamatórios. A ingestão de vitamina C está associada à prevenção, para que não ocorra a fase ativa da doença do LES (MINAMI et al., 2003).

A suplementação com vitamina C é utilizada na prevenção de problemas cardiovasculares, não devendo ultrapassar 1 g/dia. O consumo diário de 500 mg de vitamina C com 800 UI de vitamina E por um período de 3 meses esteve associado à diminuição da peroxidação lipídica; outros marcadores do estresse oxidativo ou a função endotelial permaneceram inalterados nos pacientes com LES (TAM et al., 2005).

#### **2.2.4.8 Fibras**

As fibras alimentares são importantes pelo fato de fornecerem nutrientes pouco energéticos, que diminuem taxas de glicose, de lipídios e de colesterol no sangue (KLACK; BONFA; BORBA NETO, 2012). De preferência, fazer uso de fibras solúveis presentes na aveia, nas frutas e nos legumes, sendo muito relevante a ingestão em quantidades adequadas de líquidos (SHAH et al., 2004).

A ingestão de fibra esteve associada de maneira proporcionalmente inversa à gravidade do LES. O consumo de fibras também esteve inversamente relacionado aos níveis plasmáticos de homocisteína e dos marcadores inflamatórios IL-6 e PCR (MINAMI et al., 2011). No entanto, o consumo excessivo de fibras diminui a absorção de vitaminas, minerais, proteínas e energia (KLACK; BONFA; BORBA NETO, 2012).

### **2.3 ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM PACIENTES COM LES**

#### **2.3.1 Insulina**

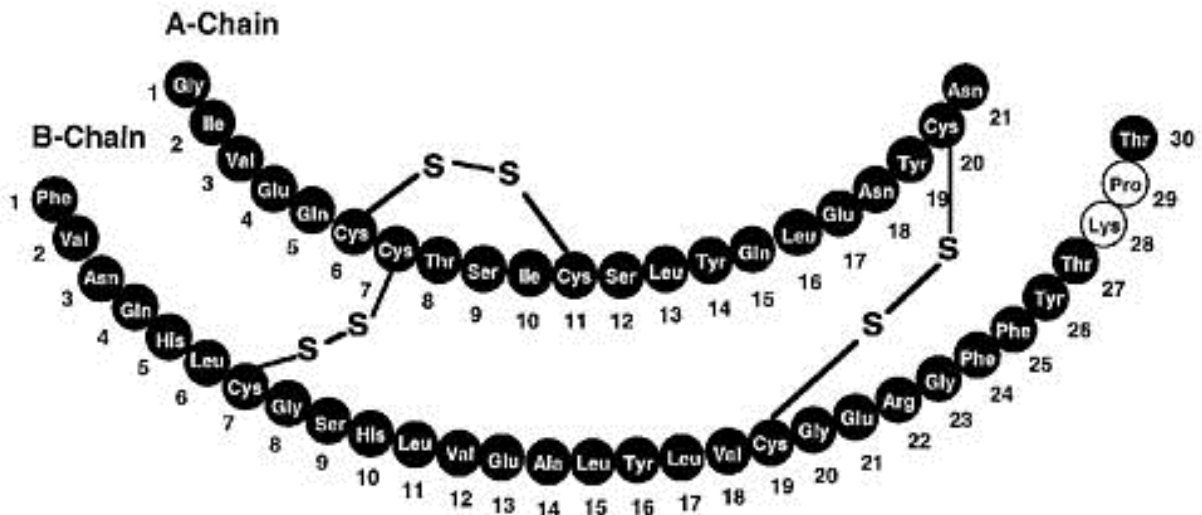
Em humanos, a insulina é formada por duas cadeias A e B, compostas por 21 e 30 aminoácidos, respectivamente, conectadas por duas ligações de dissulfeto. A insulina nativa tem três alfa-hélices na estrutura secundária, duas na cadeia A, e uma na cadeia B. A cadeia B apresenta um núcleo hidrofóbico de resíduos não polares, que são fundamentais para a dobra da insulina (HJORTH et al., 2016).

Na estrutura terciária da insulina existem três ligações dissulfeto; duas ligações intercadeias, entre os resíduos de aminoácidos A7-B7 e A20-B19; e uma ligação intracadeia, nos resíduos A6 e A11, simultaneamente (VINTHER et al., 2013). As ligações de dissulfeto fazem parte da estabilidade e funcionalidade proteica. No entanto, se ocorrer perda ou remoção na ligação dissulfeto, a insulina perde sua atividade (VINTHER et al., 2015). A Figura 2 mostra a estrutura da molécula de insulina e as ligações dissulfeto.

As ligações de dissulfeto são importantes na estabilidade da molécula; no entanto, não são capazes de proteger a insulina quando exposta a

temperaturas elevadas. Em condições fisiológicas, trímeros de insulina, de maneira coordenada com Zn, fazem uma superestrutura dimérica. Na ausência do Zn, a insulina faz associações diméricas ou tetraméricas (VINTHER et al., 2015).

**Figura 2** – Estrutura da insulina e as pontes dissulfeto entre as cadeias A e B



**Fonte:** <[https://www.drugs.com/drug\\_images/74/60031951.jpg](https://www.drugs.com/drug_images/74/60031951.jpg)>. Acesso em: 25 set. 2017.

A função da insulina não está relacionada apenas com a absorção de glicose celular; outras funções importantes são atribuídas à insulina, como efeito anti-inflamatório e supressão de fatores de transcrição pró-inflamatório, como NF-κB (ESCÁRCEGA et al., 2006). Mesmo tendo outras funções no organismo, a insulina é um dos hormônios mais importantes, responsável pela manutenção dos níveis normais de glicose em humanos e em animais. Complicações no funcionamento adequado da insulina pode desencadear problemas graves metabólicos e diabetes *mellitus* (DM) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999).

Os mecanismos inibitórios da ação da insulina podem ocorrer através da fosforilação dos substratos receptores de insulina (IRS) em serina, e quando a fosforilação ocorre em serina, diminui a transmissão do sinal, impedindo o IRS-1 de fosforilar em tirosina, após ser estimulado pela insulina. Esse tipo de fosforilação desencadeia um *feedback* negativo na sinalização da insulina e promove a resistência à insulina (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

### 2.3.2 Diabetes e Resistência à Insulina (RI)

A quantidade de pessoas portadoras de diabetes é elevada na população mundial. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimam que 347 milhões de pessoas podem ser portadoras de diabetes. Os países de população com menor poder aquisitivo são os locais onde a maioria dos casos evoluem para óbito (DANAIE et al., 2011).

Diabetes é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por níveis elevados de glicose no sangue (hiperglicemia) em decorrência de problemas na secreção da insulina, no modo de ação da insulina ou pela combinação desses dois fatores. Anormalidades básicas no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas estão relacionadas com a ação deficiente de insulina nos tecidos-alvo. Diversos danos podem ser causados no organismo por diabetes, conduzindo a danos em diversos órgãos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

A maioria dos casos de diabetes se enquadra em duas categorias: a diabetes tipo 1 (DT1), definida como uma desordem autoimune mediada pelas células T, resultando na destruição das células beta pancreáticas produtoras de insulina (ACHENBACH et al., 2005); e a diabetes tipo 2 (DT2), cuja origem é uma combinação da resistência à ação da insulina em resposta compensatória inadequada na secreção da insulina (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

A alimentação dos indivíduos com diabetes merece atenção devido à perda significativa de minerais pela urina, à baixa capacidade de absorção intestinal e à ingestão dietética inadequada, sendo necessário definir um plano equilibrado para o consumo adequado dos nutrientes, como frutas, verduras e legumes (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015).

Sensibilidade à insulina é a capacidade relativa de a insulina diminuir os níveis de glicose na corrente sanguínea (MLINAR et al., 2007). Alterações na sensibilidade à insulina podem estar relacionadas a diversas situações, como: puberdade, gestação, hábitos sedentários e consumo elevado de carboidratos (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006).

A resistência à insulina é um desequilíbrio fisiológico relacionado com a resposta alterada em tecidos sensíveis à insulina, como músculos, fígado, tecido adiposo e tecido endotelial (SIMONSON; KENDALL, 2005). Como esses tecidos não

respondem aos níveis normais de insulina circulante, são necessárias maiores concentrações de insulina para manter os níveis normais de glicose, resultando em níveis elevados de insulina como uma situação compensatória, na tentativa do organismo de realizar uma resposta apropriada (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006). Pelo fato de a RI não ser apenas uma alteração fisiológica comum, às vezes é chamada de síndrome da resistência à insulina, entre outros nomes, como síndrome de Reaven e síndrome X (SIMONSON; KENDALL, 2005).

Pacientes com LES apresentam prevalência mais elevada de RI (CHUNG et al., 2007). E muitas vezes esses pacientes com LES podem apresentar outras doenças associadas (CORTES et al., 2008). De acordo com Sabio et al. (2010), a RI tem sido apontada como potencial fator de risco de doença cardíaca coronariana em pacientes com LES. Também há indícios no aumento da incidência de RI relacionada à prevalência elevada com obesidade e DMT2 (WHO, 1999).

## **2.4 QUANTIFICAÇÃO DOS METAIS**

### **2.4.1 Espectrômetro de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado**

A espectrometria de massas com plasma de argônio induzido (ICP-MS) tem sido amplamente utilizada por ser uma técnica multielementar na quantificação de elementos-traço em diversas amostras biológicas, como sangue, urina e soro. Diversas vantagens têm sido atribuídas à técnica, como quantificação elementar simultânea, baixo limite de detecção (da ordem de  $\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $\text{ng L}^{-1}$ ), interpretação espectral simples e distinção de isótopos (PARSONS; BARBOSA, 2007).

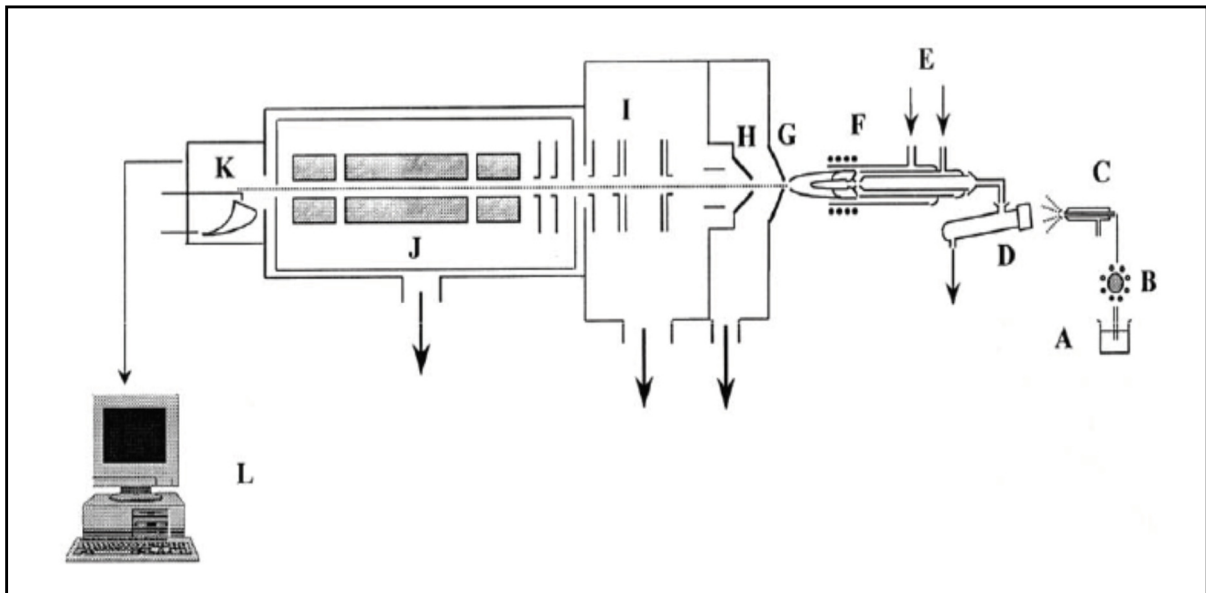
Na maioria das vezes, as amostras precisam ser diluídas antes de serem introduzidas no sistema. Principalmente o sangue, por ser considerado uma matriz altamente complexa, constituído de aproximadamente 80% de água e o restante por sais, células e proteínas solúveis (BORDIN et al., 2015). A finalidade de tratamento prévio da amostra é diminuir possíveis interferências de matriz. Uma solução diluída de  $\text{HNO}_3$  geralmente tem sido utilizado para o tratamento das amostras (BATISTA, 2009). No entanto, existem diversos métodos disponíveis para amostras complexas como o sangue, sendo conveniente a escolha do método mais

adequado (NUNES, 2009; FORTE et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2014; JUNCIONI DE ARAUZ et al., 2015;).

A introdução da amostra inicialmente ocorre na bomba peristáltica, sendo enviada ao nebulizador, que é responsável por transformar a amostra da fase líquida em aerossol. Na câmara de nebulização ocorre a separação entre as gotas maiores e menores do aerossol. Uma corrente ou fluxo de gás argônio transporta essa amostra vaporizada até a tocha do ICP. Na tocha ocorre a formação do plasma. Em um processo rápido, a amostra passa pelos estágios de dessolvatação, vaporização, atomização e ionização (NUNES, 2009).

A Figura 3 mostra, de maneira esquemática, as partes que compõem o ICP-MS, bem como a indicação de elementos que compõem o equipamento. Uma fonte de radiofrequência (RF) é acoplada à tocha, desencadeando a formação de campos elétricos e magnéticos em seu topo. O ICP atinge temperaturas de (6000 – 8000K), o que o torna uma fonte adequada na atomização e na ionização da espécie que se deseja determinar, em sua forma elementar (BATISTA, 2009).

**Figura 3** – Diagrama esquemático de um plasma indutivamente acoplado ao espectrômetro de massas



**Fonte:** Sutton e Caruso (1999).

(A) – amostra líquida; (B) – bomba peristáltica; (C) – nebulizador; (D) – Câmara de pulverização; (E) – Entradas de gás argônio; (F) – tocha (plasma); (G) – cone amostrador; (H) – cone *skimmer*; (I) – lentes de íons; (J) – quadrupolo; (K) – fotomultiplicador; (L) – coletor de dados.

No ICP são gerados íons monocarregados, que são transportados para o MS através de uma interface com bomba de vácuo. Os íons, através das lentes (eletrodos com diferentes voltagens), proporcionam condições para serem focalizados no analisador de massas. Dessa forma, os íons são separados do analisador de massas (quadrupolo) em virtude de sua razão massa/carga ( $m/z$ ) (BATISTA, 2009; SUTTON; CARUSO, 1999).

O ICP-MS é uma técnica valiosa na quantificação dos elementos. No entanto, a metodologia está sujeita a interferências que podem ser divididas em dois grupos: as interferências físicas e as espectrais (SKOOG et al., 2005). As interferências de natureza física estão relacionadas com a apresentação da amostra como viscosidade e volatilidade. Esse tipo de interferência pode afetar a introdução da amostra no equipamento e na geração do íon. Existem métodos utilizados para eliminar esse tipo de interferência, como a adição de padrão interno Índio e Ródio, adição de padrão e diluição isotópica. Ainda dentro da interferência de natureza física pode ocorrer a supressão ou o aumento de sinal em virtude da facilidade de ionização. Esse tipo de interferência pode ser diminuída com diluições da amostra (BATISTA, 2009). Outro tipo de interferência é a espectral, relacionada à quantificação de elementos químicos com unidade de massa atômica inferior a 82, que pode ser dividida em dois grupos: as isobáricas e as poliatômicas. As interferências isobáricas ocorrem quando o isótopo de um elemento se sobrepõe ao isótopo de um outro elemento com a mesma unidade de massa nominal (PRICHARD; MACKAY; POINTS, 1996 apud BATISTA, 2009). Já as interferências poliatômicas é quando espécies químicas presentes no plasma reagem entre si, formando um novo íon (NUNES, 2009). Geralmente, ocorrem em decorrência de moléculas ionizadas geradas em temperaturas elevadas do plasma ou na região denominada de interface entre o plasma e o filtro de massa (PRICHARD; MACKAY; POINTS, 1996 apud BATISTA, 2009).

## 2.5 METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS

### 2.5.1 Chumbo (Pb)

O Pb é encontrado facilmente no ambiente em decorrência de ações humanas e também é um contaminante gerado em processos industriais. A poeira de Pb em atividades industriais acumula-se no solo, e pelo fato de o metal não se degradar no meio ambiente, esse contato ambiental tornou-se uma fonte importante de exposição. Na exposição ocupacional, dados demonstram que a influência do Pb na atividade de enzimas antioxidantes está relacionada às doses e ao tempo ao qual o indivíduo ficou exposto (WIELOCH et al., 2012). Ações humanas, como extração mineral, indústrias e queima de combustíveis fósseis, geram grande quantidade de Pb e seus compostos no ar, no solo e na água (AHAMED; SIDDIQUI, 2007).

A preocupação com a toxicidade do Pb tem se tornado um assunto prioritário internacional em saúde pública, mesmo com a exposição ao metal tendo diminuído nas últimas três décadas, em virtude do seu baixo teor em tintas, da ausência na gasolina e da proibição de soldas e de fabricação de embalagens, como as latas para armazenar alimentos, contendo Pb (SPIVEY, 2007). No entanto, novas fontes de exposição por Pb demandam preocupação, como a contaminação na medicina tradicional usada em diversos países (AHAMED; SIDDIQUI, 2007).

Todos os anos, milhões de toneladas de Pb são produzidas e ou processadas de alguma maneira. O metal pode entrar em contato com o corpo humano por respiração ou ingestão e ser distribuído no corpo de maneiras distintas: sangue, tecidos moles e ossos (MALEKIRAD et al., 2010). Quando absorvido pelo organismo, o Pb entra na corrente sanguínea e 95% se ligam aos glóbulos vermelhos, alcançando praticamente todos os órgãos do corpo, causando graves danos (SINGH; CHADHA; SHARMA, 2013).

Estudos epidemiológicos demonstram que exposições em baixo nível estão associadas a várias doenças, como hipertensão, doença arterial periférica e problemas renais (MENKE et al., 2006). A exposição ao metal em baixas concentrações tem sido relacionada à diminuição do quociente de inteligência, a desenvolvimento e deficiência neurológica e a distúrbios do comportamento, como déficit de atenção e hiperatividade (JAISHANKAR et al., 2014).

O Pb pode afetar vários órgãos do corpo através do fluxo sanguíneo. É encontrado nos ossos como fosfato de chumbo, um sal praticamente insolúvel, cujo produto de solubilidade ( $K_{PS}$ ) é  $1,0 \times 10^{-8}$  (SKOOG et al., 2005; JAISHANKAR et al., 2014).

Os efeitos do Pb sobre o rim elevam a pressão sanguínea, em virtude dos danos que o metal exerce no órgão. O rim tem papel fundamental em regular o volume sanguíneo e vascular, que são fatores extremamente importantes na pressão arterial. Caso haja comprometimento no funcionamento renal, como a capacidade de excretar sais e fluidos de forma eficiente, conseqüentemente, poderá haver aumento no volume do sangue, o que desencadeia aumento da pressão arterial (AHAMED; SIDDIQUI, 2007).

A toxicidade por Pb *in vivo* afeta o sistema hematológico e inibe a atividade de enzimas envolvidas na biossíntese de heme, como a ácido  $\delta$ -aminolevulínico desidratase (ALAD) (MARTÍNEZ et al., 2013). O ALAD sofre auto-oxidação e viabiliza a geração de ERO (superóxido, hidroxila e peróxido de hidrogênio). A toxicidade induzida pelas ERO podem ter efeitos diminuídos ou neutralizados pela ação de compostos antioxidantes, como as enzimas SOD, CAT, GPx (GURER; ERCAL, 2000).

O Pb é capaz de gerar o estresse oxidativo pela ERO, o qual tem sido apontado como mecanismo extremamente relevante para a compreensão da toxicidade exercida pelo metal (JAISHANKAR et al., 2014). Mesmo sozinho ou na presença de  $H_2O_2$ , os íons  $Pb^{2+}$  induzem a rupturas na cadeia de DNA; isso pode estar relacionado à geração de oxigênio singleto (YANG et al., 1999).

Em um estudo de revisão de Lopes et al. (2016), o estresse oxidativo induzido por Pb em exposições crônicas são capazes de iniciar eventos consecutivos que podem desencadear hipertensão e doenças cardiovasculares. O  $Pb^{2+}$  danifica a membrana dos eritrócitos devido à sua grande afinidade em promover a peroxidação lipídica (SUWALSKY et al., 2003).

As concentrações de MDA, que é um produto final da peroxidação lipídica, geralmente aumenta à medida que o número de duplas ligações nos ácidos graxos aumentam, devido à exposição ao Pb, tornando as células mais suscetíveis a danos do que os ácidos graxos com menos ligações duplas (GURER; ERCAL, 2000).

Existem duas formas de intoxicação por Pb: aguda e crônica. A exposição aguda pelo metal ocorre nas pessoas que são expostas de maneira

ocupacional e os sintomas mais frequentes são perda de apetite, dor abdominal, disfunção renal, insônia, artrite e alucinações (JAISHANKAR et al., 2014). A exposição crônica pelo Pb pode causar alterações congênitas, psicose, alergia, dislexia, hiperatividade, paralisia, fraqueza muscular, lesão cerebral, lesões renais e até morte (MARTIN; GRISWOLD, 2009).

A intoxicação por Pb apresenta mecanismo iônico capaz de substituir outros cátions bivalentes, como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , e monovalentes, como  $\text{Na}^+$ . Ocorrem diversas alterações relevantes, como adesão celular, sinalização intra e intercelular, apoptose, transporte iônico e regulação de enzimas. Ainda, o Pb tem condições de substituir o cálcio em pequenas concentrações da ordem de picomolar, provocando alterações neurológicas (FLORA; MITTAL; MEHTA, 2008).

Atualmente, pouco se sabe da maneira como o Pb pode influenciar o sistema imunológico em humanos. Estudos demonstraram que a exposição ao Pb tem aumentado a incidência de alergias, doenças infecciosas, autoimunidade ou câncer. Em indivíduos expostos ocupacionalmente, algumas alterações imunotóxicas induzidas por Pb têm sido observadas. O Pb é capaz de melhorar o desenvolvimento das células T *helper* 2 (Th2) e de afetar a proliferação de células Th1. No entanto, mais estudos são necessários para melhor entendimento dos mecanismos de imunotoxicidade do Pb e da capacidade do metal de estar envolvido em um tipo de resposta imune (FENGA et al., 2017).

Estudo realizado em indivíduos expostos ocupacionalmente por Pb demonstrou porcentagem menor de células T CD4<sup>5</sup>, sugerindo que estas células são alvos direto da toxicidade exercida pelo metal, e as pequenas exposições ao longo dos anos podem desencadear efeitos cumulativos. No entanto, as células T CD8<sup>6</sup> não foram afetadas. Isto pode alterar o equilíbrio na relação CD4 e CD8, gerando consequências adversas no organismo, uma vez que respostas imunes por células efetoras mediadas por CD4 dependem da relação CD4/CD8 (FUKUI et al., 2011).

---

<sup>5</sup> CD4 são marcadores de superfície das células T helper ou auxiliar. Esses marcadores aumentam a sensibilidade da resposta das células T (ARTYOMOV et al., 2010).

<sup>6</sup> Marcadores de superfície nas células T citotóxicas (ARTYOMOV et al., 2010).

### 2.5.2 Cádmio (Cd)

O Cd está presente no solo, nas rochas e em fertilizantes minerais. É encontrado como sulfetos em minérios de Zn, Pb e Cu, erupções vulcânicas e em incineração de lixo nos grandes centros. Na indústria, como emissão da galvanização, recobrimento do aço e ferro, pigmentos em geral, inclusive os estabilizadores para plásticos, baterias cádmio-níquel, pilhas alcalinas e ligas (JAISHANKAR et al., 2014). As fontes de contaminação podem ser água, ar, alimentos (vegetais, pelo uso de fertilizantes), peixes, indústrias, combustíveis fósseis e cigarros (KIRA et al., 2016; MUDGAL et al., 2010).

O Cd presente na fumaça do cigarro acumula-se nos pulmões dos fumantes; acredita-se que a absorção do metal pelos macrófagos pode alterar funções imunes e alterar a capacidade alveolar dos macrófagos ao realizar uma resposta imune inata adequada após a exposição por patógenos (COX et al., 2016).

Apesar de muitos países diminuírem as emissões de compostos contendo Cd na atmosfera, determinar a concentração do metal em fluidos biológicos é estratégia adotada para verificar os riscos ocupacionais ou da população em geral (FUKUI et al., 2011).

Existe uma relação entre o tamanho das partículas e do agente inalado que determina a taxa de absorção do Cd. As partículas que apresentam dimensões superiores a 2 micrômetros são depositadas nas vias aéreas superiores. Mais de 30% do Cd inalado pode ser armazenado nos pulmões, alcançando a corrente sanguínea. O metal pode se ligar às células vermelhas do sangue e, também, às proteínas albumina ou metalotioneína, acumulando-se nos rins. No entanto, nos casos que ocorrem a deficiência de zinco, a distribuição de Cd no interior do corpo tem sua toxicidade aumentada (GWALTNEY-BRANT, 2002).

Nos tecidos, o Cd tem tempo de meia vida longo, pois o metal apresenta baixa taxa de excreção, contribuindo para um tempo de meia vida no organismo que pode variar de 20 a 40 anos. O metal acumula-se principalmente nos rins, no fígado e nos testículos (ZHAO et al., 2017).

Na intoxicação aguda, os órgãos envolvidos dependem da rota de exposição. A ingestão pela via oral dos compostos contendo o metal apresenta sintomas comuns, como distúrbios gastrointestinais (GWALTNEY-BRANT, 2002). A

intoxicação crônica pelo Cd leva ao desenvolvimento de nefropatia, que é a maneira mais predominante nessa modalidade de exposição (JAISHANKAR et al., 2014).

A Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classifica o Cd e os compostos como cancerígeno para o ser humano, causando, mais especificamente, o câncer de pulmão. No entanto, existem relações significativas entre níveis séricos do metal e câncer na bexiga, de próstata e do endométrio (FERREIRA; WERMELINGER, 2013).

Entre as maiores fontes de exposição não ocupacional por Cd inalado em humanos, o tabagismo exerce grande influência no agravamento do LES. Além do potencial cancerígeno do Cd, a situação no LES ainda é mais preocupante, porque existem centenas de outros contaminantes potencialmente tóxicos no cigarro que também influenciam no agravamento da doença, cujos sintomas mais comuns são manifestações na pele e fotossensibilidade (KAMEN, 2014).

Os mecanismos tóxicos que o Cd exerce no organismo humano ainda não estão totalmente compreendidos; no entanto, ações intracelulares têm sido relacionadas ao metal. Além disso, a ação das ERs pode provocar danos em pulmões, rins, cérebro, sistema nervoso central, sistema cardíaco e órgãos reprodutivos (JOMOVA; VALKO, 2011).

A presença de íons  $Cd^{2+}$  no organismo pode desencadear doenças autoimunes, câncer e processos inflamatórios crônicos (HEMDAN; ABU EL-SAAD; SACK, 2013). O Cd no organismo induz apoptose, peroxidação lipídica, dano e lesão tecidual, além de produzir, de forma indireta, espécies reativas, como  $H_2O_2$ ,  $\cdot O_2^-$ ,  $\cdot OH$ , e NO (FRANCO et al., 2009). A supressão de espécies reativas de oxigênio (ERO) conduz à diminuição da resistência por agentes infecciosos, portanto, há relatos e sugestões sobre a imunotoxicidade do Cd (MARTH et al., 2001).

O Cd atua pela ERO e pode desencadear alterações nas vias de sinalização celular, implicando na patogênese de doenças autoimunes e influenciando a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), Fator Nuclear (NF- $\kappa$ B) e janus quinase JAK/STAT. Também promove a redução de antioxidantes importantes, como o MDA, um biomarcador do estresse oxidativo e da enzima (SOD) (HEMDAN; ABU EL-SAAD; SACK, 2013).

Íons metálicos de Cd podem se ligar a vários aminoácidos, e como Cd e Zn possuem o mesmo estado de oxidação (2+), o Cd pode substituir o Zn ligado à

metaloioneína, inibindo o Zn na atuação de captar radicais livres nas células (JAISHANKAR et al., 2014).

### 2.5.3 Cobalto (Co)

O Co é encontrado na natureza como íons  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Co}^{3+}$ , em pequenas quantidades nas rochas, no solo, nas plantas e em animais. É frequentemente encontrado na forma associada a outros elementos, como oxigênio, enxofre e arsênio. Na água, geralmente está dissolvido ou é encontrado na forma iônica. O Co existe também na forma radioativa; nessa forma não é encontrado livre na natureza, mas pode ser produzido em reatores nucleares, e o tempo de meia vida é em torno de 5 anos (ATSDR, 2004).

A exposição ocupacional por Co acontece na forma de pó, pelo manuseio e uso de ferramentas e metais duros utilizados na fabricação de produtos industriais, como carvão de titânio e carvão de tântalo (KLASSON et al., 2016).

O Co é importante na saúde humana. O Co chega a constituir 4% da molécula da vitamina B12 (cobalamina) (KIM; GHERASIM; BANERJEE, 2008). Em concentrações elevadas, além de apresentar propriedades cancerígenas, pode inibir os mecanismos de reparo e alterações nas cromátides irmãs no DNA, além de induzir ao estresse oxidativo gerando ER que causam danos ao DNA (GALANIS; KARAPETSAS; SANDALTZOPOULOS, 2009).

A exposição ao Co pelas vias aéreas e dérmica pode provocar a sensibilização, que pode ser regulada por linfócitos T *helper*. O Co também pode interagir com proteínas imunológicas, como os anticorpos, resultando na imunossensibilização. Os íons  $\text{Co}^{3+}$  diminuem a proliferação de linfócitos B e T, e a liberação das citocinas IL-2, IL-6 e IFN-gama (ATSDR, 2004).

### 2.5.4 Cobre (Cu)

O Cu é utilizado nas indústrias e em diversas finalidades domésticas comuns, constituindo-se um poluente ambiental altamente relevante. As partículas do metal são liberadas na atmosfera na forma de poeira, transportadas pelo vento de

fontes como erupções vulcânicas e ações antropogênicas (KUMAR et al., 2016). A população, de modo geral, pode ser exposta ao Cu pela inalação, ingestão de alimentos e água e, também, pelo contato dérmico (ZIETZ et al., 2003). Indivíduos saudáveis residentes próximos a fontes de emissão de Cu, e os trabalhadores dessas indústrias podem estar expostos a altos níveis de Cu (KUMAR et al., 2016).

O Cu é um elemento químico encontrado nos organismos vivos na forma  $\text{Cu}^+$  e  $\text{Cu}^{2+}$ . No corpo humano, é um cofator de muitas enzimas que participam das reações redox, como citocromo C oxidase, ascorbato oxidase, SOD, atuando ainda no transporte de elétrons. A absorção do Cu ocorre no intestino e ele é armazenado no fígado. No sangue, está ligado à proteína albumina ou ao aminoácido histidina (JOMOVA; VALKO, 2011).

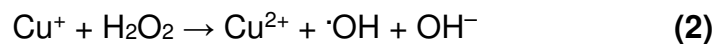
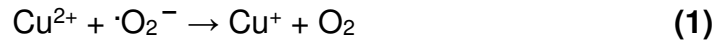
A homeostase do Cu é extremamente regulada, devido ao fato de o metal ser muito tóxico em níveis elevados. Alterações na homeostasia do metal ou exposição ambiental elevada ao Cu podem desencadear o deslocamento de outros metais nos componentes celulares, a ligação inadequada em proteínas e a geração do estresse pelas EROs, devido à atividade redox do metal, além de outros efeitos possíveis que podem ser desencadeados no organismo (MACOMBER; IMLAY, 2009), incluindo danos no fígado e nos rins, provocando anemia e imunotoxicidade (UAUY; MAASS; ARAYA, 2008).

O Cu pode se ligar em grupos tióis de algumas enzimas, como a glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD) e a glutathione redutase, interferindo na função dessas enzimas, e gerar ER, acarretando danos às células (KUMAR et al., 2016).

O Cu é um componente central da enzima SOD com efeitos antioxidantes; é um componente importante da ceruloplasmina, proteína que contém em torno de 95% de Cu sérico, e exerce função protetora das células em eventuais danos provocados por ER. O metal apresenta propriedades anti-inflamatórias no organismo (JOMOVA; VALKO, 2011; SAHEBARI et al., 2014).

Na forma livre, o Cu quase não é encontrado no interior das células. O metal atua como catalisador na formação de ERO nas reações de Fenton e Haber-Weiss. Dois mecanismos estão envolvidos na maneira em que o Cu induz ao estresse oxidativo: o primeiro ocorre pela catálise direta na formação de ERO pela reação de Fenton; o segundo é a diminuição dos níveis da proteína glutathione, em decorrência da exposição de níveis elevados de Cu (JOMOVA; VALKO, 2011).

Os íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Cu}^+$  atuam nas reações de oxidação e redução. Os íons  $\text{Cu}^{2+}$ , em contato com o  $\cdot\text{O}_2^-$ , ou com redutores biológicos como a GSH, pode reduzir para íons  $\text{Cu}^+$  na Equação (1). Na forma monovalente, os íons metálicos podem catalisar a formação de ER  $\cdot\text{OH}$  pela decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  na reação de Fenton, Equação (2) (BARBUSIŃSKI, 2009).



A toxicidade do Cu pode ser amenizada pela glutathiona, por quelação direta com o metal, para mantê-lo em estado reduzido, tornando-o indisponível para o ciclo redox. Baixos níveis de glutathiona elevam os efeitos de ERO e o metal fica mais ativo cataliticamente, além de aumentar os níveis de ERO. O Cu mostra toxicidade elevada com a diminuição dos níveis de GSH reforçando ainda mais a função de GSH como um antioxidante celular que atua contra a toxicidade do Cu (JOMOVA; VALKO, 2011).

Uma doença que desencadeia o acúmulo de Cu em diversos órgãos é a de Wilson, hereditária autossômica recessiva, causada por mutações em um gene localizado no cromossomo 13, que codifica a proteína ATP7B (ALA et al., 2007); é capaz de provocar uma grande variedade de sintomas, inclusive anéis na córnea, denominados Kayser-Fleischer (HUSTER, 2010). A população mundial apresenta prevalência de 1/30.000 com incidência de 15-25 por milhão (ALA et al., 2007).

A doença de Menkes (MD) é neurodegenerativa rara, causada pela mutação no gene ATP7A no cromossomo X, que codifica a enzima ATPase. Esta é essencial no metabolismo e no transporte de Cu (MENKES et al., 1962). As manifestações multissistêmicas na doença de Menkes resultam na deficiência grave de íons de Cu reduzido nas células enteral não enviados para a circulação periférica (WENG et al., 2016), desencadeando diversos sintomas, como degeneração neuronal, retardo mental, fraturas ósseas e aneurismas aórticos (URIU-ADAMS; KEEN, 2005). É uma doença rara com uma incidência populacional de 1/140.000 a 1/300.000 (TØNNESEN; KLEIJER; HORN, 1991; ZLATIC et al., 2015). Os mecanismos na patogenia de Menkes são extremamente relevantes para compreender a participação do Cu e o seu envolvimento em diversos mecanismos no

organismo (RABIK; DOLAN, 2007; INESI; PILANKATTA; TADINI-BUONINSEGNI, 2014).

### 2.5.5 Zinco (Zn)

O Zn geralmente é encontrado na forma iônica  $Zn^{2+}$ ; é hidrofílico e precisa de transportadores especializados para atravessar a membrana celular e chegar ao citoplasma. A concentração sérica de Zn pode estar diminuída na presença de outros cátions divalentes que estejam em níveis elevados na corrente sanguínea (BONAVENTURA et al., 2015).

Funções importantes estão atribuídas ao Zn e são consideradas fundamentais no crescimento celular; ele estimula a transcrição gênica, a proliferação de células, participa de reações bioquímicas e possui mecanismo de ação para conferir resistência imune (YILMAZ et al., 2005).

A metalotioneína é uma proteína importante que atua como regulador na homeostase do Zn e a ausência dessa proteína pode alterar funções no sistema imunológico (HAASE; RINK, 2014). Diversas metaloproteínas são constituídas por Zn; apresentam coordenação tetraédrica por quatro ligantes, geralmente enxofre e nitrogênio na cadeia lateral de aminoácidos e em menor proporção oxigênio, em aspartato e glutamato (BRYLINSKI; SKOLNIC, 2011).

Na forma iônica, vários efeitos antioxidantes são atribuídos aos íons  $Zn^{2+}$ , que podem reduzir a geração de radicais livres pela inibição da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase). Níveis deficientes de íons  $Zn^{2+}$  contribuem para o estresse oxidativo, aumentando a produção de citocinas inflamatórias. Outro fator importante é que  $Zn^{2+}$  compete com íons  $Fe^{2+}$  e  $Cu^{2+}$  para se ligar a membranas celulares, deslocando esses metais e catalisando a produção de ERO como o  $\cdot OH$  e  $H_2O_2$  (PRASAD, 2014).

Estado de imunidade nutricional é um conceito aplicado em casos nos quais os íons metálicos são sequestrados dos patógenos para que os nutrientes considerados essenciais sejam escassos, e com isso interferem no crescimento de microrganismos. Essa situação é mais comum com os íons  $Zn^{2+}$  e  $Fe^{2+}$  (KEHL-FIE; SKAAR, 2010). Por outro lado, a intoxicação também pode atuar no combate aos patógenos intracelulares; no fagolisossomo, os macrófagos aumentam a

concentração de íons como  $Zn^{2+}$  e  $Cu^{2+}$  e levam à intoxicação dos microrganismos invasores (BOTELLA et al., 2012).

Suplementos de Zn têm sido eficientes em processos infecciosos e inflamatórios, reduzindo os marcadores de estresse oxidativo. As maiores alterações no metabolismo do Zn estão associadas aos processos inflamatórios. Neles, o Zn sérico pode estar diminuído devido a perturbações na hematopoiese ou na função dos leucócitos, que alteram a geração de células mieloides (HAASE; RINK, 2014). Baixa concentração de Zn leva a defeitos na resposta imune, conduz à apoptose e inibe a proliferação celular e o aumento dos níveis de citocinas inflamatórias, que são fatores relacionados diretamente com a doença de LES (ZALUPS; KOROPATNICK, 2010). Suplementos alimentares que contêm Zn podem diminuir as moléculas de adesão celular vascular (VCAM-1) (BAO et al., 2008).

A deficiência do Zn no organismo afeta de forma mais severa o sistema imunológico, que é constituído pelas respostas imunes inata e adaptativa (TURVEY; BROIDE, 2010). Os patógenos, ao entrar no organismo humano, encontram as células do sistema imune inato – os polimorfonucleares (PMNs), os macrófagos e as células NK –, todas envolvidas no reconhecimento e eliminação de agentes invasores. A resposta imune adaptativa é composta pelas células T, pelos linfócitos B e, também, pelas células dendríticas (DCs), fazendo uma ligação entre o sistema imune inato e o adaptativo (BONAVENTURA et al., 2015).

O Zn apresenta função quimioatraente para algumas células imune. Em baixa concentração, os íons metálicos reduzem a quimiotaxia de polimorfonucleares (PMN). Por outro lado, níveis elevados de Zn induzem a quimiotaxia de PMN *in vitro*. O Zn está associado a funções importantes nas células NK, pois a quantidade e a atividade dessas células são dependentes dos níveis séricos do metal. Na deficiência do Zn, a atividade das células NK e as células CD8 são diminuídas (IBS; RINK, 2003).

### **2.5.6 Ferro (Fe)**

O Fe no ambiente pode ser encontrado em sistemas aquáticos e sedimentos de matéria orgânica. A presença do metal em altas quantidades em águas superficiais pode ser devido a atividades de mineração (JONES-LEE; LEE, 2005). O

Fe é um componente essencial para organismos e enzimas como a catalase, proteínas transportadoras de oxigênio hemoglobina e mioglobina. Nos processos biológicos, o metal participa de vários processos redox, em virtude da interconversão de íons  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  (JAISHANKAR et al., 2014).

Íons  $\text{Fe}^{2+}$  são solúveis em líquidos corporais e quando interagem com oxigênio geram ER  $\cdot\text{OH}$ , que podem produzir efeitos danosos ao organismo. Em ambiente aquoso, íons  $\text{Fe}^{2+}$  são muito reativos com oxigênio molecular para formar  $\cdot\text{O}_2^-$ . Íons  $\text{Fe}^{3+}$ , insolúveis em água e meio neutro, precipitam como hidróxido de ferro III ( $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ) (JONES-LEE; LEE, 2005).

Nos sistemas biológicos, o Fe está presente em uma grande quantidade de proteínas e enzimas, atuando como cofator para que estas espécies possam desempenhar as funções de maneira adequada (JAISHANKAR et al., 2014). A maior parte de Fe encontrado no organismo, em torno de 65%, está ligada à hemoglobina, 10% a outras proteínas e enzimas e 25% estão associados a proteínas responsáveis pelo armazenamento de Fe, ferritina e hemossiderina. No plasma, 0,1% de Fe é transportado acoplado a uma proteína conhecida como transferrina (JOMOVA; VALKO, 2011).

O Fe possui atividade redox e pode reagir com oxigênio. Desencadeia a peroxidação lipídica e ainda atua como catalisador na formação de ER  $\cdot\text{OH}$ , que desencadeia efeitos danosos aos tecidos (LOLASCON; DE FALCO; BEAUMONT, 2009). Os  $\cdot\text{O}_2^-$  são produzidos pela enzima NADPH oxidase e ativam mecanismos de defesa contra microrganismos causadores de doenças (JOMOVA; VALKO, 2011).

Várias ER são formadas quando o Fe absorvido no organismo não se liga à proteína e interfere de maneira drástica na concentração de Fe nas células de mamíferos e fluidos biológicos. O Fe não ligado circula livre e, como consequência, tem efeito corrosivo no trato gastrointestinal e em fluidos biológicos. Níveis elevados de Fe livre têm capacidade de penetrar células cardíacas, fígado e cérebro, interferindo na peroxidação lipídica, gerando danos em outras organelas celulares (JAISHANKAR et al., 2014).

O excesso ou deficiência de Fe pode gerar efeitos fisiológicos graves e deletérios no sistema imunológico. Níveis elevados de Fe levam à diminuição da fagocitose, altera as subpopulações de linfócitos T e modifica a maneira em que os linfócitos estão distribuídos nos diversos locais do sistema imunológico. Os linfócitos possuem baixa competência em captar o excesso de Fe na ferritina; isso ajuda a

compreender as alterações no sistema imunológico em indivíduos com excesso de Fe (WALKER; WALKER, 2000).

### **2.5.7 Molibdênio (Mo)**

O Mo é um metal essencial encontrado no ambiente, geralmente em alimentos, água potável, suplementos multivitamínicos e multimineral (MEEKER et al., 2010). As exposições ambientais por Mo têm gerado preocupações devido ao fato de estarem relacionadas com infertilidade masculina, por alterar a qualidade nos parâmetros do sêmen (MEEKER et al., 2008). O Mo tem sido relacionado com outras doenças, como síndrome metabólica, diabetes, problemas cardiovasculares, fraturas, desordem neurodegenerativas e mortalidade (LEWIS; MEEKER, 2015).

O Mo é biodisponível como molibdato ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ); nessa forma, entra na célula e é incorporado por complexos biossintéticos nos cofatores do metal (SCHWARZ; MENDEL; RIBBE, 2009). O Mo é muito flexível no aspecto químico; mostra atividade redox em estados fisiológicos e atua como catalisador nas reações de hidroxilação em condições moderadas envolvendo o carbono (CARDOSO, 2012). Dois sistemas distintos evoluíram para controlar o estado redox e a capacidade catalítica exercida pelo Mo. O metal desempenha, ainda, ações como catalisador eficiente nas reações que envolvem a transferência de oxigênio (SCHWARZ; MENDEL; RIBBE, 2009).

O Mo exibe propriedades biológicas importantes. É componente de muitas enzimas (SCHWARZ, 2016). O tetratiomolibdato é um fármaco anticobre produzido para ser utilizado em indivíduos portadores da doença de Wilson. Nesse caso, o tetratiomolibdato diminui os níveis de cobre e atua como angiogênico e anticancerígeno, devido à inibição de citocinas proangiogênicas dependentes de cobre (HOU et al., 2007).

No corpo humano, o Mo exerce a função de cofator em quatro enzimas: sulfito oxidase, xantina oxidase, aldeído oxidase e como componente da amidoxima mitocondrial. Em cada enzima o Mo está ligado a um complexo orgânico conhecido como molibdopterina, formando o cofator molibdênio (Moco) (NOVOTNY, 2011).

O Mo foi relatado em um estudo no qual uma paciente realizou o implante de duas placas metálicas na região cervical e, após 15 horas, apresentou febre de origem indeterminada e diversos sintomas comuns ao LES. A quantidade de Mo nas placas era de 2% e 8%. Os sintomas foram resolvidos quando as placas foram removidas e, realizados testes dos componentes metálicos, ficou comprovada a reação ao Mo. Isso sugere uma reação de hipersensibilidade pelo Mo que pode atuar com outro componente ambiental e desencadear LES (FEDERMANN et al., 1994).

### **2.5.8 Vanádio (V)**

O V é um metal de destaque ambiental e industrial. No organismo, desempenha funções fisiológicas importantes. É um metal essencial com atividade redox nos processos biológicos (ŚCIBIOR; GOŁĘBIEWSKA; NIEDŹWIECKA, 2013). Existem enzimas, como a haloperoxidase e nitrogenases alternativas, que são dependentes de V. Diversas espécies do metal atuam como cofatores externos, podendo inibir a função de muitas enzimas ou estimular a função de outras (KORBECKI et al., 2012; TSAVE et al., 2016).

Em meios biológicos, é capaz de formar complexos catiônicos e aniônicos em uma faixa de pH de 2,0 a 8,0 (IMTIAZ et al., 2015). Alimentos e atividades industriais são considerados fontes importantes de exposição por V. Apesar de os compostos de V apresentarem baixa toxicidade, esta tem sido associada aos compostos pentavalentes, e em ordem crescente de valência: conforme aumenta a valência, a toxicidade também é elevada (BARCELOUX, 1999a).

Os compostos de V apresentam absorção e distribuição muito diversificada, sendo a inalação e o sistema gastrointestinal as principais vias de absorção, além do contato epidérmico em menor extensão. Os efeitos toxicológicos são amenizados devido à baixa absorção pelo sistema digestivo. A mucosa intestinal e a corrente sanguínea são importantes fontes de absorção do metal. Na corrente sanguínea, a maior parte dos íons são transportados pela transferrina e pela albumina (SILVA, 2011). O V pode se acumular em diversos órgãos do corpo humano, sendo ossos, fígado, baço e rins os de maior acúmulo. O sistema urinário tem sido a via mais importante relacionada à excreção de V no corpo humano (BARCELOUX, 1999a).

A toxicidade do metal na saúde humana depende de vários fatores, como forma química, via de administração e estado de oxidação. O metal pode induzir a apoptose pela produção de ERO. Pelo fato de o V possuir atividade redox, o metal pode desencadear mecanismos de lesão oxidativas, elevar os níveis na geração de ERO e estimular a peroxidação lipídica. O V tem sido associado a efeitos importantes no organismo, dentre elas a ação antioxidante similar à da insulina, da atividade antitumoral, da sinalização de células B e da ativação de múltiplas cascatas de sinalização envolvendo enzimas (ŚCIBIOR; GOŁĘBIEWSKA; NIEDŹWIECKA, 2013; TSAVE et al., 2016).

Na ativação imune induzida por V, os linfócitos T participam na imunidade mediada por células, caracterizadas pelos receptores de células T (TCR) em sua superfície celular. As células T são fundamentais na imunidade humana, na resposta imune adaptativa, praticamente controlada pelas células T. O V atua na sinalização de células T e influencia no número de maturação das células T maduras que migram do timo para o baço (MALISSEN et al., 2014). O V é capaz de alterar a expressão de células T *helper* CD4<sup>+</sup> (Th), que atuam como iniciador e regulador das respostas imunológicas humoral e celular contra microrganismos e outros antígenos (HAFFNER; MIETTINEN; STERN, 1997; TSAVE et al., 2016).

O V interage com várias interleucinas, inclusive com a IL-2, que tem como função regular a tolerância do sistema imune e a autoimunidade através da atuação nas células T (STOW; MURRAY, 2013; ANESTAKIS et al., 2015).

Da atividade do V, pentóxido de vanádio (V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) inibe a secreção de citocinas pró-inflamatórias e a proliferação celular, induz a apoptose e modifica receptores negativamente à expressão das interleucinas, principalmente IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , TNF- $\gamma$ . Metavanadato de amônio (NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>) e (V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) influenciam a produção de citocinas imunoregulatórias e alteram a imunidade mediada por células (TSAVE et al. 2016).

### **2.5.9 Lítio (Li)**

O Li é um metal alcalino que pode ser encontrado na crosta terrestre em quantidades muito pequenas, em torno de 0,004%. É obtido de minerais como espodumena, lepidolite, amblygonite e eucryptite e na planta conhecida como tabaco

(LEAL; FERNANDES, 2002). Traços de Li são encontrados em alguns alimentos, na água e nos tecidos vivos (MACDONALD et al., 2014).

As propriedades químicas do Li são semelhantes ao sódio (Na) e ao potássio (K), diferindo devido ao seu menor tamanho. Uma característica importante é o uso do Li em fármacos e, ainda, pelo fato de ser um agente terapêutico não metabolizado no organismo, pode ser quantificado em fluídos biológicos (O'BRIEN; KLEIN, 2009). A eliminação do Li no organismo humano ocorre principalmente pela urina (BAUER et al., 2003).

Não há certeza sobre o Li ser essencial para o crescimento ou o desenvolvimento; no entanto, não há evidências sobre a deficiência do metal em humanos. Assim, não é necessário solicitar dosagens de Li em indivíduos que não fazem uso de fármacos compostos pelos sais do metal (MACDONALD et al., 2014). Normalmente, as concentrações de Li em fluídos biológicos são inferiores a  $0,2 \text{ meq L}^{-1}$  (TIMMER; SANDS, 1999). Os níveis de Li estabelecidos para fins terapêuticos variam de  $0,6$  a  $1,5 \text{ meq L}^{-1}$  em soro ou plasma (OKUSA; CRYSTAL, 1994). As concentrações de Li de  $0,6$  a  $1,2 \text{ meq L}^{-1}$  são os valores esperados nos casos de tratamento de desordem bipolar; nos episódios maníaco agudos, estes níveis podem variar de  $0,8$  a  $1,5 \text{ meq L}^{-1}$  (FINLEY; WARNER; PEABODY, 1995). Não são preconizados níveis de Li acima de  $1,5 \text{ meq L}^{-1}$  devido ao potencial tóxico exercido pelo metal (OKUSA; CRYSTAL, 1994).

O Li possui algumas vantagens, como baixo custo e boa eficácia nos tratamentos clínicos. No entanto, o uso de medicamentos contendo Li vem diminuindo. Nos Estados Unidos da América, o divalproato de sódio é o medicamento mais utilizado para o tratamento bipolar e, de forma similar, também houve diminuição na Europa. Entre os motivos, há relatos sobre a necessidade de monitorar os níveis séricos relacionados ao perfil de tolerância e os efeitos adversos (MACDONALD et al., 2014).

Entre as aplicações de Li e seus compostos, o carbonato de lítio ( $\text{Li}_2\text{CO}_3$ ) tem sido usado como fármaco em indivíduos portadores de desordens psiquiátricas ou na depressão, associado a outro medicamento. O Li possui alto desempenho, atuando como neuroprotetor e neurotrófico (ZUNG; MICHELON; CORDEIRO, 2010).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

- Determinar um painel de biomarcadores laboratoriais associando metais, para diagnóstico e monitoramento da resistência à insulina em pacientes com LES e em indivíduos saudáveis.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Quantificar e comparar a concentração plasmática de metais em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico e indivíduos saudáveis (controle);
- Avaliar quais metais estariam envolvidos com a resistência à insulina;
- Correlacionar os níveis plasmáticos de metais com os biomarcadores laboratoriais de atividade da doença.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 ASPECTOS ÉTICOS**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (UEL) – CAAE 01865212.0.0000.5231 parecer CEP/UEL n° 205.328. Os pacientes receberam orientações sobre a pesquisa e a participação voluntária no projeto. Um termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) foi obtido dos indivíduos envolvidos na pesquisa ou de seus responsáveis.

### **4.2 PACIENTES (POPULAÇÃO DE ESTUDO)**

Participaram deste estudo 225 indivíduos, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 69 anos, sendo 105 indivíduos com LES atendidos no Ambulatório de Reumatologia do Hospital Universitário de Londrina, Paraná, Brasil, e 120 indivíduos saudáveis, selecionados entre doadores de sangue do Hemocentro Regional de Londrina. Informações referentes ao estilo de vida e histórico médico foram obtidos a partir de avaliação clínica de cada paciente.

O diagnóstico de LES foi realizado a partir dos critérios revisados do Colégio Americano de Reumatologia (CAR) 1997 (HOCHBERG, 1997). A atividade da doença foi determinada pela utilização do escore SLEDAI, um índice global que inclui 24 critérios clínicos e laboratoriais específicos. Nesse sistema, a atividade da doença pode variar de 0 a 105 pontos (BOMBARDIER et al., 1992).

### **4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

Os critérios de exclusão no grupo controle foram: presença de doenças crônicas infecciosas, doenças autoimunes, câncer, doenças cardíacas, renais crônicas, insuficiência hepática e utilização de terapia para reposição hormonal. Fármacos estabilizadores de humor à base de Li e suplementos minerais. Nos pacientes com LES, os critérios de exclusão foram: presença de doenças crônicas

infecciosas, câncer e outras doenças autoimunes, além da utilização de terapia para reposição hormonal, medicações estabilizadoras de humor à base de Li e suplementos minerais.

#### **4.4 MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS**

A massa corpórea foi avaliada com aproximação de 0,1 kg utilizando uma balança eletrônica e com os pacientes vestindo roupas leves, sem sapatos, no período da manhã; a altura foi medida com precisão de 0,1 cm, utilizando um estadiômetro. O índice de massa corpórea (IMC) foi calculado como o peso (kg) dividido pela altura (m) ao quadrado.

#### **4.5 COLETA DE AMOSTRAS**

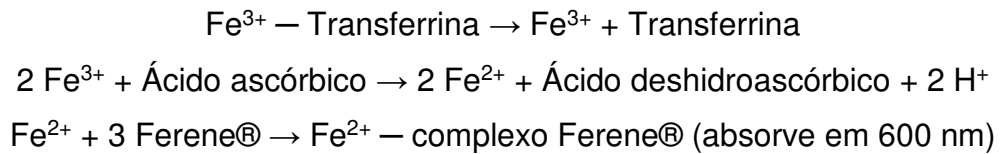
Após jejum de 12 horas, as amostras sanguíneas foram coletadas por punção venosa em tubos de soro a vácuo estéreis. O material foi imediatamente encaminhado ao laboratório para registro, processamento e armazenamento das amostras. O soro foi obtido por centrifugação durante 10 minutos a 3000 rotações por minutos (rpm) e armazenados em freezer -80 °C. Todos os pacientes e controles e suas respectivas amostras foram identificados por número e letra, para garantir o anonimato e a confidencialidade dos indivíduos e dos resultados obtidos.

#### **4.6 MARCADORES LABORATORIAIS**

##### **4.6.1 Marcadores Bioquímicos**

A quantificação de glicose foi realizada pelo método enzimático UV (hexoquinase); a creatinina foi quantificada por princípio cinético (Jaffe) e o Ferro (Fe), por colorimetria Ferene. Todos realizados por autoanalisador bioquímico (*Dimension Dade AR Dade Behring Deerfield, IL, EUA*), utilizado kits Dade Behring®.

Os métodos colorimétricos para a quantificação do Fe, em geral, têm em comum a reação do  $\text{Fe}^{3+}$  sendo reduzido em  $\text{Fe}^{2+}$  mediante um forte agente redutor. O princípio para análise é que em condições ácidas o  $\text{Fe}^{3+}$  ligado à proteína transferrina é liberado na presença do ácido ascórbico (agente redutor), o  $\text{Fe}^{3+}$  é reduzido a  $\text{Fe}^{2+}$ . O  $\text{Fe}^{2+}$  forma um complexo de cor azul com sal dissódico de ácido 5,5'(3-(2-piridil)-1,2,4-triazina-diil)-bis-2-furansulfônico (Ferene®). A absorvância do complexo é medida por uma técnica de ponto final bicromática (600, 700 nm) e é diretamente proporcional à concentração de Fe no soro. As reações ocorrem conforme as Equações descritas abaixo (Siemens Healthcare Diagnostics)<sup>7</sup>.



#### 4.6.2 Marcadores Imunológicos

Os níveis de insulina foram avaliados por imunoensaio em micropartícula com quimioluminescência (Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). Os fatores de complemento sérico C3 e C4 e níveis de proteína C reativa de alta sensibilidade (PCR) foram medidos usando um ensaio nefelométrico (Behring Nephelometer II, Dade Behring, Marburg, Alemanha). Os anticorpos anti-DNA de dupla hélice (anti-dsDNA) foram quantificados por imunoensaio enzimático (ELISA, anti-dsDNA, Orgentec Diagnostika, GmbH, Germany) e foram considerados significativos quando os títulos  $\geq 20$  IU/mL.

---

<sup>7</sup> As informações foram tiradas das bulas dos reagentes utilizados.

### 4.6.3 Avaliação da Resistência à Insulina

O modelo de homeostase que avalia a resistência à insulina (HOMA-IR) foi utilizado como uma medida que determina a sensibilidade à insulina (HAFFNER; MIETTINEN; STERN, 1997).

$$\text{HOMA-IR} = [\text{insulina em jejum } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glicose em jejum } (\text{nmol L}^{-1})] / 22,5.$$
 A resistência à insulina é considerada quando  $\text{HOMA-IR} \geq 2,114$  (CHUNG et al., 2008).

## 4.7 CURVA DE CALIBRAÇÃO

Água ultrapura (resistividade  $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ) gerada pelo sistema Milli-Q (Milipore), foi utilizada para a diluição do ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) concentrado suprapuro 65% e também no preparo da solução padrão metálico multielementar Merck nas concentrações de 0, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 75 e  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . O ródio foi utilizado como padrão interno em todas as análises. Frascos e vidrarias utilizados na preparação dos reagentes e diluições foram previamente tratados em uma solução de  $\text{HNO}_3$  10% por 24 horas.

### 4.7.1 Quantificação de Metais por ICP-MS

A espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) foi utilizada para análise dos metais-traços de (Li, V, Co, Cu, Zn, Mo, Cd e Pb). As informações sobre a configuração do equipamento estão descritas na Tabela 1. É importante ressaltar que o Fe foi quantificado por colorimetria Ferene.

As amostras, pelo fato de ficarem armazenadas no *freezer*, foram recentrifugadas por 10 minutos a 2.500 rpm e o sobrenadante livre de hemólise e lipemia foi utilizado na quantificação dos metais. As amostras sorológicas de todos os pacientes foram diluídas 1:20 em uma solução aquosa de  $\text{HNO}_3$  1%. Foram pipetados 0,25 mL de amostras (soro) dos criotubos e adicionados em 4,75 mL de  $\text{HNO}_3$  1% em tubos cônicos de 15,0 mL e após filtrar em membrana hidrofílica  $0,22 \mu\text{m}$  de éster de

celulose, dispensados 10 µL de padrão interno (Rh) em todas as amostras e fez-se a injeção no ICP-MS (Varian 820MS).

**Tabela 1** – Condições operacionais na quantificação dos metais ICP-MS

PARÂMETRO	CONDIÇÃO
Frequência de rádio (rf)	1,4
Vazão de argônio	
Nebulizador e taxa aspiração (L min <sup>-1</sup> )	0,21
Plasma (L min <sup>-1</sup> )	17
Taxa de aspiração amostra (s)	30
Padrão interno	Rh
Modo de detecção	<i>Peak hopping</i>
Número de replicatas	10
Amostrador ( <i>skimer</i> )	10
Isótopo	<sup>65</sup> Zn, <sup>63</sup> Cu, <sup>51</sup> V, <sup>7</sup> Li, <sup>207</sup> Pb, <sup>112</sup> Cd, <sup>96</sup> Mo, <sup>59</sup> Co

**Fonte:** O próprio autor.

Neste estudo, o uso das membranas hidrofílicas teve como finalidade eliminar a presença de interferentes, como precipitados de proteínas. O procedimento fez-se necessário em virtude do tempo entre a coleta e a análise e também pelo fato das amostras diluídas em HNO<sub>3</sub> 1,0% constituírem uma solução aquosa. Convém ressaltar que o uso de membranas hidrofóbicas nessa metodologia poderia dificultar o processo de filtração.

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de componentes principais (ACP) é uma ferramenta estatística utilizada para análise exploratória de dados e, também, para realizar modelos preditivos, empregada em diversas áreas de estudo. É uma metodologia baseada em álgebra linear e composta por regras sequenciais pelo uso de diversos passos para reduzir a dimensão dos dados, pois as técnicas utilizadas para

quantificação apresentam muitas variáveis em relação ao número de amostras (RINGNÉR, 2008).

A ACP é um processo de transformação de vetor ortogonal de um conjunto de dados originais das variáveis correlacionadas em um conjunto numérico de variáveis que não estão correlacionadas linearmente, e esse novo conjunto é denominado Componentes Principais (CP) (GUEDES et al., 2012). O uso da ACP possibilita a utilização de poucas variáveis. As amostras são dispersas em gráfico, no qual se pode averiguar o comportamento visual dos dados e julgar se as amostras formam um conjunto (RINGNÉR, 2008).

Procedimentos estatísticos nos quais se aplica ACP facilitam a determinação de componentes relevantes que explicam a maior parte da variância do sistema. A metodologia busca manter relações importantes nos dados quando se reduz a dimensão dos dados originais. A primeira componente principal (CP1) é a combinação linear das variáveis com contribuição máxima da variância total; a segunda componente principal (CP2) não é correlacionada à CP1 e contribui com o máximo de variância restante; a terceira componente principal (CP3) explica a variância máxima dos dados, sendo não correlacionada com as componentes CP1 e CP2, e assim sucessivamente, até a variância ser analisada para o sistema todo (GAJBHIYE; SHARMA; AWASTHI, 2015).

O número de CPs é igual ou menor que o número de variáveis originais e os resultados são expressos em termos de pontuações (*scores*) para cada componente. A ACP é realizada pela decomposição de autovalores de uma matriz submetida a um pré-processamento dos dados, denominado autoescalamento, no qual cada valor é subtraído da média e dividido pelo desvio padrão, para que todas as variáveis tenham a mesma dimensão, e por questão de escala métrica dos dados (BRO; SMILDE, 2014).

A análise hierárquica de agrupamentos (HCA) é uma técnica empregada para agrupar os dados da amostra (MINGOTI, 2005). Tem como característica principal mostrar padrões semelhantes em grupos (HAIR, 2005). A distância entre as amostras ou pontos demonstra semelhança nos parâmetros avaliados. A similaridade entre os grupos é descrita pela aplicação da distância euclidiana e a conexão entre eles se dá através do vizinho mais próximo, e os resultados são expressos em dendrogramas (FERREIRA, 2002; MINGOTI, 2005).

Além do procedimento estatístico mencionado anteriormente, outros métodos foram utilizados. O tamanho estimado da amostra foi feito utilizando o programa GPower com poder de 0,80, no nível  $\alpha < 0,05$ , e com tamanho de efeito de 0,15. Os dados categóricos foram analisados por teste de qui-quadrado ou pelo teste exato de Fisher quando apropriado. O teste de Komogorov-Smirnov foi realizado para verificar a normalidade da distribuição de dados. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Mann-Whitney ou por teste t Students, conforme apropriado, e os dados foram expressos como mediana e interquartis (1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup>) ou média ( $\pm$ desvio padrão; SD), respectivamente. A regressão logística binária foi realizada para verificar as associações e o teste de correlação de Spearman também foi verificado. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Um programa de análise estatística SPSS versão 20.0 foi utilizado para as avaliações.

#### **4.8.1 Seleção das Variáveis**

As variáveis escolhidas para a Análise de Componentes Principais (ACP) e Agrupamento Hierárquico foram: insulina sérica quantificada por quimioluminescência, glicose sérica enzimática UV (Hexoquinase) e índice de resistência à insulina (HOMA-IR) por cálculo relatado na seção 4.6 Marcadores Laboratoriais. Buscou-se, portanto, uma correlação entre os níveis de alguns metais no organismo com as três primeiras variáveis, que normalmente são influenciadas na fisiopatologia do LES.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com os resultados obtidos na quantificação dos metais e os marcadores laboratoriais, foram calculados a média e os respectivos desvios padrão nos grupos controle e LES, juntamente com os valores de referência, e construída a Tabela 2.

**Tabela 2** – Concentração dos metais e marcadores laboratoriais com seus respectivos desvios padrão e valores de referência nos grupos controle e LES

Variáveis	Grupo Controle (n= 120)	Grupo com LES (n= 105)	Valor de referência
Insulina ( $\mu\text{U mL}^{-1}$ )	9,2 $\pm$ 5,5	13,7 $\pm$ 8,4	2,7 – 10,4
Glicose (mg dL $^{-1}$ )	93 $\pm$ 11,2	85 $\pm$ 10,8	70 – 99
HOMA-IR	2,157 $\pm$ 1,109	2,676 $\pm$ 1,144	< 2,114
Fe ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	1000,0 $\pm$ 439,4	770,6 $\pm$ 314,1	600 – 1700
Li ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	13,6 $\pm$ 32,3	59,3 $\pm$ 44,6	< 0,8
V ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	17,5 $\pm$ 4,7	12,0 $\pm$ 4,8	< 10,0
Co ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	2,2 $\pm$ 0,9	<0,3	< 0,3
Cu ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	1126,8 $\pm$ 396,9	1024,5 $\pm$ 288,4	< 1000
Zn ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	3286 $\pm$ 920	2532 $\pm$ 578	< 1000,0
Mo ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	3,03 $\pm$ 2,37	3,24 $\pm$ 0,83	< 3,0
Cd ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	15,5 $\pm$ 17,9	3,8 $\pm$ 1,2	< 0,1
Pb ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	40,3 $\pm$ 15,7	25,2 $\pm$ 8,5	<13,7

Fonte: O próprio autor.

Do conjunto de dados para as amostras de pacientes com LES e do grupo controle foram extraídas as componentes principais CP1, CP2 e CP3, cujos autovalores estão acima de 1,0, critério de seleção para as CPs. A dispersão das amostras para CP1 e CP2 está descrita na Figura 4, e para CP1 e CP3, na Figura 5.



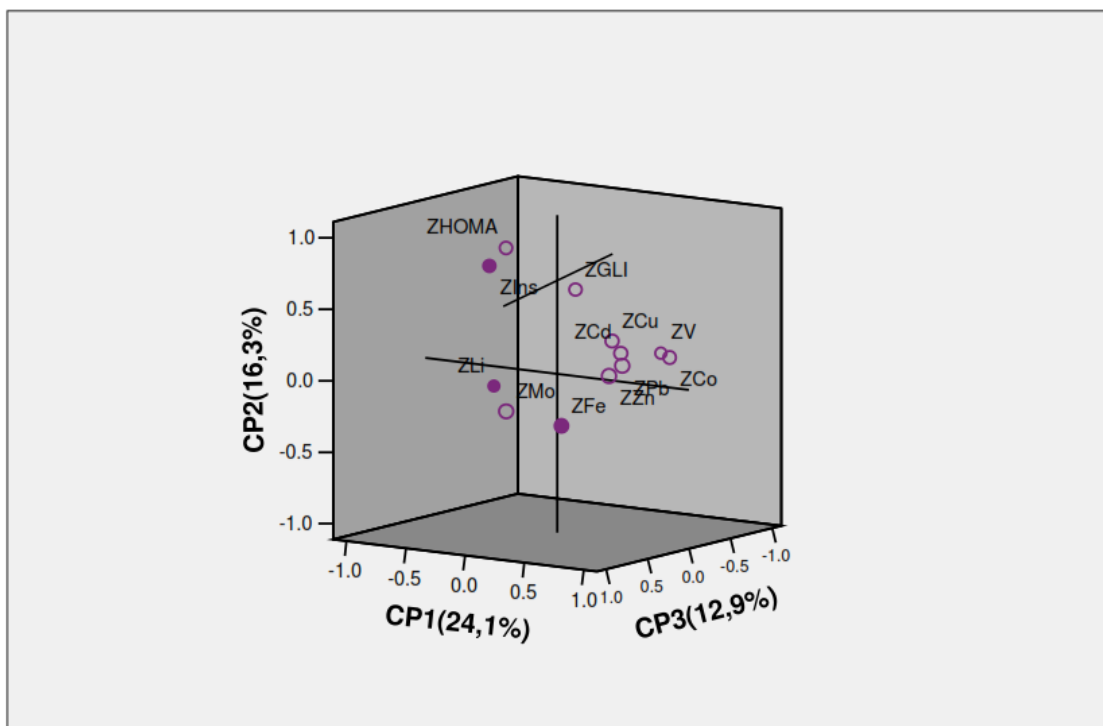


As amostras controle estão agrupadas principalmente nos quadrantes da direita por influência dos metais. A diferença na dispersão das amostras para as CP1 e CP2, na Figura 4, com relação às CP1 e CP3, na Figura 5, dá-se pela influência de Mo e Fe nos quadrantes superiores e de V para os quadrantes inferiores.

Em relação à CP3, o V no quadrante inferior direito apresentou concentrações levemente maiores quando comparado com as amostras do quadrante inferior esquerdo, composto por amostras do grupo controle e do grupo LES. Os pesos que compõem a CP3, Mo e Fe, separam amostras quase que exclusivamente do grupo controle no quadrante superior direito, com níveis menores de Mo e maiores de Fe em comparação com as amostras dispersas no quadrante superior esquerdo. Em sua maioria, pacientes do grupo LES apresentaram, portanto, níveis mais elevados de Mo e menos elevados de Fe em relação ao grupo controle.

Os pesos das variáveis estão apresentados em um gráfico tridimensional na Figura 6, em que se observa a influência das variáveis HOMA-IR, insulina e glicose nos quadrantes superiores da esquerda, juntamente com Li no quadrante inferior da esquerda; os metais Cd, Cu, V, Pb e Zn, Mo e Fe aparecem nos quadrantes inferiores.

**Figura 6** – Variáveis dispersas nos quadrantes das CP1, CP2 e CP3

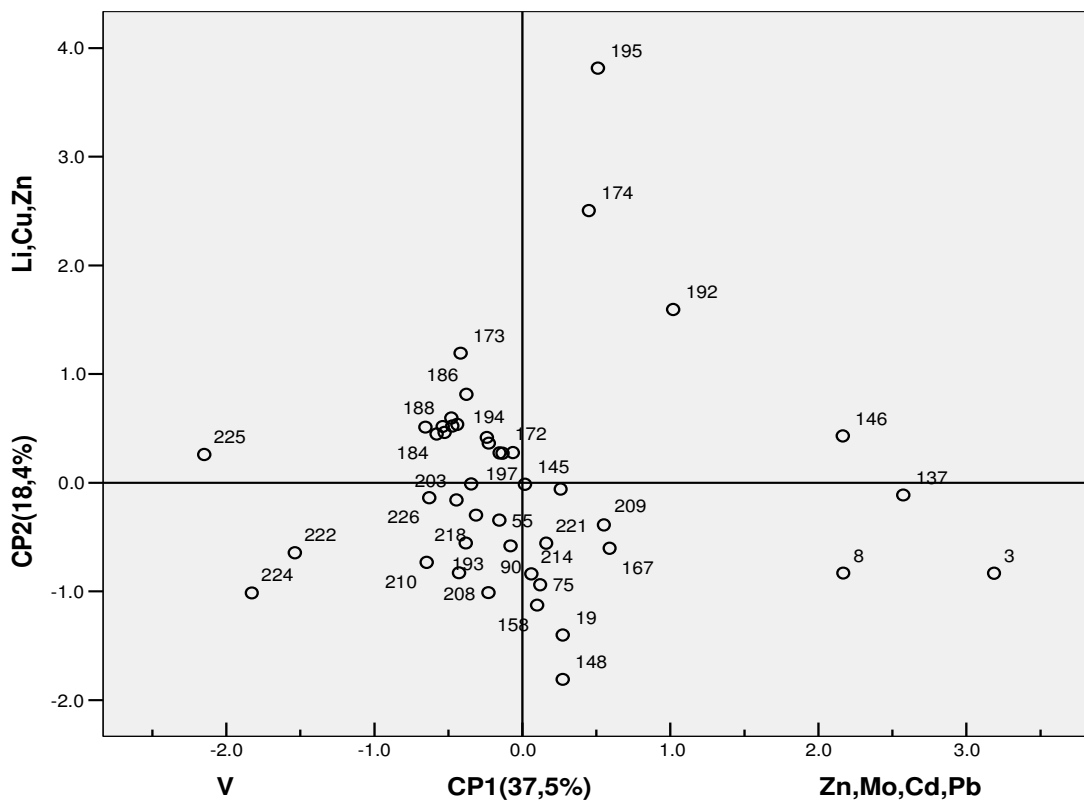


Fonte: O próprio autor.

Neste estudo foi avaliada a relação existente entre metais e a RI em indivíduos saudáveis e pacientes com LES. A separação entre as amostras de LES e controle ocorreu devido às variáveis insulina e Li exibirem concentrações mais elevadas nestas amostras, enquanto os metais Co, Zn, Pb, Cd, Cu e V apresentaram maior influência no grupo controle, sendo seus valores dentro do que preconiza a referência. Ficou evidente a separação das amostras dos pacientes com LES em relação ao controle. A maneira como as amostras ficaram dispersas demonstra possíveis alterações entre o mecanismo biológico envolvido e a interação individual exercida pelos metais sobre o metabolismo dos indivíduos saudáveis e dos pacientes com LES.

Adicionalmente, no estudo estatístico buscou-se a relação entre pacientes com LES com e sem RI. A Figura 7 apresenta a dispersão das amostras nas CP1 e CP2 para pacientes com LES sem RI.

**Figura 7** – Dispersão das amostras nas CP1 e CP2 para pacientes com LES sem RI

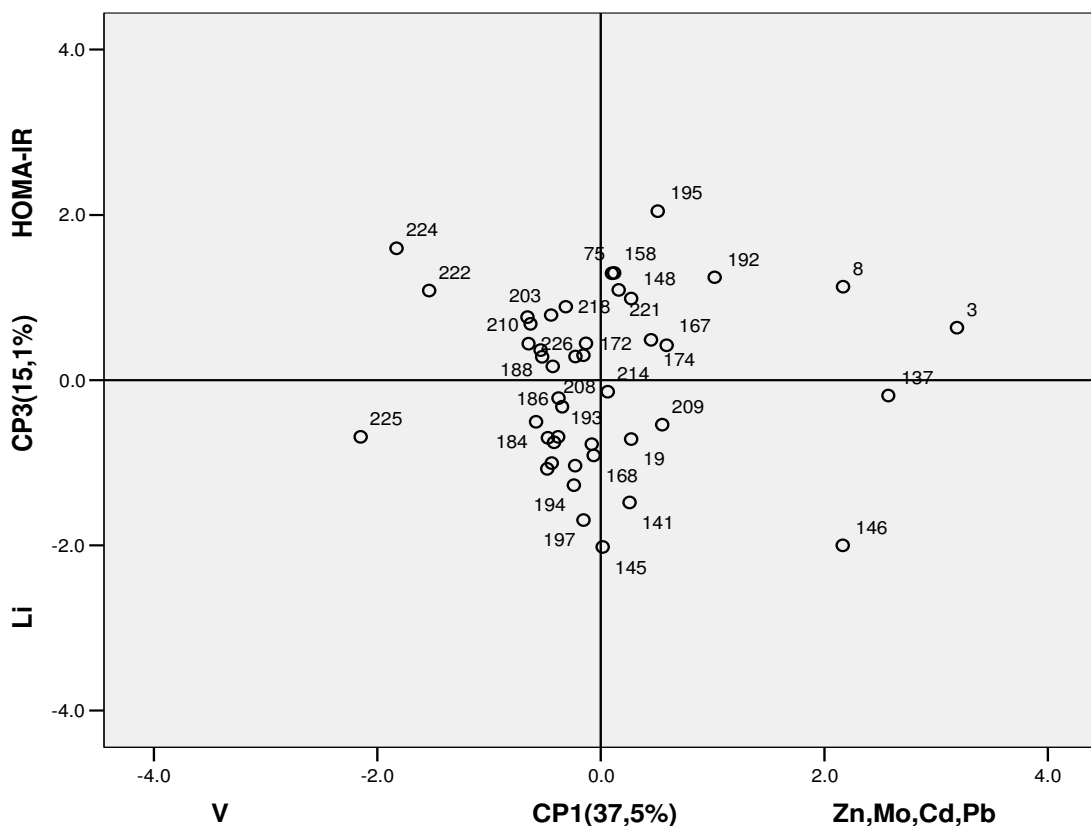


Fonte: O próprio autor.

A CP1 explica 37,5% da variância do conjunto de dados, enquanto a CP2 explica 18,4%. As amostras nos quadrantes da direita, foram separadas das demais amostras devido à maior influência dos metais (Zn, Mo, Cd e Pb). As amostras foram separadas por influência de Li, Cu e Zn nos quadrantes superiores. No quadrante superior direito, quatro pacientes LES foram separadas dos demais, ainda pela influência das variáveis relacionadas à CP2 (Li, Cu, Zn). Nos quadrantes da esquerda a dispersão das amostras está influenciada também pelo V. No quadrante inferior esquerdo, os níveis de V foram maiores nas amostras quando comparados com o quadrante superior esquerdo.

Na Figura 8 as amostras são dispersas, considerando as CP1 e CP3, destacando a influência da variável HOMA-IR em pacientes com LES sem RI nos quadrantes superiores e de Li nos quadrantes inferiores. A CP1 explica 37,5% da variância do conjunto de dados, e a CP3 12,9%. É interessante ressaltar que praticamente os mesmos pacientes com maior influência dos metais Zn, Mo, Cd e Pb na Figura 7, também são separados por HOMA-IR no quadrante superior direito.

**Figura 8** – Dispersão das amostras nas CP1 e CP3 para pacientes com LES sem RI

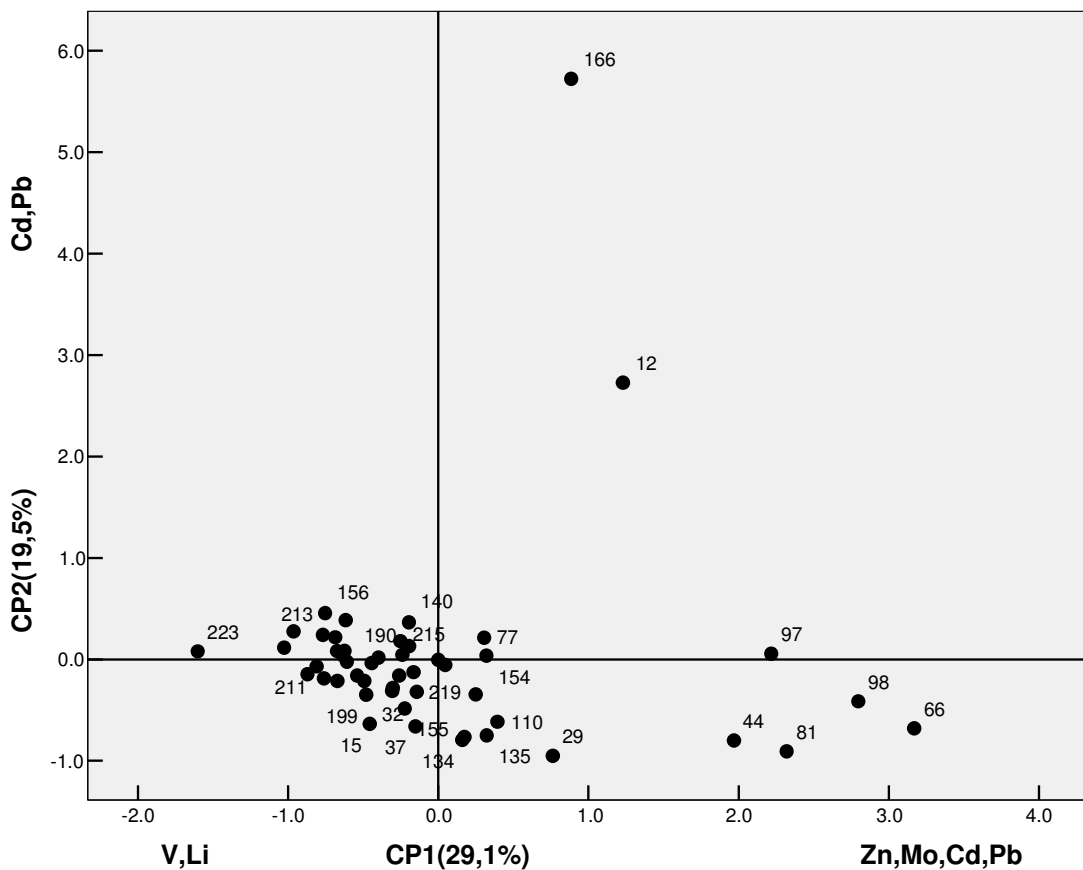


**Fonte:** O próprio autor.

Em relação à CP3 o Li nos quadrantes inferiores apresentou concentrações semelhantes. No entanto, as amostras no quadrante inferior esquerdo apresentaram níveis maiores de V quando comparado com o quadrante inferior direito.

As Figuras 9 e 10 apresentam a dispersão das amostras de pacientes com LES e com RI. Na Figura 9, a CP1 e a CP2 explicam 48,6% da variância do conjunto de dados, sendo que alguns pacientes são destacados pela influência dos metais Zn, Mo, Cd e Pb nos quadrantes da direita, com destaque maior para as amostras 166 e 12, com influência principalmente de Cd e Pb.

**Figura 9** – Dispersão das amostras nas CP1 e CP2 para pacientes com LES com RI

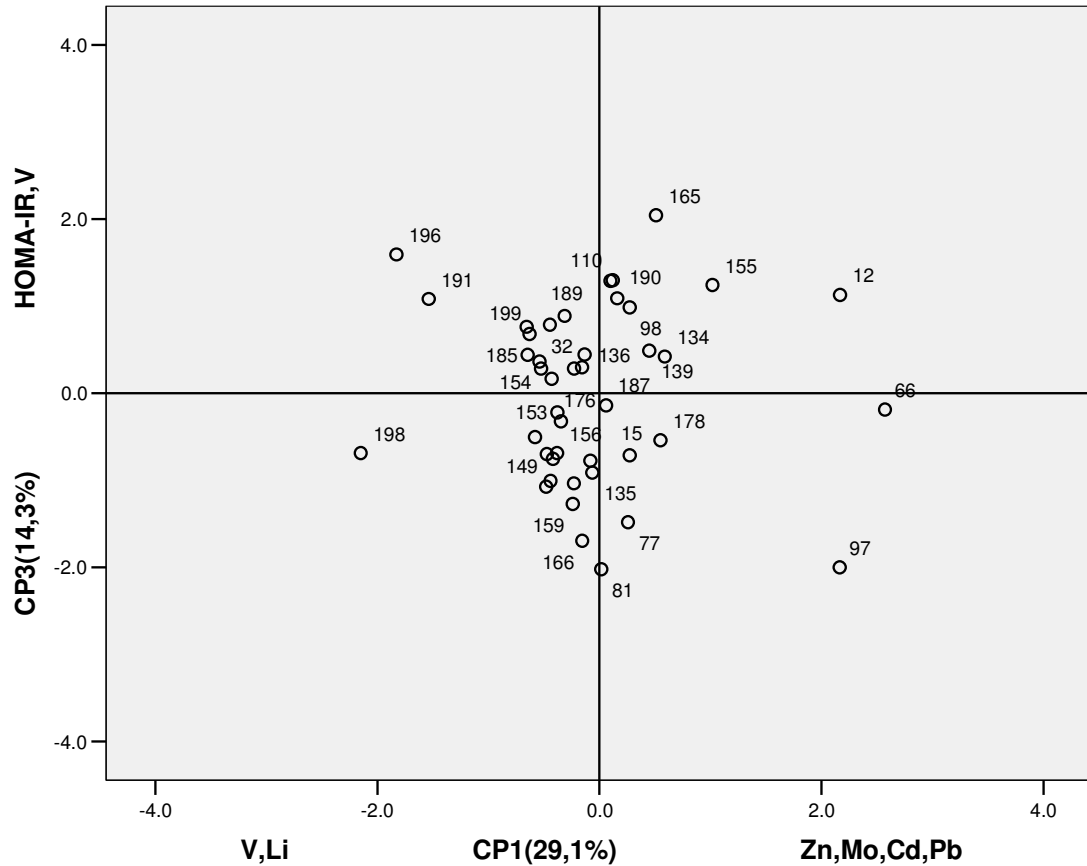


Fonte: O próprio autor.

Na Figura 10, as CP1 e CP3 explicam 43,4% da variância do conjunto de dados. Nesta configuração houve dispersão de um número maior de pacientes sob a influência de HOMA-IR e V nos quadrantes superiores. É interessante observar que os metais Zn, Mo, Cd e Pb separam pacientes no quadrante superior direito, enquanto

V e Li separam pacientes no quadrante superior esquerdo, além das variáveis HOMA-IR e V.

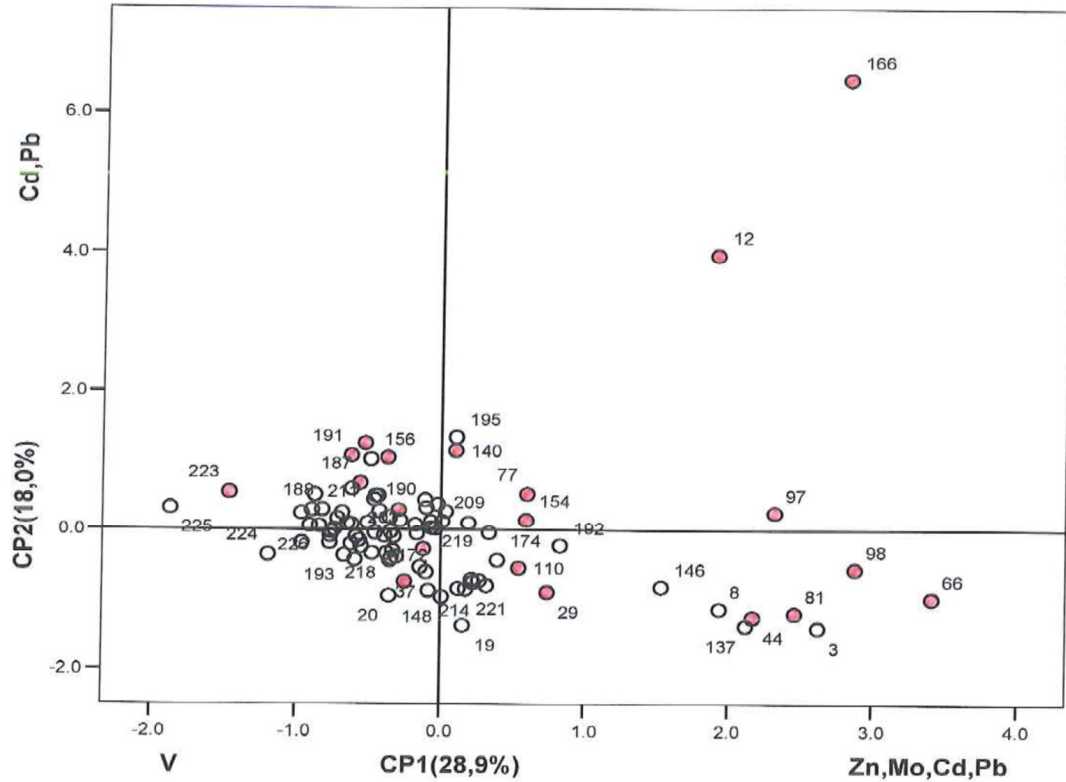
**Figura 10** – Dispersão das amostras nas CP1 e CP3 para pacientes com LES com RI



**Fonte:** O próprio autor.

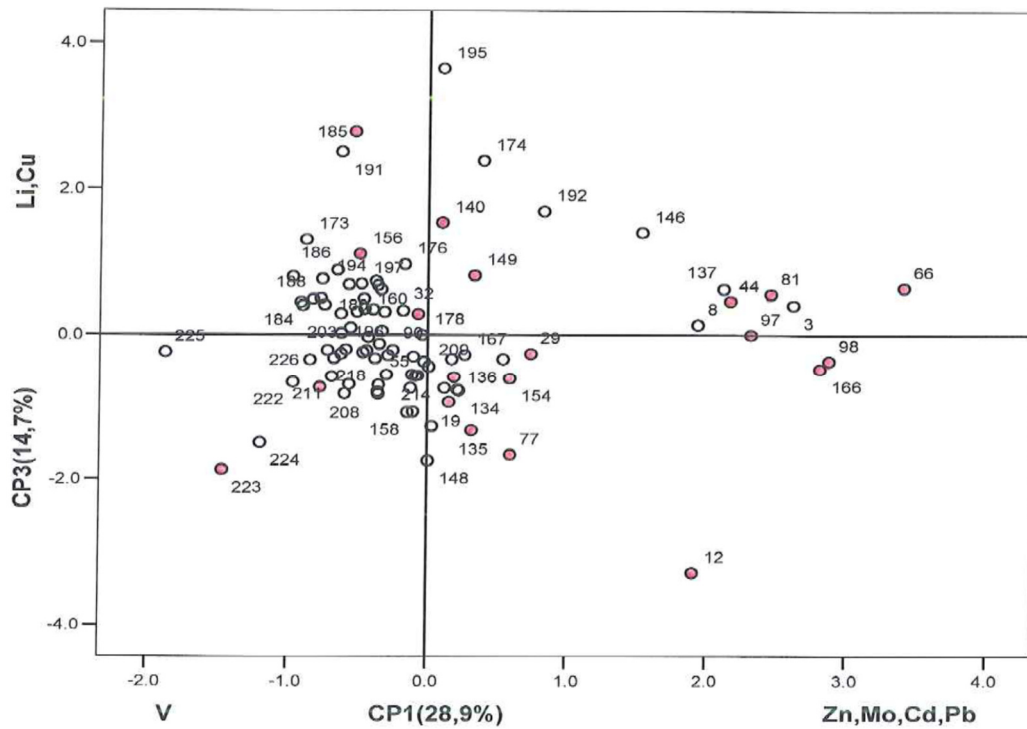
Foi realizada a ACP para o conjunto todo de amostras LES com e sem RI. As Figuras 11 e 12 apresentam a dispersão das amostras com as CP1 e CP2 explicando 46,9% e as CP1 e CP3 explicando 43,6% da variância do conjunto de dados. É interessante observar a separação das amostras LES com RI sob influência de metais tóxicos, Zn, Mo e principalmente Cd e Pb, que separam pacientes nos quadrantes superiores e nos da direita. O V aparece como mais importante na separação de amostras com RI do que sem RI, embora tenha influenciado um bom número de pacientes com RI também. A maioria das amostras LES sem RI ficaram agrupadas próximas ao eixo central na CP2.

**Figura 11** – Dispersão das amostras nas CP1 e CP2 para pacientes LES com e sem RI. As esferas em vermelho representam pacientes com RI



Fonte: O próprio autor.

**Figura 12** – Dispersão das amostras nas CP1 e CP3 para pacientes com LES com e sem RI



Fonte: O próprio autor.



## Parâmetros Demográficos, Clínicos e Laboratoriais

Os resultados da análise estatística univariada foram utilizados para delinear as variáveis explanatórias significativas a serem utilizadas como determinantes de associação independente com diagnóstico de LES nas análises de regressão logística binária. A Tabela 3 apresenta os dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos participantes do presente estudo. Não houve diferença significativa na idade ( $p=0,747$ ) entre os grupos. Foram encontrados significativamente mais caucasianos do que não caucasianos ( $p=0,049$ ) no grupo controle, e mais mulheres do que homens ( $p<0,001$ ) no grupo de estudo LES quando comparado ao grupo controle. O IMC ( $p=0,015$ ) foi consideravelmente maior no grupo LES do que no grupo controle. A média do escore de SLEDAI e os níveis de anti-dsDNA em pacientes com LES foram 3,0 (2,0-6,0) e 54,2 (7,1), respectivamente. Os níveis de insulina ( $p<0,001$ ), HOMA-IR ( $p=0,010$ ) e PCR ( $p=0,016$ ) foram substancialmente maiores, enquanto os níveis de glicose ( $p<0,001$ ) foram significativamente menores em pacientes com LES do que no grupo controle. Não houve diferenças relevantes nos níveis de creatinina ( $p=0,712$ ) e C3 ( $p=0,061$ ) e C4 ( $p=0,114$ ) entre os grupos (Tabela 3).

**Tabela 3** – Dados sociodemográficos e biomarcadores em pacientes com LES e grupo controle

Variáveis	Controles (n= 120)	LES (n= 105)	p
Sexo (F/M)	87/33	100/5	<0,001
Etnia (Caucasiano/ não Caucasiano)	93/27	69/36	0,049
Idade (anos)	37,0 (30,0 – 47,0)	36,0 (28,0 – 51,0)	0,747
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25,8 (0,4)	27,5 (0,6)	<b>0,015</b>
SLEDAI	----	03 (02 – 06)	----
C3 (mg/dL)	116 (107 – 139)	115 (93 – 130)	0,061
C4 (mg/dL)	22,3 (17,5 – 28,8)	20,8 (13,4 – 26,5)	0,114
Anti-dsDNA (U/mL)	----	54,2 (7,1)	----
Creatinina (mg/dL)	0,83 ( $\pm 0,05$ )	0,86 (0,06)	0,712
Insulina ( $\mu$ U/mL)	9,2 (0,5)	13,7 (0,8)	<b>&lt;0,001</b>
Glicose (mg/dL)	89 (83 – 98)	82 (75 – 93)	<b>&lt;0,001</b>

continua

continuação

Variáveis	Controles (n= 120)	LES (n= 105)	p
HOMA-IR	2,12 (0,14)	2,67 (0,18)	<b>0,010</b>
PCR (mg/L)	3,187 (0,401)	6,434 (1,324)	<b>0,016</b>
Lítio (µg/L)	11,5 (6,5 – 19,0)	62,5 (0 – 95,2)	<b>&lt;0,001</b>
Vanádio (µg/L)	18,2 (16,7 – 19,8)	11,9 (9,5 – 15,1)	<b>&lt;0,001</b>
Cobre (µg/L)	1028,4 (857,0 – 1277,1)	997,5 (865,9 – 1085,8)	0,133
Zinco (µg/L)	2907,0 (2460,1 – 4119,1)	2344,9 (2008,9-2677,5)	<b>&lt;0,001</b>
Molibdênio(µg/L)	2,38 (2,03 – 3,38)	3,05 (2,79 – 3,30)	<b>&lt;0,001</b>
Cádmio (µg/L)	3,18 (2,00 – 18,97)	3,08 (3,03 – 3,32)	0,752
Chumbo (µg/L)	36,0 (20,3 – 44,5)	20,0 (18,1 – 24,3)	<b>&lt;0,001</b>

**Fonte:** O próprio autor.

Teste exato de Fisher ou teste qui-quadrado. Dados são expressos como número absoluto. Teste t Student, dados são expressos como média ( $\pm$ SEM). Teste Mann-Whitney, dados são expressos como mediana e interquartil (1º e 3º).

F, feminino; M, masculino; IMC, índice de massa corpórea; SLEDAI, índice de atividade da doença LES; anti-dsDNA, anti-DNA dupla fita; HOMA-IR, modelo de homeostase que mensura a resistência à insulina; PCR, Proteína C reativa.

### **Diferenças nos Elementos-traço e Metais Tóxicos entre Pacientes com LES e Controle**

A Tabela 3 também apresenta os níveis dos metais Li, V, Cu, Zn, Mo, Cd e Pb dos participantes no presente estudo. Os níveis de Li ( $p < 0,001$ ) e Mo ( $p < 0,001$ ) foram significativamente maiores, enquanto os níveis de V ( $p < 0,001$ ), Zn ( $p < 0,001$ ) e Pb ( $p < 0,001$ ) foram sensivelmente menores em pacientes com LES do que controles. Não houve diferenças significativas nos níveis de Cu ( $p = 0,133$ ) e Cd ( $p = 0,752$ ) entre os grupos.

### **Influência de Oligoelementos e Metais Tóxicos no Diagnóstico de LES**

A Tabela 4 mostra o resultado de uma análise de regressão logística binária, com LES como variável dependente e controle como o grupo de referência, e os oligoelementos, metais tóxicos, idade, sexo e etnia como variáveis explanatórias. Li (OR = 1,003, IC 95% = 1,001-1,004,  $p < 0,001$ ) e sexo feminino (OR = 4,533, IC 95% = 1,114-18,442,  $p = 0,035$ ) foram positivamente associados ao diagnóstico de LES,

enquanto Zn (OR = 1,000, IC de 95% = 1,000-1,000, p=0,003), V (OR = 0,970, IC 95% = 0,961-0,980, p <0,001) e Pb (OR = 0,997, IC 95% = 0,995-1,000, p=0,020) foram inversamente associados ao diagnóstico de LES (Tabela 4).

**Tabela 4** – Regressão Logística Binária usando LES como variável dependente (e controle como referência) e variáveis explanatórias

Variáveis	$\beta$	Wald	df	p	OR	IC 95%
Idade (anos)	0.029	2.401	1	0.121	1.029	0.992 – 1.067
Etnia (Caucasiano/não Caucasiano)	- 0,2999	0,359	1	0,549	0,746	0,286 – 1,945
Sexo (F/M)	1,511	4,456	1	0,035	4,533	1,114 – 18,442
Molibdênio ( $\mu\text{g/L}$ )	0,00	0,114	1	0,736	1,000	0,998 – 1,003
Lítio ( $\mu\text{g/L}$ )	0,003	21,405	1	<0,001	1,003	1,001 – 1,004
Vanádio ( $\mu\text{g/L}$ )	-0,030	36,007	1	<0,001	0,970	0,961 – 0,980
Zinco ( $\mu\text{g/L}$ )	0,000	8,649	1	0,003	1,000	1,000 – 1,000
Chumbo ( $\mu\text{g/L}$ )	-0,003	5,449	1	0,020	0,997	0,995 – 1,000

Fonte: O próprio autor.

Resultados são mostrados como média ( $\pm$ SD) ou mediana e interquartil (1º e 3º). OR, odds-ratio; IC, intervalo de confiança; F, feminino; M, masculino.

### Influência de Oligoelementos e Metais Tóxicos na Atividade da Doença entre Pacientes com LES e Controle

Para delinear quais variáveis explanatórias (oligoelementos e metais tóxicos) foram significativamente associadas com o SLEDAI, fizemos uma regressão logística univariada com SLEDAI como variáveis dependentes. A Tabela 5 mostra o resultado dessa análise de regressão univariada.

**Tabela 5** – Dados sociodemográficos e biomarcadores em pacientes com LES divididos em dois grupos: SLEDAI<10 e SLEDAI $\geq$ 10

Variáveis	SLEDAI <10	SLEDAI $\geq$ 10	p
Sexo (F/M)	65/5	35/0	0,105
Etnia (Caucasiano/não Caucasiano)	47/23	23/12	0,663
Idade (anos)	35,0 (28,0-52,0)	39,0 (31,0-51,0)	0,678

continua

continuação

Variáveis	SLEDAI <10	SLEDAI ≥10	p
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	26,0 (23,7-30,1)	27,5 (23,4-33,3)	0,435
C3 (mg/dL)	119 (99-133)	100 (75-125)	<b>0,012</b>
C4 (mg/dL)	25,4 (17,5-29,5)	23,3 (16,7-28,8)	<b>0,005</b>
Anti-dsDNA (U/mL)	15,5 (6,6-56,0)	36,9 (16,5-103,1)	<b>0,023</b>
Lítio (µg/L)	68,3 (0-95,7)	61,7 (22,0-89,6)	0,997
Vanádio (µg/L)	12,1 (9,5-14,7)	11,9 (9,4-15,5)	0,686
Cobre (µg/L)	1000,06 (868,9-1029,9)	997,5 (829,1-1085,8)	0,639
Zinco (µg/L)	2319,4 (2022,7-2747,8)	2409,6 (1984,0-2582,9)	0,911
Molibdênio (µg/L)	3,01 (2,84-3,30)	3,07 (2,70-3,31)	0,625
Cádmio (µg/L)	3,08 (3,04-3,32)	3,07 (3,01-3,30)	0,260
Chumbo (µg/L)	20,0 (18,2-24,2)	19,9 (17,9-24,4)	0,885

**Fonte:** O próprio autor.

Teste exato de Fisher ou teste qui-quadrado. Dados são expressos como número absoluto. Teste Mann-Whitney. Dados são expressos como mediana e interquartil (1º e 3º).

F, feminino; M, masculino; IMC, índice de massa corpórea; SLEDAI, índice de atividade da doença LES; anti-dsDNA, anti-DNA dupla fita.

A atividade da doença medida pelo SLEDAI não foi significativamente predita por nenhum dos oligoelementos estudados. Além disso, não houve diferença no tratamento com medicamentos antimaláricos ( $p=0,952$ ), micofenolato ( $p=0,441$ ) e outros fármacos imunossupressores ( $p=0,571$ ) (dados não apresentados). No entanto, a dose de prednisona foi maior no grupo com  $SLEDAI \geq 10$  em comparação com o grupo  $SLEDAI < 10$  (10 mg/dia vs 5 mg/dia, respectivamente) (dados não apresentados).

### **Correlação entre os Metais e a Atividade da Doença e Resistência à Insulina**

A Tabela 6 mostra a correlação de Spearman entre os metais e a atividade da doença e RI em pacientes com LES e controles saudáveis. Nos indivíduos controle, foi encontrada correlação significativa e positiva entre Cu e PCR ( $r = 0,479$ ,  $p < 0,001$ ). Em pacientes com LES, encontramos correlação significativa e positiva entre Cu e PCR ( $r = 0,547$ ,  $p < 0,001$ ); Cd e glicose ( $r = 0,238$ ,  $p = 0,016$ ) e PCR ( $r = 0,239$ ,  $p = 0,015$ ) e Pb e glicose ( $r = 0,227$ ,  $p = 0,022$ ).

**Tabela 6 –** Correlação de Spearman entre metais e atividade da doença e resistência à insulina em pacientes com LES e indivíduos controle

		SLEDAI	HOMA-IR	GLICOSE	INSULINA	PCR
	Lítio (µg/L)	r -	0,000	0,057	-0,010	-0,088
		p -	0,997	0,541	0,913	0,345
	Vanádio (µg/L)	r -	0,033	0,067	0,011	0,107
		p -	0,723	0,467	0,906	0,252
	Cobre (µg/L)	r -	-0,004	-0,133	0,031	0,479
		p -	0,969	0,149	0,737	<b>&lt;0,001</b>
Controle	Zinco (µg/L)	r -	-0,102	-0,118	-0,044	0,010
		p -	0,269	0,201	0,638	0,914
	Cádmio (µg/L)	r -	0,056	0,179	<b>0,020</b>	0,184
		p -	0,645	0,135	0,868	0,127
	Chumbo (µg/L)	r -	-0,082	-0,041	-0,034	0,045
		p -	0,373	0,654	0,711	0,633
	Cobalto (µg/L)	r -	-0,076	-0,017	-0,066	-0,007
		p -	0,410	0,857	0,480	0,93
	Lítio (µg/L)	r -0,032	-0,093	-0,095	-0,130	-0,010
		p 0,744	0,374	0,344	0,191	0,923
	Vanádio (µg/L)	r 0,149	0,084	-0,056	0,118	0,028
		p 0,130	0,423	0,577	0,235	0,783
LES	Cobre (µg/L)	r -0,094	0,144	0,077	0,081	0,547
		p 0,338	0,166	0,442	0,415	<b>&lt;0,001</b>
	Zinco (µg/L)	r -0,004	0,032	0,172	0,023	-0,113
		p 0,970	0,761	0,087	0,817	0,262
	Cádmio (µg/L)	r -0,340	0,128	0,238	0,056	0,239
		p <b>&lt;0,001</b>	0,218	<b>0,016</b>	0,577	<b>0,015</b>
	Chumbo (µg/L)	r -0,082	0,175	0,227	0,041	-0,047
		p 0,409	0,093	<b>0,022</b>	0,681	0,640

Fonte: O próprio autor.

SLEDAI, índice de atividade da doença LES; HOMA-IR, modelo de homeostase que mensura a resistência à insulina; PCR, proteína C reativa.

### Influência de Oligoelementos e Metais Tóxicos na Homeostase da Glicose

A Tabela 7 mostra os dados sociodemográficos e biomarcadores dos indivíduos divididos por presença ou ausência de RI. Houve diferença na etnia entre

pacientes com LES com e sem RI. Além disso, houve significativamente mais mulheres, e o IMC foi consideravelmente maior em pacientes com RI.

**Tabela 7** – Dados demográficos, clínicos e laboratoriais de pacientes com LES na presença ou ausência de resistência à insulina (RI)

Variáveis	LES sem RI (n= 44)	LES com RI (n= 50)	p
Etnia (Caucasiano/ não Caucasiano)	35/9	29/21	0,025
Sexo (F/M)	40/4	50/0	0,029
Idade (anos)	38,04 (±1,96)	41,42 (±2,18)	0,258
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25,34 (±0,59)	29,31 (±0,86)	<0,001
SLEDAI	4,0 (2,0 – 8,0)	2,0 (0,0 – 6,0)	0,160
HOMA-IR	1,51 (0,96 – 1,92)	3,39 (2,50 – 4,30)	<0,001
Glicose (mg/dL)	77 (±1,0)	91 (±2,0)	<0,001
Insulina (µU/mL)	7,81 (±0,44)	16,60 (±0,92)	<0,001
Duração da doença (anos)	6,0 (3,0 – 13,0)	10,0 (2,5 – 15,5)	0,694
Anti-dsDNA (U/mL)	50,23 (±8,87)	49,17 (±9,56)	0,614
Creatinina (mg/dL)	0,78 (±0,03)	0,94 (±0,13)	0,276
C3 (mg/dL)	110,1 (±3,4)	114,6 (±4,2)	0,413
C4 (mg/dL)	19,91 (±1,22)	21,90 (±1,38)	0,406
<b>Tratamento</b>			
Prednisona	8,0 (5,0 – 15,0)	5,0 (5,0 – 10,0)	0,261
Antimaláricos (Sim/Não)	35/9	38/11	0,815
Micofenolato (Sim/Não)	9/35	14/35	0,365
Outros imunossupressores (Sim/Não)	18/26	17/32	0,537
Hipoglicemiantes (Sim/Não)	1/42	5/44	0,127

**Fonte:** O próprio autor.

Teste exato de Fisher ou teste qui-quadrado. Dados são expressos como número absoluto. Teste t Student. Dados são expressos como média (±SEM). Teste Mann-Whitney. Dados são expressos como mediana e interquartis (1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup>).

RI, Resistência à Insulina; F, feminino; M, masculino; IMC, índice de massa corpórea; SLEDAI, índice de atividade da doença de LES; HOMA-IR, modelo de homeostase que mensura a resistência à insulina. Presença de RI: HOMA ≥ 2,114; Ausência de RI: HOMA <2,114.

Portanto, ajustamos nossos dados para possíveis diferenças na etnia, para possíveis efeitos do sexo e do IMC (Tabelas 7 e 8). Como esperado, os níveis séricos de insulina, HOMA-IR e glicose foram significativamente maiores ( $p < 0,001$ ) em pacientes com RI, enquanto o SLEDAI, a duração da doença, o anti-dsDNA, a creatinina, C3 e C4 não foram significativamente diferentes entre os dois grupos. Não houve associação significativa entre RI e medicamentos.

A fim de analisar as associações entre os níveis séricos de metais tóxicos e dos oligoelementos com RI, foram comparados os níveis de Li, V, Cu, Zn, Mo, Cd e Pb em pacientes com LES com e sem RI, como demonstrado na Tabela 8. Não houve associação entre o Cd e RI (OR= 1,002, IC 95%= 0,998 - 1,006,  $p=0,276$ ) (dados não apresentados).

**Tabela 8** – Níveis séricos de elementos-traço em pacientes com LES na presença ou ausência de resistência à insulina

Variáveis	LES sem RI (n=44)	LES com RI (n=50)	p
Lítio ( $\mu\text{g/L}$ )	72,55 (11,0 – 97,65)	61,50 (0,00 – 95,20)	0,555
Vanádio ( $\mu\text{g/L}$ )	13,0 (9,4 – 15,5)	11,4 (9,7 – 14,2)	0,649
Cobre ( $\mu\text{g/L}$ )	975,5 (832,8 – 1067,5)	1025,5 (876,5 – 1092,9)	0,187
Zinco ( $\mu\text{g/L}$ )	2301,4 (2035,0 – 2571,5)	2411,4 (1957,5 – 2794,9)	0,710
Molibdênio ( $\mu\text{g/L}$ )	3,03 (2,78 – 3,31)	3,07 (2,83 – 3,30)	0,685
Cádmio ( $\mu\text{g/L}$ )	3,06 (3,02 – 3,16)	3,19 (3,04 – 3,32)	<b>0,042</b>
Chumbo ( $\mu\text{g/L}$ )	19,8 (17,8 – 23,5)	22,6 (18,1 – 24,4)	0,173

**Fonte:** O próprio autor.

Teste Mann-Whitney. Resultados são mostrados como mediana e interquartil (1º e 3º) RI: Resistência à Insulina. Presença de RI: HOMA  $\geq 2,114$ ; Ausência de RI: HOMA  $< 2,114$ .

### HOMA-IR e Insulina

O HOMA – IR é um modelo de medida da homeostase que mensura a resistência à insulina; obtido pela dosagem de glicose e insulina sanguínea, é um método confiável de alta sensibilidade e especificidade, utilizado para medir a RI e o risco de DM T2 (GARCÍA CUARTERO et al., 2007). Nesse estudo, os maiores valores de HOMA-IR foram encontrados no grupo LES ( $2,676 \pm 1,144$ ), quando comparados

ao grupo controle ( $2,157 \pm 1,109$ ), conforme a Tabela 2. De forma similar, em estudo realizado por Gazareen et al. (2014) foram encontrados valores de HOMA-IR maiores nos pacientes com LES.

A resistência à insulina (RI) aqui determinada foi maior para o grupo LES (57,28%) do que para o grupo controle (34,17%).

Neste estudo, as maiores concentrações de insulina foram encontradas no grupo LES ( $13,7 \pm 8,4 \mu\text{U mL}^{-1}$ ), quando comparadas ao grupo controle ( $9,2 \pm 5,5 \mu\text{U mL}^{-1}$ ), conforme a Tabela 2. Alterações na sensibilidade à insulina estão relacionadas a diversos mecanismos e sugerem informações importantes nos indivíduos portadores de LES (CHUNG et al., 2008). Segundo Posadas-Romero et al. (2004), a presença de anticorpos anti-insulina e a inflamação crônica relatados nos pacientes com LES são alguns dos fatores que podem contribuir com os maiores níveis de insulina apresentados por esses indivíduos. Em outro estudo, realizado por El Magadmi et al. (2006), também foram encontradas maiores concentrações de insulina nos indivíduos do grupo LES.

O uso de fármacos como corticosteroides desempenham ação anti-inflamatória (ROMAN et al., 2003). No entanto, os corticosteroides podem causar efeitos indesejáveis, como obesidade, hipertensão e dislipidemia (GRUNDY et al., 2005; SABIO et al., 2010), bem como intolerância à glicose e elevação dos níveis de insulina e RI (ZARKOVIĆ et al., 2008), que são sinais de maior prevalência nos pacientes com LES (BULTINK et al., 2008).

A inflamação relacionada à obesidade provoca o aumento nos mediadores inflamatórios plasmáticos e no tecido adiposo (KADOWAKI et al., 2006). A obesidade é um fator de risco para o desenvolvimento da RI e DM T2. No entanto, nem todos os indivíduos obesos apresentam RI (ABBASI et al., 2002). Mas a maneira como a gordura corporal está distribuída é importante, pois as pessoas que apresentam excesso de gordura abdominal ou visceral são as que apresentam maior risco de RI (DESPRÉS; LEMIEUX, 2006).

A composição dietética tem sido outra condição para os níveis elevados de insulina em pacientes com LES. O tipo de ácidos graxos presentes na alimentação pode influenciar a ação da insulina (SUMMERS et al., 2002). O consumo de ácidos graxos poli-insaturados pode ser uma orientação importante aos pacientes com LES (CUTOLO; OTSA, 2008).

O tecido adiposo não está relacionado apenas com o armazenamento de lipídios; também é considerado como um órgão endócrino (DESPRÉS; LEMIEUX, 2006). É um produtor de citocinas e outras biomoléculas, como o TNF- $\alpha$ , a interleucina 6 (IL-6), a resistina, proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1), o inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1), a visfatina, o agiotensinogênio e outras moléculas (STEPPAN et al., 2001; SHOELSON, LEE, GOLDFINE, 2006). A liberação elevada de TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 e outras células do tecido adiposo podem desencadear a RI (FAIN et al., 2004; KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006).

Uma situação crítica na sensibilidade à insulina nos indivíduos magros é a maneira como a gordura corporal está distribuída (KAHN, 2003). Pessoas magras que apresentam gordura mais periférica têm maior sensibilidade à insulina quando comparados com os indivíduos magros que possuem a gordura localizada nas regiões torácica e abdominal (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006). Diferenças nas características do tecido adiposo nesses dois lugares explicam parcialmente o motivo pelo qual os efeitos da gordura abdominal e subcutânea têm mecanismos de ação distintos (MAEDA et al., 1997).

Partículas inaladas desencadeiam ativação elevada dos mecanismos de defesa quando interagem com os receptores tipo *Toll* (TLR), NOD ou através da liberação de mediadores secundários. Os receptores tipo *Toll* e NOD estão relacionados com a resposta imune inata e atuam como mediadores extremamente importantes na resposta inflamatória nos casos de exposição ambiental, ocupacional ou substâncias presentes no ar (BAUER; DIAZ-SANCHEZ; JASPERS, 2012). Segundo Peden (2011), em um estudo de revisão, leva a acreditar que os receptores denominados de *NOD-like receptor* (NLRs) estão relacionados com a oligomerização e formação do imunocomplexo denominado de inflamassoma. Esse é o mecanismo inato que pode estar associado à resposta inflamatória por ação de poluentes ambientais nos quais o indivíduo é exposto.

Em um estudo realizado por Sun et al. (2009), foi demonstrado aumento nos níveis de insulina hepática em animais expostos a partículas finas (menores que 2,5 micrômetros). A diminuição na sinalização da insulina devido à presença de poluentes ambientais prejudicou a ativação da via PI3K/Akt e a translocação do GLUT4 (HAN et al., 2013). Dessa forma, em decorrência da presença de gordura corporal na região abdominal ou visceral e dos fatores ambientais, entre

outros como o estresse oxidativo e processo inflamatório crônico, os indivíduos com LES apresentaram níveis mais elevados de insulina em relação ao grupo controle.

## Glicose

A glicose, neste estudo, apresentou concentrações levemente menores no grupo LES ( $85,0 \pm 10,8$  mg dL<sup>-1</sup>), quando comparado ao grupo controle ( $93,0 \pm 11,2$  mg dL<sup>-1</sup>), conforme a Tabela 2. O uso de fármacos como os esteroides, utilizados para controlar a inflamação sistêmica nos pacientes com LES, deve ser avaliado, devido às alterações no metabolismo da glicose (CORTES et al., 2008). O uso da prednisolona poderia causar a RI, hiperinsulinemia e hiperglicagonemia (GRAVHOLT et al., 2002). O consumo de hidrocortisona pode aumentar os níveis plasmáticos de glicose, insulina e ácidos graxos (BRILLON et al., 1995).

Fármacos antimaláricos, como a hidroxicloroquina, têm sido associados a efeitos metabólicos benéficos no controle da glicose e perfil lipídico. Os mecanismos relacionados à ação dos antimaláricos ainda são incertos, mas acredita-se que ocorrem alterações no metabolismo da insulina e sinalização por meio de receptores celulares (HAGE; BADRI; AZAR, 2014). Principalmente na diminuição da glicose, como relatado em um estudo de caso em um indivíduo com LES e DM T2, sem uso de outros hipoglicemiantes (KANG; MIKULS; O'DELL, 2009).

Morel (2017) discutiu como alterações metabólicas, incluindo aquelas relacionadas ao metabolismo da glicose, poderiam contribuir para a patogênese do LES. E descobriu que três vias principais de utilização de glicose – via das pentoses fosfato, fosforilação oxidativa e glicólise aeróbia – foram implicadas na ativação de células T no LES (PERL et al., 2015). A ativação crônica de células T CD4+ por autoantígenos, como ocorre no LES, é apoiada pela fosforilação oxidativa, enquanto a glicólise aeróbica suporta a ativação aguda induzida por antígenos estranhos ou a estimulação suprafisiológica de TCR *in vitro*. Células T CD4+ de pacientes com LES também apresentam alterações na glicólise (YIN et al., 2015). Este processo poderia corresponder a um mecanismo compensatório para remediar a produção de ATP por mitocôndrias defeituosas. Um requisito duplo para glicólise e fosforilação oxidativa foi encontrado em células efectoras e de memória, tipo T CD4+ (GHAYOUR-MOBARHAN, 2005), um subgrupo que é expandido no LES (SOBEL et al., 2011). Finalmente, a

superexpressão de GLUT1 foi observada em camundongos e pode levar ao acúmulo de células T ativadas e à produção de autoanticorpos (JACOBS et al., 2008). Neste estudo, sugere-se que o estresse oxidativo e o processo inflamatório crônico nos indivíduos do grupo LES podem ter contribuído para maior concentração de insulina e RI, e diminuído os níveis de glicose sanguínea.

## Lítio

A dosagem de Li em indivíduos que não fazem uso de fármacos compostos pelos sais do metal não se faz necessária, uma vez que não há certeza sobre sua essencialidade e nem evidências sobre sua deficiência no ser humano. Apesar de os valores de referência de Li no soro ou plasma variarem de 0,6 a 1,2 meq L<sup>-1</sup>, esses níveis são preconizados para que o metal possa atingir resposta terapêutica e boa tolerabilidade em função do quadro clínico. Neste estudo o Li apresentou concentrações maiores no grupo LES (59,3±44,6 µg L<sup>-1</sup>; 0,00854 meq L<sup>-1</sup>) quando comparados ao grupo controle (13,6±32,3 µg L<sup>-1</sup>; 0,00196 meq L<sup>-1</sup>), conforme a Tabela 2. A hipótese para essa alteração é que seria devido à diminuição da excreção renal. Como as concentrações de Li em fluídos biológicos são geralmente <0,2 meq L<sup>-1</sup> (BORKAN, 2002), a ligação do Li em proteínas é baixa; menos de 10% do metal encontra-se ligado a elas, sendo a excreção do metal via renal, pelos glomérulos, que são os responsáveis pela filtração (OKUSA; CRYSTAL, 1994). O Li é excretado quase inteiramente pelos rins e sua concentração é afetada quando a função renal se deteriora, o que ocorre frequentemente no LES (TIMMER; SANDS, 1999). Li também parece aumentar a produção de IL-2 que é deficiente nas células T do LES e pode ser um dos fatores responsáveis por muitas das anormalidades imunológicas observadas nesses pacientes. Este efeito ocorre pelo aumento do nível de trifosfato de inositol como resultado da inibição da inositol-1-fosfatase, que aumenta a liberação de cálcio no citosol com a ativação da proteína quinase C e a produção de IL-2. Assim, o Li aparece aqui como um íon imunomodulador no curso da doença.

Entre as vias relacionadas com o transporte de Li pelas membranas dos eritrócitos, tem-se a bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>. Esse processo ocorre com a entrada de Li na célula pela substituição do potássio (LEAL; FERNANDES, 2002). O Li inibe a

glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3), uma enzima capaz de controlar o transporte de água e Na<sup>+</sup> pelo canal de sódio epitelial (ENaC) e aquaporina (AQP2, canal de água) (GRÜNFELD; ROSSIER, 2009). AQP2 é uma proteína presente nas membranas apicais do tubo coletor (ROCHA et al., 2000). Além de inibir a GSK3, o Li está envolvido em outras ações e respostas, como a síntese de glicogênio e a hematopoiese. O Li é o único inibidor clinicamente utilizado que inibe a GSK3 de maneira direta e indireta (RYVES; HARWOOD, 2001). Associada ao aumento de Li no grupo LES está a insulina, separando-o do grupo controle, cujo aumento diminui glicose no organismo.

Adicionalmente, a glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3), em testes realizados, mostrou ser a única proteína inibida pelo Li em níveis terapêuticos tolerados, enquanto outras proteínas foram inibidas parcialmente pelo metal. Outra importante característica da GSK-3 dá-se pelo fato de não haver compartilhamento estrutural junto a outras enzimas sensíveis ao Li (O'BRIEN; KLEIN, 2009). Estudos futuros de outros aspectos envolvendo o Li em humanos ainda são necessários, para melhor compreensão dos efeitos moleculares desencadeados no organismo humano pela ação do metal (PETIT-PAITEL et al., 2009).

## **Ferro**

Nesse estudo, as menores concentrações de Fe foram obtidas no grupo LES ( $770,6 \pm 314,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ), quando comparado com o grupo controle ( $1000,0 \pm 439,4 \mu\text{g L}^{-1}$ ), conforme a Tabela 2. As alterações no metabolismo do Fe têm sido associadas à RI e à diabetes *mellitus* tipo 2 (DM T2) (ZANDMAN-GODDARD; SHOENFELD, 2007). A participação do Fe nas reações com ERO geram moléculas que desencadeiam o estresse oxidativo, resultando em danos às células beta pancreáticas e prejudicando a liberação de insulina (KANETO et al., 2010; VIEIRA, 2016). O metabolismo do Fe mostrou alterações significativas na DM T2 e no metabolismo da glicose segundo Lee et al. (2006). Em indivíduos expostos ocupacionalmente, com a diminuição dos níveis de Fe, houve melhora na sensibilidade à insulina (JOMOVA; VALKO, 2011).

Ferro e ferritina estão relacionados aos mecanismos de doenças inflamatórias crônicas, autoimunes e RI. Níveis elevados de ferritina interferem na

liberação de insulina hepática, aumentando os níveis de insulina e a RI. Essa resistência, quando ocorre por via hepática, é o efeito inicial pelos danos dependentes de Fe (JUNG et al., 2013; LOZOVYOY et al., 2013).

O Fe é armazenado no organismo através das cadeias H e L na ferritina, uma proteína com 24 subunidades peptídicas. O Fe armazenado na ferritina ocorre na forma solúvel e de modo seguro para o organismo. A liberação de Fe acontece de maneira controlada. A ferritina tem estrutura com capacidade de armazenar 4500 átomos de Fe(III) (VANARSA et al., 2012). Em processos inflamatórios crônicos, a ferritina libera maior quantidade de cadeia H e, conseqüentemente, há diminuição dos níveis de ferro nas células (ZANDMAN-GODDARD; SHOENFELD, 2007). Isso explica, portanto, os níveis menores de Fe obtidos neste estudo em pacientes com LES. Embora a função da ferritina seja de natureza complexa no LES, outros aspectos devem ser levados em consideração, como atividade e manifestação da doença. A participação da ferritina em uma doença inflamatória como o LES deve ser avaliada junto ao metabolismo do Fe (MASCITELLI; PEZZETTA, 2005).

Nos indivíduos com LES, a deficiência de Fe pode ser encontrada em até 70% dos casos, durante a evolução da doença. A anemia mais comum nos pacientes com LES é conhecida como anemia da doença crônica (ADC), e tem como característica a deficiência no transporte de Fe para a medula óssea, mesmo apresentando valores normais ou elevados na reserva de Fe (KLACK; BONFA; BORBA NETO, 2012). Na ADC, a ingestão de suplemento alimentar contendo Fe geralmente não influencia nos níveis do Fe no organismo, ao contrário da anemia por deficiência por Fe (PRADHAN et al., 2016). Em outro estudo, realizado por Lozovoy et al. (2013), níveis menores de Fe em pacientes com LES também foram encontrados, além da RI.

## **Zinco**

Zinco apresentou, tanto para os indivíduos do grupo controle como para o grupo LES, concentrações acima dos valores referência ( $<1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (TYLER, 1994). No entanto, de acordo com a Tabela 2, as menores concentrações de Zn nas amostras com LES ( $2532 \pm 578 \mu\text{g L}^{-1}$ ), quando comparadas ao controle

( $3286 \pm 920 \mu\text{g L}^{-1}$ ), podem se dar pelo envolvimento do metal com a síntese, a secreção e o armazenamento da insulina (GONZÁLEZ-VILLALVA et al., 2016).

Em um estudo de revisão, segundo Foster e Samman (2012), a diminuição da quantidade de Zn resulta na diminuição dos níveis séricos de insulina devido ao aumento na produção de proteínas inflamatórias que danificam as células beta pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina. De acordo com essas informações, em sua maioria, concentrações menores de Zn também foram encontrados em pacientes com LES, em comparação com controles saudáveis (SAHEBARI et al., 2014; TÓTH et al., 2017; YILMAZ et al., 2005). Mas nem todos os estudos confirmaram a diminuição nos níveis de Zn (NOSSENT et al., 2017). Sahebari et al. (2014) levantaram a hipótese de que os níveis séricos mais baixos de Zn em pacientes com LES poderiam ser explicados pelo aumento do consumo de Zn induzido pelo estresse oxidativo, uma vez que esse oligoelemento é um cofator de enzimas antioxidantes; esses autores também argumentaram que a deficiência de Zn poderia estar envolvida na disfunção de células T (SAHEBARI et al., 2014). Além disso, o consumo inadequado de Zn foi relatado em um estudo que investigava a ingestão dietética de crianças e adolescentes com LES juvenil (CAETANO et al., 2009), indicando que insuficiência de nutrientes na dieta também pode ser, pelo menos parcialmente, responsável por esses níveis mais baixos. Strickland et al. (2013) descobriram que uma dieta enriquecida em doadores de metilo e os cofatores de zinco, ácido fólico e vitamina B12 melhorou a resposta de anticorpos anti-DNA e a doença renal no modelo de lúpus murino transgênico, sugerindo que micronutrientes dietéticos, como Zn, podem melhorar a doença de LES (STRICKLAND et al., 2013).

O Zn desempenha ações importantes no metabolismo de carboidratos; o metal estimula a via glicolítica, aumentando a atividade das enzimas fosfofrutoquinase e piruvato quinase. O metal atua também inibindo a gliconeogênese. A indução pelo Zn na translocação do GLUT na membrana plasmática aumentou a absorção de glicose celular, resultando na diminuição dos níveis de glicemia (RANASINGHE et al., 2015). Pelo fato de o Zn estar relacionado com a síntese, o armazenamento e a secreção da insulina, nos casos de hiperglicemia ocorre maior liberação de Zn através das vias urinárias, resultando na diminuição de níveis de Zn no organismo, como observado neste estudo. Com os níveis diminuídos de Zn no organismo, as células das ilhotas têm suas funções afetadas para secretar insulina (SOINIO et al., 2007; VIKTORÍNOVÁ et al., 2009). Em um estudo realizado por

Viktorínová et al. (2009), demonstraram menores concentrações de Zn nos pacientes com DM T2 (VIKTORÍNOVÁ et al., 2009). Em estudo realizado por Tang e Shay (2001), foi demonstrado que o Zn eleva o transporte de glicose induzida por insulina e também o transporte de glicose na célula agindo através da via de sinalização da insulina. Pelo fato de o Zn estar envolvido na sinalização da insulina, suplementos contendo Zn podem ser considerados como adjuvante no tratamento de DM T2 (JANSEN et al., 2012). No caso de LES, a suplementação por Zn poderia ser sugerida após estudos mais aprofundados.

## **Chumbo**

Neste estudo, de acordo com a Tabela 2, as maiores concentrações de Pb foram encontradas no grupo controle ( $40,3 \pm 15,7 \mu\text{g L}^{-1}$ ), que apresentou maior dispersão das amostras quando comparado ao grupo LES ( $25,2 \pm 8,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ). A concentração de Pb esperada em soro é  $<13,0 \mu\text{g L}^{-1}$  (PAOLIELLO et al., 2001). A dispersão das amostras relacionada ao Pb também esteve relacionada à influência de Mo e Fe. Em um estudo de Mohmand et al. (2015), níveis de Pb semelhantes foram encontrados em amostra sérica. No presente estudo encontramos correlação positiva entre Pb e os níveis de glicose.

Existem relatos sobre a quantificação dos níveis plasmáticos de Pb poderem refletir melhor a fração livre do metal, além de apresentar maior biodisponibilidade e, assim, poder circular pelos tecidos do corpo humano, quando comparados com Pb presente no sangue total (SMITH et al., 2002). Há evidências que sustentam a ideia de que Pb induz alteração imune em relação à imunidade semelhante a Th2 (humoral) (HEO; PARSONS; LAWRENCE, 1996), e regula a ativação imune Th1 (intracelular). A administração de Pb resulta em níveis mais elevados de monofosfato de adenosina cíclica intracelular (cAMP) em células Th1, sugerindo que o Pb aumenta a adenil ciclase (HEO; LEE; LAWRENCE, 1998). E níveis elevados de cAMP são inibitórios para as células Th1. Essa regulação positiva da adenil ciclase nas células em Th1 das células T é o meio pelo qual a norepinefrina e o sistema nervoso simpático induzem mudanças imunológicas semelhantes à imunidade do tipo 2 (SANDERS, 1995).

Outra indicação de supressão induzida por Pb na imunidade Th1 é que os ratos tratados com Pb reduziram a resistência do hospedeiro aos agentes patogênicos que exigem as defesas imunes do tipo 1 (LAWRENCE, 1981). Os ratos geneticamente predispostos ao lúpus eritematoso sistêmico murino (LES) mostraram-se suscetíveis a uma exacerbação do LES induzida por Pb (HUDSON et al., 2003).

Em estudo realizado por Nováková et al. (2015), ratos foram expostos a baixas concentrações de acetato de chumbo ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Embora os testes tenham mostrado níveis de glicose e atividade da amilase diminuídos e atividade de LDH aumentada, não houve alteração nos níveis de hemoglobina glicada. Os parâmetros avaliados são muito úteis na avaliação por intoxicação através de chumbo (NOVÁKOVÁ et al., 2015).

Os dados apresentados na literatura envolvendo Pb são, em sua maioria, de indivíduos expostos ocupacionalmente ou em experimentos que utilizaram animais como modelos, pelo fato de o Pb ser um metal tóxico. Não há, até o presente momento, estudos que avaliaram efeitos ou mecanismos envolvendo o Pb no metabolismo da glicose e RI em pacientes portadores de LES. Neste estudo, pacientes LES com RI apresentaram Pb como um metal importante.

Por ser o Pb um metal não essencial que, até o momento, não tem função biológica conhecida em humanos, é questionável estabelecer níveis seguros para a exposição ao metal (AHAMED; SIDDIQUI, 2007).

## **Cobalto**

A concentração de Co não teve variações significativas para as amostras do grupo controle ( $2,2 \pm 0,9 \mu\text{g L}^{-1}$ ), conforme a Tabela 2, embora estejam acima do valor de referência ( $<0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (TYLER, 1994). Os resultados de Co neste estudo foram semelhantes aos descritos por Błażewicz et al. (2013). Mas, de forma curiosa, os resultados para Co nas amostras do grupo LES estiveram abaixo do limite de detecção (LD) da técnica ICP-MS ( $0,005 \mu\text{g L}^{-1}$ ). No entanto, de acordo com Galanis, Karapetsas e Sandaltzopoulos (2009), íons  $\text{Co}^{2+}$ , em concentrações elevadas, podem desencadear estresse oxidativo e contribuir para a geração de ER, desencadeando danos celulares.

Exposição ocupacional ao Co, mesmo em baixas concentrações e a longo prazo, pode desencadear efeitos prejudiciais à saúde, afetando diversos órgãos e tecidos humanos. Os mecanismos sobre a toxicidade do Co ainda não são claros. Mas, conhecendo os efeitos causados no organismo, o metal possui grande afinidade pelo grupo tiol (SH), resultando na inibição de enzimas importantes (BARCELOUX, 1999b). A geração de ERO nas células é semelhante às reações de Fenton, desencadeando o estresse oxidativo, além de danos oxidativos a DNA, proteínas e lipídios (JOMOVA; VALKO, 2011).

## **Cádmio**

A dispersão das amostras relacionadas ao Cd foi influenciada por níveis de Cd menores para o grupo LES ( $3,8 \pm 1,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em relação ao controle ( $15,5 \pm 17,9 \mu\text{g L}^{-1}$ ), conforme a Tabela 2, que apresentou um desvio padrão muito elevado, provavelmente relacionado ao ambiente no qual o indivíduo vive, comparado ao valor de referência ( $<0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (TYLER, 1994).

Existem indícios sobre a ação do Cd em elevar os níveis de glicose em experimentos tanto em humanos quanto em animais.

No estudo realizado por El Muayed et al. (2012), inibição nos níveis de insulina foi observada após as células beta pancreáticas terem sido expostas a concentrações variadas de Cd.

Neste estudo Cd apresentou-se como um metal importante em pacientes LES com RI. O Cd foi associado com os maiores níveis de glicose. O Cd é um metal não essencial com efeitos tóxicos. A principal fonte de Cd é a alimentação, principalmente arroz, grãos e frutos do mar (CHUNHABUNDIT, 2016). O padrão comum de refeição brasileira é abundante em arroz branco (DREHMER et al., 2017). Acredita-se que o Cd altera o metabolismo da glicose, afetando os órgãos-alvo, como o pâncreas (diminuição da secreção de insulina), o fígado (aumento da atividade das enzimas da gliconeogênese), tecido adiposo (expressão decrescente do transportador de glicose, GLUT4), glândulas adrenais e rins (CHUNHABUNDIT, 2016). Além disso, os níveis dos marcadores inflamatórios, como PCR, têm sido associados à insuficiência da homeostase da glicose e ao aumento do risco de desenvolvimento de diabetes (MUGABO; LI; RENIER, 2010). Conseqüentemente, ocorreu uma

associação positiva entre Cd e PCR, que confirmam achados anteriores na população americana em geral (LIN et al., 2010). Colacino et al. (2014) investigaram a relação entre Cd e PCR e argumentaram que Cd é um indutor de estresse oxidativo, o que levaria à inflamação sistêmica; a suposição baseou-se na associação entre Cd e PCR, que foi mais forte entre os indivíduos que ingeriram menos nutrientes anti-inflamatórios e antioxidantes, o que dá suporte à noção de que o estresse oxidativo está envolvido na inflamação induzida por Cd (COLACINO et al., 2014).

Em um estudo de revisão dos autores González-Villalva et al. (2016), embora o vínculo entre Cd e glicose tenha apresentado resultados controversos, o metal, quando relacionado ao estresse oxidativo, pode exercer influência nos níveis de glicose. Em outro estudo, agora realizado por De Blas Bravo et al. (2007), também foram encontradas concentrações de Cd em amostras de soro de indivíduos saudáveis, semelhantes às deste estudo. Não há, até o presente momento, na literatura, estudos explorando mecanismos de ação detalhados envolvendo o Cd na RI em indivíduos com LES.

Foi demonstrada uma correlação negativa entre Cd e SLEDAI. No entanto, a relação entre esses parâmetros ainda não está bem estabelecida. Bigazzi (1994) relatou que trabalhadores expostos ao Cd podem desenvolver proteinúria, nefrite tubulointersticial e ocasionalmente dano glomerular, quadro característico da doença ativa. Por outro lado, ratos tratados com Cd não apresentaram resposta autoimune. Assim, a correlação entre a atividade do Cd e do LES merece uma investigação mais profunda.

A exposição através do Cd tem sido associada à manutenção de níveis elevados de glicose sanguínea e, como consequência, favorece o desenvolvimento de DM T2 (SCHWARTZ; IL'YASOVA; IVANOVA, 2003).

Alterações importantes, como o aumento da peroxidação lipídica, a diminuição dos níveis de liberação de insulina, maior ativação de células neoglicogênicas e a diminuição dos receptores de insulina, são fatores envolvidos na hiperglicemia induzida através do Cd (HAN et al., 2003).

O Cd também influencia na diminuição da tolerância à glicose e aumenta a RI (EDWARDS; PROZIALECK, 2009). Em um estudo realizado por estes autores, ratos foram expostos ao Cd por doze semanas. A exposição resultou no aumento dos níveis de açúcar. Também houve diminuição nos níveis de insulina sérica e maior concentração de Cd no pâncreas; as células  $\beta$  pancreáticas produtoras

de insulina também foram afetadas. Um mecanismo provável tem sido atribuído ao Cd devido ao efeito danoso que o metal desencadeia nas células  $\beta$  pancreáticas em ratos, resultando na diminuição da produção de insulina (EDWARDS; PROZIALECK, 2009).

## Cobre

Neste estudo, concentrações de Cu para o grupo LES foram menores ( $1024,5 \pm 288,4 \mu\text{g L}^{-1}$ ) que no grupo controle ( $1126,8 \pm 396,9 \mu\text{g L}^{-1}$ ), conforme a Tabela 2. O valor de referência para Cu é ( $<1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) em indivíduos saudáveis (TYLER, 1994). A dispersão das amostras relacionadas ao Cu esteve relacionada a concentrações mais elevadas do metal. Em um estudo realizado por Evliyaoğlu et al. (2004) foram encontrados níveis de Cu sérico maiores nos pacientes com IMC superior a 30 e portadores de DM T2, enquanto indivíduos saudáveis apresentaram níveis menores de cobre sérico.

Íons  $\text{Cu}^+$  e  $\text{Cu}^{2+}$  na forma livre são muito reativos e quando presentes em concentrações elevadas podem desencadear danos celulares, devido à participação em reações de oxidorredução e geração de ( $\cdot\text{OH}$ ) hidroxila (GAETKE; CHOW, 2003). De acordo com Tangvarasittichai (2015), a participação do Cu nessas reações gera estresse oxidativo, que está associado à RI. Os íons Cu livre em excesso possuem alto potencial oxidativo e podem gerar ER, provocando danos celulares. Sendo assim, a homeostase do metal no organismo deve ser regulada, para manter os níveis adequados (KODAMA; FUJISAWA; BHADHPRASIT, 2012). O Cu é armazenado principalmente no fígado, órgão que desempenha funções importantes na homeostase do metal (LAUWENS et al., 2016).

Este estudo encontrou uma associação positiva entre os níveis de Cu e PCR nos grupos controle e LES. Essa relação tem sido consistentemente observada mesmo em populações saudáveis (BO et al., 2008; BUI et al., 2012; GHAYOUR-MOBARHAN et al., 2005). Da mesma forma que a associação verificada entre Cd e PCR, a ligação entre níveis de Cu e PCR pode ser mediada pelo estresse oxidativo (BO et al., 2008).

## Ferro e Molibdênio

Neste estudo, as concentrações de Mo no grupo controle foram ( $3,03 \pm 2,37 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e no grupo LES ( $3,24 \pm 0,83 \mu\text{g L}^{-1}$ ), conforme a Tabela 2. Existe uma relação entre o metabolismo do Fe e Mo. Segundo estudos de Hänzelmann et al. (2004) e de Mendel e Kruse (2012), o Mo destaca sua atividade biológica na presença de proteínas específicas, resultando no grupo prostético. A biossíntese do cofator do Molibdênio (Moco) está relacionada ao metabolismo do Fe pelos grupos heme e cluster redox ativos  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ . Os valores de referência para o Mo em amostras séricas é  $< 3,0 \mu\text{g L}^{-1}$  (DIAGNÓSTICO DO BRASIL, 2017).

Foi observado aumento dos níveis de Mo em pacientes com LES, no presente estudo, embora não tenha sido encontrada associação entre LES e Mo para a avaliação estatística univariada. No entanto, na ACP o Mo, aparece associado ao Zn, Cd e Pb para pacientes LES com RI. A hipersensibilidade ao Mo foi proposta como um gatilho ambiental de LES ANA-negativo (FEDERMANN et al., 1994). Inesperadamente, a importância dessa questão foi subestimada nos estudos do LES.

## Vanádio

Neste estudo, as menores concentrações de V foram encontradas no grupo LES ( $12,0 \pm 4,8 \mu\text{g L}^{-1}$ ), quando comparadas ao grupo controle, de ( $17,5 \pm 4,7 \mu\text{g L}^{-1}$ ), de acordo com a Tabela 2. O grupo LES também apresentou maiores valores de insulina. Em um estudo de Niu et al. (2016), esses resultados são justificados pelo fato de o V possuir ação hipoglicemiante e atuar no metabolismo da glicose através da inibição proteínas tirosina fosfatases, resultando na elevação da fosforilação dos intermediários, ativando a via de sinalização da insulina e a translocação do transportador GLUT para a membrana plasmática (NIU et al., 2016).

De acordo com Fortoul et al. (2014), o V potencializa a ação da insulina conduzindo a diminuição dos níveis de glicose no sangue. Em nosso estudo foram encontrados níveis de V semelhantes aos obtidos na pesquisa de De Blas Bravo et al. (2007).

Os compostos de V têm sido utilizados com finalidade de melhorar os efeitos na resposta insuficiente da insulina em DM. São compostos que não substituem a falta de insulina em doenças como DM T1, mas podem diminuir o uso de insulina por fármacos utilizados em DM T2 (THOMPSON; ORVIG, 2006).

Pelo que se pode observar, este é o primeiro estudo relatando a diminuição dos níveis de V em pacientes com LES. As espécies de V afetam a função de diversas enzimas e podem desempenhar um papel importante em vários mecanismos-chave na regulação imunológica, envolvidos na sinalização das células B e T e na ativação de várias interleucinas, como IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 (TSAVE et al., 2016). Assim, o papel de V no LES merece uma investigação mais aprofundada. Embora tenha sido relatada uma associação inversa entre os níveis séricos de Li e V (CAMPBELL; PEET; WARD, 1988). Os dados apresentados aqui e a literatura atualmente disponível não nos permitem inferir a causa desses níveis diminuídos, o que também pode estar relacionado à diminuição da ingestão, absorção reduzida, mecanismos de absorção ou aumento da excreção.

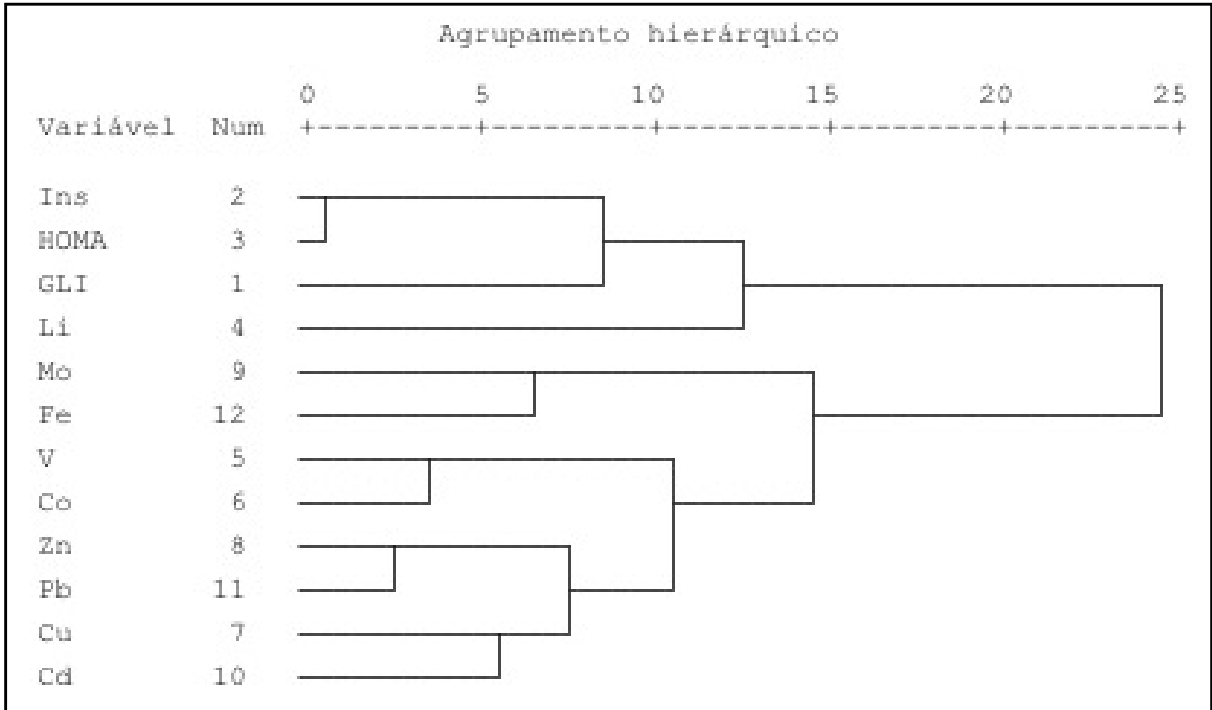
## 6 CONSIDERAÇÕES

Algumas limitações devem ser consideradas neste estudo. Primeiro, trata-se de um estudo transversal e, portanto, não permite inferências sobre relações causais. Segundo, os pacientes deste estudo mostram uma atividade baixa da doença, como indicado pelo escore de SLEDAI de 3 (2-6), em consequência, nossos achados podem não ser aplicáveis a pacientes com maior atividade de doença. Estudos adicionais devem ser realizados em pacientes com LES com maior índice de SLEDAI para verificar os perfis de metais tóxicos e oligoelementos quando a doença é mais agressiva. Outra limitação deste estudo é que a maioria dos pacientes com LES recebeu medicamentos com propriedades anti-inflamatórias e/ou imunomoduladoras, e isso pode afetar os resultados (PERETZ; NEVE; FAMAIEY, 1989).

No entanto, o presente estudo também possui vários pontos fortes. Primeiro, a nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avaliou a relação entre oligoelementos e metais tóxicos com RI no LES. Além disso, a seleção rigorosa de pacientes e avaliação estatística completa agregam valor a este estudo. Além disso, os pacientes incluídos aqui foram recrutados no mesmo mês do ano, minimizando os possíveis efeitos da sazonalidade nas variáveis (HAGA et al., 1999).

A Figura 14 apresenta o agrupamento hierárquico para as variáveis. Pode-se observar elevada similaridade entre Ins, HOMA, GLI com Li, além da formação de grupos que separam Fe e Mo, de V e Co de outros metais contaminantes, agrupados Zn, Pb, Cu e Cd.

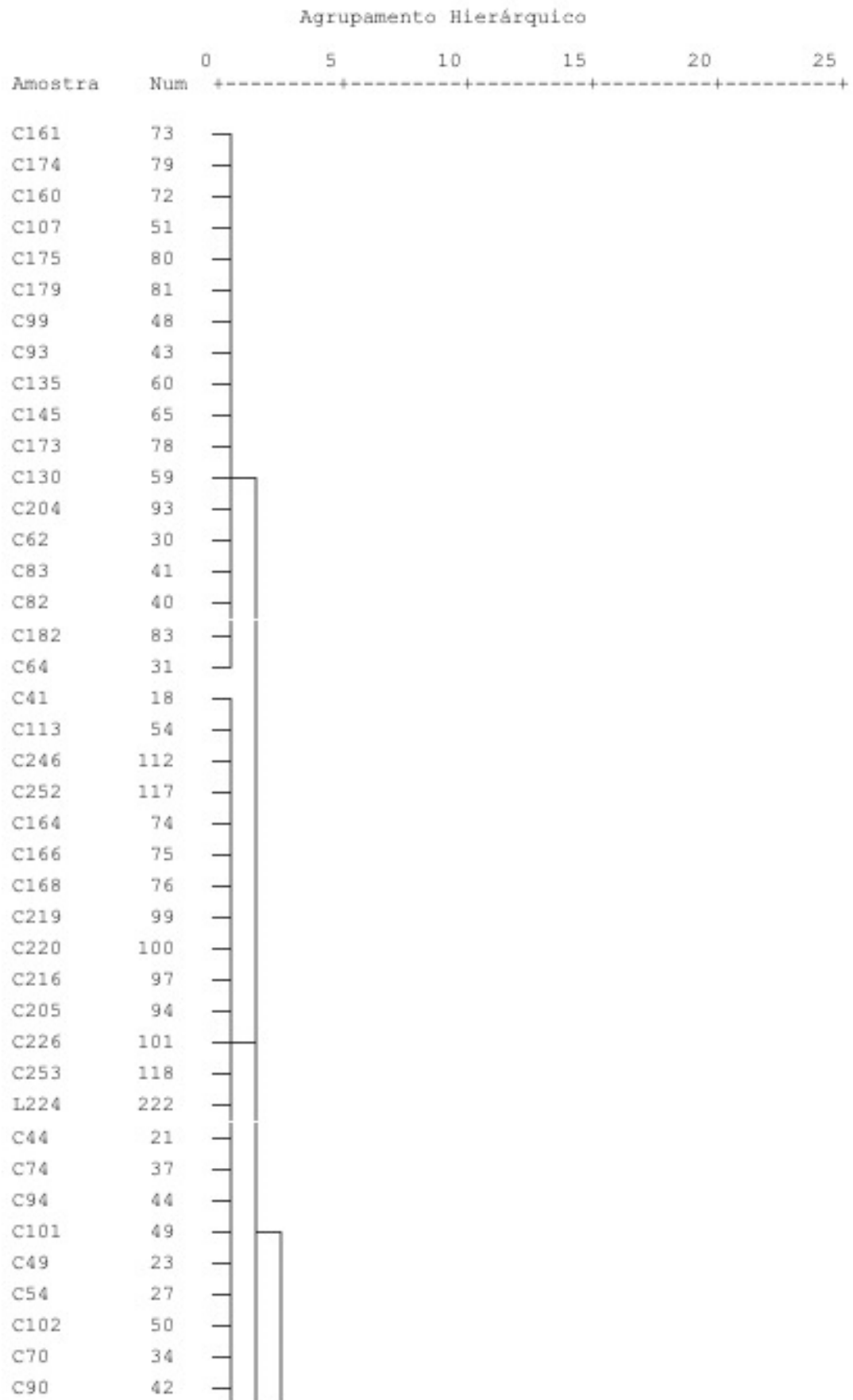
**Figura 14** – Agrupamento hierárquico determinado pelo Método de Ward – distância reescalada para as variáveis dos grupos LES e controle

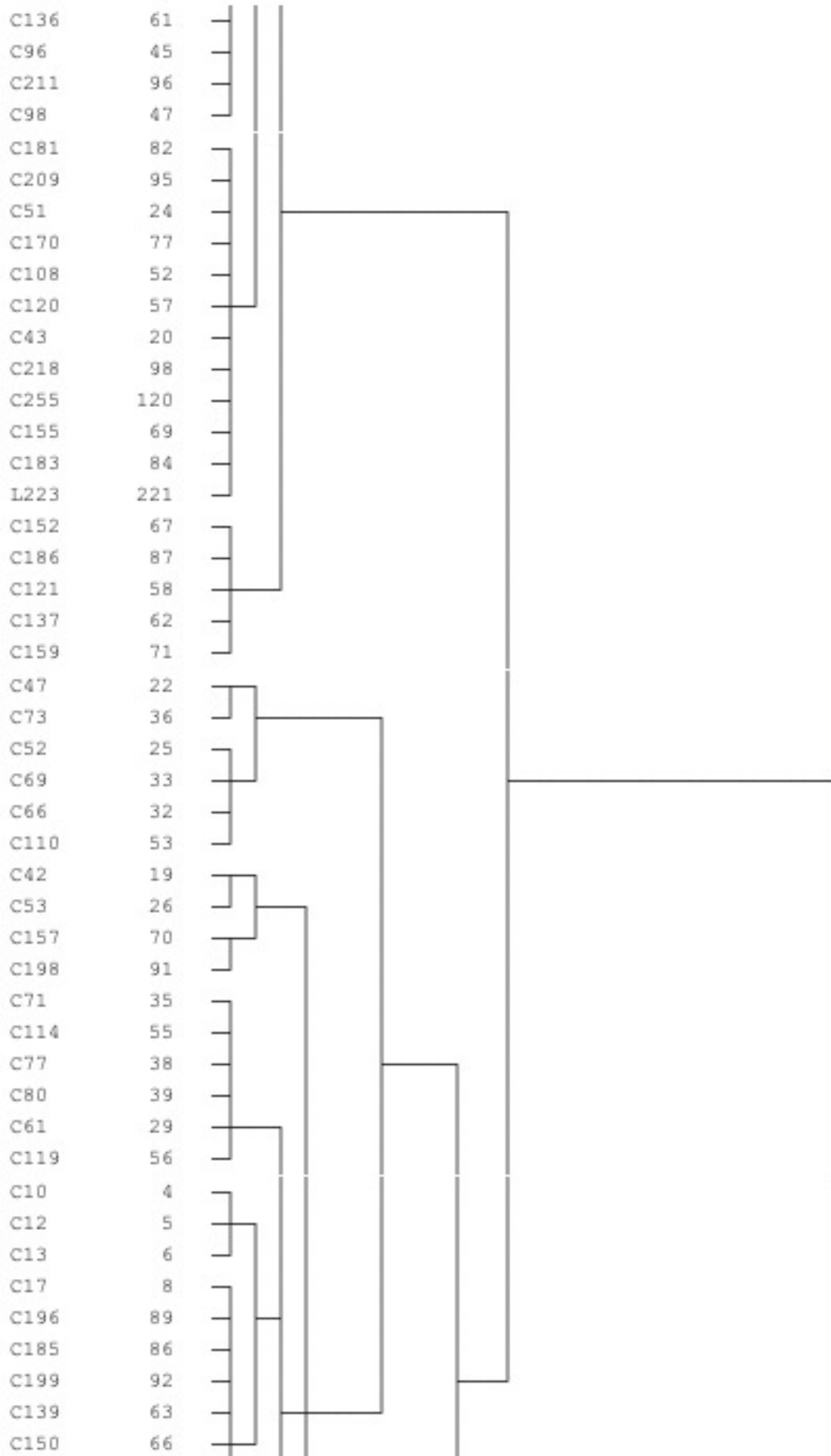


Fonte: O próprio autor.

Na Figura 15 pode-se observar a formação de dois grupos bem distintos, separando pacientes com LES daqueles do grupo controle. Algumas amostras do grupo controle se colocam no grupo LES, e vice-versa. A dispersão nas amostras ocorreu pelos níveis de cada metal presente na amostra ou outros parâmetros, como glicose, insulina e HOMA-IR ou pela influência de ambos.

**Figura 15** – Agrupamento hierárquico determinado pelo Método de Ward – distância reescalada para as amostras dos grupos LES e controle





C184	85	—
C187	88	—
C197	90	—
C18	9	—
C143	64	—
L166	171	—
C154	68	—
C97	46	—
L211	212	—
L217	216	—
L205	206	—
L176	180	—
L213	213	—
L150	158	—
L198	200	—
L199	201	—
L152	159	—
L160	167	—
L37	130	—
L55	132	—
L193	195	—
C239	105	—
C241	107	—
L159	166	—
L189	191	—
L139	149	—
L142	152	—
L138	148	—
L170	175	—
L32	129	—
L181	184	—
L186	188	—
L175	179	—
L188	190	—
L173	177	—
L208	209	—
L210	211	—
L203	204	—
L218	217	—
L172	176	—
L169	174	—
L20	126	—
L209	210	—
L225	223	—
C244	110	—
C245	111	—

C249	115	
C254	119	
C237	103	
C240	106	
C243	109	
C251	116	
L179	182	
L180	183	
L162	169	
L184	186	
L194	196	
L141	151	
L168	173	
L197	199	
L145	153	
L182	185	
L90	138	
L157	164	
L202	203	
C247	113	
L185	187	
L191	193	
L195	197	
C242	108	
L149	157	
C238	104	
L174	178	
L146	154	
L192	194	
L201	202	
L66	134	
L81	137	
L3	121	
L8	122	
L44	131	
C16	7	
C19	10	
C20	11	
C8	2	
L137	147	
C3	1	
L77	136	
L207	208	
C9	3	
C31	15	
C35	17	

C30	14		
C26	13		
L110	141		
L167	172		
L214	214		
L75	135		
L221	219		
L158	165		
L15	124		
L222	220		
L29	127		
L154	161		
L133	143		
L134	144		
L155	162		
L135	145		
L148	156		
L19	125		
L140	150		
L153	160		
L147	155		
L187	189		
L215	215		
L204	205		
C24	12		
L196	198		
L219	218		
L31	128		
L127	142		
L190	192		
L136	146		
L165	170		
L178	181		
L156	163		
C248	114		
L65	133		
L161	168		
L206	207		
C32	16		
L98	140		
L97	139		
C229	102		
L12	123		
C56	28		

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram a importância da quantificação dos metais Li, Cu, Pb, Co, Zn, V, Cd, Mo em amostras séricas de indivíduos saudáveis e nos portadores de LES. Os dados demonstraram que os metais e os outros biomarcadores apresentaram separação altamente significativa, formando dois grandes grupos bem distintos constituídos por amostras de LES e grupo controle, no método estatístico. As variações apresentadas nas concentrações dos metais podem estar relacionadas com fatores ambientais aos quais o indivíduo é exposto ou outra condição específica, intrínseca, envolvida na doença de LES.

O Li foi o único metal que apresentou níveis elevados no LES juntamente com os outros marcadores HOMA e insulina. Os demais metais apresentaram menores concentrações nos indivíduos com LES.

As informações disponíveis na literatura apresentam, na maioria das vezes, a maneira de interação dos metais com as células e proteínas, a forma como são transportados, armazenados e excretados. Ainda são escassos, na literatura, mecanismos detalhados envolvendo os metais e o aspecto imunológico em pessoas com LES e sujeitos saudáveis. Estudos futuros são necessários para a compreensão minuciosa de mecanismos envolvidos entre metais e LES, assim como a metodologia estatística.

Os resultados indicam que os pacientes com LES têm diferentes perfis de oligoelementos e metais tóxicos em comparação com controles saudáveis. O aumento de Li e a diminuição dos níveis de V, Zn e Pb foram associados ao diagnóstico de LES, mas não tiveram efeito sobre a atividade da doença e RI.

Ao separar o grupo LES com e sem resistência à insulina, pôde-se destacar a influência de metais potencialmente tóxicos como Zn, Mo, Cd e Pb, separando pacientes LES com RI dos sem Ri, indicando um caminho no estabelecimento de novos parâmetros a serem estabelecidos para a composição do quadro de variáveis que descrevem a doença LES.

Estudos futuros são necessários para elucidar os mecanismos pelos quais esses elementos estão associados ao LES.

## REFERÊNCIAS

- ABBASI, F. et al. Relationship between obesity, insulin resistance, and coronary heart disease risk. **J Am Coll Cardiol**, v. 40, n. 5, p. 937–943, Sept. 2002.
- ACHENBACH, P. et al. Natural history of type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 54, suppl. 2, p. S25-S31, Dec. 2005.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY – ATSDR. **Toxicological Profile for Cobalt**. Atlanta, GA: ATSDR, Apr. 2004.
- AHAMED, M.; SIDDIQUI, M. K. J. Low level lead exposure and oxidative stress: Current opinions. **Clin Chim Acta**, v. 383, n. 1–2, p. 57–64, Aug. 2007.
- ALA, A. et al. Wilson’s disease. **Lancet**, v. 369, n. 9559, p. 397–408, Feb. 2007.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 37, suppl. 1, p. S81-S90, Jan. 2014.
- ANESTAKIS, D. et al. Mechanisms and applications of interleukins in cancer immunotherapy. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 1, p. 1691–1710, Jan. 2015.
- ARTYOMOV, M. N. et al. CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 107, n. 39, p. 16916-16921, Sept. 2010.
- BAO, B. et al. Zinc supplementation decreases oxidative stress, incidence of infection, and generation of inflammatory cytokines in sickle cell disease patients. **Transl Res**, v. 152, n. 2, p. 67–80, Aug. 2008.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev Nutr**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629–643, jul./ago. 2010.
- BARBUSIŃSKI, K. Fenton reaction – controversy concerning the chemistry. **Ecol Chem Eng**, v. 16, n. 3, p. 347–358, 2009.
- BARCELOUX, D. G. Vanadium. **J Toxicol Clin Toxicol**, v. 37, n. 2, p. 265-278, 1999a.
- BARCELOUX, D. G. Cobalt. **J Toxicol Clin Toxicol**, v. 37, n. 2, p. 201-206, 1999b.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113–123, jan./fev. 2006.

BATISTA, B. L. **Avaliação do uso da cela de reação dinâmica em espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (DRC-ICP-MS) para determinação de elementos químicos em sangue.** 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

BAUER, M. et al. Lithium augmentation therapy in refractory depression-update 2002. **Euro Arch Psychiatry Clin Neurosci**, v. 253, n. 3, p. 132–139, June 2003.

BAUER, R. N.; DIAZ-SANCHEZ, D.; JASPERS, I. Effects of air pollutants on innate immunity: The role of Toll-like receptors and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors. **J Allergy Clin Immunol**, v. 129, n. 1, p. 14–24, Jan. 2012.

BELTRÃO, S. M. da R. **Prevalência de sintomas psiquiátricos em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico de um centro de referência.** 2010. 145 f. Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

BIGAZZI, P. E. Autoimmunity and heavy metals. **Lupus**, v. 3, n. 6, p. 449–453, Dec. 1994.

BŁAŻEWICZ, A. et al. Differences in trace metal concentrations (Co, Cu, Fe, Mn, Zn, Cd, and Ni) in whole blood, plasma, and urine of obese and nonobese children. **Biol Trace Elem Res**, v. 155, n. 2, p. 190–200, Nov. 2013.

BO, S. et al. Associations of dietary and serum copper with inflammation, oxidative stress, and metabolic variables in adults. **J Nutr**, v. 138, n. 2, p. 305–310, Feb. 2008.

BOMBARDIER, C. et al. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. **Arthritis Rheum**, v. 35, n. 6, p. 630–640, June 1992.

BONAVENTURA, P. et al. Zinc and its role in immunity and inflammation. **Autoimmun Rev**, v. 14, n. 4, p. 277–285, Apr. 2015.

BORBA, E. F. et al. Consenso de lúpus eritematoso sistêmico. **Rev Bras Reumatol**, v. 48, n. 4, p. 196–207, jul./ago. 2008.

BORDIN, D. C. M. et al. Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 2, p. 125–143, 2015.

BORKAN, S. C. Extracorporeal therapies for acute intoxications. **Crit Care Clin**, v. 18, n. 2, p. 393–420, Apr. 2002.

BOTELLA, H. et al. Metallobiology of host-pathogen interactions: An intoxicating new insight. **Trends Microbiol**, v. 20, n. 3, p. 106–112, Mar. 2012.

BRILLON, D. J. et al. Effect of cortisol on energy expenditure and amino acid metabolism in humans. **Am J Physiol**, v. 268, n. 3, pt. 1, p. E501–E513, Mar. 1995.

BRO, R.; SMILDE, A. K. Principal component analysis. **Anal Methods**, v. 6, n. 9, p. 2812-2831, 2014.

BROWN, A. C. Lupus erythematosus and nutrition: A review of the literature. **J Ren Nutr**, v. 10, n. 4, p. 170–183, 1 Oct. 2000.

BRYLINSKI, M.; SKOLNIC, J. FINDSITE-metal: Integrating evolutionary information and machine learning for structure-based metal binding site prediction at the proteome level. **Proteins**, v. 79, n. 3, p. 735-751, Mar. 2011.

BUI, V. Q. et al. associations between serum C-reactive protein and serum zinc, ferritin, and copper in Guatemalan school children. **Biol Trace Elem Res**, v. 148, n. 2, p. 154–160, Aug. 2012.

BULTINK, I. E. et al. Prevalence of and risk factors for the metabolic syndrome in women with systemic lupus erythematosus. **Clin Exp Rheumatol**, v. 26, n. 1, p. 32–38, Jan./Feb. 2008.

CAETANO, M. C. et al. Inadequação do consumo alimentar de crianças e adolescentes com artrite idiopática juvenil e lúpus eritematoso sistêmico. **J Pediat**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 6, p. 509–515, nov./dez. 2009.

CAMPBELL, A. W. Autoimmunity and the Gut. **Autoimmune Dis**, v. 2014, art. ID 152428, p. 1-12, May 2014.

CAMPBELL, C. A.; PEET, M.; WARD, N. I. Vanadium and other trace elements in patients taking lithium. **Biol Psychiatry**, v. 24, n. 7, p. 775–781, Nov. 1988.

CARDOSO, A. R. C. O. Caracterização estrutural de enzimas de molibdênio e suas chaperonas. 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2012.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de sinalização da insulina. **Arqu Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 419–425, ago. 2002.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2, suppl. 2, p. S3–S23, Feb. 2010.

CHIGHIZOLA, C.; MERONI, P. L. The role of environmental estrogens and autoimmunity. **Autoimmun Rev**, v. 11, n. 6–7, p. A493–A501, May 2012.

CHUNG, C. P. et al. High prevalence of the metabolic syndrome in patients with systemic lupus erythematosus: Association with disease characteristics and cardiovascular risk factors. **Ann Rheum Dis**, v. 66, n. 2, p. 208–214, Feb. 2007.

CHUNG, C. P. et al. Inflammation-Associated Insulin Resistance: Differential Effects in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus Define Potential Mechanisms. **Arthritis Rheum**, v. 58, n. 7, p. 2105–2112, July 2008.

CHUNHABUNDIT, R. Cadmium exposure and potential health risk from foods in contaminated area, Thailand. **Toxicol Res**, v. 32, n. 1, p. 65–72, Jan. 2016.

COLACINO, J. A. et al. Dietary antioxidant and anti-inflammatory intake modifies the effect of cadmium exposure on markers of systemic inflammation and oxidative stress. **Environ Res**, v. 131, p. 6–12, May 2014.

COLOMBO, M. et al. Differential effects of mercury, lead, and cadmium on IL-2 production by Jurkat T cells. **Clin Immunol**, v. 111, n. 3, p. 311–322, June 2004.

CORTES, S. et al. Diabetes mellitus complicating systemic lupus erythematosus - Analysis of the UCL lupus cohort and review of the literature. **Lupus**, v. 17, n. 11, p. 977–980, Nov. 2008.

COSTA, T. X. da. Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo no lúpus eritematoso sistêmico. 2009. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

COX, J. N. et al. Cadmium attenuates the macrophage response to LPS through inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 311, n. 4, p. L754–L765, Oct. 2016.

CUTOLO, M.; OTSA, K. Vitamin D, immunity and lupus. **Lupus**, v. 17, n. 1, p. 6–10, Jan. 2008.

D'CRUZ, D. P.; KHAMASHTA, M. A.; HUGHES, G. R. Systemic Lupus Erythematosus. **Lancet**, v. 369, n. 9561, p. 587–596, Feb. 2007.

DANAEI, G. et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. **Lancet**, v. 378, n. 9785, p. 31–40, July 2011.

DE BLAS BRAVO, I. et al. Optimization of the trace element determination by ICP-MS in human blood serum. **J Trace Elem Med Biol**, v. 21, suppl. 1, p. 14–17, 2007.

DESPRÉS, J.-P.; LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 881–887, Dec. 2006.

DIAGNÓSTICOS DO BRASIL. Guia de Exames. **MOLIB**. Disponível em: <<http://diagnosticosdobrasil.com.br/guia/>>. Acesso em: 30 set. 2017.

HUSTER, D. 2010. Wilson disease. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 24, n. 5, p. 531–539, Oct. 2010.

DREHMER, M. et al. Brazilian dietary patterns and the dietary approaches to stop hypertension (DASH) diet-relationship with metabolic syndrome and newly diagnosed diabetes in the ELSA-Brasil study. **Diabetol Metab Syndr**, v. 9, p. 13, Feb. 2017.

DUFFUS, J. H. “Heavy Metals” — A meaningless term? **Pure Appl. Chem**, v. 74, n. 5, p. 793–807, 2002.

EDWARDS, J. R.; PROZIALECK, W. C. Cadmium, diabetes and chronic kidney disease. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 238, n. 3, p. 289–293, Aug. 2009.

EL MAGADMI, M. et al. Hyperinsulinemia, insulin resistance, and circulating oxidized low density lipoprotein in women with systemic lupus erythematosus. **J Rheumatol**, v. 33, n. 1, p. 50–56, Jan. 2006.

EL MUAYED, M. et al. Accumulation of cadmium in insulin-producing  $\beta$  cells. **Islets**, v. 4, n. 6, p. 405–416, Nov. 2012.

ESCÁRCEGA, R. O. et al. Insulin resistance, chronic inflammatory state and the link with systemic lupus erythematosus-related coronary disease. **Autoimmun Rev**, v. 6, n. 1, p. 48–53, Nov. 2006.

EVLİYAOĞLU, O. et al. Correlations of serum  $\text{Cu} + 2$ ,  $\text{Zn} + 2$ ,  $\text{Mg} + 2$  and HbA 1c in type 2 and type 2 diabetes mellitus. **Turkish J Endocrinol Metabol**, v. 2, p. 75–79, 2004.

EYESON, J. et al. Relationship between mercury levels in blood and urine and complaints of chronic mercury toxicity from amalgam restorations. **Br Dent J**, v. 208, n. 4, p. E7; disc. 162-3, Feb. 2010.

FAIN, J. N. et al. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. **Endocrinology**, v. 145, n. 5, p. 2273–2282, May 2004.

FEDERMANN, M. et al. Hypersensitivity to molybdenum as a possible trigger of ANA-negative systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis**, v. 53, n. 6, p. 403–405, Jun. 1994.

FENGA, C. et al. Immunological effects of occupational exposure to lead. **Mol Med Rep**, v. 15, n. 5, p. 3355–3360, May 2017.

FERREIRA, A. P.; WERMELINGER, E. D. Concentrações séricas de metais e suas implicações para a saúde pública. **J. Health Sci. Inst**, v. 31, n. 1, p. 13-19, jan./mar. 2013.

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, jan./mar. 1997.

FERREIRA, M. M. C. Multivariate QSAR. **J Braz Chem Soc**, São Paulo, v. 13, n. 6, p. 742–753, nov./dez. 2002.

FIGURE 1. In: **Insulin lispro, human**. Disponível em: <[https://www.drugs.com/drug\\_images/74/60031951.jpg](https://www.drugs.com/drug_images/74/60031951.jpg)>. Acesso em: 25 set. 2017.

FINLEY, P. R.; WARNER, M. D.; PEABODY, C. A. Clinical relevance of drug interactions with lithium. **Clin Pharmacokinet**, v. 29, n. 3, p. 172-191, Sept. 1995.

FLORA, S. J. S.; MITTAL, M.; MEHTA, A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. **Indian J Med Res**, v. 128, n. 4, p. 501–523, Oct. 2008.

FORTE, G. et al. Reference intervals for blood Cd and Pb in the general population of Sardinia (Italy). **Int J Hyg Environ Health**, v. 214, n. 2, p. 102–109, Mar. 2011.

FORTOUL, T. I. et al. Overview of environmental and occupational vanadium exposure and associated health outcomes: An article based on a presentation at the 8th International Symposium on Vanadium Chemistry, Biological Chemistry, and Toxicology, Washington DC, August 15–18, 20. **J Immunotoxicol**, v. 11, n. 1, p. 13–18, Jan./Mar. 2014.

FOSTER, M.; SAMMAN, S. Zinc and regulation of inflammatory cytokines: implications for cardiometabolic disease. **Nutrients**, v. 4, n. 7, p. 676–694, July 2012.

FRANCHI, L. et al. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. **Immunol Rev**, v. 227, n. 1, p. 106–128, Jan. 2009.

FRANCO, R. et al. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: ménage à trois. **Mutat Res**, v. 674, n. 1–2, p. 3–22, Mar. 2009.

FUKUI, Y. et al. Comparative evaluation of GFAAS and ICP-MS for analyses of cadmium in blood. **Ind Health**, v. 49, n. 3, p. 338–343, 2011.

GAETKE, L. M.; CHOW, C. K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. **Toxicology**, v. 189, n. 1–2, p. 147–63, July 2003.

- GAJBHIYE, S.; SHARMA, S. K.; AWASTHI, M. K. Application of principal components analysis for interpretation and grouping of water quality parameters. **Int J Hybrid Information Technol**, v. 8, n. 4, p. 89–96, 2015.
- GALANIS, A.; KARAPETSAS, A.; SANDALTZOPOULOS, R. Metal-induced carcinogenesis, oxidative stress and hypoxia signalling. **Mut Res**, v. 674, n. 1–2, p. 31–35, Mar. 2009.
- GALLAGHER, J. D.; NOELLE, R. J.; MCCANN, F. V. Mercury suppression of a potassium current in human B lymphocytes. **Cell Signal**, v. 7, n. 1, p. 31–38, Jan. 1995.
- GARCÍA CUARTERO, B. et al. Índice HOMA y QUICKI, insulina y péptido C en niños sanos. Puntos de corte de riesgo cardiovascular. **An Pediatr (Barc)**, v. 66, n. 5, p. 481–490, May 2007.
- GARDNER, R. M. et al. Mercury exposure, serum antinuclear/antinucleolar antibodies, and serum cytokine levels in mining populations in Amazonian Brazil: a cross-sectional study. **Environ Res**, v. 110, n. 4, p. 345–354, May 2010.
- GAZAREEN, S. et al. Study of insulin resistance in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. **Menoufia Med J**, v. 27, n. 2, p. 215–225, Mar. 2014.
- GHAYOUR-MOBARHAN, M. et al. Determinants of serum copper, zinc and selenium in healthy subjects. **Anna Clin Biochem**, v. 42, pt. 5, p. 364–375, Sept. 2005.
- GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 695–706, maio/jun. 2007.
- GIL, F.; HERNÁNDEZ, A. F. Toxicological importance of human biomonitoring of metallic and metalloid elements in different biological samples. **Food Chem Toxicol**, v. 80, p. 287–297, June 2015.
- GILBERT, K. M. et al. Coexposure to mercury increases immunotoxicity of trichloroethylene. **Toxicol Sci**, v. 119, n. 2, p. 281–292, Feb. 2011.
- GONZÁLEZ-VILLALVA, A. et al. Pollution by metals: Is there a relationship in glycemic control? **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 46, p. 337–343, Sept. 2016.
- GRAVHOLT, C. H. et al. Preferential stimulation of abdominal subcutaneous lipolysis after prednisolone exposure in humans. **Obes Res**, v. 10, n. 8, p. 774–781, Aug. 2002.
- GRIMSRUD, P. A. et al. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. **J Biol Chem**, v. 283, n. 32, p. 21837–21841, Aug. 2008.

GROMBONI, C. F. **Teores dos elementos químicos essenciais e tóxicos na rastreabilidade da carne bovina**. 2012. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências – Química Analítica) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

GRUNDY, S. M. et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. **Circulation**, v. 112, n. 17, p. 2735–2752, Oct. 2005.

GRÜNFELD, J.-P.; ROSSIER, B. C. Lithium nephrotoxicity revisited. **Nat Rev Nephrol**, v. 5, n. 5, p. 270–276, May 2009.

GUEDES, H. A. S. et al. Aplicação da análise estatística multivariada no estudo da qualidade da água do Rio Pomba, MG. **Rev Bras Eng Agríc Ambient**, Campina Grande, v. 16, n. 5, p. 558–563, maio 2012.

GURER, H.; ERCAL, N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? **Free Radic Biol Med**, v. 29, n. 10, p. 927–945, Nov. 2000.

GWALTNEY-BRANT, S. M. Heavy Metals. In: HASCHEK, W. M.; ROUSSEAU, C. G.; WALLING, M. A. (Ed.). **Handbook of Toxicologic Pathology**. 2nd. ed. v. 1. Illinois: Academic Press, 2002. p. 701–733.

HAASE, H.; RINK, L. Zinc signals and immune function. **Biofactors**, v. 40, n. 1, p. 27–40, Jan./Feb. 2014.

HABIB, S.; MOINUDDIN, A. R. Peroxynitrite-modified DNA: a better antigen for systemic lupus erythematosus anti-DNA autoantibodies. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 43, n. 2, p. 65-70, Feb. 2006.

HAFFNER, S. M.; MIETTINEN, H.; STERN, M. P. The homeostasis model in the San Antonio Heart Study. **Diabetes Care**, v. 20, n. 7, p. 1087–1092, July 1997.

HAGA, H. J. et al. Seasonal variations in activity of systemic lupus erythematosus in a subarctic region. **Lupus**, v. 8, n. 4, p. 269–273, 1999.

HAGE, M. P.; BADRI, M. R.; AZAR, S. T. A favorable effect of hydroxychloroquine on glucose and lipid metabolism beyond its anti-inflammatory role. **Ther Adv Endocrinol Metab**, v. 5, n. 4, p. 77–85, Aug. 2014.

HAIR, J. F. et al. **Análise multivariada de dados**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2005.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J Neurochem**, v. 59, n. 5, p. 1609–1623, Nov. 1992.

HAN, J. C. et al. Cadmium induces impaired glucose tolerance in rat by down-regulating GLUT4 expression in adipocytes. **Arch Biochem Biophys**, v. 413, n. 2, p. 213–220, May 2003.

HAN, Y. et al. Hydrogen sulfide inhibits abnormal proliferation of lymphocytes via AKT/GSK3 beta signal pathway in systemic lupus erythematosus patients. **Cell Physiol Biochem**, v. 31, n. 6, p. 795–804, 2013.

HÄNZELMANN, P. et al. Characterization of MOCS1A, an oxygen-sensitive iron-sulfur protein involved in human molybdenum cofactor biosynthesis. **J Biol Chem**, v. 279, n. 33, p. 34721–34732, Aug. 2004.

HEINDEL, J. J. et al. Developmental origins of health and disease: Integrating environmental influences. **Endocrinology**, v. 156, n. 10, p. 3416–3421, Oct. 2015.

HEMDAN, N. Y. A.; ABU EL-SAAD, A. M.; SACK, U. The role of T helper (T H)17 cells as a double-edged sword in the interplay of infection and autoimmunity with a focus on xenobiotic-induced immunomodulation. **Clin Dev Immunol**, v. 2013, art. ID 374769, 2013.

HEMDAN, N. Y. A. et al. Alterations of Th1/Th2 reactivity by heavy metals: Possible consequences include induction of autoimmune diseases. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1109, p. 129–137, Aug. 2007.

HEO, Y.; LEE, W. T.; LAWRENCE, D. A. Differential effects of lead and cAMP on development and activities of Th1-and Th2-lymphocytes. **Toxicol Sci**, v. 43, n. 2, p. 172–185, Jun. 1998.

HEO, Y.; PARSONS, P. J.; LAWRENCE, D. A. Lead differentially modifies cytokine production in vitro and in vivo. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 138, n. 1, p. 149–157, May. 1996.

HJORTH, C. F. et al. Structure, aggregation, and activity of a covalent insulin dimer formed during storage of neutral formulation of human insulin. **J Pharm Sci**, v. 105, n. 4, p. 1376–1386, Apr. 2016.

HOCHBERG, M. C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 40, n. 9, p. 1725, Sept. 1997.

HOU, G. et al. Antitumor and antiinflammatory effects of tetrathiotungstate in comparison with tetrathiomolybdate. **Transl Res**, v. 149, n. 5, p. 260–264, May 2007.

HUDSON, C. et al. Susceptibility of lupus-prone nzm mouse strains to lead exacerbation of systemic lupus erythematosus symptoms. **J Toxicol Environ Health**, v. 66, n. 10, p. 895–918, May 2003.

HULL, R. P.; GOLDSMITH, D. J. A. Nephrotic syndrome in adults. **BMJ**, v. 336, n. 7654, p. 1185-1189, May 2008.

HULTMAN, P. Immunotoxicology of metals. In: NORDBERG, G. F. et al. **Handbook on the Toxicology of Metals**. 3rd. ed. Burlington: Academic Press, 2007. p. 197-211.

HUMORAL immunity. Disponível em: <<https://www.nature.com/subjects/humoral-immunity>>. Acesso em: 04 out. 2017.

IBS, K. H.; RINK, L. Zinc altered immune function. **J Nutr**, v. 133, n. 5, suppl, 1, p. 1452S–1456S, May 2003.

IMTIAZ, M. et al. Vanadium, recent advancements and research prospects: A review. **Environ Int**, v. 80, p. 79–88, Jul. 2015.

INESI, G.; PILANKATTA, R.; TADINI-BUONINSEGNI, F. Biochemical characterization of P-type copper ATPases. **Biochem J**, v. 463, pt. 2, p. 167–176, Oct. 2014.

INTERDONATO, M. et al. Levels of heavy metals in adolescents living in the industrialised area of Milazzo-Valle del Mela (Northern Sicily). **J Environ Public Health**, v. 2014, art. ID 326845, p. 1-9, 2014.

JACOBS, S. R. et al. Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires CD28-mediated Akt-dependent and independent pathways. **J Immunol**, v. 180, n. 7, p. 4476–4486, Apr. 2008.

JAFARI, S. et al. Prooxidant-Antioxidant balance in patients with Systemic Lupus Erythematosus and its relationship with clinical and laboratory findings. **Autoimmune Dis**, v. 2016, art. ID 4343514, p. 1–5, 2016.

JAISHANKAR, M. et al. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. **Interdiscip Toxicol**, v. 7, n. 2, p. 60–72, June 2014.

JANEWAY, C. A. Jr.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 197-216, 2002.

JANEWAY, C. A. Jr. et al. Immunological memory. In: JANEWAY, C. A. Jr. et al. **Immunobiology: The immune system in health and disease**. 5th ed. New York: Garland Science, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27158/>>. Acesso em: 25 set. 2017.

JANSEN, J. et al. Disturbed zinc homeostasis in diabetic patients by in vitro and in vivo analysis of insulinomimetic activity of zinc. **J Nutr Biochem**, v. 23, n. 11, p. 1458–1466, Nov. 2012.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, v. 283, n. 2–3, p. 65–87, May 2011.

JONES-LEE, A.; LEE, G. F. Role of iron chemistry in controlling the release of pollutants from resuspended sediments. **Remediation J**, v. 16, n. 1, p. 33–41, Dec. 2005.

JUNCIONI DE ARAUZ, L. et al. Comparação de métodos de prepare de amostras de sangue para determinação de chumbo e cádmio por ICP-MS. **Rev Bras Farm**, v. 96, n. 2, p. 1216–1227, 2015.

JUNG, C. H. et al. Elevated serum ferritin level is associated with the incident type 2 diabetes in healthy Korean men: a 4 years longitudinal study. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, e75250, Sept. 2013.

KADOWAKI, T. et al. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. **J Clin Invest**, v. 116, n. 7, p. 1784–1792, July 2006.

KAHN, S. E. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 46, n. 1, p. 3–19, Jan. 2003.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840–846, Dec. 2006.

KAMEN, D. L. Environmental influences on systemic lupus erythematosus expression. **Rheumat Dis Clin North Am**, v. 40, n. 3, p. 401–412, Aug. 2014.

KANETO, H. et al. Role of Reactive Oxygen Species in the Progression of Type 2 Diabetes and Atherosclerosis. **Mediators Inflamm**, v. 2010, art. ID 453892, 2010.

KANG, L.; MIKULS, T. R.; O'DELL, J. R. Hydroxychloroquine: a diabetic drug in disguise? **BMJ Case Rep**, v. 2009, bcr08.2008.0654, Mar. 2009.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. **Int Immunol**, v. 21, n. 4, p. 317–337, Apr. 2009.

KEHL-FIE, T. E.; SKAAR, E. P. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. **Curr Opin Chem Biol**, v. 14, n. 2, p. 218–224, Apr. 2010.

KHLIFI, R.; HAMZA-CHAFFAI, A. Head and neck cancer due to heavy metal exposure via tobacco smoking and professional exposure: A review. **Toxicol App Pharmacol**, v. 248, n. 2, p. 71–88, Oct. 2010.

KIM, H.-A.; JUNG, J.-Y.; SUH, C.-H. Biomarkers for systemic lupus erythematosus: an update. **Int. J. Clin. Rheumatol.**, v. 10, n. 3, p. 195–204, 2015.

KIM, J.; GHERASIM, C.; BANERJEE, R. Decyanation of vitamin B12 by a trafficking chaperone. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 105, n. 38, p. 14551–14554, Sept. 2008.

KINOSHITA, K.; FUNAUCHI, M. Therapeutic effect of retinoic acid in lupus nephritis. **Japan J Clin Immunol**, v. 35, n. 1, p. 1–7, 2012.

KIRA, C. S. et al. Associated factors for higher lead and cadmium blood levels, and reference values derived from general population of São Paulo, Brazil. **Sci Total Environ**, v. 543, pt. A, p. 628–635, Feb. 2016.

KLACK, K.; BONFA, E.; BORBA NETO, E. F. Dieta e aspectos nutricionais no lúpus eritematoso sistêmico. **Rev Bras Reumatol**, São Paulo, v. 52, n. 3, p. 395–408, maio/jun. 2012.

KLASSON, M. et al. Occupational exposure to cobalt and tungsten in the Swedish hard metal industry: air concentrations of particle mass, number, and surface area. **Ann Occup Hyg**, v. 60, n. 6, p. 684–699, July 2016.

KOCA, S. S. et al. Insulin resistance is related with oxidative stress in systemic lupus erythematosus. **Anadolu Kardiyol Derg**, v. 9, n. 1, p. 23–28, Feb. 2009.

KODAMA, H.; FUJISAWA, C.; BHADHPRASIT, W. Inherited copper transport disorders: biochemical mechanisms, diagnosis, and treatment. **Curr Drug Metabol**, v. 13, n. 3, p. 237–250, Mar. 2012.

KODNER, C. Nephrotic syndrome in adults: diagnosis and management. **Am Fam Physician**, v. 80, n. 10, p. 1129–1134, Nov. 2009.

KORBECKI, J. et al. Biochemical and medical importance of vanadium compounds. **Acta Biochim Pol**, v. 59, n. 2, p. 195–200, 2012.

KUMAR, S. et al. Pulmonary functions, oxidative stress and DNA damage in workers of a copper processing industry. **Int J Occup Environ Med**, v. 7, n. 2, p. 107–115, Apr. 2016.

LANGIE, S. A. et al. Causes of genome instability: The effect of low dose chemical exposures in modern society. **Carcinogenesis**, v. 36, suppl. 1, p. S61–S88, June 2015.

LAUWENS, S. et al. Cu isotopic signature in blood serum of liver transplant patients: a follow-up study. **Sci Rep**, v. 6, art. ID 30683, 2016.

LAWRENCE, D. A. In vivo and in vitro effects of lead on humoral and cell-mediated immunity. **Infect Immun**, v. 31, n. 1, p. 136–143, Jan. 1981.

LEAL, A. C. M.; FERNANDES, A. S. G. Lítio e a sua aplicação terapêutica na psicose maníaco-depressiva. **Biologias**, n. 4, p. 1-12, fev. 2002.

LEE, D. H. et al. Common presence of non-transferrin-bound iron among patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 29, n. 5, p. 1090–1095, May 2006.

LEWIS, R. C.; MEEKER, J. D. Biomarkers of exposure to molybdenum and other metals in relation to testosterone among men from the United States National Health and Nutrition Examination Survey 2011-2012. **Fertil Steril**, v. 103, n. 1, p. 172–178, Jan. 2015.

LIMA, G. L. Avaliação da suplementação de vitamina D em pacientes com lúpus eritematoso de início juvenil: estudo clínico, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo. 2015. 69 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

LIN, Y. S. et al. Cigarette smoking, cadmium exposure, and zinc intake on obstructive lung disorder. **Respir Res**, v. 11, p. 53, May 2010.

LIOSSIS, S. N. et al. B cells from patients with systemic lupus erythematosus display abnormal antigen receptor-mediated early signal transduction events. **J Clin Invest**, v. 98, n. 11, 2549–2557, Dec. 1996.

LOLASCON, A.; DE FALCO, L.; BEAUMONT, C. Molecular basis of inherited microcytic anemia due to defects in iron acquisition or heme synthesis. **Haematologica**, v. 94, n. 3, p. 395–408, Mar. 2009.

LOPES, A. C. B. A. et al. Lead exposure and oxidative stress: A systematic review. In: de VOOGT, P. (Ed.). **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 236**. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology (Continuation of Residue Reviews), vol 236. Springer, Cham. p. 193-238.

LOZOVY, M. et al. Relationship between iron metabolism, oxidative stress, and insulin resistance in patients with systemic lupus erythematosus. **Scand J Rheumatol**, v. 42, n. 4, p. 303–310, 2013.

MACDONALD, C. et al. **Lítio**. 2014. Disponível em: <<https://www.medicinanet.com.br/acesso-mobile/?frm=/m/conteudos/revisoes/5869/litio.htm>>. Acesso em: 16 fev. 2018. [Acesso restrito].

MACOMBER, L.; IMLAY, J. A. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 106, n. 20, p. 8344–8349, May 2009.

MAEDA, K. et al. Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue. **Gene**, v. 190, n. 2, p. 227–235, May 1997.

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

MALISSEN, B. et al. Integrative biology of T cell activation. **Nat Immunol**, v. 15, n. 9, p. 790–797, Sept. 2014.

MARTH, E. et al. The effect of heavy metals on the immune system at low concentrations. **Int J Occup Med Environ Health**, v. 14, n. 4, p. 375–386, 2001.

MARTIN, S.; GRISWOLD, W. Human health effects of heavy metals. **Environ Sci Technol**, n. 15, p. 1–6, Mar. 2009.

MARTÍNEZ, S. A. et al. Blood lead levels and enzymatic biomarkers of environmental lead exposure in children in Córdoba, Argentina, after the ban of leaded gasoline. **Hum Exp Toxicol**, v. 32, n. 5, p. 449–463, May 2013.

MASCITELLI, L.; PEZZETTA, F. High iron stores and cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. **J Intern Med**, v. 258, n. 6, p. 584; aut. rep. 585-586, Dec. 2005.

MEEKER, J. D. et al. Cadmium, lead, and other metals in relation to semen quality: Human evidence for molybdenum as a male reproductive toxicant. **Environ Health Perspect**, v. 116, n. 11, p. 1473–1479, Nov. 2008.

MEEKER, J. D. et al. Environmental exposure to metals and male reproductive hormones: circulating testosterone is inversely associated with blood molybdenum. **Fertil Steril**, v. 93, n. 1, p. 130–140, Jan. 2010.

MENDEL, R. R.; KRUSE, T. Cell biology of molybdenum in plants and humans. **Biochim Biophys Acta**, v. 1823, n. 9, p. 1568–1579, Sept. 2012.

MENDONÇA, L. O. et al. Uma nova classe de doenças: doenças autoinflamatórias. **Arq Asma Alerg Immunol**, v. 1, n. 3, p. 263-271, 2017.

MENKE, A. et al. Blood lead below 0.48 micromol/L (10 microg/dL) and mortality among US adults. **Circulation**, v. 114, n. 13, p. 1388–1394, Sept. 2006.

MENKES, J. H. et al. A sex-linked recessive disorder with retardation of growth, peculiar hair, and focal cerebral and cerebellar degeneration. **Pediatrics**, v. 29, p. 764-779, May 1962.

MINAMI, Y. et al. Diet and systemic lupus erythematosus: a 4 year prospective study of Japanese patients. **J Rheumatol**, v. 30, n. 4, p. 747–754, Apr. 2003.

MINAMI, Y. et al. Intakes of vitamin B6 and dietary fiber and clinical course of systemic lupus erythematosus: a prospective study of Japanese female patients. **J Epidemiol**, v. 21, n. 4, p. 246–254, 2011.

MINGOTI, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada**: uma abordagem aplicada. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2005.

MLINAR, B. et al. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. **Clin Chim Acta**, v. 375, n. 1–2, p. 20–35, 1 Jan. 2007.

MOHMAND, J. et al. Human exposure to toxic metals via contaminated dust: Bio-accumulation trends and their potential risk estimation. **Chemosphere**, v. 132, p. 142–151, Aug. 2015.

MOREL, L. Immunometabolism in systemic lupus erythematosus. **Nat Rev Rheumatol**, v. 13, n. 5, p. 280–290, May 2017.

MUDGAL, V. et al. Effect of toxic metals on human health. **Open Nutraceuticals J**, v. 3, p. 94–99, 2010.

MUGABO, Y.; LI, L.; RENIER, G. The connection between C-reactive protein (CRP) and diabetic vasculopathy. Focus on preclinical findings. **Curr Diabetes Rev**, v. 6, n. 1, p. 27–34, Jan. 2010.

NASCIMENTO, S. N. et al. Evaluation of toxic metals and essential elements in children with learning disabilities from a rural area of southern Brazil. **Int J Environ Res Public Health**, v. 11, n. 10, p. 10806–10823, Oct. 2014.

NEVES, L. B.; MACEDO, D. M.; LOPES, A. C. Homocisteína. **J Bras Patol Med Lab**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 5, p. 311–320, out. 2004.

NIU, X. et al. The molecular mechanisms and rational design of anti-diabetic vanadium compounds. **Curr Top Med Chem**, v. 16, n. 8, p. 811–822, 2016.

NOSSENT, J. et al. no zinc deficiency but a putative immunosuppressive role for labile Zn in patients with systemic autoimmune disease. **Curr Rheumatol Rev**, v. 13, n. 1, p. 59–64, 2017.

- NOVÁKOVÁ, J. et al. Lifetime exposure to low doses of lead in rats: Effect on selected parameters of carbohydrate metabolism. **Toxicol Ind Health**, v. 31, n. 5, p. 448–458, May 2015.
- NOVOTNY, J. A. Molybdenum Nutrition in Humans. **J Evid Based Complementary Altern Med**, v. 16, n. 3, p. 164–168, May 2011.
- NUNES, J. A. Desenvolvimento de método para determinação de Ag, As, Cd, Co, Mn, Ni, Pb e Se em sangue por espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) utilizando diluição das amostras em meio alcalino. 2009. 77 f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- O'BRIEN, W. T.; KLEIN, P. S. Validating GSK3 as an in vivo target of lithium action. **Biochem Soc Trans**, v. 37, pt 5, p. 1133–1138, Oct. 2009.
- OATES, J. C. The biology of reactive intermediates in systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity**, v. 43, n. 1, p. 56–63, Feb. 2010.
- OKUSA, M. D.; CRYSTAL, L. J. T. Clinical manifestations and management of acute lithium intoxication. **Am J Med**, v. 97, n. 4, p. 383–389, Oct. 1994.
- PAGLIUSO, R. G. et al. 2006. Estresse oxidativo e disfunção crônica do enxerto renal. *Arq Ciênc Saúde*, v. 13, n. 4, p. 223–227, out./dez. 2006.
- PAOLIELLO, M. M. B. et al. Valores de referência para plumbemia em uma população urbana do sul do Brasil. **Rev Panam Salud Publica**, v. 9, n. 5, p. 315–319, May 2001.
- PARSONS, P. J.; BARBOSA, F. Atomic spectrometry and trends in clinical laboratory medicine. **Spectrochim Acta Part B At Spectrosc**, v. 62, n. 9, p. 992–1003, Sept. 2007.
- PATAVINO, T.; BRADY, D. M. Natural medicine and nutritional therapy as an alternative treatment in systemic lupus erythematosus. **Altern Med Rev**, v. 6, n. 5, p. 460–471, Oct. 2001.
- PEDEN, D. B. The role of oxidative stress and innate immunity in O<sub>3</sub> and endotoxin-induced human allergic airway disease. **Immunol Rev**, v. 242, n. 1, p. 91–105, July 2011.
- PERETZ, A.; NEVE, J.; FAMAIEY, J. P. Effects of chronic and acute corticosteroid therapy on zinc and copper status in rheumatoid arthritis patients. **J Trace Elem Electrolytes Health Dis**, v. 3, n. 2, p. 103–108, June 1989.
- PERL, A. Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lupus erythematosus. **Nat Rev Rheumatol**, v. 11, n. 9, p. 674–686, Nov. 2013.

PERL, A. et al. Comprehensive metabolome analyses reveal N-acetylcysteine-responsive accumulation of kynurenine in systemic lupus erythematosus: implications for activation of the mechanistic target of rapamycin. **Metabolomics**, v. 11, n. 5, p. 1157–1174, 2015.

PESTKA, J. J. N-3 Polyunsaturated fatty acids and autoimmune-mediated glomerulonephritis. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 82, n. 4-6, p. 251–258, Apr. 2010.

PETIT-PAITEL, A. et al. Involvement of cytosolic and mitochondrial GSK-3 $\beta$  in mitochondrial dysfunction and neuronal cell death of MPTP/MPP $^{+}$ -treated neurons. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, e549, 2009.

POLLARD, K. M. Environment, autoantibodies, and autoimmunity. **Front Immunol**, v. 6, p. 1–4, Feb. 2015.

POLLARD, K. M.; HULTMAN, P.; KONO, D. H. Toxicology of autoimmune diseases. **Chem Res Toxicol**, v. 23, n. 3, p. 455–466, Mar. 2010.

POSADAS-ROMERO, C. et al. High Insulin Levels and Increased Low-Density Lipoprotein Oxidizability in Pediatric Patients with Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 50, n. 1, p. 160–165, Jan. 2004.

PRADHAN, V. et al. Association of serum ferritin levels with hematological manifestations in systemic lupus erythematosus patients from Western India. **J Assoc Physicians India**, v. 64, n. 5, p. 14–18, May 2016.

PRASAD, A. S. Zinc: An antioxidant and anti-inflammatory agent: Role of zinc in degenerative disorders of aging. **J Trace Element Med Biol**, v. 28, n. 4, p. 364–371, Oct. 2014.

RABIK, C. A.; DOLAN, M. E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. **Cancer Treat Rev**, v. 33, n. 1, p. 9–23, Feb. 2007.

RANASINGHE, P. et al. Zinc and diabetes mellitus: understanding molecular mechanisms and clinical implications. **Daru**, v. 23, p. 44, Sept. 2015.

RINGNÉR, M. What is principal component analysis? **Nat Biotechnol**, v. 26, n. 3, p. 303–304, Mar. 2008.

ROMAN, M. J. et al. Prevalence and correlates of accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. **N Engl J Med**, v. 349, p. 2399–2406, Dec. 2003.

ROSSONI, C. Perfil nutricional e metabólicos de pacientes com lupus eritematoso sistêmico de um centro de referência. 2009. 81 f. Dissertação (Mestrado em

Medicina e Ciências da Saúde) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

RYVES, W. J.; HARWOOD, A. J. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 280, n. 3, p. 720–725, Jan. 2001.

SABIO, J. M. et al. Effects of low or medium-dose of prednisone on insulin resistance in patients with systemic lupus erythematosus. **Clin Exp Rheumatol**, v. 28, n. 4, p. 483–489, July/Aug. 2010.

SAHEBARI, M. et al. Association between serum trace element concentrations and the disease activity of systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 23, n. 8, p. 793–801, July 2014.

SAKURAI, T. et al. Evaluation of immunotoxic and immunodisruptive effects of inorganic arsenite on human monocytes/macrophages. **Int Immunopharmacol**, v. 6, n. 2, p. 304–315, Feb. 2006.

SANDERS, V. M. The role of adrenoceptor-mediated signals in the modulation of lymphocyte function. **Adv Neuroimmunol**, v. 5, n. 3, p. 283–298, 1995.

SCHMIDT, C. W. Questions persist: environmental factors in autoimmune disease. **Environ Health Perspect**, v. 119, n. 6, p. A248–A253, June 2011.

SCHWARTZ, G. G.; IL'YASOVA, D.; IVANOVA, A. Urinary cadmium, impaired fasting glucose, and diabetes in the NHANES III. **Diabetes Care**, v. 26, n. 2, p. 468–470, Feb. 2003.

SCHWARZ, G. Molybdenum cofactor and human disease. **Curr Opin Chem Biol**, v. 31, p. 179–187, Apr. 2016.

SCHWARZ, G.; MENDEL, R. R.; RIBBE, M. W. Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. **Nature**, v. 460, n. 7257, p. 839–847, Aug. 2009.

ŚCIBIOR, A.; GOŁĘBIEWSKA, D.; NIEDŹWIECKA, I. Magnesium can protect against vanadium-induced lipid peroxidation in the hepatic tissue. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2013, art. ID 802734, p. 1–11, May 2013.

SELMI, C.; TSUNEYAMA, K. Nutrition, geoepidemiology, and autoimmunity. **Autoimmun Rev**, v. 9, n. 5, p. A267–A270, Mar. 2010.

SHAH, M. et al. Nutrient intake and diet quality in patients with systemic lupus erythematosus on a culturally sensitive cholesterol lowering dietary program. **J Rheumatol**, v. 31, n. 1, p. 71–75, Jan. 2004.

SHAH, D. et al. Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. **J Biomed Sci**, v. 21, n. 1, p. 1–13, Mar. 2014.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 116, n. 7, p. 1793-1801, July 2006.

SHOENFELD, Y.; AGMON-LEVIN, N. 'ASIA' - autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. **J Autoimmun**, v. 36, n. 1, p. 4–8, Feb. 2011.

SILVA, D. T. R. da. **Vanádio: efeitos terapêuticos**. 2011. 30 f. Monografia (Licenciatura em Ciências Biomédicas) – Universidade do Algarve, Faro, 2011.

SILVA, I. A. et al. Mercury exposure, malaria, and serum antinuclear/antinucleolar antibodies in Amazon populations in Brazil: a cross-sectional study. **Environ Health**, v. 3, n. 1, p. 11, Nov. 2004.

SIMONSON, G. D.; KENDALL, D. M. Diagnosis of insulin resistance and associated syndromes: the spectrum from the metabolic syndrome to type 2 diabetes mellitus. **Coron Artery Dis**, v. 16, n. 8, p. 465–472, Dec. 2005.

SINGH, Z.; CHADHA, P.; SHARMA, S. Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in battery manufacturing workers occupationally exposed to lead. **Toxicol Int**, v. 20, n. 1, p. 95-100, Jan./Apr. 2013.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2005.

SMITH, D. et al. The relationship between lead in plasma and whole blood in women. **Environ Health Perspect**, v. 110, n. 3, p. 263–268, Mar. 2002.

SOBEL, E. S. et al. Defective response of CD4(+) T cells to retinoic acid and TGF $\beta$  in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Res Ther**, v. 13, n. 3, R106, Jun. 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES – SBD. Princípios para orientação nutricional no diabetes mellitus. **Diretrizes SDB 2014-2015**. São Paulo: SBD, 2015. p. 19-41.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA. **Lúpus**. 2011. (Cartilhas SBR).

SOINIO, M. et al. Serum zinc level and coronary heart disease events in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 30, n. 3, p. 523–528, Mar. 2007.

SOMERS, E. C.; RICHARDSON, B. C. Environmental exposures, epigenetic changes and the risk of lupus. **Lupus**, v. 23, n. 6, p. 568–576, May 2014.

SPIVEY, A. The weight of lead: Effects add up in adults. **Environ Health Perspect**, v. 115, n. 1, p. A30–A36, Jan. 2007.

STEPPAN, C. M. et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. **Nature**, v. 409, p. 307–312, Jan. 2001.

STOW, J. L.; MURRAY, R. Z. Intracellular trafficking and secretion of inflammatory cytokines. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 24, n. 3, p. 227–239, June 2013.

STRICKLAND, F. M. et al. Diet influences expression of autoimmune-associated genes and disease severity by epigenetic mechanisms in a transgenic mouse model of lupus. **Arthritis Rheum**, v. 65, n. 7, p. 1872–1881, July 2013.

SUMMERS, L. K. M. et al. Substituting dietary saturated fat with polyunsaturated fat changes abdominal fat distribution and improves insulin sensitivity. **Diabetologia**, v. 45, n. 3, p. 369–377, Mar. 2002.

SUN, Q. et al. Ambient air pollution exaggerates adipose inflammation and insulin resistance in a mouse model of diet-induced obesity. **Circulation**, v. 119, n. 4, p. 538–546, Feb. 2009.

SUTTON, K. L.; CARUSO, J. A. Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. **J Chromatog A**, v. 856, n. 1–2, p. 243–58, Sept. 1999.

SUWALSKY, M. et al. Effects of lead on the human erythrocyte membrane and molecular models. **J Inorg Biochem**, v. 97, n. 3, p. 308–313, Nov. 2003.

SUZUKI, Y.; INOUE, T.; RA, C. Autoimmunity-inducing metals (Hg, Au and Ag) modulate mast cell signaling, function and survival. **Curr Pharm Des**, v. 17, n. 34, p. 3805–3814, Nov. 2011.

TAM, L. S. et al. Effects of vitamins C and E on oxidative stress markers and endothelial function in patients with systemic lupus erythematosus: a double blind, placebo controlled pilot study. **J Rheumatol**, v. 32, n. 2, p. 275–282, Feb. 2005.

TANG, X.; SHAY, N. F. Zinc has an insulin-like effect on glucose transport mediated by phosphoinositol-3-kinase and Akt in 3T3-L1 fibroblasts and adipocytes. **J Nutr**, v. 131, n. 5, p. 1414–1420, May 2001.

TANGVARASITTICHAJ, S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. **World J Diabetes**, v. 6, n. 3, p. 456–480, Apr. 2015.

TELLES, R. W. et al. Frequência de doença cardiovascular aterosclerótica e de seus fatores de risco em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. **Rev Bras Reumatol**, v. 47, n. 3, p. 165–173, maio/jun. 2007.

THOMPSON, K. H.; ORVIG, C. Metal complexes in medicinal chemistry: new vistas and challenges in drug design. **Dalton Trans**, n. 6, p. 761–764, 2006.

TIMMER, R. T.; SANDS, J. M. Lithium intoxication. **J Am Soc Nephrol**, v. 10, n. 3, p. 666–674, Mar. 1999.

TØNNESEN, T.; KLEIJER, W. J.; HORN, N. Incidence of Menkes disease. **Hum Genet**, v. 86, n. 4, p. 408–410, Feb. 1991.

TÓTH, C. N. et al. Elemental analysis of whole and protein separated blood serum of patients with systemic lupus erythematosus and Sjögren's Syndrome. **Biol Trace Elem Res**, v. 179, n. 1, p. 14–22, Sept. 2017.

TSAVE, O. et al. Role of vanadium in cellular and molecular immunology : association with immune-related inflammation and pharmacotoxicology mechanisms. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, art. ID 4013639, p. 1-10, 2016.

TURVEY, S. E.; BROIDE, D. H. Innate immunity. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2, suppl. 2, p. S24–S32, Feb. 2010.

TYLER, G. ICP-MS: instruments at work. **Varian**, ICP-MS-1, p. 1-7. 1994.

UAUY, R.; MAASS, A.; ARAYA, M. Estimating risk from copper excess in human populations. **Am J Clin Nutr**, v. 88, n. 3, p. 867S–871S, Sept. 2008.

URAMOTO, K. M. et al. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. **Arthritis Rheum**, v. 42, n. 1, p. 46–50, Jan. 1999.

URIU-ADAMS, J. Y.; KEEN, C. L. Copper, oxidative stress, and human health. **Mol Aspects Med**, v. 26, n. 4-5, p. 268–298, Aug. 2005.

VANARSA, K. et al. Inflammation associated anemia and ferritin as disease markers in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Res Ther**, v. 14, n. 4, R182, Aug. 2012.

VARELA-MOREIRAS, G.; MURPHY, M. M.; SCOTT, J. M. Cobalamin, folic acid, and homocysteine. **Nutr Rev**, v. 67, suppl. 1, p. S69–S72, May 2009.

VIKTORÍNOVÁ, A. et al. Altered metabolism of copper, zinc, and magnesium is associated with increased levels of glycated hemoglobin in patients with diabetes mellitus. **Metabolism**, v. 58, n. 10, p. 1477–1482, Oct. 2009.

VINTHER, T. N. et al. Insulin analog with additional disulfide bond has increased stability and preserved activity. **Protein Sci**, v. 22, n. 3, p. 296–305, Mar. 2013.

VINTHER, T. N. et al. Additional disulfide bonds in insulin: Prediction, recombinant expression, receptor binding affinity, and stability. **Protein Sci.**, v. 24, n. 5, p. 779–788, May 2015.

WALKER, E. M. Jr.; WALKER, S. M. Effects of iron overload on the immune system. **Ann Clin Lab Sci**, v. 30, n. 4, p. 354–365, Oct. 2000.

WANG, C. H. et al. Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: Implication in the pathophysiology of aging. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 238, n. 5, p. 450–460, May 2013.

WANG, G. et al. Oxidative and nitrosative stress in trichloroethene-mediated autoimmune response. **Toxicology**, v. 229, n. 3, p. 186–193, Jan. 2007.

WENG, S. C. et al. Recurrent spontaneous subserosal hematoma of ileum causing intestinal obstruction in a patient with menkes disease: A case report. **Medicine (Baltimore)**, v. 95, n. 37, p. e4842, Sept. 2016.

WIELOCH, M. et al. Do toxic heavy metals affect antioxidant defense mechanisms in humans? **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 78, p. 195–205, Apr. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva: WHO; Department of Noncommunicable Disease Surveillance, 1999.

YANG, J. L. et al. Singlet oxygen is the major species participating in the induction of DNA strand breakage and 8-hydroxydeoxyguanosine adduct by lead acetate. **Environ Mol Mutagen**, v. 33, n. 3, p. 194–201, 1999.

YILMAZ, A. et al. Trace elements and some extracellular antioxidant proteins levels in serum of patients with systemic lupus erythematosus. **Clin Rheumatol**, v. 24, n. 4, p. 331–335, Aug. 2005.

YIN, Y. et al. Normalization of CD4 + T cell metabolism reverses lupus. **Sci Transl Med**, v. 7, n. 274, 274ra18, Feb. 2015.

ZALUPS, R. K.; KOROPATNICK, D. J. (Ed.). **Cellular and molecular biology of metals**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2010.

ZANDMAN-GODDARD, G.; SHOENFELD, Y. Ferritin in autoimmune diseases. **Autoimmun Rev**, v. 6, n. 7, p. 457–463, Aug. 2007.

ZARKOVIĆ, M. et al. Glucocorticoid effect on insulin sensitivity: a time frame. **J Endocrinol Invest**, v. 31, n. 3, p. 238–242, Mar. 2008.

ZELIGER, H. I. Co-mordities of environmental diseases: A common cause. **Interdiscip Toxicol**, v. 7, n. 3, p. 117–122, Sept. 2014.

ZHAO, L.-L. et al. Reproductive effects of cadmium on sperm function and early embryonic development in vitro. **PLoS One**, v. 12, n. 11, e0186727, 2017.

ZIETZ, B. P. et al. Epidemiological investigation on chronic copper toxicity to children exposed via the public drinking water supply. **Sci Total Environ**, v. 302, n. 1–3, p. 127–144, Jan. 2003.

ZLATIC, S. et al. Molecular basis of neurodegeneration and neurodevelopmental defects in Menkes disease. **Neurobiol Dis**, v. 81, p. 154-161, Sept. 2015.

ZUNG, S.; MICHELON, L.; CORDEIRO, Q. O uso do lítio no transtorno afetivo bipolar. **Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo**, v. 55, n. 1, p. 30-37, 2010.