

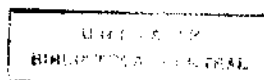
**MÁRCIA DIAS FERNANDES**

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM  
INDIVÍDUOS COM EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A INSETICIDAS  
ANTICOLINESTERÁSICOS**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em  
Farmacologia da Faculdade de Ciências  
Médicas da Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção do título de  
Mestre em Ciências, na área de  
Farmacologia.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mary Luci de Souza Queiroz**

**UNICAMP  
1997**



UNIDADE	3C
N.º CHAMADA:	
T. Unicamp	
F391a	
V.	Ex.
N.º DO BC/30	847
PROC.	281197
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	19/06/97
N.º CPD	

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP**

CM-00098341-1

Fernandes, Marcia Dias  
F391a Avaliação de parâmetros da resposta imunológica em indivíduos com  
exposição ocupacional aos inseticidas anticolinesterásicos/Marcia Dias  
Fernandes. Campinas, SP:83p., 1997

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Mary Luci de Souza Queiroz  
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Ciências Médicas.

1. inseticidas 2. fagocitose 3. neutrófilos I. Prof.ª Dr.ª Mary Luci de Souza  
Queiroz. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências  
Médicas. III. Título: Mestre

**MÁRCIA DIAS FERNANDES**

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM  
INDIVÍDUOS COM EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A INSETICIDAS  
ANTICOLINESTERÁSICOS**

Este exemplar corresponde à versão final da  
Dissertação de Mestrado, apresentada ao Curso  
de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências  
Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de  
Mestre em Ciências, na Área de Farmacologia da  
Farmacêutica Bioquímica Marcia Dias Fernandes.

Campinas, 16 de maio de 1997

  
Prof. Dr. Mary Luci de Souza Queiroz  
- Orientadora -

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mary Luci de Souza Queiroz

UNICAMP  
1997

## Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

**Orientadora:** Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

### Membros:

1. Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz



2. Prof. Dr. Eduardo Mello Capitani



3. Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdala



Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 16/05/97

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, pelo amor e incentivo

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>ª</sup>.Dr<sup>ª</sup>. Mary Luci de Souza Queiroz, por ter sido muito mais que apenas a minha orientadora.

Ao Prof. Dr. Ângelo Zanaga Trapé e Dr. Herling Gregório Aguiar, funcionárias e enfermeiras do Ambulatório de Toxicologia da Área de Saúde Ambiental e Toxicologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP, pelo encaminhamento dos pacientes.

Ao Laboratório de Toxicologia do Centro de Controle de Intoxicações do Hospital das Clínicas da UNICAMP, pelo importante trabalho de realização dos exames da atividade das colinesterases.

Ao Hemocentro de Campinas, pelo apoio financeiro.

Aos funcionários do Laboratório de cultura de células do Hemocentro, pelo apoio e colaboração na realização das técnicas.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, pela postura, disponibilidade e colaboração constantes.

Às amigas, Claudia, Marlene, Marize, Rita, Denise pela imensurável amizade e disposição para ajudar sempre.

Aos pacientes do Ambulatório de Toxicologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP-Campinas, cujos dados utilizei.

Aos docentes, alunos, funcionários e amigos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

E finalmente, não por uma importância derradeira, mas sim por representarem o cenário de minha vida,

Aos meus irmãos, que me ensinaram a amar.

À minha família.

# SUMÁRIO

---

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	6
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
3.1. INDIVÍDUOS .....	7
3.2. MÉTODOS.....	8
3.2.1. Teste do Nitroblue tetrazolium (NBT) .....	8
3.2.2. Capacidade Fagocitária e Lítica Frente aos Antígenos <i>Candida albicans</i> e <i>Candida pseudotropicalis</i> .....	9
3.2.3. Quimiotaxia de Neutrófilos.....	10
3.2.4. Dosagem de Imunoglobulinas.....	12
3.2.5. Atividade das colinesterases .....	12
3.7. AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA.....	18
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
3.8.1. Teste de Student (teste t) .....	18
3.8.2. Teste de Correlação .....	18
4. RESULTADOS .....	19
4.1. AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA.....	19
4.2. ATIVIDADE DAS COLINESTERASES .....	19
4.3. CAPACIDADE FAGOCITÁRIA E LÍTICA DE NEUTRÓFILOS FRENTE AOS ANTÍGENOS <i>C. ALBICANS</i> E <i>C. PSEUDOTROPICALIS</i> .....	20
4.4. TESTE DO NITROBLUE TETRAZOLIUM (NBT) .....	25
4.5. ATIVIDADE QUIMIOTÁTICA DE NEUTRÓFILOS .....	26
4.6. DOSAGEM DAS IMUNOGLOBULINAS SÉRICAS (IGM, IGG, IGA) .....	27
5. DISCUSSÃO.....	28
5.1. CAPACIDADE FAGOCITÁRIA E LÍTICA DE NEUTRÓFILOS FRENTE À <i>CANDIDA ALBICANS</i> E <i>CANDIDA PSEUDOTROPICALIS</i> .....	30
5.2. TESTE DO NITROBLUE TETRAZOLIUM (NBT) .....	32
5.3. ATIVIDADE QUIMIOTÁTICA DE NEUTRÓFILOS .....	34
5.4. DOSAGEM DAS IMUNOGLOBULINAS IGA, IGG E IGM .....	35
6. CONCLUSÕES .....	37
7. SUMMARY .....	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS* .....	40
9. TABELAS.....	52



# **SÍMBOLOS E ABREVIATURAS**

---

---

	e comercial
<b>&amp;</b>	
<b>dp</b>	Desvio padrão
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiaminotetracético
<b>IgA</b>	Imunoglobulina A
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>n</b>	Número de indivíduos
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
<b>NBT</b>	Nitroblue tetrazolium
<b>qsp</b>	Quantidade suficiente para
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline

---

## **RESUMO**

---

Neste trabalho estudamos alguns dos efeitos dos inseticidas, organofosforados e carbamatos, sobre o sistema imunológico. Foram estudados 40 indivíduos expostos ocupacionalmente a estes inseticidas e 40 indivíduos-controle, sem história de exposição ocupacional a estes compostos. A atividade das colinesterases no sangue foi utilizada como indicador de exposição. Os testes imunológicos utilizados foram:

- resposta imune-inespecífica avaliada através da atividade fagocitária e lítica dos neutrófilos frente aos antígenos *Candida albicans* e *Candida pseudotropicalis*, capacidade do neutrófilo de reduzir o corante nitroblue tetrazolium (NBT) e locomoção de neutrófilos (Quimiotaxia).
- resposta imune-humoral avaliada através das dosagens séricas das imunoglobulinas IgG, IgA e IgM.

Os resultados demonstraram uma redução significativa na atividade lítica de neutrófilos, frente ao antígeno *C. albicans* nos indivíduos expostos aos inseticidas; no entanto, a atividade fagocitária estava normal. As atividades fagocitária e lítica dos neutrófilos frente ao antígeno *C. pseudotropicalis*, permaneceram inalteradas. Observamos também uma diminuição significativa na produção de superóxidos, avaliada pelo teste de redução do corante NBT. Através da quimiotaxia, observamos uma diminuição significativa na locomoção de leucócitos. Em relação às dosagens séricas da imunoglobulinas, não observamos nenhuma alteração quando comparadas ao grupo controle.

# **1. INTRODUÇÃO**

---

# **1. INTRODUÇÃO**

---

Os praguicidas têm sido objeto de muitas investigações na área de toxicologia, pois são compostos que ocorrem freqüentemente como contaminantes ambientais e ocupacionais. Dentre os praguicidas, os inseticidas organofosforados e carbamatos têm sido os mais utilizados, para combater pragas ou doenças nas plantações das quais destacam-se as de algodão, frutas, cereais e tabaco e também como agentes de controle de vetores nos programas de saúde pública (McCLINTOCK; KOUGHHH; SJOBLAD, 1994; OMS, 1992; WATTERSON & THOMAS, 1992; HAYES, 1991). Desta forma, esses compostos representam um grupo de contaminantes com os quais o homem entra em contato, na maioria das situações, com um objetivo determinado podendo, entretanto, estar sujeito a uma intoxicação. As pessoas mais suscetíveis a uma exposição são os trabalhadores agrícolas, produtores de praguicidas e consumidores de produtos agrícolas.

A contaminação ambiental por praguicidas pode ocorrer através da água, do solo ou de resíduos industriais. A maioria das determinações é realizada em água ou alimento. A presença dos inseticidas carbamatos, carbofuran e aldicarb, foi detectada em águas de lagoa em quantidades de 1 - 50 ppb (COHEN; EIDEN; LORBER, 1986). Na dieta alimentar, pela ingestão de frutas, foi detectado carbaryl inalterado (GATRELL et al, 1986).

O aparecimento de intoxicações agudas e crônicas por inseticidas, como organofosforados e carbamatos, vem aumentando consideravelmente com a intensificação do uso destes agentes. Entre os casos de intoxicação atendidos nos Centros de Controle de Intoxicações do Brasil em 1994, com história de exposição ocupacional, os inseticidas organofosforados apareceram em 25,6 % dos casos, seguidos

dos carbamatos com 22,3 %, dos piretróides com 15,3 % e dos organoclorados com 9,5% (ALONZO, 1995).

Muitos estudos envolvem somente intoxicações agudas decorrentes de exposições a altas doses do composto, em que a maioria dos casos é acidental (Descotes, 1988). Na intoxicação aguda, o tratamento sintomático leva ao desaparecimento dos sintomas; no entanto, alterações hematológicas, após contato esporádico com os praguicidas podem persistir ( SULLIVAN, 1989; SHUURMAN et al, 1994).

Já no caso de intoxicação crônica, é difícil estabelecer as relações causa-efeito, isto é, os sinais das manifestações tóxicas podem surgir meses ou anos após a exposição. Um dos métodos utilizados para estudo das alterações crônicas consiste no monitoramento biológico, utilizando-se os indicadores biológicos de efeito, como a determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase. O mecanismo de ação dos compostos organofosforados está associado com a inibição da acetilcolinesterase (AChE) nos tecidos nervosos, permitindo o acúmulo de Acetilcolina livre. Os sinais de toxicidade resultam da estimulação dos receptores muscarínicos do sistema nervoso autônomo parassimpático, da estimulação e bloqueio dos receptores nicotínicos (incluindo gânglios simpáticos e parassimpáticos), assim como da placa de junção neuromuscular, além dos sinais decorrentes e efeitos no sistema nervoso central (GOLDFRANK et al, 1994; ECHOBICON,1993; JEYARATNAM & MARONI, 1994; TAYLOR, 1991; DE BLECKER et al, 1992). Os compostos carbamatos são também compostos inibidores diretos da acetilcolinesterase, e o organismo manifesta-se com sinais e sintomas semelhantes aos causados pelos organofosforados (GOLDFRANK et al, 1994; BURGER, 1993; HENAO & COREY, 1991). No entanto, a utilização destes métodos indica apenas uma exposição recente, podendo não ser um indicador fiel da existência do efeito tóxico (SHUURMAN; KUPER; JOSEPH, 1994).

Várias pesquisas demonstram a importância da detecção de alterações no organismo que sejam indicadores sensíveis do grau de intoxicação de indivíduos

expostos a praguicidas (AARON & WHITE, 1985; EVANS et al, 1988; QUEIROZ, 1986; BLAIR & WHITE, 1985; THRASHER; MADISON; BROUGHTON, 1993). Neste particular, as alterações nos sistemas hematológico e imunológico, por permitirem medir os diferentes níveis de envolvimento celular nos processos toxicológicos, constituem indicadores sensíveis do grau de toxicidade.

Os praguicidas são pouco seletivos, sendo tóxicos para órgãos-alvo de diversas espécies, incluindo o homem, e sua toxicidade tem sido extensivamente estudada nos vários sistemas: o sistema nervoso, o sistema respiratório, o trato gastrintestinal, o sistema enzimático, entre outros. No entanto, os efeitos no sistema imunológico decorrentes da exposição a estes agentes têm recebido pouca atenção (DESCOTES, 1988; KURTZ; DESKIN; HARRINGTON, 1989; BARON, 1991).

As alterações provocadas no sistema imunológico após contato esporádico de xenobióticos com o seres vivos são consideradas como parâmetro importante na rotina dos processos toxicológicos crônicos (HERMANOWICZ et al, 1982; ROUX et al, 1979; ANDERSON et al, 1978; LADICS et al, 1993). Estes agentes químicos, alterando a integridade do sistema imune, podem desencadear um quadro imunossupressor, o que torna o hospedeiro mais suscetível a processos patológicos tais como infecção, doenças autoimune e até mesmo indução de carcinogênese (SHUBIK, 1987; THRASHER et al, 1993; CIESIELSKI et al, 1994).

A maioria dos estudos sobre efeitos imunotoxicológicos dos inseticidas tem sido realizada em animais de experimentação. Os efeitos dos carbamatos e organofosforados se tornam aparentes após pequenas doses destes compostos. BOLKOVITIANOVA & KOGAN (1969) observaram supressão da imunidade induzida pela vacina anti-tifóide em ratos após a administração de carbaril. Eles também observaram que esta supressão estava associada a uma redução na atividade fagocitária dos leucócitos e nos níveis séricos de anticorpos. Outros trabalhos têm demonstrado várias disfunções imunológicas, incluindo atrofia de tecido linfóide e imunossupressão

humoral induzida por uma variedade de praguicidas (BARBERS & OISHI, 1987; THRASHER et al, 1993; LADICS et al, 1994; LANDER & RONNE,1995).

OLEFIR (1971) notou redução na atividade do complemento, diminuição na atividade fagocitária de neutrófilos, títulos subnormais de aglutininas e alteração nas células reticuloendoteliais em ratos tratados com pequenas doses de carbamatos e ditiocarbamatos após a vacina anti-tifóide. STREET & SHARMA (1975) estudaram as alterações provocadas na resposta imune humoral e celular de coelhos alimentados com dietas contendo quantidades subtóxicas de DDT (organoclorado). Eles observaram uma redução dos centros germinais do baço e da parte cortical do timo. Em relação à resposta humoral foi observada uma redução nos níveis de gamaglobulinas séricas, após a administração de antígenos nos animais tratados com os praguicidas.

Desde os anos setenta, o National Institute of Environmental Health Science está conduzindo testes em animais de experimentação com o propósito de triagem e delineamento dos efeitos imunotóxicos de produtos químicos (SULLIVAN et al, 1989).

São poucos os estudos já efetuados sobre as alterações imunotoxicológicas em indivíduos expostos à ação de praguicidas. KATSENOVICH; RUZYBAJIEV; FEODORINA (1981) observaram variações quantitativas entre as populações de linfócitos T e B, dependendo dos diferentes graus de intoxicação. Redução na resposta imune tipo celular, em indivíduos expostos aos pesticidas DDT e gama-HCT, foi encontrada por TRACZYK et al (1978) e HERMANOWICZ et al (1982). Autoimunidade em humanos após exposição a praguicidas foi sugerida por THARASHER et al (1993).

Dermatite de contato e alergias dérmicas pela exposição a praguicidas são provavelmente, os efeitos mais comuns e podem ocorrer após exposição a inseticidas organofosforados ou a uma variedade de fungicidas, formicidas e compostos piretróides (SHARMA & KAUR, 1990).

Recentemente, TSVETKOVA et al (1992), após avaliar a função de granulócitos em indivíduos com exposição ocupacional a inseticidas, sugeriu a avaliação destes parâmetros nos procedimentos de rotina para monitoramento das intoxicações.

Resultados obtidos em nosso laboratório através de avaliações em trabalhadores expostos cronicamente ao chumbo (QUEIROZ; ALMEIDA; HOEHR, 1993; QUEIROZ et al, 1994; QUEIROZ et al, 1994a), mercúrio (PERLINGEIRO & QUEIROZ, 1994; PERLINGEIRO & QUEIROZ, 1995; DANTAS & QUEIROZ, 1997a; DANTAS & QUEIROZ, 1997b; DANTAS & QUEIROZ, 1997c) e hexaclorobenzeno (QUEIROZ; PERLINGEIRO; BINCOLETO, 1997a; QUEIROZ et al, 1997b; SILVEIRA & QUEIROZ, 1997) também demonstram que métodos para detecção da atividade funcional de neutrófilos e linfócitos constituem indicadores sensíveis do nível de comprometimento celular nas intoxicações dos xenobióticos estudados. Neste trabalho, investigamos os efeitos da exposição a inseticidas anticolinesterásicos (orgafoforados e carbamatos) na resposta imunológica inespecífica, através da avaliação da atividade fagocitária e lítica dos neutrófilos frente aos antígenos *Candida albicans* e *Candida pseudotropicalis*, da capacidade do neutrófilo de reduzir o corante nitroblue tetrazolium (NBT) e da locomoção de neutrófilos (Quimiotaxia). Uma avaliação da resposta imunológica tipo humoral foi realizada através da detecção dos níveis séricos de imunoglobulinas (IgA, IgG e IgM). A atividade das colinesterases foi utilizada como indicador de exposição.



## **2. OBJETIVO**

---

## **2. OBJETIVO**

---

O objetivo principal deste trabalho consistiu em detectar indicadores sensíveis dos efeitos tóxicos de inseticidas através do estudo de alterações na resposta imunológica inespecífica e humoral em indivíduos assintomáticos e oligossintomáticos, com exposição ocupacional a inseticidas anticolinesterásicos (organofosforados e carbamatos), nos quais os níveis de atividade das colinesterases estivessem abaixo dos Limites de Tolerância Biológica.

A resposta imunológica inespecífica nestes indivíduos foi avaliada através das provas de atividade fagocitária e lítica dos neutrófilos frente ao antígeno *Candida albicans* e *Candida pseudotropicalis*, de capacidade dos neutrófilos em reduzir o corante nitrobluetetrazolium (N.B.T.) e de locomoção de neutrófilos (Quimiotaxia). A resposta humoral foi avaliada através dos níveis séricos de imunoglobulinas.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

---

### **3.1. Indivíduos**

Foram estudados 40 indivíduos, com história de exposição crônica a inseticidas anticolinesterásicos (organofosforados e carbamatos) atendidos no Ambulatório de Toxicologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP-Campinas, no período de 13 de junho de 1995 a 02 de abril de 1996. Estes indivíduos foram encaminhados, ou por apresentarem sintomas de intoxicação por inseticidas ou para controle e monitoramento periódico relacionado ao Programa de Vigilância à Saúde da População Exposta a Agrotóxicos na região de Campinas-SP, da área de Saúde Ambiental do Departamento de Medicina Preventiva e Social da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP.

Paralelamente, 40 indivíduos sem história de exposição a inseticidas, doadores de sangue que vêm ao Hemocentro - UNICAMP, do mesmo sexo e faixa etária dos indivíduos expostos, foram utilizados como controle para este estudo. Indivíduos expostos e controles (não expostos) foram avaliados clinicamente e laboratorialmente através de hemograma e atividade das colinesterases.

Para estes dois grupos analisados, trabalhadores e controle, foi aplicado um questionário, com a finalidade de investigar a história ocupacional e clínica, idade, o uso de equipamento de proteção individual e para saber da existência de patologias ou uso de medicamentos.

Estes trabalhadores são, na maioria, oligossintomáticos, nos quais os sintomas mais freqüentes observados foram: cefaléia (42,5%), fraqueza muscular (20,0%), alta freqüência de gripes (20,0%), dores no corpo (15,0%), reações alérgicas (15,0%), tontura (12,5%), alteração visual (10,0%), sudorese (7,5%), dores estomacais (7,5%), perda de memória (2,5%) e falta de sensibilidade nas extremidades (2,5%).

Todos os indivíduos, após amplo esclarecimento sobre os procedimentos a serem realizados, consentiram espontaneamente em participar do estudo. A faixa etária dos trabalhadores variou entre 19 e 62 anos ( $x = 37,2 \pm 12,5$ ); o tempo de exposição variou de 02 a 480 meses ( $x = 83,7 \pm 103,3$ ). A coleta do material foi obtida de indivíduos que se encontravam em atividade normal de trabalho.

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Teste do Nitroblue tetrazolium (NBT)**

#### ***Princípio do Teste***

Este teste consiste em verificar a capacidade do neutrófilo de produzir superóxido, capaz de reduzir o NBT a um composto de cor azul escura (Formazan), ou seja, NBT reduzido (FALCÃO; VOLTARELLI; BOTURA, 1982). Este teste fornece parâmetros sobre a função lítica dos neutrófilos.

#### ***Descrição da Técnica***

Colhe-se 1 ml de sangue em EDTA. Prepara-se em um tubo de ensaio: 100 µl de sangue total e 100 µl de solução de NBT (0,1 % em PBS), em que se adicionam 50 µl de endotoxina 1 mg/ml em PBS (endotoxina *Escherichia coli*-Difco).

Incuba-se o tubo por 15 min em banho a 37°C. A seguir centrifuga-se por 5 min a 250 g. O sobrenadante é desprezado e adicionam-se 50 µl de soro bovino fetal. São feitos esfregaços e deixa-se secar.

As lâminas são coradas com Leishman por 5 min, e após este tempo, o corante é diluído através da adição de água destilada sobre a lâmina, a qual é mantida por 15 min. Ao microscópio, conta-se o número de neutrófilos contendo NBT reduzido e não reduzido num total de 100 neutrófilos. O índice de NBT é expresso em percentagem, multiplicando-se o número de neutrófilos contendo NBT reduzido por 100 e dividindo-se pelo número total de neutrófilos.

### **3.2.2. Capacidade Fagocitária e Lítica Frente aos Antígenos *Candida albicans* e *Candida pseudotropicalis***

#### ***Princípio do Teste***

A capacidade fagocitária dos leucócitos pode ser detectada através da incubação *in vitro* de neutrófilos com uma suspensão celular de leveduras para que ocorra a fagocitose e conseqüente lise das mesmas (BALLART et al, 1987).

#### ***Descrição da Técnica***

Sobre uma lâmina com bordas esmaltadas é distribuído 1 ml de sangue periférico, para que não haja extravasamento de sangue. Esta lâmina é incubada por 2 hs 37°C.

São preparadas as suspensões de *Candida ssp* em meio Eagle (Sigma cod:M1010) de culturas inoculadas no dia anterior em meio ágar Sabouraud (Biobrás cod:107-3). As suspensões são lavadas duas vezes em meio Eagle e ressuspensas na concentração  $5 \times 10^6$  células/ml.

As leveduras são opsonizadas em meio Eagle com 10 % de soro humano normal tipo AB, deixando a suspensão por 30 min a 37°C.

Passando o tempo de incubação, remove-se cuidadosamente o coágulo formado sobre a lâmina, lavando com meio Eagle.

A lâmina é coberta com aproximadamente 1 ml da suspensão de levedura sendo incubada por 30 min a 37°C.

Terminado o tempo de incubação, a lâmina é lavada com meio Eagle e corada com corante Giemsa (Ecibra). A lâmina é observada em microscópio e são contadas num total de 100 neutrófilos, o número de leveduras fagocitadas e lisadas. O resultado de lise é calculado dividindo-se o número de leveduras lisadas pelo número de leveduras fagocitadas, sendo expresso em percentagem (BALLART et al, 1987).

### **3.2.3. Quimiotaxia de Neutrófilos**

#### ***Princípio do Teste***

Quimiotaxia é um método utilizado para o estudo quantitativo da locomoção de leucócitos. Basicamente consiste em colocar uma suspensão de leucócitos em um compartimento e um agente quimiotático no outro compartimento de uma câmara de migração, sendo estes compartimentos divididos por um filtro com microporos de 3 µm. O tamanho dos microporos tem que ser suficiente para permitir a migração da célula em estudo sem, no entanto, permitir sua passagem passivamente (TOOD; SANFORD; DAVIDSON, 1989).

### **Descrição da Técnica**

Colhem-se 5 ml de sangue em heparina (Roche). O sangue é centrifugado por 10 min a 400 g e o sobrenadante é separado juntamente com o creme leucocitário. Separam-se cerca de 0,8 ml de plasma.

Adiciona-se ao creme leucocitário 1 ml de dextran (Sigma cod: D-4876; solução 6 % em salina 0,85%) e incuba-se por 25 min a 37°C.

Lava-se três vezes a solução de dextran recolhida em meio TC 199 com bicarbonato de sódio, contendo 10 mM HEPES, 200 UI de penicilina por ml de água destilada e 0,1 mg de estreptomicina. As células foram ajustadas para  $2 \times 10^6$  células/ml.

Do plasma separado inicialmente, tomam-se 0,5 ml e adiciona-se 0,1 ml de endotoxina 2,5 % em PBS (endotoxina *Escherichia coli*-Difco). Incuba-se por 30 min a 37°C, e adiciona-se 4,4 ml de meio TC 199. Homogeneiza-se.

Monta-se a câmara quimiotática sendo colocando um pré-filtro (Millipore AP 2501300) e um filtro (millipore SSWPO 1300) no interior de um dos orifícios de uma placa de cultura (Costar catálogo nº3424). Para cada indivíduo são preparadas duas câmaras, uma contendo 0,25 ml de plasma com endotoxina e a outra 0,25 ml de meio TC 199. Em seguida adicionam-se 0,2 ml da suspensão de  $2 \times 10^6$  células/ml num receptáculo raso e circular, de diâmetro ligeiramente menor ao do orifício da placa e inverte-se o receptáculo sobre o filtro no interior do orifício. Incuba-se por 30 min a 37°C em câmara úmida.

Lavam-se os filtros em meio TC 199 que em seguida são fixados por 20 min em propanol 2 (álcool isopropílico). A coloração é feita passando pela seguinte bateria, 2 min em cada etapa: água destilada, hematoxilina, água destilada, propanol-2 e xilol.

A leitura é feita usando-se lente objetiva de imersão, medindo-se a distância de migração das células através de ajustes no micrômetro até atingir o plano onde se encontram no máximo 5 células (AKENZUA & AMIENGHEME, 1981).



### **3.2.4. Dosagem de Imunoglobulinas**

#### ***Princípio do Teste***

A técnica baseia-se na precipitação antígeno-anticorpo em ágar. O anticorpo utilizado é o antisoro, já incorporado numa fina camada de ágar, e o antígeno é o soro contendo as imunoglobulinas IgG, IgA e IgM a serem dosadas, inoculando a amostra nos orifícios do gel. O antígeno difunde-se radialmente formando um anel de precipitação que forma ao redor dos orifícios (HUDSON & HAY, 1989).

#### ***Descrição da Técnica***

Fazem-se as curvas de padronização, utilizando soros com concentrações definidas de imunoglobulinas. Colocam-se os resultados das leituras em gráficos com as medidas em mm e mg/dl e traça-se a reta.

Separa-se o soro por centrifugação. Inoculam-se 5 µl do soro nos orifícios da placa com gel contendo o anti-soro. Deixar por 48 h.

São feitas então, as leituras do raio de precipitação do anel formado, com auxílio de uma régua milimetrada. Extrapolar estes resultados para a reta determinando, assim, a concentração em mg/dl.

### **3.2.5. Atividade das colinesterases**

#### ***Determinação por duas metodologias***

As metodologias citadas abaixo foram desenvolvidas no Laboratório de Toxicologia do Centro de Controle de Intoxicações/HC/UNICAMP - Campinas/SP, o qual, desde 1990, é indicado como Laboratório de Referência Nacional na Determinação da Atividade das Colinesterases.

Método de Édson/Colorímetro de Lovibond: avaliação das colinesterases totais (plasmática + eritrocitária). É um método semi-quantitativo, rápido, obtendo-se resultados em porcentagem de atividade enzimática (EDSON, 1958).

Método de Ellman: avaliação da atividade das colinesterases eritrocitária e plasmática, separadamente. É um método quantitativo obtendo-se resultados em U.I./ml (SITTERT, 1987).

### **3.2.5.1. Método de Édson/Colorímetro de Lovibond**

#### ***Princípio do Teste***

O ácido acético, resultante da hidrólise do perclorato de acetilcolina pela ação da enzima acetilcolinesterase, altera o indicador azul de bromotimol, que passa da cor verde (pH neutro) para amarelo (pH ácido). A cor resultante é então comparada com um disco padrão no colorímetro de Lovibond (EDSON, 1958).

#### **Descrição da Técnica**

##### ***REAGENTES***

- Solução indicadora:

Dissolvem-se 112 mg de azul de bromotimol (Merck, ref. 3026) em qsp de NaOH 0,02 N para dissolução. Completar o volume para 250 ml com água destilada.

- Substrato

Dissolvem-se 0,5 g de perclorato de acetilcolina (Biochemical, ref. 44003) em 100 ml de água destilada.

## PROCEDIMENTO

Colhe-se 1 ml de sangue em heparina. Coloca-se 1,0 ml de água destilada em tubo de ensaio (branco). Em outro tubo são colocadas 0,5 ml da solução de azul de bromotimol (amostra).

Pipetam-se 10 µl da amostra em cada tubo. Adicionam-se 0,5 ml de substrato ao tubo que contém a amostra. Os tubos são homogenizados e aguarda-se o tempo de desenvolvimento da reação de acordo com a Tabela 01.

Transferem-se o branco e a amostra para as cubetas do colorímetro. A leitura foi efetuada imediatamente contra a luz, no círculo inferior do colorímetro.

**TABELA 01 - Tabela da relação de Tempo e Temperatura para desenvolvimento da reação de cor, proposta pelo método de Edson/Lovibond (EDSON, 1958).**

20	28	25
21	27	24
22	26	23
23	25	23
24	24	22
25	24	20
26	23	19
27	22	18
28	21	18
29	19	17
30	19	17
31	18	17
32	18	16
33	18	16

### **3.2.5.2. Método de Ellman Modificado**

#### ***Princípio do Teste***

A hidrólise enzimática da acetiltiocolina (substrato) produz ácido acético e tiocolina. A atividade da colinesterase pode ser medida com a adição de um reativo de cor (DTNB), o qual reage com a tiocolina produzindo um complexo amarelo. A intensidade da cor é proporcional à atividade enzimática e pode ser medida em espectrofotômetro a 405 nm (SITTERT, 1987).

#### ***Descrição da Técnica***

##### ***REAGENTES***

- Solução tampão de DTNB (ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzóico) (Sigma, ref. D-8130)

NaCl.....	1,25 g
DTNB.....	25 mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1,117 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	62,5 mg
Sol. dil. NaOH ou HCl.....	qsp pH 7,8
Água destilada.....	qsp 250 ml

- Substrato:

Dissolvem-se 37,5 mg de iodeto de propioniltiocolina (Sigma, ref. P-2880) em 25 ml de água destilada . A solução é preparada diariamente.

- Solução Inibidora:

Dissolvem-se 5 mg de salicilato de eserina (Sigma, ref. E-8500) em 5 ml de água destilada. Estável por 15 dias.

- Solução Padrão de L-Cisteína:

Dissolvem-se 63,05 mg de L-cisteína (Riedel-DE-Haën, 39010) em 1 L de água destilada. Prepara-se no momento do uso.

## *PROCEDIMENTO*

### *A) Curva de calibração*

Transferem-se alíquotas de 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 ml da solução padrão de L-cisteína (respectivamente 0; 0,08; 0,16; 0,24; 0,32 e 0,40  $\mu\text{mol}$ ) para balões volumétricos de 5 ml. Completa-se o volume com água destilada.

São efetuadas as leituras das absorbâncias em espectrofotômetro contra água destilada, em comprimento de onda de 420 nm.

### *B) Atividade das Colinesterases*

Colhe-se 1 ml de sangue em heparina.

São colocadas 20 ml de solução tampão DTNB em um *Erlenmeyer*, adicionando-se 20  $\mu\text{l}$  da amostra (sangue total). Homogeniza-se, e desta solução de amostra diluída, retirou-se duas alíquotas de 4 ml que são colocadas em dois tubos identificados como "T" (Total) e "TB" (Branco da Total).

Centrifugam-se os 12 ml restantes da solução de amostra diluída durante 5 min a 1000 g. Do sobrenadante, retiram-se duas alíquotas de 4 ml que são colocadas em dois tubos de ensaio identificados como "P"(Plasmática) e "PB" (Branco da Plasmática).

Utilizou-se o seguinte protocolo:

Amostra de sangue diluído	4,0 ml	4,0 ml
Salicilato de Eserina	--	50 µl
Pré - Incubação	5 min. 30°C	5 min. 30°C
Propioniltiocolina	1,0 ml	1,0 ml
Incubação	10 min. 30°C	10 min. 30°C
Salicilato de Eserina	50 µl	--

Os tubos "T" e "TB" são centrifugados por 5 min a 1000 g.

Mediu-se as absorbâncias dos sobrenadantes dos tubos "T" e "TB" e dos tubos "P" e "PB" em espectrofotômetro à 405 nm contra água destilada.

*Cálculos:*

$$\text{Atividade CHE Total} = \frac{A(T - TB) \times 10 \text{ U.I./ml.}}{A(S)}$$

A (S)

$$\text{Atividade CHE Plasmática} = \frac{A(P - PB) \times 10 \text{ U.I./ml}}{A(S)}$$

A (S)

$$\text{Atividade CHE Eritrocitária} = \text{Ativ. CHE Total} - \text{Ativ. CHE Plasmática.}$$

*ONDE:*

$$A(T - TB) = \text{Absorbância de "T" menos absorbância de "TB"}$$

$$A(P - PB) = \text{Absorbância de "P" menos absorbância de "PB"}$$

A(S) = Absorbância do ponto 0,40 µmol menos absorbância do ponto zero da curva de calibração.

### **3.7. Avaliação Hematológica**

Alguns parâmetros hematológicos foram realizados através da avaliação das séries eritrocítica e leucocitária pelo laboratório de Emergência do HC/UNICAMP, através do Contador de Células Hematológicas Roche COBAS HELIOS (RAB 006B).

### **3.8. Análise Estatística**

#### **3.8.1. Teste de Student (teste t)**

As variáveis foram medidas no grupo exposto e grupo controle. Através do teste comparamos o grupo exposto x grupo controle, utilizando-se *teste t* para contraste entre duas médias de amostras independentes (BEIGUELMAN, 1991).

#### **3.8.2. Teste de Correlação**

As associações entre as variáveis foram avaliadas através do coeficiente de correlação de Pearson (BEIGUELMAN, 1991).

## **4. RESULTADOS**



## **4. RESULTADOS**

---

### **4.1. Avaliação Hematológica**

A avaliação hematológica de 37 indivíduos expostos está apresentada na Tabela 1 (pág.52). Os valores de hematócrito e hemoglobimetria estavam normais em 10 indivíduos (WILLIANS, 1977). Dos outros 27 indivíduos, 16 apresentaram valores aumentados no hematócrito, 22 apresentaram valores aumentados na hemoglobimetria e 12 apresentaram valores aumentados nos dois parâmetros.

A leucometria estava dentro dos valores de referência (WILLIANS, 1977) em 28 indivíduos. Dos 9 indivíduos restantes, 4 apresentaram valores acima dos valores normais e 5 valores diminuídos.

Todos os indivíduos do grupo controle (n=40) apresentaram valores normais na série vermelha, hematócrito e hemoglobimetria, assim como na série branca.

### **4.2. Atividade das colinesterases**

A atividade das colinesterases foi avaliada pelo método de Ellman (SITTERT, 1987) e paralelamente pelo método de Édson/Lovibond (Edson, 1958), sendo utilizada como indicador de exposição aos inseticidas estudados.

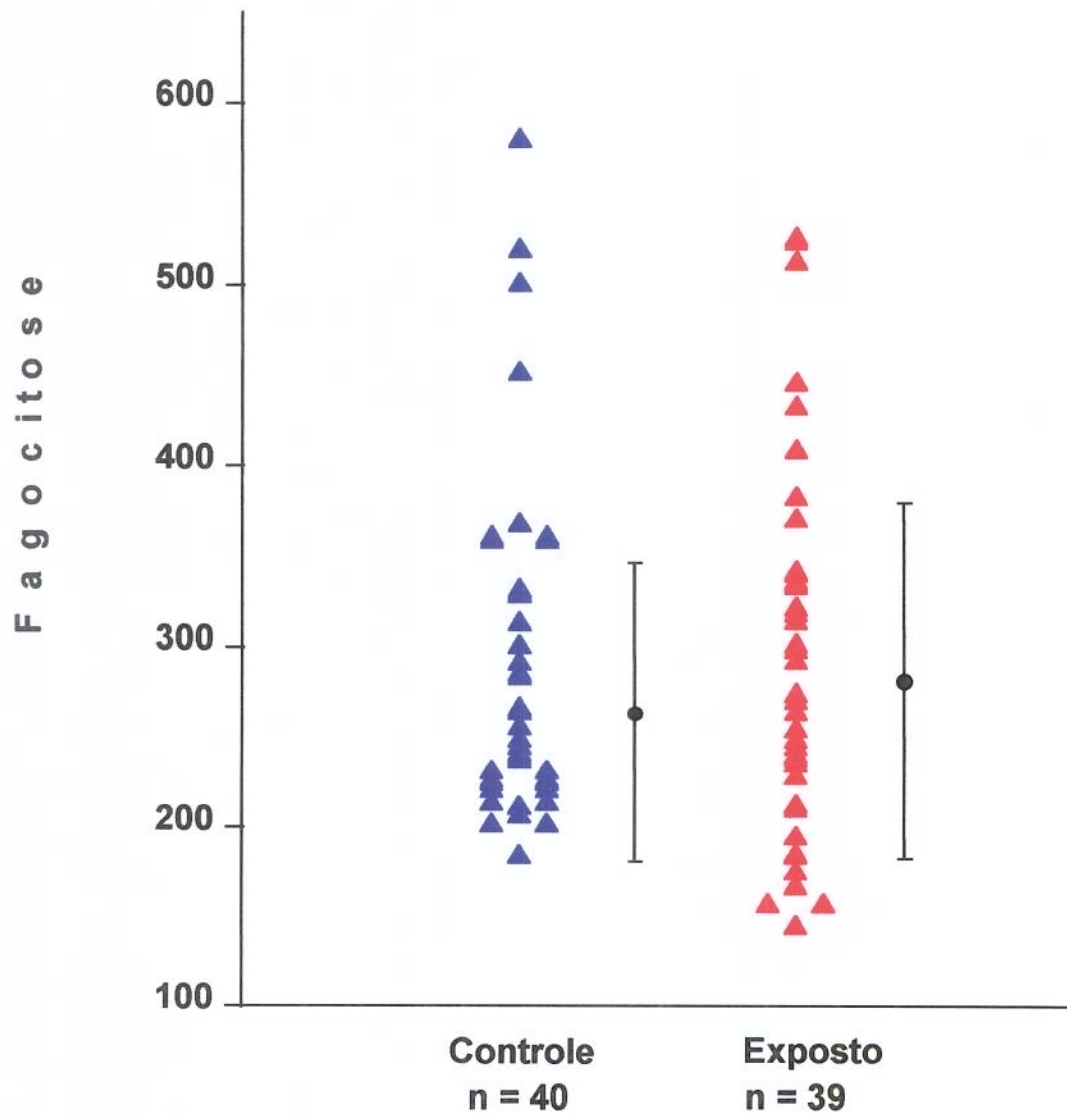
Em todos os trabalhadores estudados (n = 40) assim como no grupo controle (n = 40) os níveis de atividade das colinesterases encontravam-se normais (Tabela2; pág.53)

### **4.3. Capacidade Fagocitária e Lítica de Neutrófilos frente aos Antígenos *C. albicans* e *C. pseudotropicalis***

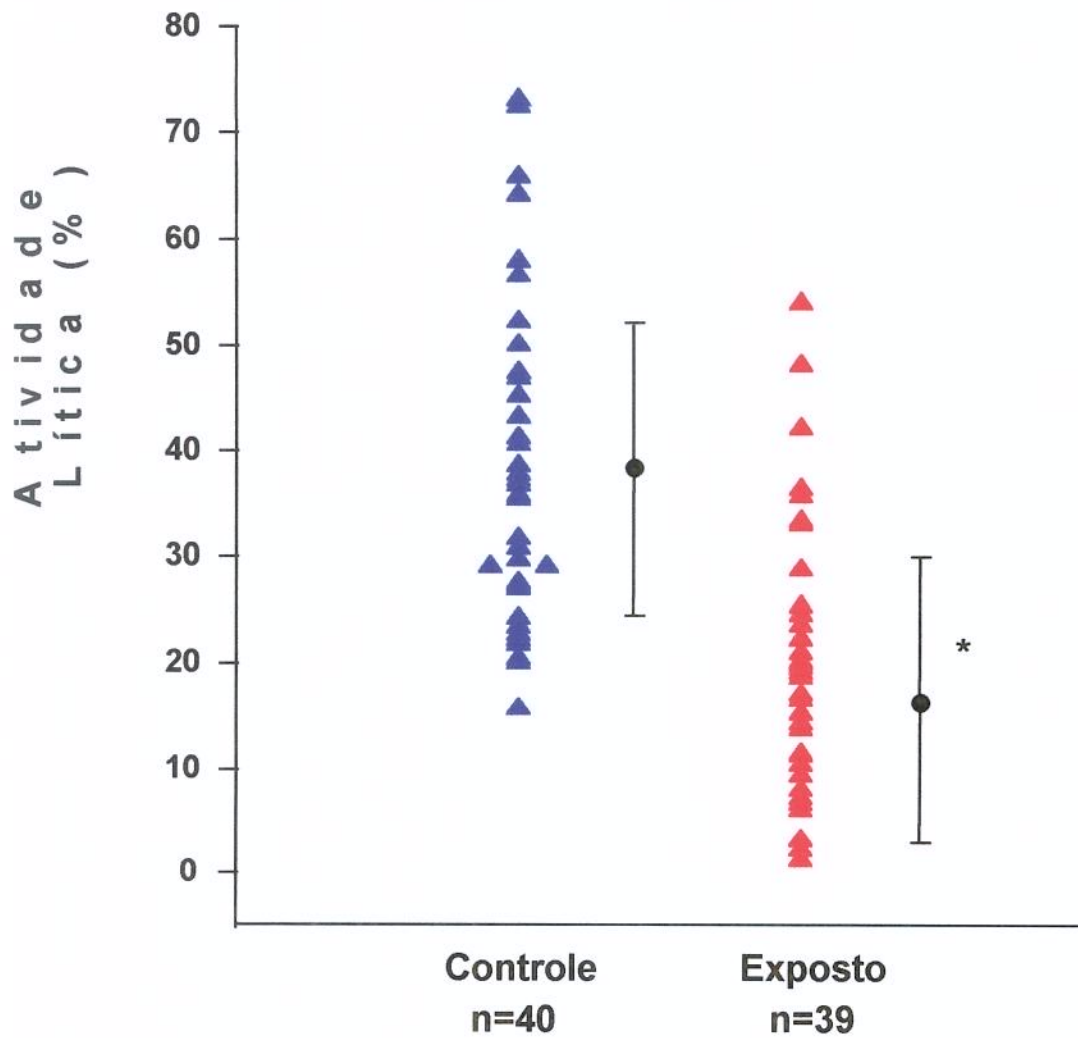
Na Tabela 3 (pág.54) estão dispostos os resultados da capacidade fagocitária e lítica de neutrófilos frente ao antígeno *C. albicans*, idade e o tempo de exposição de 39 indivíduos expostos à inseticidas. A capacidade fagocitária e lítica frente ao antígeno *C. pseudotropicalis*, idade e tempo de exposição de 36 indivíduos expostos à inseticidas apresentam-se no Tabela 4 (pág.55), sendo ambos os resultados comparados com 40 indivíduos controle.

Conforme Figuras 1 e 3, não observamos diferença significativa entre a capacidade fagocitária de neutrófilos dos indivíduos expostos e dos controles frente às duas leveduras. Por outro lado, a atividade lítica destas células frente à *C. albicans* estava significativamente reduzida ( $p < 0,001$ ; Teste t de Student) nos indivíduos expostos (Figura 2). A atividade lítica de neutrófilos dos indivíduos expostos frente à *C. pseudotropicalis*, no entanto, não apresentou alterações significativas quando comparadas ao controle (Figura 4).

Não houve correlação entre os resultados da fagocitose e lise de neutrófilos com o tempo de exposição e os níveis de atividade das colinesterases.



**Figura 1.** Atividade fagocitária de neutrófilos frente ao antígeno *Candida albicans* em indivíduos com exposição ocupacional a inseticidas anticolinesterásicos comparada com o grupo controle (não exposto).



**Figura 2.** Atividade lítica de neutrófilos frente ao antígeno *Candida albicans* em indivíduos com exposição ocupacional a inseticidas anticolinesterásicos comparada com o grupo controle (não exposto). (\*)  $p < 0,001$  (Teste t de Student)

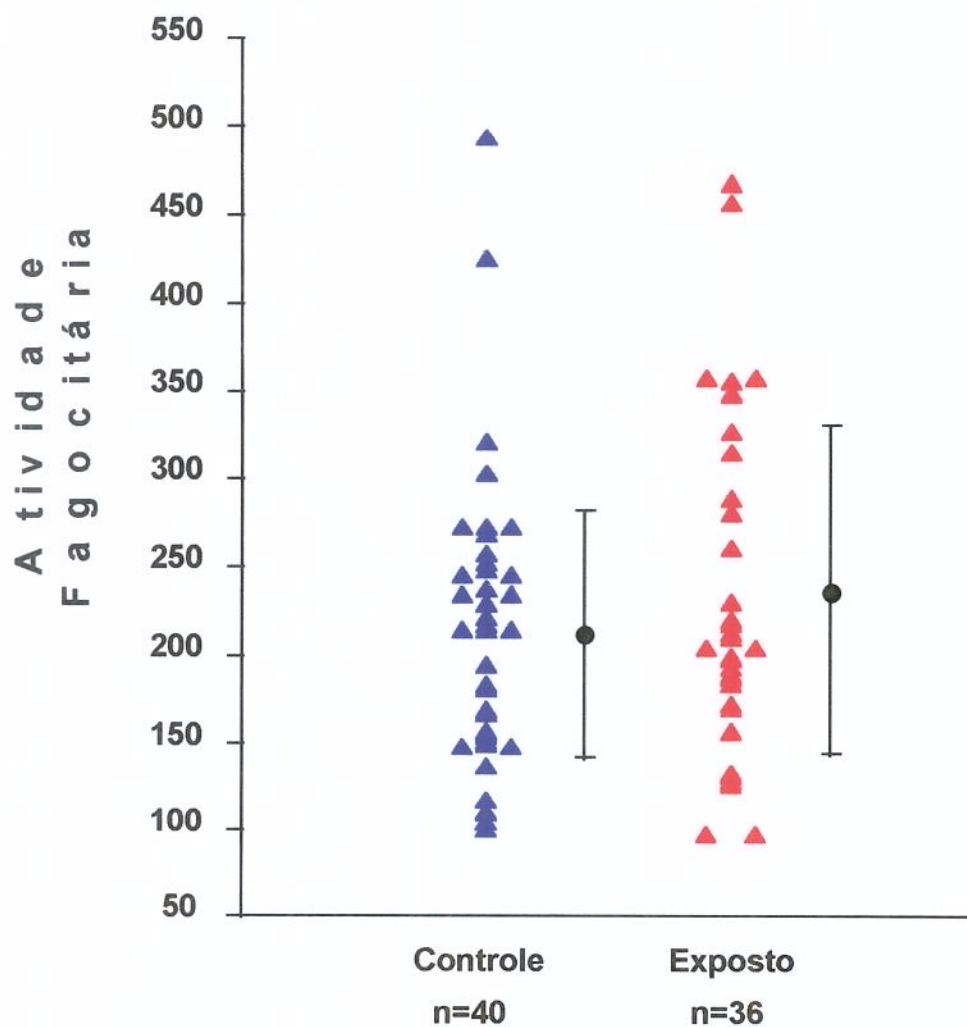


Figura 3. Atividade fagocitária de neutrófilos frente ao antígeno *Candida Pseudotropicalis* em indivíduos com exposição ocupacional a inseticidas anticolinesterásicos comparada com o grupo controle (não exposto).

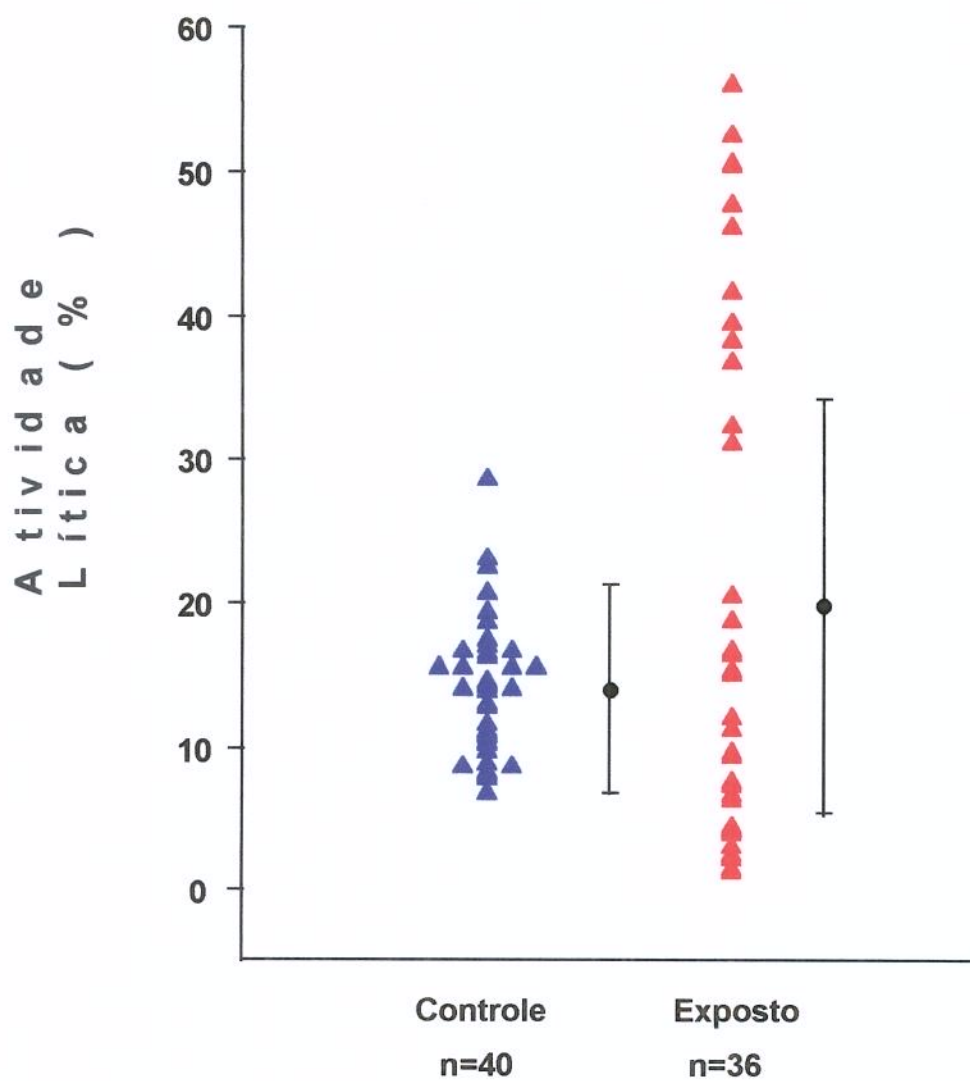
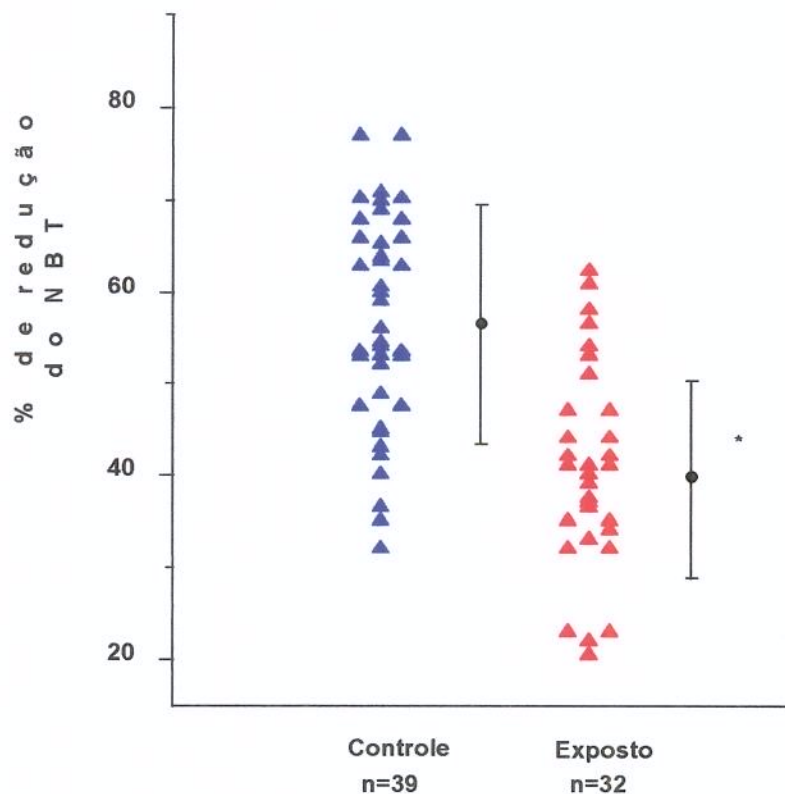


Figura 4. Atividade lítica de neutrófilos frente ao antígeno *Candida Pseudotropicalis* em indivíduos com exposição ocupacional a inseticidas anticolinesterásicos comparada com o grupo controle (não exposto).

#### 4.4. Teste do Nitroblue tetrazolium (NBT)

A capacidade do neutrófilo de reduzir o corante nitroblue tetrazolium (NBT) foi estudada em 32 indivíduos expostos a inseticidas, sendo comparada com os valores obtidos de 39 indivíduos controle. Como pode ser visto na Figura 5 e Tabela 5 (pág.56), esta capacidade encontra-se significativamente reduzida em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$  - Teste t de Student).

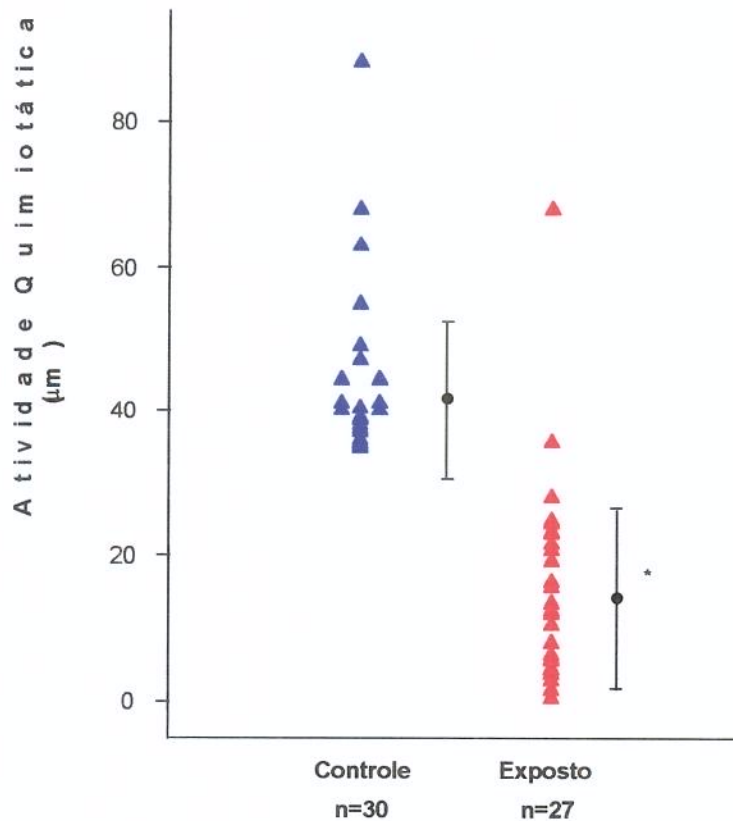
Não houve correlação entre a capacidade do neutrófilo de reduzir o NBT, o tempo de exposição dos indivíduos e os níveis de atividade das colinesterases.



**Figura 5.** Capacidade do neutrófilo de reduzir o corante nitroblue tetrazolium (NBT) em indivíduos com exposição ocupacional a inseticidas anticolinesterásicos comparada com o grupo controle (não exposto). (\* )  $p < 0,001$  (Teste t de Student)

#### 4.5. Atividade Quimiotática de Neutrófilos

A atividade quimiotática de neutrófilos foi estudada em 27 indivíduos expostos a inseticidas, sendo comparada com 30 indivíduos-controle. Como pode ser visto na Figura 6 e Tabela 6 (pág.57), esta atividade encontra-se significativamente reduzida em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ; Teste t de Student). Não houve correlação entre a atividade quimiotática e o tempo de exposição dos indivíduos e os níveis de atividade das colinesterases.



**Figura 6.** Atividade quimiotática de leucócitos em indivíduos com exposição ocupacional a inseticidas anticolinesterásicos comparada com o grupo controle (não exposto).  
(\*  $p < 0,001$  (Teste t de Student))



#### 4.6. Dosagem das Imunoglobulinas Séricas (IgM, IgG, IgA)

Os níveis séricos destas três imunoglobulinas foram estudados em 32 indivíduos expostos a inseticidas, sendo comparados com 12 indivíduos controle através do método de imunodifusão radial. Utilizando o Teste t de Student nos resultados obtidos, constatamos que não houve alterações significativas nos níveis das imunoglobulinas em relação ao grupo controle, conforme se observa na Figura 7 e Tabela 7 (pág.58). Não houve correlação entre as concentrações de IgG, IgA e IgM e o tempo de exposição e os níveis de atividade das colinesterases.

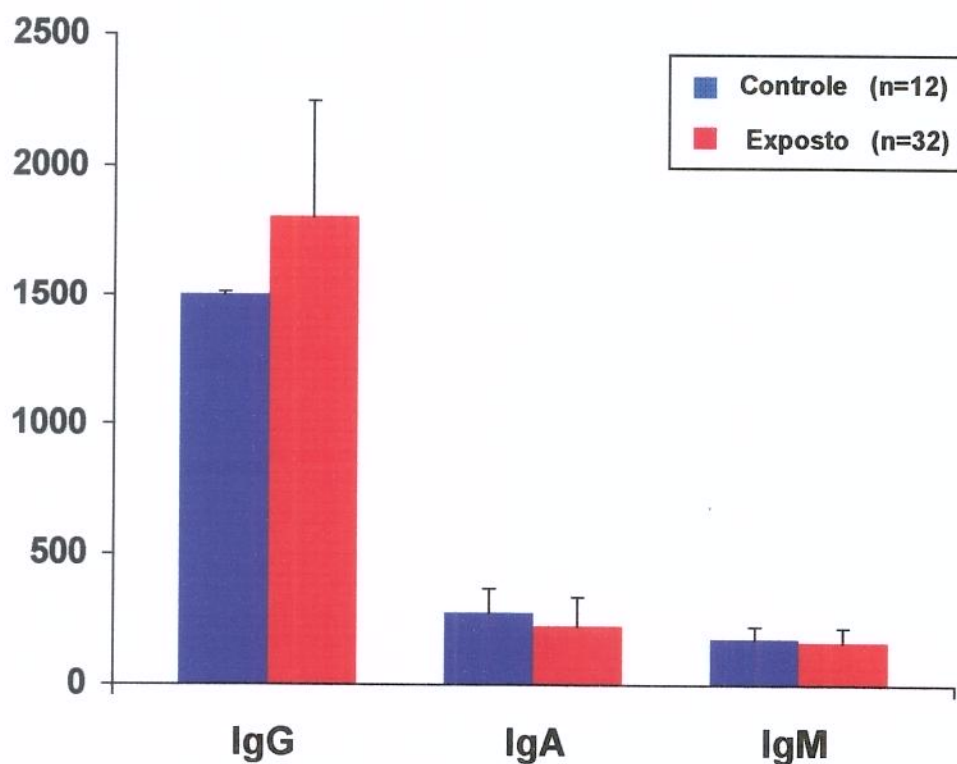


Figura 7. Dosagem sérica das imunoglobulinas G, A, e M em indivíduos com exposição ocupacional a inseticidas anticolinesterásicos comparadas com o grupo controle (não exposto)

## **5. DISCUSSÃO**

---

## **5. DISCUSSÃO**

---

Estudamos, neste trabalho, alguns parâmetros da resposta imunológica de indivíduos com história de exposição ocupacional a inseticidas anticolinesterásicos (organofosforados e carbamatos). O nível da atividade das colinesterases, utilizada como indicador de exposição ocupacional a estes inseticidas, foi medido neste trabalho por dois métodos: Método de Édson/Colorímetro de Lovibond e Método de Ellman. O uso de duas metodologias para determinação da atividade das colinesterases se justifica porque o Método de Lovibond é aplicado como teste de triagem, por ser rápido e prático, sendo muito utilizado em avaliações de trabalhadores na zona rural permitindo, desta forma, estimar a porcentagem de inibição das esterases presentes no sangue total (colinesterase plasmática + eritrocitária); já o Método de Ellman permite a análise das colinesterases dos dois grupos separadamente, ou seja, a avaliação da colinesterase plasmática e eritrocitária individualmente e, por ser um método sensível, tem sido indicado também para o monitoramento de indivíduos com exposição crônica a compostos inibidores das colinesterases (COYE et al,1986; HOEHR et al,1989).

É sabido que compostos como malathion, diazinon e diclorvós inibem, primeiramente a colinesterase plasmática, monitorada pelo Método de Ellman, o que torna este parâmetro o mais sensível indicador de exposição. Deste modo, a colinesterase plasmática, por ser afetada mais rapidamente, reflete melhor a absorção de um inseticida organofosforado ou carbamato, sendo sua determinação muito significativa no início da exposição. Entretanto, esta inibição pode não estar associada ao quadro clínico apresentado (HENAO & COREY,1991). A colinesterase eritrocitária, nas intoxicações agudas, parece ser um indicador mais específico do

que a plasmática pois acompanha a severidade dos casos agudos. Geralmente, a recuperação da colinesterase plasmática ocorre mais rapidamente, por volta de 30 dias, devido à ressíntese hepática destas enzimas; já a colinesterase eritrocitária tem recuperação total após 90 dias, uma vez que requer a síntese de novos eritrócitos (KUTTY,1980; HENAO & COREY,1991). Estes dados de recuperação das colinesterases aplicam-se, principalmente, aos compostos organofosforados que possuem a capacidade de uma ligação mais estável com a enzima. Para compostos da classe carbamatos, os quais ligam-se reversivelmente às colinesterases, alguns dias são suficientes para que haja recuperação das atividades, sendo este período diretamente relacionado à dose biodisponível do composto.

O estabelecimento dos Limites de Tolerância Biológica (LTB), que expressam as concentrações limites do agente tóxico ou de seus produtos nos fluidos biológicos, é feito a partir de manifestações tóxicas no indivíduo exposto (WHO, 1986; LOTTI, 1995; OLIVEIRA, 1991). No Brasil, o LTB, consiste na inibição de 50 %, tanto para a atividade da colinesterase plasmática como para a atividade da colinesterase eritrocitária (portaria nº 24 do Ministério do Trabalho - NR 7, 1996). Entretanto, é importante observar que embora a determinação das colinesterases seja um método simples e muito utilizado no controle laboratorial de exposições que interferem com a atividade destas enzimas, ela apresenta grande variabilidade individual em pessoas não expostas ocupacionalmente, com desvios de até 40% para a enzima plasmática e 25 % para a eritrocitária (SIQUEIRA; FERNICOLA; BORGES, 1978; OLIVEIRA et al, 1991).

Embora em alguns trabalhos foram observadas alterações das colinesterases em indivíduos com exposição aos inseticidas carbamatos e organofosforados (CIESIELLSKI et al, 1994; HERMANOWICZ & KOSSMAN,1984; LANDER & RONNE,1995), nos trabalhadores avaliados neste estudo, os níveis destas enzimas estavam dentro dos valores de referência. Apesar da

normalidade nos valores de colinesterase, observamos que, em sua maioria (72,5 %), os indivíduos apresentavam sinais e sintomas comuns à intoxicação por inseticidas anticolinesterásicos, ou seja, efeitos sobre o Sistema Nervoso Central (tontura 12,5 %; cefaléia 42,5 %; perda de memória 2,5 %); efeitos muscarínicos (alteração visual 10,0 %; sudorese 7,5 %, dores abdominais 7,5 %) e efeitos nicotínicos (fraqueza muscular 20,0 %; dores no corpo 15,0 %). Além disso, nossos resultados demonstram que a resposta imunológica inespecífica também encontrava-se alterada, como discutiremos adiante.

### **5.1. Capacidade fagocitária e lítica de neutrófilos frente à *Candida albicans* e *Candida pseudotropicalis***

Vários trabalhos realizados em nosso laboratório indicam que a atividade lítica de neutrófilos constitui um indicador sensível dos efeitos de xenobióticos no sistema imunológico. Nestes estudos foram investigados os efeitos do chumbo (QUEIROZ et al, 1994; QUEIROZ et al, 1993), mercúrio (PERLINGEIRO & QUEIROZ, 1995; PERLINGEIRO & QUEIROZ, 1994) e hexaclorobenzeno (QUEIROZ et al, 1997b; SILVEIRA & QUEIROZ, 1997). Conforme apresentamos neste estudo, os inseticidas organofosforados e carbamatos também fazem parte do grupo de compostos que interferem com a atividade lítica de neutrófilos. Nossos resultados demonstram que, embora a atividade fagocitária dos neutrófilos esteja normal (Figuras 1 e 3; pág.21 e 23), ocorre um comprometimento na capacidade lítica de neutrófilos de trabalhadores com exposição ocupacional a inseticidas organofosforados e carbamatos. Este comprometimento, no entanto, ocorreu apenas na presença do antígeno *Candida albicans*, mas não na presença do antígeno *Candida pseudotropicalis* (Figuras 2 e 4; pág.22 e 24). A redução da atividade lítica frente ao antígeno *C. albicans* e a ausência de inibição na lise da *C. pseudotropicalis*

indicam uma ação destes inseticidas sobre a enzima mieloperoxidase. Esta enzima está presente em neutrófilos e é fundamental no processo de lise da *C.albicans* (LEHRER & CLINE, 1969a e 1969b; BOGOMOLSKI-YAHALOM & MATZNER,1995). Por outro lado, a lise de *C. pseudotropicalis* é MPO-independente (LEHRER, 1975).

Estudos na literatura com indivíduos expostos a inseticidas carbamatos também confirmam a interferência destes compostos na atividade lítica de neutrófilos. Neste estudo, no entanto, a atividade fagocitária destas células também está reduzida (TSVETKOVA et al, 1992). Estes autores sugerem que a inibição da atividade lítica destas células, está relacionada a ação dos inseticidas anticolinesterásicos sobre as oxidases celulares. Estudos de avaliação dos inseticidas anticolinesterásicos sobre o metabolismo oxidativo, realizados em trabalhos experimentais, demonstram que o efeito inibidor destes compostos sobre as espécies reativas de oxigênio é dose-dependente (FORGUE et al, 1990). Outros estudos sugerem que os inseticidas carbamatos podem dificultar processos da via glicolítica e via das pentoses, limitando o NADPH no interior das células (PALMBLAND, 1987; ANDERSEN; UTERMOHLEN; FEYEREISEN, 1994). Desta forma, essa complexa série de eventos pode limitar severamente a utilização de NADPH por enzimas NADPH-dependentes, como é o caso da NADPH oxidase, reduzindo a formação de espécies reativas de oxigênio, levando a uma diminuição na atividade lítica dos neutrófilos. Em nosso estudo, no entanto, não há indicação de inibição do NADPH, uma vez que a lise da *C. pseudotropicalis* não foi alterada em relação aos controles. Um achado na literatura (FORGUE et al, 1990), mencionado anteriormente, que pode conciliar estas diferenças é o fato do processo de inibição da NADPH-oxidase ser progressivo e dose-dependente, e portanto não estaria presente nos trabalhadores deste estudo nos quais os índices de exposição estão normais.

Explicações adicionais ao mecanismo de inibição lítica de fagócitos são encontrados em estudos da atividade de macrófagos em animais tratados com inseticidas anticolinesterásicos (PIPY et al, 1983; FLIPO, 1992). Estes autores sugerem que o provável mecanismo de ação destes compostos se dá através da inibição das esterases. Como consequência, outros aspectos de atividade funcional das células fagocitárias, para os quais estas enzimas são essenciais, são juntamente comprometidos (PIPY et al, 1983; LADICS et al, 1994 e CASALE et al, 1993). No entanto, embora muitos trabalhos cite a importância das esterases nas diversas funções celulares, pouco se sabe sobre os mecanismos de interação entre estas proteínas e a membrana celular.

Portanto, nossos resultados apontam uma inibição da enzima mieloperoxidase, com consequente redução na lise de antígenos MPO-dependentes em indivíduos expostos a inseticidas anticolinesterásicos. Entretanto, como mencionamos anteriormente, outros sistemas enzimáticos podem ser inibidos por ação destes compostos, como NADPH-oxidase e esterases, sendo que este comprometimento parece ocorrer de forma progressiva, ou seja, dependente do tempo de exposição. Tendo em vista que em todos os trabalhadores do nosso estudo a atividade das colinesterases se encontram dentro dos valores de referência não podemos descartar a hipótese de comprometimentos progressivos após um maior grau de exposição.

## **5.2. Teste do nitroblue tetrazolium (NBT)**

Nossos resultados demonstram uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ - Teste t de Student) na capacidade de redução do corante nitroblue tetrazolium nos trabalhadores expostos, simultaneamente, a inseticidas carbamatos e organofosforados (Figura 5; pág.25). Esta metodologia permite um estudo adicional

da função lítica, uma vez que o corante vai para o interior da célula, sendo então reduzido pelo íons superóxido. O teste também nos dá informação sobre a função metabólica, uma vez que a redução intracelular depende da ativação da via hexose monofosfato, a qual é necessária em atividades microbicidas normais (WILKSON, 1981). Uma estimulação na via hexose monofosfato seguida da oxidação da glicose e iodinação da proteína, a qual é mediada pela enzima mieloperoxidase, acontece após a ingestão de uma variedade de partículas pelos neutrófilos. Em paralelo, há mudanças no metabolismo oxidativo e conseqüente aumento do consumo de oxigênio pelas células e da produção de peróxido de hidrogênio, o qual é uma das espécies reativas do oxigênio. Um prejuízo na função lítica de neutrófilos para reduzir o corante NBT pode ser reflexo da diminuição na geração de ânion radical superóxido e do substrato primário das peroxidases, ou seja, do peróxido de hidrogênio, o qual também pode reagir com vários redutores biológicos e com o ânion superóxido (KLEBANOFF, 1988; BOGOMOLSKI-YAHALOM & MATZNER, 1995; GOLDSTEIN, 1988). Portanto, nossos resultados sugerem que os inseticidas anticolinesterásicos podem alterar os processos de geração de ânion superóxido contribuindo para o comprometimento da atividade lítica de fagócitos.

Estudos clínicos na literatura, indicam que os inseticidas anticolinesterásicos podem reagir com uma variedade de sistemas, incluindo o citocromo P-450, NADPH, flavoproteínas e citocromo b5, sendo que este último sistema participa na redução das moléculas de oxigênio e formação de radicais de oxigênio. Estes mecanismos podem explicar a diminuição na capacidade de redução do NBT em granulócitos de indivíduos expostos a inseticidas anticolinesterásicos (TSVELKOVA et al, 1992).

Resultados divergentes são apresentados por HERMANOWICZ & KOSSMAN (1984), em indivíduos com exposição crônica a inseticidas organofosforados, os quais apresentavam inibição da atividade das colinesterases.



Os autores observaram um aumento na redução do NBT de neutrófilos, juntamente com um alto índice de infecções (78 %) e também, correlação entre tempo de exposição e atividade das colinesterases. Estes resultados reafirmam a predominância do efeito imunossupressor destes compostos e reforçam a hipótese de que os efeitos destas substâncias são dose-dependente.

### **5.3. Atividade quimiotática de neutrófilos**

Nossos resultados demonstram uma redução significativa ( $p < 0,001$  - Teste t de Student) na atividade quimiotática de neutrófilos nos trabalhadores expostos, simultaneamente, a inseticidas carbamatos e organofosforados (Figura 6; pág.26). Estes achados corroboram estudos na literatura onde a atividade quimiotática de indivíduos com exposição a inseticidas organofosforados e com a atividade das colinesterases diminuídas, apresentou-se reduzida (HERMANOWICZ & KOSSMAN, 1984). Os autores sugerem que esta deficiência pode ser resultado de uma interação destes compostos com as esterases, que se encontram unidas à membrana e são necessárias para a locomoção celular (LEE, 1979). Um bloqueio irreversível na ação das esterases foi observado em estudos experimentais, após uma pré-exposição a inseticidas organofosforados, reforçando a idéia de que estas proteínas são importantes para algumas funções celulares como a quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos. Foi observado ainda que essas proteínas parecem ter papel importante em outras funções imunes como estimulação antigênica na sinalização do  $Ca^{++}$  em células T citolíticas e sinalização da IL-2 em linfócitos (CASALE et al, 1993).

Outro mecanismo, reportado, que pode explicar esta alteração na locomoção celular é o comprometimento a nível de complemento em indivíduos expostos a inseticidas organofosforados, observado por NEWCOMBE; ROSE;

BLOOM (1992). Desta forma, um possível mecanismo responsável pela redução na atividade quimiotática em indivíduos com exposição a inseticidas anticolinesterásicos, avaliados neste estudo, pode ser um comprometimento a nível de complemento, uma vez que todos os indivíduos apresentaram valores normais de atividade das colinesterases.

Foi observado por HERMANOWICZ & KOSSMAN (1984) uma correlação entre tempo de exposição e atividade das colinesterases, as quais, conforme mencionamos anteriormente, apresentam-se alteradas nos indivíduos por eles avaliados. Estes resultados sugerem que exposições a inseticidas anticolinesterásicos, com comprometimento das colinesterases, pode ocorrer um efeito somatório na inibição da resposta quimiotática decorrente de comprometimento progressivo a nível de complemento e das esterases. Esta hipótese justifica a redução da quimiotaxia em nosso estudo mesmo em ausência de um comprometimento das esterases.

#### **5.4. Dosagem das Imunoglobulinas IgA, IgG e IgM**

As imunoglobulinas são proteínas sintetizadas e secretadas pelos plasmócitos, que são derivados de linfócitos B quando estimulados por antígenos. As imunoglobulinas combinam-se com antígenos neutralizando-os, numa tentativa de destruí-los. Essencialmente, cada tipo de imunoglobulina, isto é IgA, IgG, IgM, IgD e IgE são bifuncionais, ou seja, uma região da molécula liga-se ao antígeno e outra liga-se ao tecido do hospedeiro. A IgG está em maior quantidade no soro, 70-75%, sendo o principal anticorpo nas respostas imunes secundárias e com função opsonizante para os leucócitos polimorfonucleares e os macrófagos. A IgM representa 10% no soro é o primeiro anticorpo secretado no processo infeccioso sendo capaz de fixar complemento, produzir aglutinação e aderência opsonica. A

IgA faz parte das secreções de glândulas exócrinas, como as glândulas salivares sendo encontrada em concentrações de 10-15 % (GRAZIANO & BELL, 1985; WHO,1981;ROITT, I.; BRTOSTOFF, J.; MALE, D., 1993).

Embora grande parte dos trabalhos experimentais na literatura envolvendo a avaliação da resposta imune humoral em animais expostos a inseticidas organofosforados e carbamatos demonstrem alterações no número de células formadoras de anticorpos do tipo IgM (INSTITÓRIS; SIROKI; DÉSI, 1995; FLIPO et al, 1992; LADICS et al, 1993), os nossos resultados demonstram que não há alterações nos níveis séricos de imunoglobulinas em indivíduos expostos simultaneamente a inseticidas carbamatos e organofosforados (Figuras 7; pág.27) quando comparados ao grupo controle.

Revedo resultados anteriores obtidos, em nosso laboratório, podemos observar que a resposta imune humoral parece ser mais seletiva do que a resposta imune inespecífica em indivíduos com exposição crônica a xenobióticos. Nestes estudos, foi observado um aumento policlonal nos níveis séricos de imunoglobulinas (IgG/IgM/IgA/IgE) em indivíduos expostos ao mercúrio (DANTAS & QUEIROZ, 1997a). No caso de indivíduos expostos ao hexaclorobenzeno, ocorreu apenas um aumento de IgG e IgM (QUEIROZ ; PERLINGEIRO; BINCOLETO, 1997a). Já, em indivíduos com exposição ao chumbo não houve alteração nos níveis séricos das imunoglobulinas (QUEIROZ et al, 1994a). Portanto, nossos achados apontam para um maior envolvimento com a resposta imune inespecífica na ação dos inseticidas anticolinesterásicos.

## **6. CONCLUSÕES**

## 6. CONCLUSÕES

---

Este estudo sobre alterações imunológicas em indivíduos com exposição ocupacional aos inseticidas organofosforados e carbamatos permite concluir:

1. A capacidade fagocitária de neutrófilos apresentou-se normal frente a *C. albicans* e *C. pseudotropicalis*. No entanto, a atividade lítica frente a *Candida albicans* encontrou-se reduzida ( $p < 0,001$  - Teste t de Student), ao contrário da atividade lítica frente a *Candida pseudotropicalis* que estava normal em indivíduos expostos a inseticidas anticolinesterásicos, sugerindo portanto uma inibição da enzima mieloperoxidase.
2. A capacidade do neutrófilo de reduzir o corante nitroblue tetrazolium apresentou-se diminuída ( $p < 0,001$ - Teste t de Student), sendo que esta alteração sugere uma interferência na produção de superóxido nestes trabalhadores.
3. A atividade quimiotática de neutrófilos apresentou-se reduzida ( $p < 0,001$  - Teste t de Student) em indivíduos expostos a inseticidas anticolinesterásicos, apontando para um comprometimento no sistema complemento.

4. As concentrações séricas das imunoglobulinas IgG, IgA e IgM apresentaram-se normais em indivíduos expostos a inseticidas anticolinesterásicos.

A determinação da atividade das colinesterases, considerada aceitável como indicador de exposição, não previne o trabalhador exposto a inseticidas anticolinesterásicos de alterações no organismo e não se correlaciona com as alterações imunológicas observadas. Isto nos permite concluir que a determinação da atividade das colinesterases não constitui um método sensível para avaliação do comprometimento celular na exposição a inseticidas anticolinesterásicos.

## **7. SUMMARY**

---

## **7. SUMMARY**

---

In this work, some effects of the organophosphate and carbamate insecticides on the immune response were investigated. We have studied forty workers occupationally exposed to these insecticides and forty non-exposed control individuals. To monitor exposure we used cholinesterase activity in red blood cells as an indicator of exposure. Phagocytosis and killing of *Candida albicans* and *Candida pseudotropicalis* by neutrophils, neutrophil chemotaxis, nitroblue tetrazolium reduction and levels of IgG, IgM and IgA were measured. The results obtained demonstrated that the phagocytic function of neutrophils in exposed workers did not differ from that of the control individuals. On the other hand, lysis of *C. albicans* by neutrophils was significantly decreased even in those workers with normal cholinesterase activity. Conversely, the lysis of *C. pseudotropicalis* by neutrophils was not altered. We also observed a significant decrease of nitroblue tetrazolium reduction and neutrophil chemotaxis in the exposed group. Regarding the levels of IgM, IgA and IgG we observed no significant alterations as compared to controls.



## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\***

- AARON, B. & WHITE, D.W. - Leukemia cell types and agricultural practices in Nebraska, **Archives of Environmental Health**, 40:11-214, 1985.
- AKENZUA, G.I. & AMIEGHEME, O.R. - Inhibitor of in vitro neutrophil migration in sera of children with homozigous sickle cell gene during pain crisis. **British Journal Haematology**, 47:345-352, 1981.
- ALONZO, H.G.A. - **Intoxicações Agudas por Praguicidas nos Centros de Toxicologia de seis Hospitais Universitários**. Campinas, 1995. [Tese - Mestrado - UNICAMP]
- ANDERSEN, J.F.; UTERMOHLEN, J.G.; FEYEREISEN, R. - Expression of house fly CYP6A1 and NADPH-cytochrome P450 reductase in *Echerichia coli* and reconstitution of an insecticide-metabolizing P450 system, **Biochemistry**, 33:2171-2177, 1994.
- ANDERSON, H.A.; FISCHBEIN, A.S.; WOLF, M.S.; ROM, W.; SELIKOFF, I.J. Lymphocyte function of Michigan Dairy farmers exposed to polybrominated biphenyls. **Science**, 199:1207-1209, 1978.
- BALLART, I.J.; ETEVEZ, M.E.; DIEZ, R.A.; SEN, L. - Comparison of Candida killing activity measured by chemiluminescence and cytomorphological methods in human phagocytes. **Journal Immunology Met.**, 97:263-268, 1987.

---

\* HERANI, M.L.G. - Normas para apresentação de dissertações e teses. BIREME, São Paulo, 1991. 45p.

- BARBERS, R.G. & OISHI, J. - Effects of in vitro Asbestos on natural killer and antibody-dependent cellular cytotoxicity. **Environmental Research**, **43**:217-226, 1987.
- BARON, R.L. - Carbamate insecticides. In: **Handbook of Pesticide Toxicology**, eds. W. J. Hayes, Jr., and E. R. Laws, Jr. pp. 1125-1189, New York:Academic Press, 1991.
- BEIGUELMAN, B. - Curso prático de bioestatística. **Revista Brasileira de Genética**. 2 edição, Ribeirão Preto, 1991 (em Português).
- BLAIR, A. & WHITE, D.W. - Leukemia cell types and agricultural practices in Nebraska. **Archives of Environmental Health**, **40**:(4):211-214, 1985.
- BOGOMOLSKI-YAHALOM, V. & MATZNER, Y. - Disorders of neutrophil function, **Blood Reviews**, **9**:183-190, 1995.
- BOLKHOVITIANOVA, V.M.& KOGAN, R.F. - The effect of sevin on the immunological reactivity of the organism. **Sredy Znachendlia Zdorovia Naselem**, 1:129-132 (sumário publicado em:**Health Aspects of Pesticides**, **70**:1401), 1969.
- BURGER, M. - Insecticidas. In: FOGEL, E., ed. - **Patologia Toxicológica**. Montevideo, Oficina del libro, p.75-200, 1993.
- CASALE, G. P.; VANNERSTROM, J.L.; BAVARI, S.; WANG, T. L. - Inhibition of interleukin 2 driven proliferation of mouse CTLL2 cells, by selected carbamate and organophosphate insecticides and congeners of carbaryl, **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, **15**:199-215, 1993.

- CIESIELSKI, S.; LOOMIS, D.P.; MIMS, S.R.; AUER, A. - Pesticide Exposures, cholinesterase depression, and symptoms among north Carolina migrant farmworkers, **American Journal of Public Health**, **84**:446-451, 1994.
- COHEN, S.Z.; EIDEN, C.; LORBER, M.N. - Monitoring groundwater for pesticides. In Evaluation of pesticides in groundwater, eds. W.Y. Garner, R.C. Honeycutt, and H.N. Nigg, Washington, D.C. American Chemical Society, pp. 170-196, 1986.
- COYE, M.J.; LOWE, J.A.; MADDY, K.T. - Biological monitoring of agricultural workers exposed to pesticides: I. cholinesterase activity determinations. **Journal of Occupational Medicine**, **28**:619-627, 1986.
- DANTAS, D.C.M. & QUEIROZ, M.L.S. - B lymphocytes in mercury exposed-workers, **Pharmacology & Toxicology**, [in press], 1997b.
- DANTAS, D.C.M. & QUEIROZ, M.L.S. - Immunoglobulin E and autoantibodies in mercury-exposed workers, **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, [enviado para publicação], 1997a.
- DANTAS, D.C.M. & QUEIROZ, M.L.S. - T lymphocytes in mercury-exposed workers, **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, [enviado para publicação], 1997c.
- De BLECKER, J.L.; De REUCK, J.L.; WILLEMS, L. - Neurological aspects of organophosphate poisoning. **Clinical Neurosurgery**, **94**:93-103, 1992.
- DESCOTES, J. Immunotoxicity of pesticides. In: **Immunotoxicology of Drugs and Chemicals**, pp.337-363, New York: Elsevier, 1988.

- ECHOBICON, D.J. - Toxic effects of pesticides. In: AMDUR, M.O.; DOULL, J.;KLASSEN, C.D. ED. - **Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons**. 4 ed. McGraw-Hill INC, New York, p.565-622,1993.
- EDSON, E.F. - Blood tests for users of O.P. insecticides. *Word Crops*, 10:49-51, 1958.
- EVANS, R.G.; WEBB, K,B.; KNUTSEN, A.P.; ROODMAN, S.T. - A medical follow-up of the health effects of long-term exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **Archives of Environmental Health**, **43**:273-278, 1988.
- FALCÃO, R.P.; VOLTARELLI, J.C.; BOTURA, C. - The possible role of the spleen in the reduction of nitroblue tetrazolium by neutrophils, **Acta Haematologica**, **68**:89-95, 1982.
- FLIPO, D.; BERNIER, J.; GIRARD, D.; KRZYSTYNIAK, K.; FOURNIER, M. - Combined effects of selected insecticides on humoral immune response in mice, **International Journal of Immunopharmacology**, **14**:747-752, 1992.
- FRANK, R.S. - Time-depement alterations in the deformability of human neutrophils in response to chemotatic activation, **Blood**, **76**:2606-2612, 1990.
- FORGUE, M.F.; PIPY, B.; SOUQUAL,M.C.; COMBIS, J.M. - 1-naphthl N-methyl carbamate effect on intra- and extracellular concentrations of arachidonic acid metabolities, and the chemiluminescence generation by mouse peritoneal macrophages, **International Journal Immunopharmacology**, **12**:155-63, 1990.

- GATRELL, M.J.; CRAUN, J.C.; PODREBARAC, D.S.; GUNDERSON, E.L.  
- Pesticides, selected elements, and other chemicals in adult total diet samples, **Association of Analytical Chemistry**, **69**:146-161, 1986
- GOLDFRANK, L.R.; FLOMENBAUM, N.E.; LEWIN, N.A.; WEISMAN, R.S.; HOWLAND, M.A. - **Goldfrank's Toxicologic Emergencies**. 5th edition, Appleton & Lange, California, 1994.
- GOLDSTEIN, I.M. Complement: Biologically active products. **In Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. Gallin, J.I, Goldstein, I.M. & Snyderman, R. (Eds), chapter 4, p.65. Raven Press: New York, 1988.
- GRAZIANO, F.M. & BELL, C.L. - The normal immune response and what can go wrong. A classification of immunologic disorders, **The Medical Clinics of North America**, **69**:439-453, 1985.
- HAYES, W.J., JR. - Production and use of pesticides. In: **Handbook of Pesticides Toxicology**, eds. W.J.HAYES, Jr., and E.R. LAWS, Jr., pp. 22-45. New York: Academic Press, 1991.
- HENAO, S. & COREY, G. - **Plaguicidas inhibidores de las colinesterasas**. Mexico, Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud OPS/WHO, 1991. 169p. Serie Vigilancia 11.
- HERMANOWICZ, A. & KOSSMAN, S. - Neutrophil function and infectious disease in workers occupationally exposed to phosphoorganic pesticides: role of mononuclear-derived chemotactic factor for neutrophils, **Clinical Immunology and Immunopathology**, **33**:13-22, 1984.

- HERMANOWICZ, A.; NAWARSKA, Z.; BORYS, D.; MASLANKIEWICZ, A. - The neutrophil function and infectious diseases in workers occupationally exposed to organochloride insecticides. In: **International Archives of Occupational Environmental Health**, **50**:329-340, 1982.
- HOEHR, N.F.; VIEIRA, R.J.; PECININI, R.G.; MELLO, S.M. - Estudo comparativo dos métodos de Édson/Colorimétrico de Lovibond e Ellman modificado para a determinação da atividade da colinesterase. **Revista Brasileira de Toxicologia, Ed. Esp. 5(1)**:1989.
- HUDSON, L. & HAY, F.C. - Practical immunology, 3ª edição, London, Blackwell Scientific Publications, 495p., 1989.
- INSTITÓRIS, L. SIROKI, O.; DÉSI, I. - Immunotoxicity study of repeated small doses of dimethoate and methylparathion administered to rats over three generations, **Human & Experimental Toxicology**, **14**:879-883, 1995.
- JEYARATNAM, J. & MARONI, M. - Organophosphorous compounds. **Toxicology**, **91**:15-27, 1994.
- KATSENOVICH, L.A.; RUZYBAJIEV, R.M.; FEODORINA, L.A. - T and B immunity system in pesticide poisoning. **Gigiena Truda i Professionalnye Zabolevaniia**, **4**: 17-19, 1981.
- KLEBANOFF, S.J. - Phagocytic cells:products of oxygen metabolism. In **Inflammation:Basic Principles and Clinical Correlates**. Gallin, J.I., Golsteins, I.M. & Snyderman, R. (Eds), chapter 23 , p.401. Raven Press: New York, 1988.

- KURTZ, P.J.; DESKIN, R.; HARRINGTON, R.M. - Pesticides. In: **Principles and Methods of Toxicology**, ed. A. W. Hayes, Jr., pp. 137-167, New York: Raven Press, 1989.
- KUTTY, K.M. - Review: Biological function of cholinesterase, **Clinical Biochemistry**, **13**:239-243, 1980.
- LADICS, G.S.; SMITH, C.; HEAPS, K.; LOVELESS, S.E. - Evaluation of humoral immune response of CD rats following a 2-week exposure to the pesticide carbaryl by the oral, dermal, or inhalation routes. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, **42**:143-156, 1993.
- LANDER, F. & RONNE, M. - Frequency of sister chromatid exchange and hematological effects in pesticide-exposed greenhouse sprayers, **Scandinavian Journal Work Environmental Health**, **21**:283-8, 1995.
- LEHRER, R.J. - The fungicidal mechanisms of human monocytes in evidence for myeloperoxidase-linked and myeloperoxidase-independent candidacidal mechanisms. **Journal Clinical Investigation** , **55**:338-346, 1975.
- LEHRER, R.J. & CLINE, M.J. - Interaction of *Candida albicans* with human leukocytes and serum. **Journal Bacterial**, **98**:996-1002, 1969a.
- LEHRER, R.J. & CLINE, M.J. - Leukocyte myeloperoxidase deficiency and disseminated candidiasis: the role of myeloperoxidase in resistance to candida infection. **Journal Clinical Investigation**, **48**:1478-1488, 1969b.
- LOTTI, M. - Cholinesterase inhibition: Complexities in interpretation. **Clinical Chemistry**, **41/42**:1814-1818, 1995.



- McCLINTOCK, J.T.; KOUGHHH, J.L.; SJOBLAD, R.D. - Regulatory oversingth of biochemical pesticides by the U.S. enviromental agency: health effects considerations. **Regulation Toxicology Pharmacology**,19:115-24,1994.
- NEWCOMBE, A.S.; ROSE, N.R.and BLOOM, J.C. - **Clinical Immunotoxicology**. Raven Press Ltda, New York, 1992.
- Normas Regulamentadoras (NR) Aprovadas pela Portaria nº 3.214, de 8 de junho de 1978 - **Segurança e Medicina do Trabalho**, Manuais de Legislação, Editora Atlas, 31ª edição, São Paulo, 1996.
- OLEFIR, A.I. - A study of the effect of chemical substance on the formation of acquired immunity. **Vrachneboe Delo**, 10:125-127, 1971.
- OLIVEIRA, G.H.; SALGADO, P.E.T.; LEPERA, J.S.; LARINI, L. - comparação de dois métodos para determinação da atividade da colinesterase plasmática. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, 74:36-42, 1991.
- ORGANIZATION MUNDIAL DE LA SALUD - **Consecuencias Sanitarias del empleo de Plaguicidas en la Agricultura**. Ginebra, OMS, 128p., 1992.
- PALMBLAND, J. - Leucotrienes and granulocytes. The biologymof phagocytes in health and disease, **Advances in the Bioscienses**, 66:357-365, 1987.
- PERLINGEIRO, R.C.R. & QUEIROZ, M.L.S. - Measurement of the respiratiry burst and chemotaxis in polymorphonuclear leukocytes form mercury-exposed workers. **Human & Experimental Toxicology**, 14:281-286, 1995.

- PERLINGEIRO, R.C.R. & QUEIROZ, M.L.S. - Polimorphonuclear phagocytosis and killing in workers exposed to inorganic mercury. **International Journal of Immunopharmacology**, **16**:1011-1017, 1994.
- PIPY, B.; MAROUSSEM,D.; BERAUD, M.; DERACHE, P. - Evaluation of cellular and humoral mechanisms of Carbaryl-induced reticuloendothelial phagocytic depression. **RES: Journal of the Reticuloendothelial Society**, **34**:395-412, 1983.
- QUEIROZ, M.L.S. - Efeitos tóxicos de pesticidas sobre os sistemas hematológico e imunológico: Revisão bibliográfica. **Ciência e Cultura**, **36**:968-972, 1986.
- QUEIROZ, M.L.S; PERLINGEIRO, R.C.R. & BINCOLETO,C - Immunoglobulin levels in workers exposed to hexachlorobenzene, [enviado para publicação], 1997a.
- QUEIROZ, M.L.S; PERLINGEIRO, R.C.R.; BINCOLETO, C.; SOUZA, C.A.; TOLEDO, H. - Defective neutrophil functions in workers exposed to hexachlorobenzene. **Human and Experimental Toxicology**, [In press], 1997b
- QUEIROZ, M.L.S.; ALMEIDA, M.; HOEHR, N.F. - Defective neutrophil function in workers occupationally exposed to lead. **Pharmacology & Toxicology**, **72**:73-77, 1993.
- QUEIROZ, M.L.S.; COSTA, F.F.; BINCOLETO, C.; PERLINGEIRO, R.C.R.; DANTAS, D.C.M.; CARDOSO, M.P.; ALMEIDA, M. - Eugulfment and killing capabilities splenic function in persons occupationally exposed to lead. **International Journal of Immunopharmacology**, **16**:239-244, 1994.

- QUEIROZ, M.L.S.; PERLINGEIRO, R.C.R.; BINCOLETTO, C.; ALMEIDA, M.; CARDOSO, M.P.; DANTAS, D.C.M. - Immunoglobulin levels and cellular immune function in lead exposed workers. **Immunopharmacology and Toxicology**, **16**:115-128, 1994a.
- ROITT, I.; BRTOSTOFF, J.; MALE, D. - *Imunologia*, 3<sup>o</sup> edição, Editora Manole, 1993.
- ROUX, F.; TREICH, I.; BRUN, C.; DESOIZE, B.; FOURNIER, E. - Effect of Lindane on human lymphocyte responses to phytohemagglutinin. **Biochemical Pharmacology**, **28**:2419-2426, 1979.
- SHARMA, V.K. & KAUR, S. - Contact sensitization by pesticides in farmers. **Contact Dermatitis**, **23**:77-80, 1990.
- SHUBIK, P. - Toxicology, disappointments and promise. **Archives of Toxicology**, **60**:246-249, 1987.
- SHUURMAN, H.J.; KUPER, C. F.; JOSEPH, G.V. - Histopatology of the immune system as a tool to assess immunotoxicity, **Toxicology**, **86**:187-212, 1994.
- SILVEIRA, J. & QUEIROZ, M.L.S. - Phagocytosis and lytic activity of neutrophils in workers exposed to chlorinated compounds, [In press] 1997.
- SITTERT, N.J.V. - Manual Spectrophotometric method for the measurement of erythrocyte and plasma cholinesterase (Modified Ellman Method). Shell Internationale Petroleum. The hague, Nederland, 1987.

- SIQUEIRA, M.E.B.; FERNICOLA, N.A.G.G.; BORGES, E.L. -  
 Determinação de níveis de colinesterase plasmática e eritrocitária,  
**Revista de Saúde Pública**, 12:304-4, 1978.
- STEHR-GREEN, P.A. & BURSE, V.W. - Human exposure to polychlorinated  
 biphenyls at toxic waste sites: investigations in the United States.  
**Archives of Environmental Health**, 43(6):420-424, 1988.
- STREET & SHARMA, R.P. - Alterations of induced cellular and humoral  
 immune responses by pesticides and chemicals of environmental  
 concern:quantitatives studies of immunosuppression by DDT, Arochlor  
 1254, Carbaryl, Carbofuran and Methylparathion. **Toxicology and  
 Applied Pharmacology**, 32:587-602, 1975.
- SULLIVAN, J.B.Jr. -Immunological alterations and chemical exposure,  
**Clinical Toxicology**, 27(6):311-343, 1989.
- TAYLOR, P. - Agentes anticolinesterasa. In: GOODMAN, A.G.; RALL,  
 T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. In: - **Goodman y Gilman: Las Bases  
 Farmacológicas de la Terapéutica**. 8. ed. Buenos Aires, 1991, p.143-  
 60.
- THELEN, M.; PEVERI, P.; KERNEN, P.; TSCHARNER, V.V.; WALZ, A.;  
 BAGGIOLINI, M. - Mechanism of neutrophil activation by NAF, a  
 novel monocyte-derived peptide agonist, **Fj Research  
 Communications**, 2:2702-2706, 1988.
- THRASHER, J.D.; MADISON, R.; BROUGHTON, A. - Immunologic  
 abnormalities in humans exposed to chlorpyrifos: Preliminary  
 Observations, **Archives of Environmental Health**, 48(2):89-93, 1993.

- TOOD; SANFORD; DAVIDSON - Diagnósticos clínicos e conduta terapêutica por exames laboratoriais, 16<sup>a</sup> edição, vol. 1 e 2, Ed. Manole, São Paulo/SP, 1989.
- TRACZYK, Z.; BLATON, D.; ARCZYBSKA, E.; WIT, B. - Effect of chlo pesticides on leukocyte migration in vitro, **Acta Med. Pol.**, **19(4):451-602**, 1978.
- TSVETKOVA, T.; ANDONOVA, S.; ZVETKOVA, E.; BLAGOEVA, S. - Aspects of granulocyte function in workers professionally exposed to pesticides, **In Archives Occupational Environmental Health**, **64:275-279**, 1992.
- WATTERSON, A.E. & THOMAS, H.F. - Acute pesticide poisoning in the UK and information and training needs of general practioners: recording a conundrum. **Public Health**, **106:473-80**, 1992.
- WILKSON, P.C. - Neutrophil leukocyte function tests. In Techniques in Clinical Immunology. Thompson R.A., (Ed.), chapter 13, p.276, Blackwell Scientific Publications, 1981.
- WILLIAMS, W.J.; BEUTLER, E.; ERSLEV, A.J.; RUNDLES, W. - Hematology, second edition, McGraw-Hill Book Company, A Blakiston Publication, USA, 1977.
- WHO, World Health Organization - Use and abuse of laboratory tests in clinical immunology: critical consideraions of eight widely used diagnostic procedures, **Clinical Experimental Immunology**, **46:662-674**, 1981.
- WHO. Organophosphorus insecticides a general introduction. **Environmental Health Criteria**, Geneva:World health organization, **63:181**, 1986.

## **9. TABELAS**

---

## 9. TABELAS

**TABELA 1 - Avaliação hematológica através da séries vermelha (Hematócrito e hemoglobinometria) e série branca (leucometria) em indivíduos (n=37) com exposição ocupacional a inseticidas anticolinesterásicos.**

J.A.M	48,8	15,5	7.400
O.A.J.	46,8	14,7	7.700
R.J.	48,2	15,1	10.700
J.A.	48,7	15,8	5.800
A.A.O	47,0	14,8	6.200
J.A.V.	54,4	16,6	10.700
A.C.A.	41,4	12,5	5.200
M.E.O	46,4	14,0	8.500
A.B.	54,2	16,5	12.600
G.S.	48,3	14,8	4.800
A.F.	46,4	14,5	8.500
M.R.O.	45,3	15,9	5.500
O.L.M.	42,0	14,6	5.500
S.T.	43,6	14,6	12.300
M.P.S.	42,1	15,0	8.200
A.R.O.	43,4	14,8	6.700
L.E.S.	50,0	17,2	9.400
J.C.C.	42,4	14,3	9.000
O.A.B.	45,0	15,0	8.500
M.P.	47,1	16,2	9.000
V.D.C.	49,0	16,7	8.800
J.C.P.	49,3	17,1	7.400
R.V.	44,9	15,3	8.100
C.M.	47,8	15,9	5.300
L.S.C.	47,8	16,2	7.300
R.O.	44,6	15,4	3.900
M.R.N.	45,6	15,5	7.400
A.N.C.	48,7	16,9	7.700
J.P.A.	45,6	15,6	8.500
R.O.A.	41,8	14,7	6.800
L.A.A.	41,4	14,7	6.000
A.G.	40,2	14,2	4.200
A.E.M.	42,2	15,4	6.300
M.M.N.	47,3	17,2	6.900
V.P.S.	45,0	15,8	4.500
J.A.P.	42,4	15,0	4.500
A.S.	47,5	15,9	6.000

VALORES DE REFERÊNCIA: Hematócrito: 38 - 45 %; Hemoglobinometria: 13 - 15 g/dl; Leucometria: 5.000 - 10.000 cel/mm<sup>3</sup>

**TABELA 2 - Determinação da atividade das colinesterases pelo método de Ellman (colinesterase plasmática e eritrocitária) e pelo Método de Edson/Colorímetro de Lovibond em indivíduos (n=40) com exposição ocupacional a inseticidas anticolinesterásicos.**

J.A.M	6,0	3,3	2,7	100
O.A.I.	7,1	2,1	5,0	100
R.J.	7,4	3,3	4,1	100
J.A.	7,3	2,5	4,8	100
A.A.O	7,1	1,7	5,4	100
J.A.V.	6,4	1,8	4,6	100
A.C.A.	5,7	2,3	3,4	100
M.E.O	5,6	2,4	3,2	100
A.B.	7,2	3,0	4,2	100
G.S.	6,0	2,0	4,0	87,5
A.F.	5,5	1,9	3,6	87,5
M.R.O.	6,9	2,4	4,5	100
O.L.M.	6,7	3,2	3,5	100
S.T.	6,8	2,6	4,2	100
M.P.S.	5,4	2,2	3,2	100
A.R.O.	6,9	3,5	3,4	100
C.A.H.	4,6	1,9	2,7	100
A.L.A.H.	---	---	---	100
L.E.S.	7,4	3,7	3,7	100
J.C.C.	7,0	3,5	3,5	100
O.A.B.	7,6	3,5	4,1	100
J.R.P.	6,9	3,2	3,7	100
M.P.	7,6	4,0	3,6	100
V.D.C.	7,1	3,3	3,8	100
J.C.P.	7,3	3,5	3,8	100
J.M.	7,8	2,9	4,9	100
R.V.	7,0	3,0	4,0	100
C.M.	7,6	4,0	3,6	100
L.S.C.	5,3	1,7	3,6	100
R.O.	5,8	1,8	4,0	100
M.R.N.	5,1	1,7	3,4	100
A.N.C.	6,2	2,5	3,7	100
R.O.A.	7,5	3,0	4,5	100
L.A.A.	6,7	3,6	3,1	100
A.G.	6,6	2,4	4,2	100
A.E.M.	6,5	2,7	3,8	100
M.M.N.	5,9	2,3	3,6	100
V.P.S.	6,2	2,3	3,9	100
J.A.P.	6,4	2,4	4,0	100
A.S.	6,0	2,4	3,6	100
<b>ELLMAN</b>		<b>LOVIBOND</b>		
Valores de Referência:		Valores de Referência: 75 % - 100 %		
colinesterase total:	4,5 - 7,0 UI/ml			
colinesterase plasmática:	1,5 - 3,5 UI/ml			
colinesterase eritrocitária:	2,6 - 4,1 UI/ml			



**TABELA 3 - Idade, tempo de exposição, capacidade fagocitária e lítica de neutrófilos frente à *C. albicans* em indivíduos (n=39) com exposição ocupacional a inseticidas anticolinesterásicos.**

J.A.M.	55	180	341	36,30
O.A.J.	25	42	212	33,00
R.J.	30	72	238	42,00
J.A.	54	02	228	53,90
A.A.O.	63	276	333	48,00
J.A.V.	46	150	298	19,60
A.C.A.	18	02	270	17,03
M.E.O.	23	ñ trab.	249	24,49
A.B.	44	180	318	20,12
G.S.	42	240	245	18,70
A.F.	34	60	255	9,41
M.R.O.	49	204	264	14,39
O.L.M.	62	480	184	11,40
S.T.	59	120	210	16,60
M.P.S.	43	162	156	11,50
A.R.O.	48	240	144	15,27
C.A.H.	18	12	174	8,04
A.L.A.H.	55	30	314	6,00
L.E.S.	38	108	321	3,11
J.C.C.	32	216	445	1,23
O.A.B.	37	60	432	7,17
J.R.P.	35	24	274	2,18
M.P.	28	30	523	19,88
V.D.C.	30	32	382	10,47
J.C.P.	49	07	408	3,18
J.M.	39	22	194	11,34
R.V.	48	08	370	35,67
C.M.	38	06	525	6,66
L.S.C.	30	48	235	20,00
R.O.	23	24	292	25,34
M.R.N.	21	04	335	19,10
A.N.C.	26	24	512	22,20
R.O.A.	22	26	240	28,75
L.A.A.	22	24	156	33,33
A.G.	36	48	301	20,90
A.E.M.	24	09	336	23,51
M.M.N.	29	24	166	13,85
V.P.S.	39	08	183	15,3
J.A.P.	30	30	340	10,58

Valores de Referência: Fagocitose = 138,9 a 317,1  
% Lise = 20,2 a 59,4

$x = 292,4 / dp = 92,85$

$x = 18,96 / dp = 12,51$

**TABELA 4 - Idade, tempo de exposição, capacidade fagocitária e lítica de neutrófilos frente à *C. pseudotropicalis* em indivíduos (n=36) com exposição ocupacional a inseticidas anticolinesterásicos .**

J.A.M	55	180	217	32,20
O.A.J	25	42	313	15,30
R.J	30	72	287	9,40
J.A	54	02	192	16,66
A.A.O	63	276	259	36,66
J.A.V.	46	150	130	47,60
A.C.A.	18	02	96	41,60
A.B.	44	180	88	20,40
G.S.	42	240	148	31,00
A.F.	34	60	127	50,30
M.R.O.	49	204	229	4,36
O.L.M.	62	480	132	3,00
S.T.	59	120	125	2,40
M.P.S.	43	162	96	4,16
A.R.O.	48	240	198	18,68
C.A.H.	18	12	156	4,48
A.L.A.H.	55	30	466	2,14
L.E.S.	38	108	356	38,20
J.C.C.	32	216	455	1,23
O.A.B.	37	60	279	39,42
M.P.	28	30	187	52,40
J.C.P.	49	07	212	50,47
J.M.	39	22	186	55,91
R.V.	48	08	347	1,44
C.M.	38	06	354	46,04
L.S.C.	30	48	197	9,64
R.O.	23	24	346	15,00
M.R.N.	21	04	356	12,07
A.N.C.	26	24	183	16,39
R.O.A.	23	26	171	7,60
L.A.A.	22	24	203	3,94
A.G.	36	48	325	4,3
A.E.M.	24	09	169	11,24
M.M.N.	29	24	209	6,69
V.P.S.	39	08	203	7,38
J.A.P.	30	30	219	6,39

Valores de Referência: Fagocitose = 126,4 a 269,6  
% Lise = 7,8 a 21,4

x = 228,22 / dp = 97,34

x = 20,11 / dp = 18,00

**TABELA 5 - Capacidade do neutrófilo em reduzir o NBT em indivíduos (n=32) com exposição ocupacional a inseticidas anticolinesterásicos.**

J.A.M	55	180	62,5
O.A.J	25	42	32,0
R.J	30	72	36,5
J.A	54	02	56,5
A.A.O	63	276	44,0
J.A.V.	46	150	37,0
A.C.A	18	02	39,0
M.E.O	23	ñ trab.	41,0
A.B.	44	180	20,5
G.S.	42	240	34,0
A.F.	34	60	35,0
M.R.O.	49	204	40,0
O.L.M.	62	480	44,0
S.T.	59	120	61,0
M.P.S.	43	162	41,0
A.R.O.	48	240	37,5
C.A.H.	18	12	41,0
A.L.A.H.	55	30	51,0
L.E.S.	38	108	34,0
J.C.C.	32	216	47,0
O.A.B.	37	60	47,0
M.P.	28	30	22,0
V.D.C.	30	32	54,0
J.C.P.	49	07	58,0
R.V.	48	08	35,0
L.S.C.	30	48	53,0
R.O.	22	26	33,0
A.N.C.	26	24	42,0
R.O.A.	23	24	23,0
A.G..	36	48	42,0
M.M.N.	29	24	32,0
A.S.	19	18	23,0

Valores de Referência: 35 a 77 %

x = 40,53 / dp = 10,94

**TABELA 6 - Atividade quimiotática de neutrófilos em indivíduos (n=27) com exposição ocupacional a inseticidas anticolinesterásicos.**

J.A.M	55	180	0,50
O.A.J.	25	42	28,00
J.A.	54	02	5,80
J.A.V.	46	150	13,40
A.C.A.	18	02	68,00
G.S.	42	240	15,60
O.L.M.	62	480	19,26
S.T.	59	120	4,50
M.P.S.	43	162	5,60
A.R.O.	48	240	3,80
L.E.S.	38	108	12,40
J.C.C.	312	216	10,50
O.A.B.	37	60	24,40
J.R.P.	35	24	8,00
V.D.C.	30	32	23,30
J.C.P.	49	07	23,00
J.M.	39	22	2,93
R.V.	48	08	12,00
R.O.	23	24	20,70
A.N.C.	26	24	16,30
R.O.A.	22	26	1,60
L.A.A.	22	24	4,33
A.G.	36	48	35,60
MM.N.	29	24	24,80
V.P.S.	39	08	21,60
J.A.P.	30	30	6,40
A.S.	19	18	12,33

Valores Referência: 33,4  $\mu$ m a 79,7  $\mu$ m

$x = 15,72 / dp = 13,9$

**TABELA 7 - Dosagem das imunoglobulinas séricas (IgM, IgG, IgA) em indivíduos (n=32) com exposição ocupacional a inseticidas anticolinesterásicos.**

J.M.	39	22	122	1.100	268
J.C.P.	49	07	170	2.450	382
V.D.	30	12	150	1.375	422
R.V.	48	08	150	1.200	151
C.M.	38	06	138	1.720	164
A.E.M.	24	09	141	1.720	132
R.O.	23	24	141	1.620	142
A.G.	36	48	66	2.100	232
L.A.A.	22	24	155	2.540	---
V.P.S.	39	08	190	2.350	232
MM.N.	29	24	130	1.450	115
J.A.P.	30	30	260	1.200	180
J.R.P.	35	24	150	1.1.00	164
O.A.B.	37	60	130	1.830	98
L.E.S.	38	108	122	1.830	344
M.P.	28	30	205	1.710	170
J.C.C.	32	216	280	2.450	437
M.R.N.	21	04	129	1.620	99
A.N.C.	26	24	158	1.620	223
A.L.A.H.	55	30	280	2.025	355
C.A.H.	18	12	205	2.110	164
A.R.O.	48	240	82	1.450	330
M.P.S.	43	162	175	1.620	98
S.T.	59	120	150	1.710	200
J.A.M.	55	180	158	2.100	344
O.A.J.	25	42	262	2.450	180
R.J.	30	72	130	1.835	423
J.A.	54	02	68	1.550	65
A.A.O.	63	276	200	2350	270
J.A.V.	46	150	180,7	2.040	344
L.S.C.	30	48	170	1.125	98
R.O.A.	22	26	215	2.450	115

Valores de Referência: IgA= 256 ± 1031 mg/dl

IgG= 1245 ± 293 mg/dl

IgM= 122 ± 49 mg/dl

x=164,4/dp=54,0 - x=1805,9/dp=441,0 - x=223,9/dp=111,9