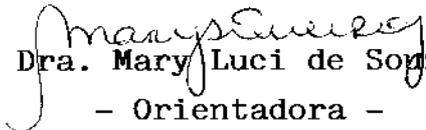


DENISE CONCEIÇÃO MESQUITA DANTAS

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Mestrado, apresentada a Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica Denise Conceição Mesquita Dantas.

Campinas, 19 de setembro de 1994

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

**PARÂMETROS DA RESPOSTA
IMUNOLÓGICA EM TRABALHADORES
EXPOSTOS AO MERCÚRIO**

Tese de Mestrado apresentada ao
Departamento de Farmacologia
Faculdade de Ciências Médicas
Universidade Estadual de Campinas

Orientadora : Prof. Dra. Mary Luci de Souza, Queiroz

D235p

22942/BC

Agradecimentos :

À orientadora Prof^ª Dra. Mary Luci de Souza Queiroz que incentivou e soube conduzir o aprendizado e a pesquisa.

Ao Departamento de Farmacologia que viabilizou a realização deste trabalho.

Ao Hemocentro da Unicamp que teve grande participação neste estudo.

Aos chefes e funcionários do Setor de Imunologia do Departamento de Patologia Clínica que colaboraram intensamente no decorrer deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), e CNPq pelo auxílio financeiro.

Aos trabalhadores e proprietários da firma Apliquim que prestaram colaboração imprescindível para que este estudo fosse realizado.

À todas as pessoas que no dia-a-dia participaram na elaboração deste trabalho e que não estão aqui citadas.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	04
OBJETIVO	13
CASUÍSTICA E MÉTODOS	15
RESULTADOS	28
DISCUSSÃO	60
CONCLUSÕES	72
RESUMO	74
SUMMARY	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

INTRODUÇÃO

Os xenobióticos tem chamado atenção de diversos campos de estudo, devido as suas ações sobre o homem, os animais e a natureza. Dentre estes, o mercúrio, tem recebido relevância em diferentes áreas de pesquisa.

Durante séculos, o Hg foi uma substância importante em numerosos medicamentos tais como: diuréticos, bactericidas, anti-sépticos, laxantes e unguentos.

No decorrer das últimas décadas os mercuriais foram substituídos por métodos de tratamento mais eficazes e específicos, de modo que os sinais de intoxicação mercurial devido às drogas tornaram-se cada vez mais raros. Hoje o interesse a respeito da intoxicação por compostos mercuriais, está basicamente voltado para o campo profissional.

Quimicamente o mercúrio apresenta-se em três formas distintas no que se refere à sua ação tóxica, a saber: vapores de mercúrio (mercúrio elementar), sais de mercúrio e compostos mercuriais orgânicos. Os vapores de mercúrio são a forma mais tóxica das formas inorgânicas deste metal.

Sabe-se de muito tempo que dentre as vias de absorção do Hg, a respiratória é a que apresenta maior risco de intoxicação ocupacional. A absorção gástrica é pequena, embora estudos recentes demonstrem que há uma deposição e absorção pelo trato gastrointestinal (Piotrowski et al, 1992 & Nielsen et al, 1992).

Os vapores de mercúrio ao serem inalados, são completamente absorvidos pelos pulmões, e a seguir abandonam rapidamente os mesmos sendo prontamente oxidados nos eritrócitos, a cátion mercúrio divalente (Hg^{2+}) através da enzima catalase.

O íon Hg^{2+} é a forma inorgânica tóxica, que forma facilmente ligações covalentes com o enxofre, propriedade esta responsável pela maioria dos efeitos biológicos deste metal.

O Hg também combina-se com outros grupos de conhecida importância fisiológica tais como fosforil, carboxil, amido, amino e outros, mas sua principal ligação, do ponto de vista toxicológico, é com grupamentos sulfidrilas (-SH) de proteínas, de

enzimas e de substâncias de baixo peso molecular como a coenzima A, a cisteína, o glutathione e outras (Vallee & Ulmer 1972). Se estas proteínas ou polipeptídeos ligados ao metal forem estruturais, como a queratina do cabelo ou das unhas, a lesão sofrida pelo organismo será mínima, porém se forem grupos prostéticos de enzimas o comprometimento do organismo será grande, uma vez que acarretará alteração, ou mesmo bloqueio na atividade das mesmas.

O mercúrio ligado à estrutura da membrana celular, a qual contém grupos -SH, pode originar alterações na permeabilidade à certos nutrientes (REPORT OF INTERNATIONAL COMITTEE), e alguns trabalhos apontam a membrana celular como o primeiro sítio de ataque dos metais pesados (Environmental Health Criteria, 1976).

A ação tóxica do mercúrio manifesta-se sobretudo nas células do sistema nervoso central. Em trabalhos com exposição de ratos à vapores de mercúrio, este foi encontrado primariamente no córtex, núcleo basal e células de Purkinje (Warfvinge et al, 1992).

As manifestações características do mercurialismo em humanos são: tremor bilateral dos dedos, pálpebras e lábios, agitação, fadiga e também o quadro clínico de eretismo, que é um comportamento anormal e introvertido com mudanças na personalidade, perda de memória e outros sintomas (Environmental Health Criteria, 1976 & Hunter 1970).

Em estudos recentes (Langworth et al, 1992), analisaram o efeito do Hg no Sistema Nervoso Central de trabalhadores de uma indústria de cloro-alkali, que ao serem comparados com um grupo controle verificaram uma diferença significativa na frequência dos sintomas do mercurialismo, causados nestes trabalhadores, e no grupo não exposto.

No que se refere à nefrotoxicidade do Hg, estudos experimentais demonstram que as lesões renais são progressivas e estão confinadas em grande parte ao epitélio tubular, especialmente o túbulo proximal (Schreiner & Maher 1965), mas os glomérulos também são lesados (Mandema et al, 1963). Por outro lado, em estudos realizados em nosso laboratório, pudemos observar que indivíduos expostos ao mercúrio não

apresentaram alterações nos seguintes parâmetros de avaliação renal estudados: dosagem de microalbuminúria e RBP (Retinol Binding Protein), clearance de lítio e pesquisa de auto-anticorpos anti-membrana basal renal (dados não publicados).

Em outros trabalhos no entanto, através da dosagem de N-acetil-b-glicosaminidase, excretada na urina, que é um indicador sensível na demonstração de dano renal decorrente da exposição ao Hg e outros produtos nefrotóxicos, (Meyer et al, 1984), demonstraram que mesmo em condições seguras de exposição houve aumento na excreção desta enzima.

Os efeitos do mercúrio se dão também a nível de lisossomos, que são corpúsculos citoplasmáticos presentes em muitos tipos de células, mas preferencialmente abundantes nos rins e também no fígado. Os lisossomos contém enzimas hidrolíticas que agem no catabolismo de proteínas de baixo peso molecular. Durante a intoxicação crônica de ratos tratados com cloreto de mercúrio, houve uma diminuição no catabolismo destas proteínas (Madsen et al, 1978).

Os metais pesados são conhecidos por prejudicarem a síntese do heme nas células eritróides, através da inibição de várias enzimas sulfidrílicas. Como consequência, a Coenzima A (Co A), que é um nucleotídeo presente no ciclo de Krebs, pode ter sua função bloqueada devido a ligação da mesma, ou seja, dos seus grupos -SH, com o mercúrio. Dentre os muitos processos metabólicos que podem ser prejudicados devido a esta ligação , está a síntese do heme a nível de incorporação da Succinil Co A, podendo resultar em uma anemia, uma vez que o heme constitui o grupo prostético da hemoglobina (Sharma 1987). Sabe-se também que a fração importante do heme sintetizada no fígado, serve como um grupo prostético para a Citocromo P-450 que é uma hemoproteína microsomal. Esta hemoproteína desempenha um papel central na detoxicação de drogas, hormônios e substâncias químicas estranhas. Em trabalhos utilizando-se doses de Cloreto de mercúrio e Cloreto de Chumbo em animais, obteve-se um decréscimo da Citocromo P-450 (Alvarez et al, 1972).

Alguns autores apontam para a ação do mercúrio sobre as ATPases (Na-K- ATPase). O transporte ativo de íons Na^+ e K^+ através da membrana celular, depende da chamada bomba de sódio a qual obtém energia do ATP produzido pela fosforilação oxidativa (Skou 1965). Vários metais pesados mas principalmente o Hg, mesmo em pequenas quantidades, tem demonstrado a capacidade de atuar sobre o metabolismo energético celular, inibindo a Na-K-ATPase a qual desempenha papel importante na bomba de sódio e potássio (Kramer et al, 1986). O acúmulo destes metais pode causar sério risco à saúde, devido à uma deficiência geral no transporte através da membrana celular. A Na-K-ATPase contém diversos grupamentos sulfidrilas (Schoot et al, 1978), cuja complexação por cátions mercúrio altera a estereo especificidade da enzima, diminuindo o acesso do ATP ao centro catalítico da ATPase. Este fenômeno foi observado tanto com o Hg inorgânico (HgCl_2), quanto com o Hg orgânico (Magour 1986). Portanto a ação do referido metal sobre as ATPases a nível renal ou em células da musculatura lisa do sistema vascular, inibindo o transporte de íons e outras substâncias, pode exercer um papel patogênico em doenças renais e em doenças cardiovasculares (Kramer et al, 1986).

Em relação ao efeito genotóxico do Hg, o efeito mutagênico mais evidente de compostos mercuriais sobre células eucarióticas é a produção de C-mitose a qual pode resultar em aneuploidia e poliploidia (Leonard et al, 1983). A toxicidade do Hg é exercida sobre as fibras do fuso, nos microtúbulos das células que estão envolvidas na organização citoplasmática. A capacidade genotóxica do Hg está relacionada com a ligação do mesmo aos grupamentos -SH da tubulina, que é a unidade estrutural dos microtúbulos celulares (Kuriyama & Sakai 1974), e também o metil mercúrio provoca ruptura nos microtúbulos celulares em concentração e tempo dependentes (Sager et al, 1983). No entanto, estudos citogenéticos expondo linfócitos humanos ao mercúrio, demonstraram alteração na segregação cromossômica, que pode estar ligada não

necessariamente devido à ligação do Hg às proteínas do fuso, mas um outro possível mecanismo seria a inativação da RNA polimerase (Verschaeve et al, 1985).

O mercúrio tem sua ação comprovada na liberação de um neurotransmissor, a acetilcolina (Ach). O estímulo para a liberação espontânea da Acetilcolina, foi constatado quando (Levesque et al, 1987) expuseram a junção neuromuscular de ratos ao metal, demonstrando que o mesmo pode bloquear a captação de Ca^{2+} pela mitocôndria, ou promover sua liberação aumentando assim o Ca^{2+} citoplasmático, que estimularia a liberação espontânea de Acetilcolina.

Em meio a tantas alterações que o Hg provoca no homem e nos animais, sabe-se da existência das metalotioneínas que são um grupo de proteínas citoplasmáticas de baixo peso molecular, que possuem grande afinidade com metais pesados e presume-se ter papel importante na detoxicação de metais. Estas proteínas são similares na composição de aminoácidos e carregam o nome "TIONEÍNA" devido a grande número de grupamentos tióis. Em sua composição 6 a 11% constitui-se de metal e 30% de cisteína e são completamente desprovidas de aminoácidos aromáticos e pontes dissulfídicas. As metalotioneínas não tem sido detectadas em nenhum fluido biológico e são consideradas citoplasmáticas por localizarem-se exclusivamente nos tecidos. Sua síntese realiza-se no fígado, rim e baço. Alguns estudos demonstram que a regulação da síntese das metalotioneínas aconteceria na etapa de tradução da biossíntese proteica, isso ocorreria se o m-RNA da metalotioneína já estivesse presente na célula e metais pesados o transformariam de uma forma inativa para uma forma ativa, em outras palavras, certos metais teriam a capacidade de desmascarar o m-RNA para a metalotioneína a qual está normalmente presente na célula. O papel biológico destas proteínas ainda não é totalmente conhecido, um número de funções tem sido sugeridas, como o armazenamento, metabolização, detoxicação, transporte de metais e uma provável ação na resposta imunológica. A indução na síntese destas proteínas por excesso de algum tipo de metal no organismo, interessa particularmente à saúde ambiental e ocupacional

porque elas parecem modificar os efeitos patológicos desta exposição, ligando-se fortemente a eles e reduzindo a disponibilidade das formas difusíveis dentro das células, diminuindo assim o potencial tóxico dos mesmos (Cherian & Goyer 1978).

Autoimunidade induzida por substâncias tóxicas em geral é conhecido como um perigo ambiental, que pode afetar indivíduos geneticamente predispostos a doenças autoimunes. Efeitos do mercúrio e outros metais pesados sobre o sistema imunológico de indivíduos com exposição crônica ao metal tem, de uma maneira geral recebido pouca atenção.

Estudos "IN VITRO" sobre os efeitos de pequenas concentrações de Hg em leucócitos polimorfonucleares de indivíduos normais levaram a supressão na aderência, polarização, eritrofagocitose e atividade quimiotática destas células. Observou-se também aumento na quimioluminescência e produção de H_2O_2 (Contrino et al, 1988).

Alguns autores como (Bernaudin et al, 1981) demonstraram que a ingestão ou inalação crônica de $HgCl_2$ e CH_3HgCl por ratos mesmo em pequenas doses, produziram doença autoimune, deposição granular de IgG nos vasos esplênicos e não no rim, sugerindo que o baço seria um sítio preferencial de deposição ou formação de complexo imune, manifestações de autoimunidade também foram encontradas com doses muito baixas de $HgCl_2$ através de instilação intratraqueal. Produção de auto anticorpos anti-núcleo e anti-nucléolo em camundongos foram verificados por Mirtcheva et al, 1989.

A exposição de camundongos a doses subcutâneas ou ingestão de $HgCl_2$ (Hultman & Eneström 1987) produz imunoestimulação com aumento de imunoglobulina G (IgG) no soro, formação de imuno complexo mesangial, glomerulonefrite e também formação de complexo nas paredes dos vasos hepáticos, renais e esplênicos com um padrão correspondente ao encontrado no soro. Em experimentos utilizando-se linfócitos de sangue periférico de ratos, usando como mitógeno a PHA (fitohemaglutinina), Weening et al 1981 observaram um decréscimo na proliferação destas células após a incorporação de 3H - Timidina comparado com animais controle. Neste mesmo trabalho

foram injetadas doses de Hg e após 12 semanas foi detectado no soro dos mesmos , anticorpos anti-núcleo.

Em estudos experimentais, utilizando-se doses sub-tóxicas de Hg, foram observadas alterações imunopatológicas caracterizadas por reações autoimunes resultantes de linfócitos B dependentes de células T, linfoproliferação (Hirsch et al, 1982 & Rossert et al, 1988), hipergamaglobulinemia, alterando principalmente os níveis de imunoglobulina E (Prouvost et al, 1991).

Poucos estudos clínicos foram realizados em indivíduos expostos cronicamente ao mercúrio, estudos realizados em nosso laboratório demonstraram uma redução na atividade lítica, quimiotática e redutora do NBT de neutrófilos de trabalhadores expostos ao mercúrio (Perlingeiro & Queiroz, 1995a,b), e ao chumbo (Queiroz et al, 1993). Os níveis urinários do metal na maioria destes indivíduos estava abaixo dos limites de tolerância biológica.

Alguns autores observaram que a resposta de linfócitos frente ao mitógeno Concanavalina A, em trabalhadores expostos ao mercúrio estava deprimida (Mottironi et al, 1986), no entanto estes resultados pareceram correlacionar-se mais com a idade do indivíduo do que com a exposição ao mercúrio. Os mesmos autores não encontraram diferença na percentagem de CD₂₊, CD₄₊ ou CD₈₊, enquanto que CD₃₊ estava reduzido nos trabalhadores expostos, quando comparados com um grupo controle.

Um aumento nos níveis de imunoglobulinas séricas em trabalhadores expostos ao mercúrio, foram observadas por Bencko et al, 1990. No entanto estes autores não correlacionaram as alterações nos níveis de imunoglobulinas com grau e tempo de exposição ao referido metal.

Neste trabalho investigamos os níveis séricos de imunoglobulinas, correlacionando-os com grau e tempo de exposição ao Hg. Tendo em vista que células B hiperativas, assim como uma alteração na atividade de células T podem resultar em

respostas autoimunes, também foi investigado nestes trabalhadores a produção de auto anticorpos e paralelamente avaliações da resposta imune celular.

OBJETIVO

O principal objetivo deste trabalho, consistiu no estudo de alterações imunológicas que podem surgir em decorrência da exposição ocupacional ao mercúrio.

Através de vários parâmetros avaliamos a resposta imunológica humoral e celular. Este estudo foi realizado em indivíduos com concentração de mercúrio urinário, consideradas aceitáveis no campo profissional.

Os efeitos adversos observados nestas condições podem ser incluídos dentro dos chamados " efeitos críticos " , assim denominados por serem críticos em relação a uma ação preventiva visando limitar as exposições a níveis mais seguros.

Neste trabalho estudamos os " efeitos críticos " relacionados com a resposta imunológica dos indivíduos expostos, uma vez que, conforme apresentado anteriormente na introdução, o sistema imune parece ser alvo sensível a doses sub-tóxicas de mercúrio.

CASUÍSTICA & MÉTODOS

Os indivíduos analisados neste estudo, trabalham com o reaproveitamento do mercúrio de várias procedências, metal contido em termômetros, pilhas e principalmente Hg liberado nos afluentes das indústrias de cloro-soda. O reaproveitamento destas indústrias ocorre através da adição de sulfeto no tratamento da água, logo o Hg deposita-se sob a forma de sulfeto de mercúrio que é insolúvel. Esta água é filtrada em terra diatomita por processo de pressão através da qual ela é purificada e liberada nos rios. O processo de reaproveitamento do mercúrio nesta firma ocorre da seguinte maneira, a terra diatomita contendo sulfeto de mercúrio, passa por vários processos físico-químicos, que obtém o mercúrio metálico puro para posterior comercialização.

Estes trabalhadores mesmo em contato com o referido metal, são assintomáticos ou oligossintomáticos e exercem suas atividades normalmente, não apresentando história clínica de infecções ou qualquer outro tipo de patologia.

Paralelamente à estas investigações, um grupo de doadores de sangue que vem ao Hemocentro da Unicamp, analisados clínica e laboratorialmente como indivíduos normais, foram tomados como controle para este estudo.

Para estes dois grupos analisados, controle e trabalhadores, foi aplicado um questionário, com a finalidade de investigar a história ocupacional e clínica, idade, uso de material protetor, existência de patologias ou mesmo uso de medicamentos.

1- DETERMINAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL:

1a- QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS B, UTILIZANDO ANTICORPOS MONOCLONAIS.

Coletar 10ml de sangue periférico heparinizado e separar em gradiente de Ficoll-hypaque.

Retirar a camada linfocitária e realizar três lavagens das células usando meio RPMI. Acertar a concentração das células em 5×10^6 linfócitos/ ml. Transferir 0,2ml de células para outro tubo e adicionar 0,1ml de um anticorpo monoclonal contendo as imunoglobulinas IgA, IgG, IgM conjugadas com a fluoresceína. Incubar os tubos à 4°C por 60 minutos. Retirar as células da incubação e lavá-las com meio RPMI, após última lavagem ressuspender as células com 10ul de BSA e preparar as células entre lâmina e lamínula. O material então é observado em microscópio de fluorescência, primeiramente em contraste de fase, com a finalidade de contar as células do campo, para posteriormente verificar a percentagem das mesmas que fluoresceram.

1b- DOSAGEM DE IMUNOGLOBULINAS IgA, IgG e IgM ATRAVÉS DA TÉCNICA DE IMUNO DIFUSÃO RADIAL SIMPLES.

Este método é feito em placas contendo ágar com anticorpos específicos incorporados ao mesmo. Cada placa possui orifícios para 12 soros. Aplicar 5ul de soro, tampar a placa e deixá-la à temperatura ambiente por 48h. Após este período fazer a leitura do halo que se formou no ágar, que será proporcional à quantidade de antígeno no soro.

Uma curva padrão foi traçada, usando padrões conhecidos de anticorpos, a qual foi usada para determinação da concentração do antígeno através do diâmetro do halo de precipitação.

Para fazer o gráfico foram utilizados 3 padrões com concentrações diferentes, sendo necessário uma alta pureza dos anticorpos que se encontram no ágar.

Fez-se a leitura dos diâmetros correspondentes aos halos de precipitação de cada padrão e traçou-se a reta, lançando na ordenada as concentrações em "mg" ou unidades internacionais, contra o quadrado dos diâmetros dos respectivos halos de precipitação.

A leitura dos soros em estudo, foi a partir do quadrado do diâmetro analisando sobre a reta padrão, a qual foi estabelecida para cada lote de placas.

1C- DOSAGEM DE IgE SÉRICA, PELO MÉTODO DE ENZIMA IMUNO ENSAIO

O soro para esta análise deve ser diluído 1:5, usando tampão de diluição apropriado.

A técnica foi feita em placas com orifícios para até 10 soros. Como antígeno foram usadas pérolas revestidas com anticorpos de coelho anti IgE humana.

Após o soro ser diluído na própria placa, coloca-se uma pérola por orifício e incuba-se a placa em banho-maria 37°C por 30 minutos. Ao término desta incubação foram feitas lavagens dos orifícios usando tampão de lavagem apropriado.

Em uma segunda fase coloca-se 0,2ml do conjugado que é um anticorpo anti IgE produzido em cabra, juntamente com a enzima peroxidase, esta ligação se dá em banho-maria a 37°C durante 30 minutos.

Proceder 3 lavagens, e em seguida transferir o conteúdo dos orifícios para os tubos e adicionar em cada tubo 0,3ml do substrato OPD o qual contém grupo cromógeno que produz cor a reação. Esta incubação deve ser de 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período, adicionar 1ml de ácido sulfúrico 1N, que é um bloqueador da reação, necessário até que se proceda a leitura em espectrofotômetro. Os resultados são expressos em UI/ml.

2-DETERMINAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR:

2a- TRANSFORMAÇÃO BLÁSTICA DE LINFÓCITOS T:

Coletar em seringa estéril heparinizada, 10ml de sangue periférico. Diluir este sangue com salina ou PBS (estéreis), usando volumes iguais, e homogeneizar. Separar as células em gradiente de Ficoll-hypaque, após retirar a nuvem linfocitária e lavar as células 3 vezes usando meio RPMI. Em seguida da última lavagem, ressuspender o sedimento em 3ml de RPMI e homogeneizar.

Acertar a concentração das células em 1×10^6 linfócitos/ ml. Preparar a placa de micro cultura e adicionar 0,2ml de suspensão celular, 10ul de fitohemaglutinina (diluída 1:8), e 10ul de soro AB* ou soro do indivíduo exposto. Incubar por 48h em estufa à 37°C, com 5% de CO₂.

Depois deste período de incubação, observar a estimulação ocorrida, em microscópio invertido.

Adicionar 10ul de timidina e incubar novamente em estufa de CO₂ (5%) à 37°C, por mais 24h.

Após este período, as culturas são coletadas por método semi-automático em papel de fibra de vidro por meio de um coletor de células (cell-harvester), utilizando água destilada. Os discos de papel referentes a cada cultura são destacados e transferidos para os frascos de cintilação, contendo 2ml de líquido de cintilação (difeniloxazole a 0,3% em tolueno). Os resultados são expressos pela média aritmética das triplicatas contadas por minuto, realizado em cintilador B.

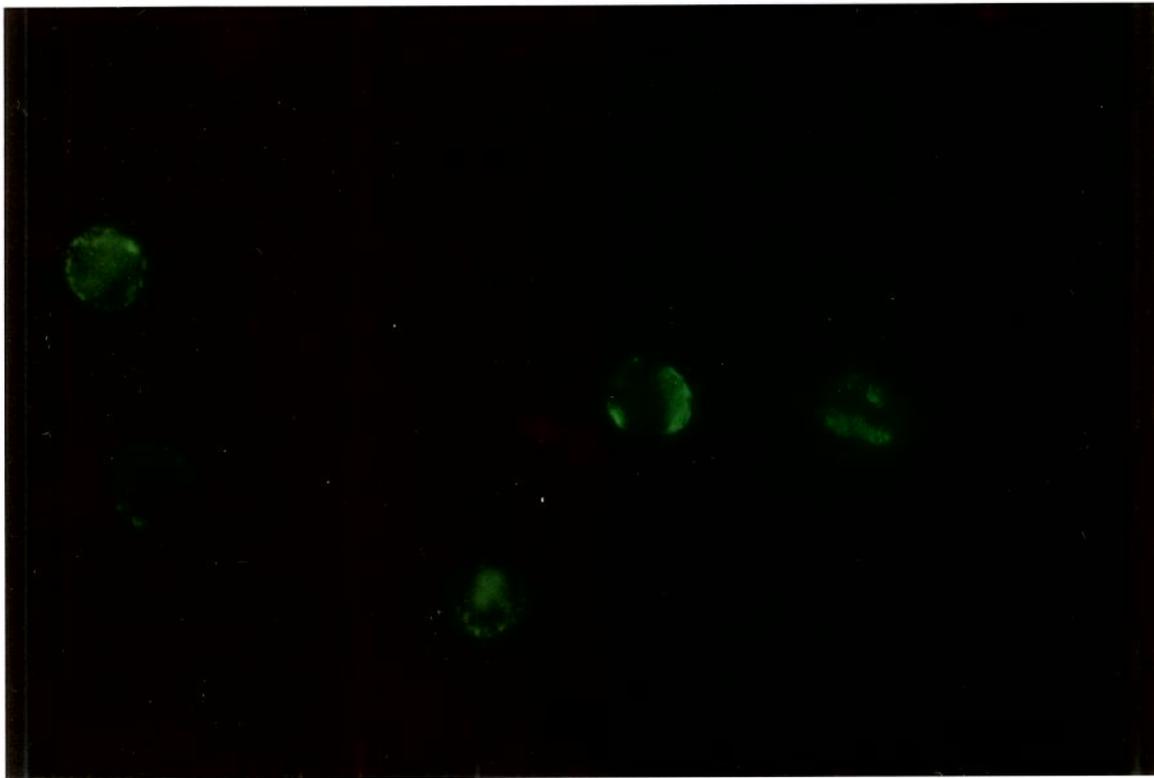
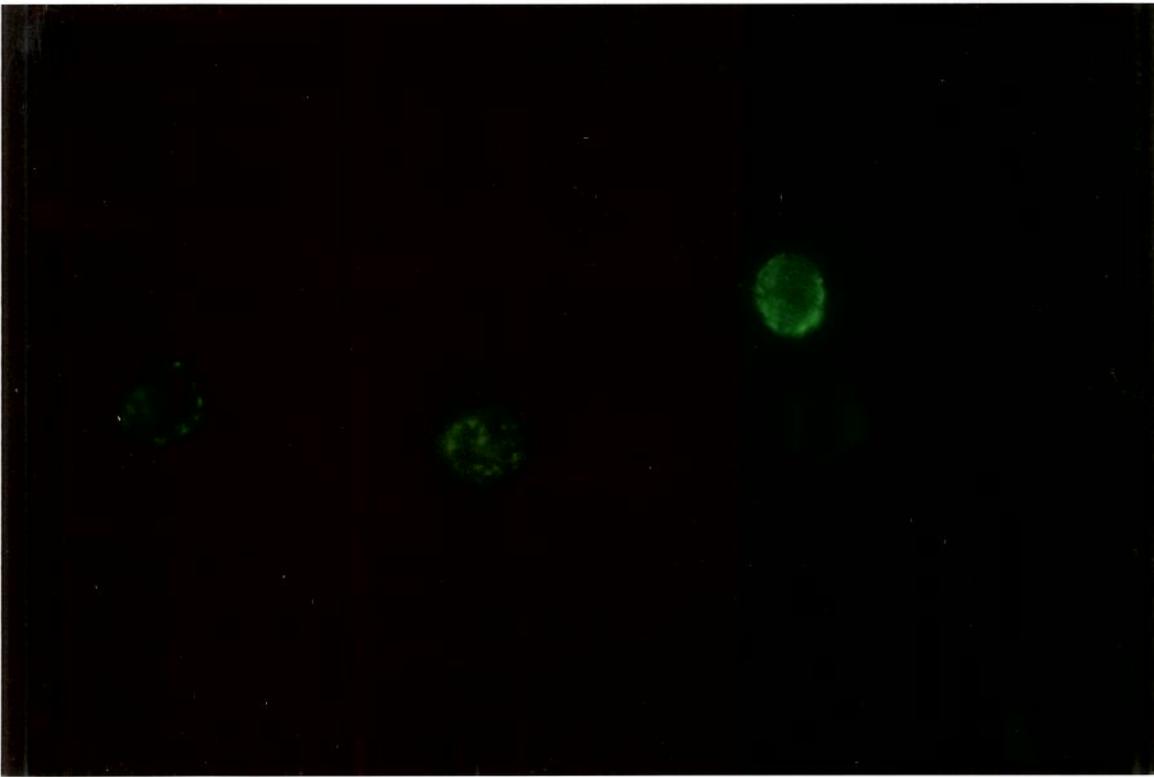
OBS: * a cultura foi realizada com células de indivíduos normais (em triplicata) testadas com soro AB normal (controle) e soro do indivíduo exposto em triplicatas separadas.

2b- QUANTIFICAÇÃO DE SUB-POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T, T₄ e T₈, ATRAVÉS DE ANTICORPOS MONOCLONAIS:

Coletar 10ml de sangue periférico heparinizado, e separar em gradiente de Ficoll-hypaque. Lavar as células com meio RPMI e acertar a concentração das mesmas para 5×10^6 linfócitos/ ml.

Preparar tubos para as respectivas células a serem quantificadas: CD₄ e CD₈, e um tubo controle. Em cada tubo é colocado, 0,2 ml de suspensão celular a 5×10^6 linfócitos/ml e 5 μ l do anticorpo monoclonal respectivo. Incubar as células por 30 minutos. Tirar da incubação e lavar 3 vezes com meio RPMI. Após a última lavagem, ressuspender o sedimento e adicionar 0,1ml do conjugado de anticorpo com a fluoresceína e incubar por 30 minutos a 4°C. Ao término desta incubação lavar as células 3 vezes com meio RPMI e após a última lavagem ressuspender as células com BSA. Preparar um esfregaço de células entre lâmina e lamínula.

O material então é observado em microscópio de fluorescência, primeiro em contraste de fase, com a finalidade de contar as células do campo, para posteriormente verificar a porcentagem de células que fluoresceram.



3- PESQUISA DE AUTO-ANTICORPOS:

3a- Pesquisa de auto-anticorpos no soro, utilizando a técnica do fator anti-núcleo (FAN), através de imunofluorescência indireta.

Os soros apresentando auto-anticorpos, reagem com o antígeno, que nesta técnica é um imprint, em lâmina, de fígado de camundongo.

Técnica:

Fazer diluições seriadas do soro de (1:10 a 1:80), em placas de micro titulação, utilizando como diluidor tampão PBS.

Cada uma destas diluições foram colocadas em áreas delimitadas da lâmina as quais contém o antígeno. Incubar as lâminas em câmara úmida à 37°C por 30 minutos. Após estas lâminas foram lavadas com tampão PBS. Retirar as lâminas das cubas de lavagem, preparar o conjugado H, que é uma globulina de carneiro anti imunoglobulinas totais humanas, marcada pelo isotiocianato de fluoresceína em uma diluição de 1:100 que deve ser realizada com azul de Evans, solução que exacerba a fluorescência.

Colocar o conjugado sobre as lâminas e incubá-las em câmara úmida à 37°C por 30 minutos. A seguir as lâminas foram lavadas com tampão PBS e deixadas secar à temperatura ambiente por 5 minutos. Montar as lâminas com glicerina tamponada e lamínula.

Levar as lâminas para leitura em microscópio de fluorescência.

3b- Pesquisa de auto-anticorpos anti-DNA no soro, utilizando a técnica de imunofluorescência indireta.

Os soros apresentando auto-anticorpos, reagem com o antígeno que neste técnica é um protozoário, a Crithidia lucillae, que pode ser mantida em cultura. O cinetoplasto deste protozoário é rico em DNA de fita dupla, logo se o soro em análise contiver auto-anticorpos anti-DNA , os mesmos se ligam ao antígeno produzindo fluorescência.

Técnica:

O soro a ser analisado deve ser diluído em placas de micro titulação, utilizando tampão PBS em diluições seriadas que começam em 1:10 a 1:80.

As lâminas contendo o protozoário (que foi previamente seca em estufa), deve ter áreas delimitadas para colocação dos soros diluídos.

Colocar os soros nas lâminas e levá-las a câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Retirá-las desta incubação e proceder lavagens utilizando tampão PBS.

Preparar o conjugado H, diluído 1:200 com solução de Azul de Evans, conforme anteriormente descrito. Colocar o conjugado sobre as lâminas e incubá-las em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Após esta incubação proceder lavagens utilizando tampão PBS. Depois de lavadas deixá-las secando à temperatura ambiente, montar as lâminas com glicerina tamponada.

Levar as lâminas ao microscópio de fluorescência para leitura.

4- DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MERCÚRIO NA URINA

A concentração de mercúrio na urina foi determinada, utilizando-se um espectrofotômetro de absorção atômica (equipamento Varian AA175 com lâmpada de catodo ocô de mercúrio e câmara de absorção).

A amostra de urina foi mineralizada por processo de digestão, sob refluxo, com uma mistura de ácidos sulfúrico, persulfato de potássio e, permanganato de potássio em um recipiente de vidro. Este recipiente possui um reservatório de condensação, no qual o material condensado pode ser devolvido ao frasco de digestão ou, alternativamente, ser eliminado do recipiente (Richardson, 1976).

Após digestão, a concentração de mercúrio foi determinada em espectrofotômetro de absorção atômica, cuja sensibilidade é 0,1ug/l, usando-se hidrato bórico de sódio como agente redutor (Sharma & Davis, 1979; Margel & Hirsh, 1984; Baselt, 1988 e Baselt & Cravey, 1990).

Foi realizada paralelamente, a dosagem de creatinina na urina que permite a expressão dos resultados em micrograma de Hg^{2+} por grama de creatinina. Esta correção é importante pois ajusta a eliminação de Hg^{2+} ao volume de água urinário, o qual é bastante variável a ponto de diluir ou concentrar de duas a três vezes as substâncias a serem dosadas. A concentração urinária de creatinina foi medida pelo método de Jaffé, utilizando-se espectrofotômetro (Todd et al, 1989).

REAGENTES E EQUIPAMENTOS

REAGENTES

FICOLL- COD F 4375 - SIGMA

HYPAAQUE 50%- DIATRIZOATO DE SÓDIO - CEME

SORO FETAL BOVINO- CULTLAB

TOLUENO- MERCK

RPMI- MEIO DE CULTURA - SIGMA

PHYTOHAEMAGGLUTININ P- DIFCO

HEPARINA SÓDICA 5000UI/ml- ORGANON FICO

FILTRO COLETOR DE CÉLULAS- COD: AP 2081025 - MILLIPORE

PPO 2,5- DIPHENYLOXAZOLE- COD: 4630 - SIGMA

TAMPÃO PBS

CONJUGADO H

TRÍCIO ³H

CD4- M 716- T CELL, HELPER, INDUCER, MT 310- DAKO

CD8- M707- T CELL, SUPRESSOR/ CYTOTOXIC- DK 25 / FITC

ANTI-MOUSE- COD: 232 MOUSE IMMUNOGLOBULINS / FITC- DAKO

IgS (LINFÓCITO B)- COD: F 200 IgA, IgG, IgM , KAPPA LAMBDA / FITC -
DAKO

NOR- PARTIGEN- IgA- BEHRING

NOR- PARTIGEN- IgM- BEHRING

NOR- PARTIGEN- IgG- BEHRING

**REAGENTES ABBOTT DE ENZIMA IMUNO ENSAIO, PARA DOSAGEM DE
IgE**

TAMPÃO DE DILUIÇÃO

ANTÍGENO

TAMPÃO DE LAVAGEM

CONJUGADO ANTI-IgE

SUBSTRATO OPD

ÁCIDO SULFÚRICO 1N

EQUIPAMENTOS

MICROSCÓPIO DE FLUORESCÊNCIA- ZEISS

CELL- HARVESTER- CEB- UNICAMP

CINTILADOR B - BECHMAN LS 5801

ESTUFA À 37°C- FANEM 002 CB

ESTUFA DE O₂/CO₂- FORMA SCIENTIFIC - MODEL 3159

AGITADOR ELÉTRICO- FISATOM MOD: 752 A

MICROSCÓPIO OLYMPUS- CBA- K

BANHO- MARIA- FANEM 102/1

CENTRÍFUGA- FANEM 204

RESULTADOS

Neste trabalho investigamos através de alguns parâmetros, a resposta imune humoral e celular de trabalhadores expostos ao mercúrio.

Também pesquisamos uma possível produção de auto-anticorpos nestes indivíduos.

Uma avaliação hematológica foi realizada paralelamente através de hemograma, com o objetivo de analisarmos as séries eritrocítica e leucocitária.

A concentração de mercúrio urinário (HgU) destes trabalhadores, foi realizada mensalmente. Estes dados de HgU e o tempo de exposição destes indivíduos, foram ao final deste estudo correlacionados com os resultados obtidos.

Os valores de HgU foram corrigidos pela creatinina, por ser o melhor fator de correção. Em pessoas normais não expostas ao mercúrio o valor normal de HgU é de 5ug Hg/ g creatinina, entretanto em indivíduos expostos o limite aceitável no campo profissional é de até 50ug Hg/ g creatinina.

1- Avaliação Hematológica

A avaliação hematológica realizada em 25 indivíduos expostos, está apresentada na tabela 1.

A série vermelha quanto à eritrometria, hematócrito e hemoglobinometria manteve valores normais na quantificação e na avaliação de tamanho e forma dos eritrócitos.

A série branca apresentou a leucometria enquadrada nos valores de referência, e não apresentou alterações morfológicas.

2- Quantificação de Linfócitos B

Na quantificação de células B através de imunoglobulinas de superfície (IgS), o valor é expresso em percentagem de células.

Encontramos uma redução significativa no número de linfócitos B ($p < 0.001$ Teste T de Student), nos indivíduos expostos ao mercúrio ($n = 33$), quando comparados com o grupo controle ($n = 33$), Figura 2 Tabela 3.

Não houve correlação destes resultados com o tempo de exposição e níveis de mercúrio urinário.

3- Dosagem de imunoglobulinas séricas (IgA, IgG e IgM)

Os níveis séricos destas três imunoglobulinas estava significativamente aumentado ($p < 0.001$ Teste T de Student) nos trabalhadores expostos ($n = 44$) em relação ao grupo controle.

Foram realizadas duas avaliações destas imunoglobulinas: a primeira foi realizada em 44 indivíduos, Figura 7. A segunda, seis meses após, em 16 indivíduos Figura 8.

A concentração de mercúrio urinário na primeira avaliação manteve-se em valores de 3.5 a 67.9 ug Hg/ g creatinina, distribuídos da seguinte maneira: < 10 ug/ g, 12 trabalhadores; 10-20 ug/ g, 10 trabalhadores; 20-30 ug/g, 7 trabalhadores; 30-40 ug/ g, 3 trabalhadores; 40-50 ug/ g, 8 trabalhadores; > 50 ug/ g, 4 trabalhadores.

Nos 16 trabalhadores avaliados duas vezes, a concentração de mercúrio urinário na primeira avaliação foi de 3.5 a 67.9 ug Hg/ g creatinina, e a distribuição foi a seguinte: < 10 ug/ g, 2 trabalhadores; 10-20 ug/ g, 2 trabalhadores; 20-30 ug/ g, 4 trabalhadores; 30-40 ug/ g, 3 trabalhadores; 40-50 ug/ g, 3 trabalhadores; > 50 ug/ g, 2 trabalhadores.

Na segunda avaliação neste grupo de 16 indivíduos, houve uma redução na concentração de mercúrio urinário (Figura 9) devido a melhorias de higiene no local de trabalho, e os níveis de HgU permaneceram entre 2.1- 31.3 ug Hg/ g creatinina,

distribuídos da seguinte maneira: < 10 ug/ g, 11 trabalhadores; 10-20 ug/ g, 3 trabalhadores; 20-30ug/ g, em nenhum trabalhador; 30-31.3 ug/ g, 2 trabalhadores.

Nenhuma correlação foi observada entre o tempo de exposição, concentração de mercúrio urinário e níveis de imunoglobulinas.

As Tabelas de 10 a 15 apresentam os valores destas imunoglobulinas e concentração de mercúrio urinário na primeira e segunda avaliações.

4- Dosagem de imunoglobulina E (IgE)

Os níveis de IgE estavam significativamente aumentados ($p < 0.009$ Teste T de Student) nos indivíduos expostos ($n = 36$), Figura 1 Tabela 9.

Observamos uma correlação negativa moderada, entre os valores de IgE e o tempo de exposição $r = - 0.4280$ Figura 5.

5- Quantificação de sub-populações de linfócitos T auxiliar (CD₄) e T supressor (CD₈).

A proporção CD₄/ CD₈, que em condições normais é maior que 1, estava significativamente diminuída ($p < 0.001$ Teste T de Student) nos trabalhadores expostos ($n = 33$), em relação grupo controle ($n = 33$), Figura 4 Tabela 8.

Nenhuma correlação foi encontrada quando estes resultados foram correlacionados com o tempo de exposição e concentração de mercúrio urinário.

OBS: As Tabelas 4,5,6 e 7 apresentam valores em separado de células CD₄ e CD₈ de indivíduos expostos e controle.

6 - Transformação Blástica de Linfócitos T

A presença de fator estimulador ou inibidor no soro dos indivíduos expostos, foi testada através da adição do soro destes indivíduos na cultura de linfócitos normais estimulados pela fitohemaglutinina. Soro AB normal foi utilizado como controle.

Não foi detectado nenhum componente no soro destes trabalhadores, que alterasse a resposta blástica dos linfócitos ($p= 0.364$ Teste T de Student) Tabela 2.

Ao correlacionarmos estes resultados com o tempo de exposição e concentração de mercúrio urinário, observamos uma correlação moderada com a concentração de mercúrio urinário $r= 0.4402$ $p< 0.052$ (Figura 6).

7- Pesquisa de auto-anticorpos (anti-DNA e anti-núcleo)

A pesquisa no soro dos indivíduos expostos ($n = 17$), para verificar a presença de auto-anticorpos anti-DNA e anti-núcleo foi negativa.

Fig.1: Níveis de imunoglobulina E (IgE) em indivíduos expostos ao mercúrio

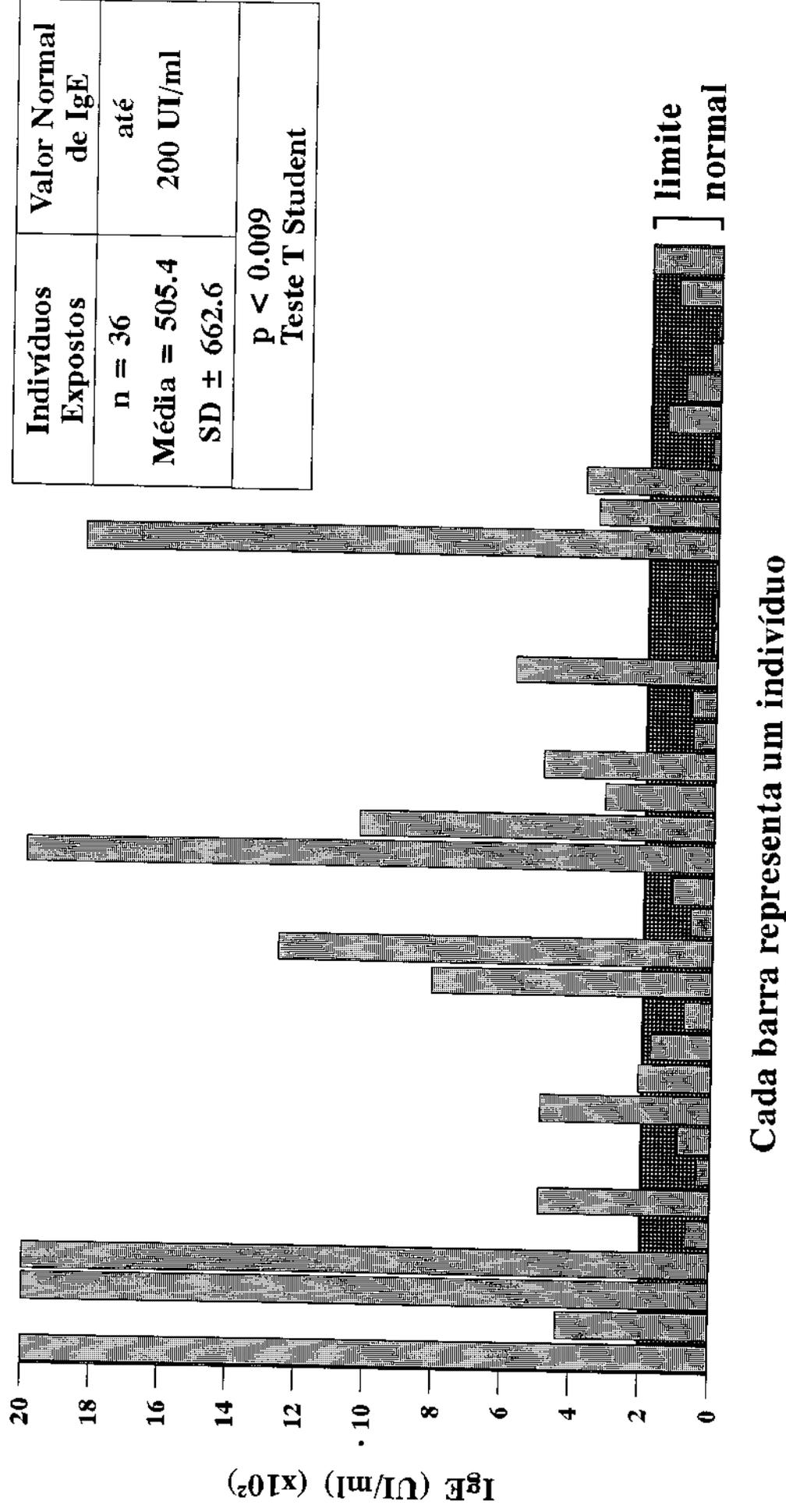


Fig.2: Quantificação de linfócitos B, através de imunoglobulinas de superfície (IgS) em indivíduos expostos ao mercúrio



Fig.3: Quantificação de linfócitos CD4 e CD8 em indivíduos não expostos ao mercúrio

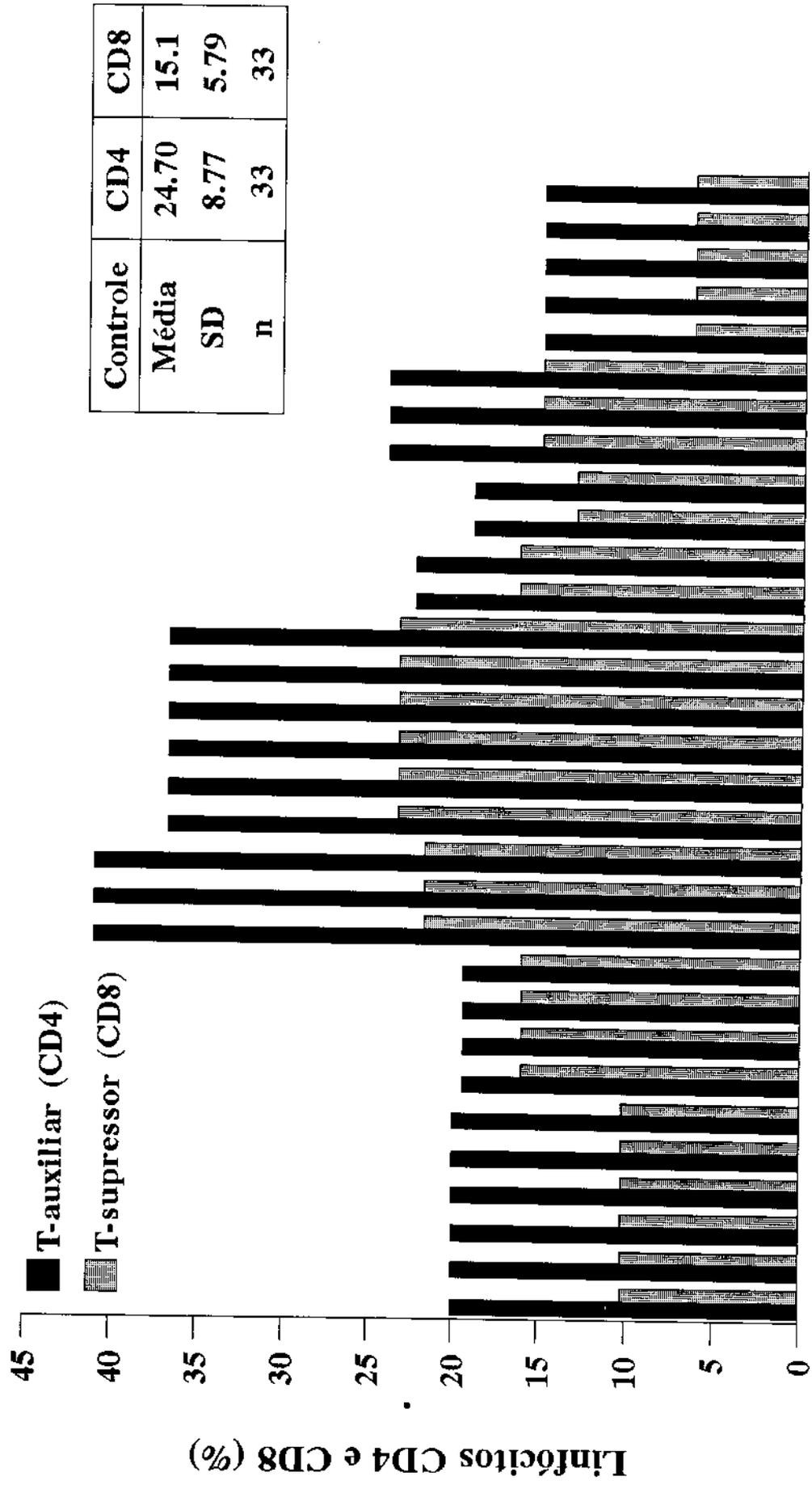
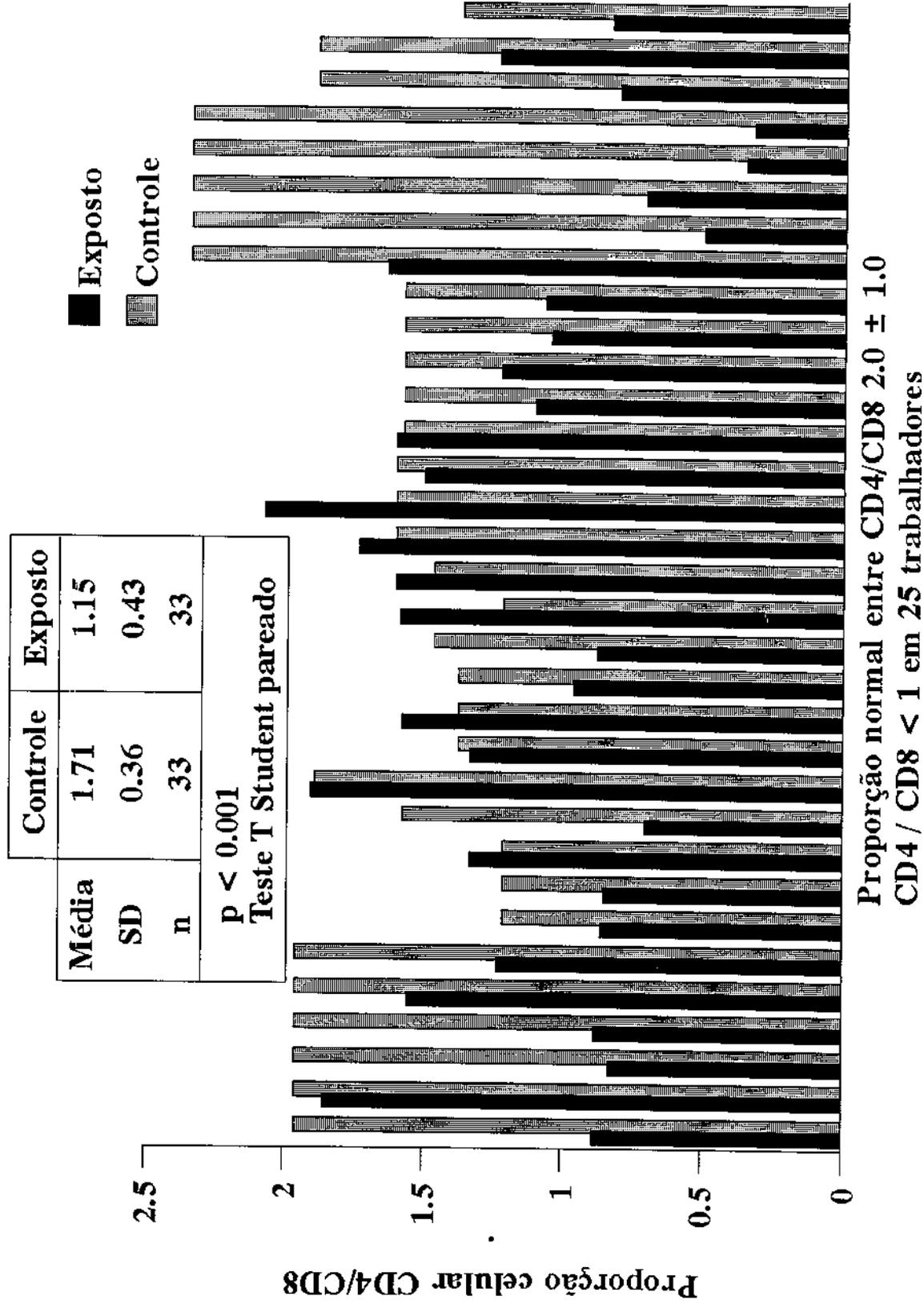


Fig.4: Proporção celular entre linfócitos CD4/CD8 em trabalhadores expostos ao mercúrio e indivíduos controle



**Fig.5:Correlação entre os níveis de IgE com tempo de exposição
em trabalhadores expostos ao mercúrio
($r = - 0,4280$)**

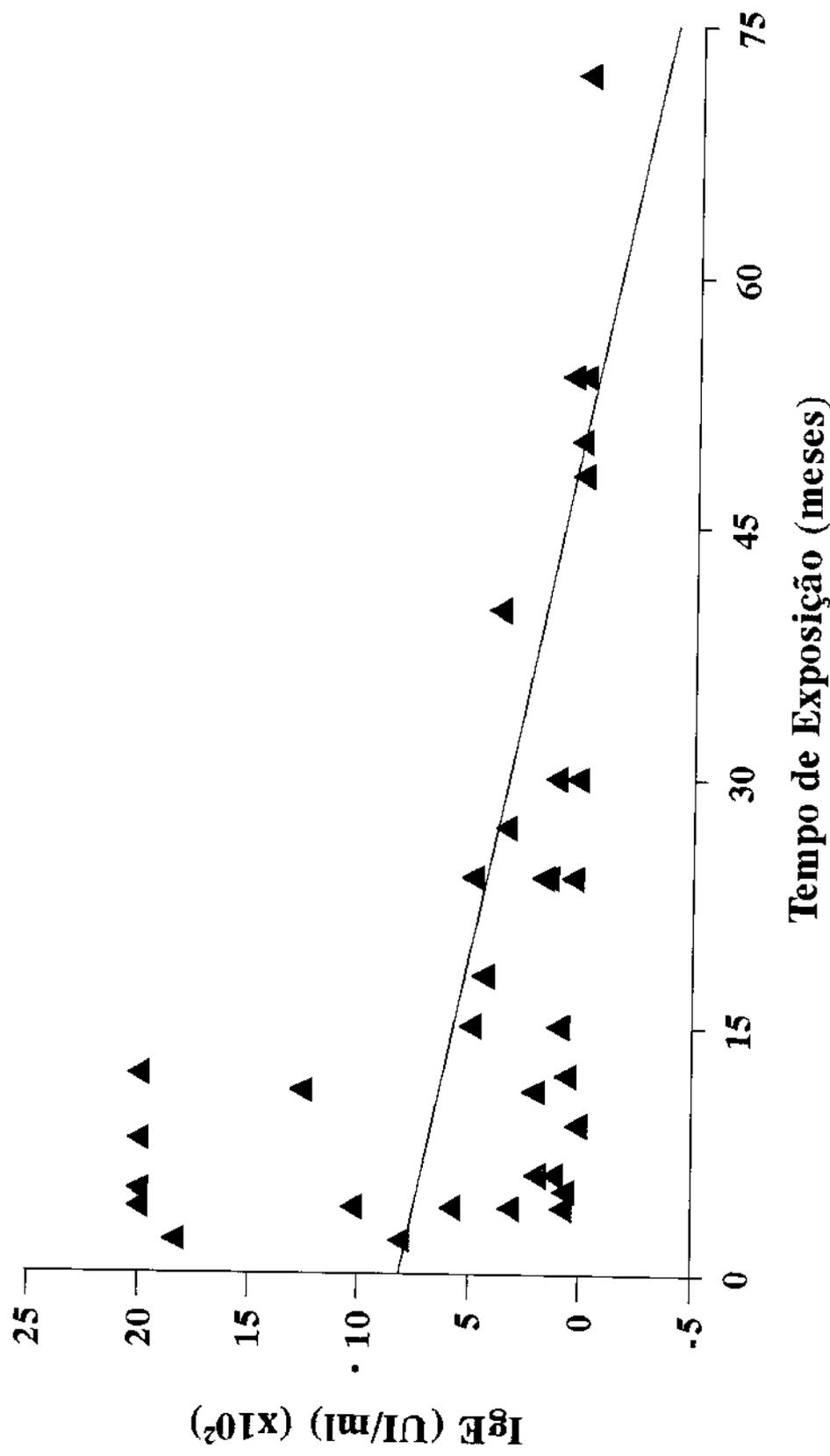
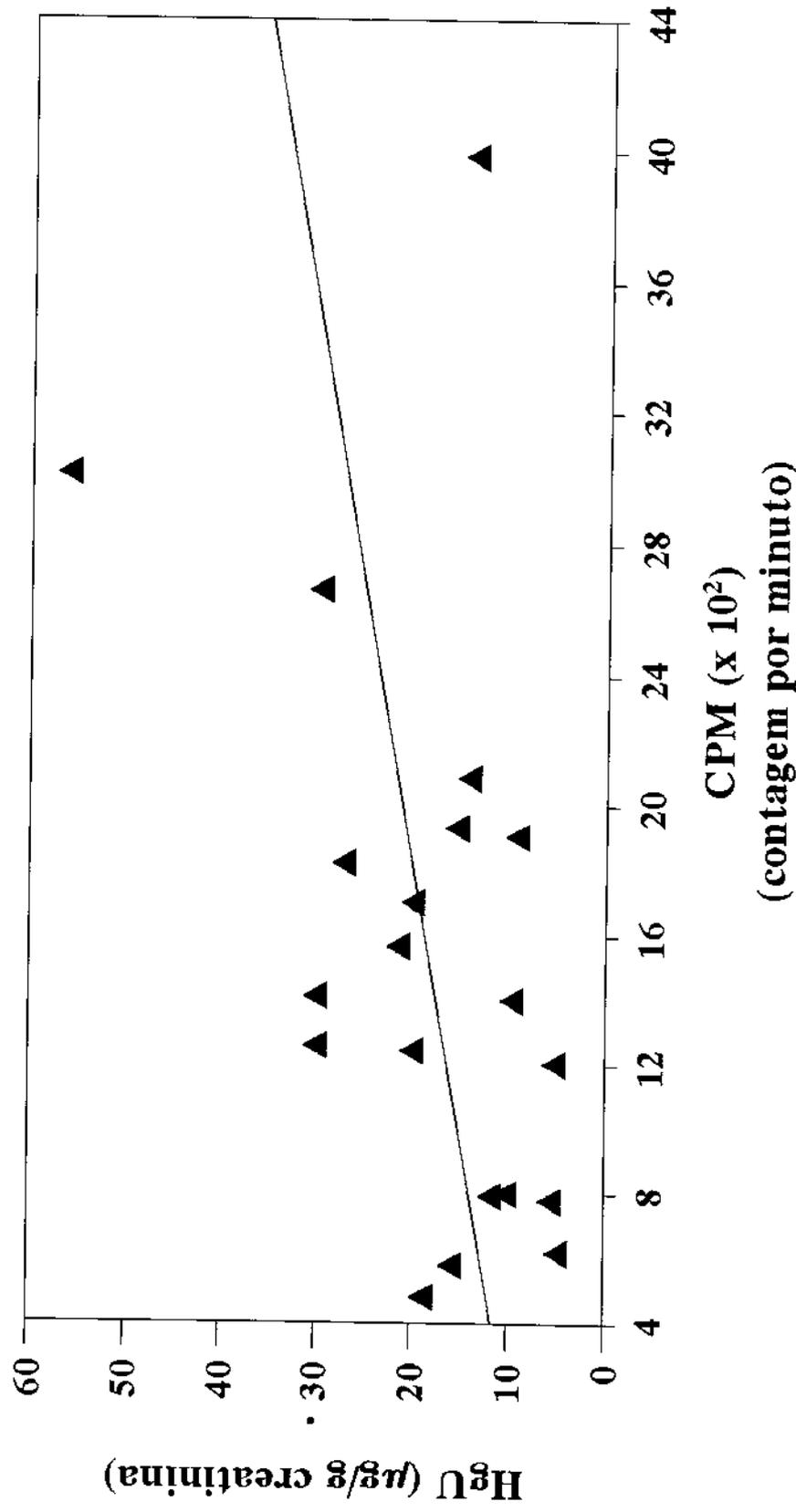


Fig.6: Efeito do soro de indivíduos expostos ao mercúrio sobre a estimulação de linfócitos normais por PHA. Correlação entre o efeito do soro e a concentração de mercúrio urinário (HgU)



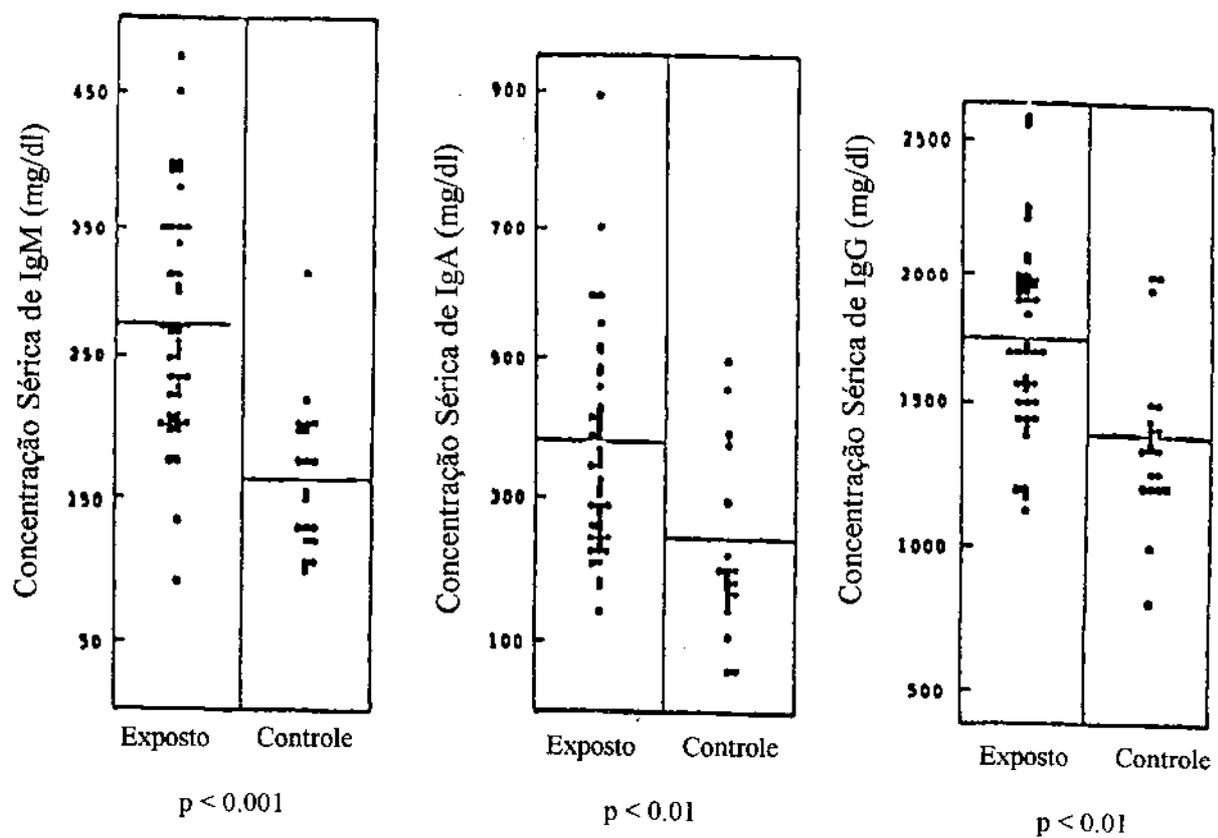


Fig. 7: Concentração sérica de imunoglobulinas (IgM, IgA, IgG) em trabalhadores expostos ao mercúrio e controle. As linhas horizontais indicam a média geométrica.

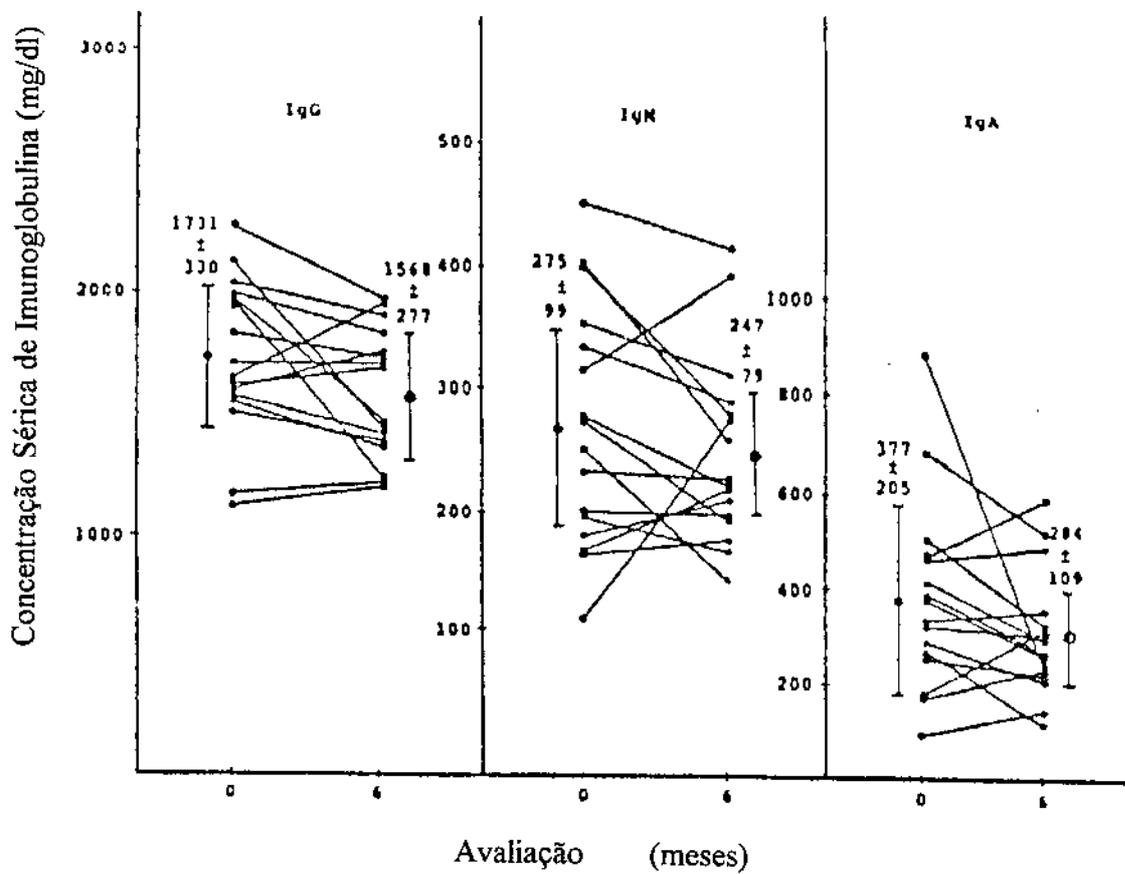


Fig. 8: Estudo comparativo dos níveis séricos de imunoglobulinas em trabalhadores expostos ao mercúrio (n=16). O intervalo entre as avaliações foi de seis meses.

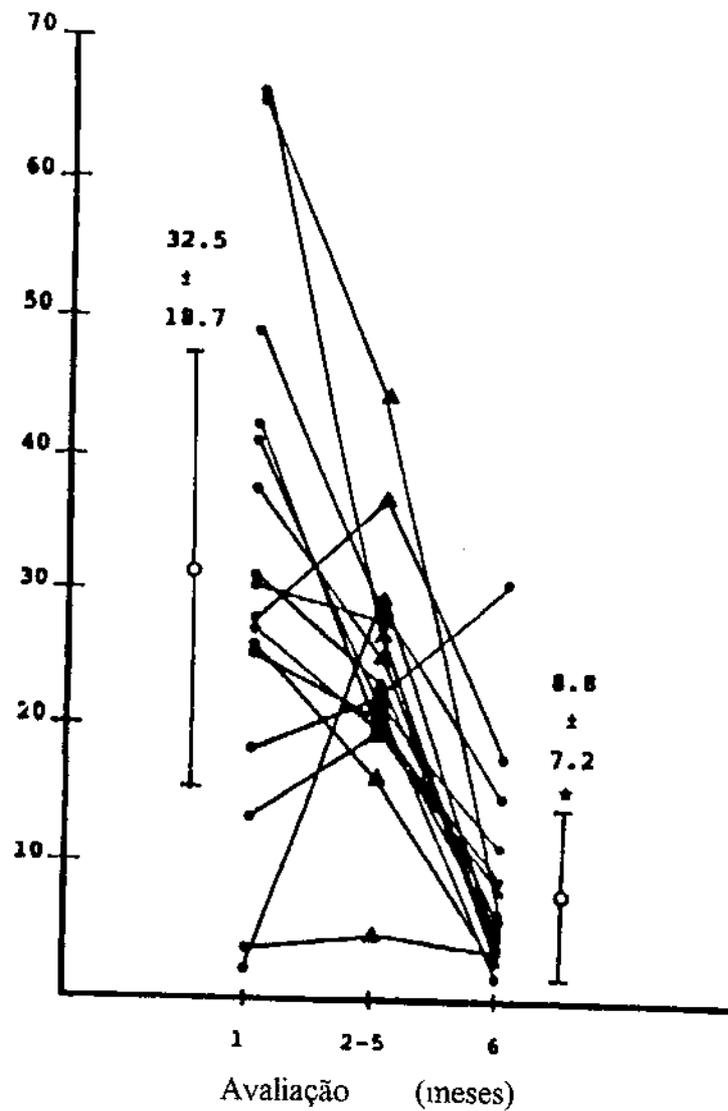


Fig. 9: Estudo comparativo dos níveis de mercúrio urinário em trabalhadores expostos a este metal (n=16). A primeira e a terceira avaliações (●) correspondem ao primeiro e sexto mês respectivamente. A segunda avaliação (▲) é a mediana das concentrações intermediárias. (○) representa a média ± S.D. dos valores obtidos no primeiro e sexto mês.

* P < 0.001

TABELA 1- HEMOGRAMA

INDIVÍDUOS	HEMATÓCRITO (%)	HEMOGLOBINOMETRIA (g/dl)	LEUCOMETRIA (cel/mm³)
R.D.S	44.3	15.0	6300
C.D.D	42.6	14.8	5000
E.D.C	43.5	15.4	6400
S.B.S	47.9	15.7	6600
M.A.Z	46.8	15.3	7000
A.M	41.8	13.9	10300
A.A.S	42.8	14.7	3700
C.S	47.9	16.5	6200
M.E.B.L	41.5	14.6	6800
A.L.V	43.3	15.1	10100
J.M.L.M	41.8	14.6	7800
W.J.O	45.8	16.6	7900
J.R.M.C	45.3	14.9	6800
V.O.S	45.2	15.7	9000
L.C.M	40.9	13.7	8500
F.R.S	49.7	16.9	9100
A.Q.O	42.3	13.9	6300
C.D.S	46.9	15.8	7400
N.L.D	42.8	14.6	6800
J.T.O	44.6	14.4	9700
G.A.V	47.0	16.4	10200
H.V.S	45.3	15.0	7700
G.F.S	48.9	16.1	7600
E.R.C	44.1	14.8	7900
J.B.S	43.5	14.9	6800

VALORES NORMAIS

HEMATÓCRITO: 38- 45 %

HEMOGLOBINOMETRIA: 13- 15 g/dl

LEUCOMETRIA: 5000- 10000 cel/ mm³

TABELA 2- TRANSFORMAÇÃO BLÁSTICA DE LINFÓCITOS T EM RESPOSTA A FITOHEMAGLUTININA, EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS AO MERCÚRIO

INDIVÍDUOS	IDADE (anos)	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (meses)	MERCÚRIO URINÁRIO (ug/g creat)	CONTROLE (CPM) SORO AB	CONTROLE (CPM) IND. EXPOSTOS
R.D.S	20	4	38.7	10279	12431
C.D.D	20	4	44.8	10279	20833
E.D.C	20	8	15.0	10279	7933
S.B.S	34	2	15.4	16980	19293
M.A.Z	39	36	17.6	16980	16996
A.M	30	2	29.8	16980	26600
A.A.S	41	48	14.2	8298	12575
C.S	46	72	13.2	8298	12028
M.E.B.L	30	27	16.1	8298	14004
A.L.V	33	72	18.2	29864	39854
J.M.L.M	43	6	10.4	29864	19041
W.J.O	27	36	47.6	29864	30089
J.R.M.C	25	28	57.4	19963	18218
J.B.S	25	15	29.8	19963	14090
V.O.S	26	11	21.5	19963	15677
E.R.C	39	24	4.9	5769	6169
G.F.S	23	54	15.8	5769	5768
H.V.S	22	24	18.7	5769	4783
C.S	24	24	10.2	8320	7995
N.L.D	28	48	5.6	8320	7779

CPM= contagem por minuto

MERCÚRIO URINÁRIO

VALOR DE REFERÊNCIA: 5 ug Hg / g de creatinina

VALOR DE TOLERÂNCIA BIOLÓGICA : 50 ug Hg / g de creatinina

TABELA 3- QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS B, ATRAVÉS DE IMUNOGLOBULINAS DE SUPERFÍCIE (IgS) EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS AO MERCÚRIO (n = 33) E CONTROLE (n= 33).

INDIVÍDUOS (IgS) %	CONTROLE (IgS) %
16.2	22.6
13.0	22.6
15.0	22.6
11.5	22.6
11.0	22.6
9.0	22.6
8.0	23.0
21.0	23.0
15.0	23.0
22.0	23.0
20.0	23.0
15.0	23.0
10.0	18.0
11.0	18.0
11.0	18.0
12.0	17.0
7.0	17.0
8.0	17.0
27.2	39.0
34.6	39.0
28.6	39.0
34.0	39.0
33.0	39.0
38.0	39.0
15.0	20.0
17.0	20.0
3.0	11.0
6.7	11.0
7.4	11.0
11.0	19.2
15.4	19.2
9.0	19.2
17.5	19.2

TABELA 4- MARCADORES DE SUPERFÍCIE DE LINFÓCITOS T AUXILIAR (CD4) E T SUPRESSOR (CD8), EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS AO MERCÚRIO (n= 33)

T AUXILIAR (CD4) %	T SUPRESSOR (CD8) %
14.7	16.6
13.3	9.8
8.3	10.0
15.0	17.0
14.0	9.0
16.0	13.0
21.5	25.0
11.2	13.2
20.0	15.0
19.0	12.0
40.0	21.0
20.9	26.0
29.0	23.4
19.7	28.0
28.0	17.5
22.0	20.6
23.0	19.5
23.0	22.0
26.7	25.0
20.0	15.0
16.0	19.2
21.0	13.3
14.4	15.0
14.0	16.0
24.0	15.0
26.0	15.0
27.0	13.0
15.0	10.0
5.4	3.3
1.5	3.0
3.4	4.8
5.8	16.4
3.5	10.8

TABELA 6- MARCADORES DE SUPERFÍCIE DE LINFÓCITOS T AUXILIAR (CD4) DE INDIVÍDUO EXPOSTO AO MERCÚRIO, E INDIVÍDUO CONTROLE (n= 33)

INDIVÍDUOS (CD4) %	CONTROLE (CD4) %
14.7	20.0
20.9	41.0
13.3	20.0
29.0	41.0
8.3	20.0
26.0	20.0
15.0	20.0
27.0	24.0
14.0	20.0
15.0	24.0
16.0	20.0
1.5	15.0
21.5	19.4
3.4	15.0
11.2	19.4
3.5	15.0
20.0	19.4
5.8	15.0
19.0	19.4
5.4	15.0
19.7	36.7
20.0	22.4
28.0	36.7
16.0	22.4
22.0	36.7
21.0	22.4
23.9	36.7
14.4	22.4
23.0	36.7
26.7	36.7
14.0	19.0
24.0	19.0
40.0	41.0

CONTAGEM DE CD4 EM INDIVÍDUOS NORMAIS

VALOR ABSOLUTO: 400- 1400 cels/ ul

VALOR PERCENTUAL: 30 - 60 %

TABELA 7- MARCADORES DE SUPERFÍCIE DE LINFÓCITOS T SUPRESSORES (CD 8), DE INDIVÍDUOS EXPOSTOS AO MERCÚRIO E INDIVÍDUOS CONTROLE (n= 33)

INDIVÍDUOS (CD 8) %	CONTROLE (CD 8) %
16.6	10.2
9.8	10.2
10.0	10.2
17.0	10.2
9.0	10.2
13.0	10.2
25.0	16.0
13.2	16.0
15.0	16.0
12.0	16.0
15.0	16.3
19.2	16.3
13.3	16.3
15.0	16.3
28.0	23.3
17.5	23.3
20.6	23.3
19.5	23.3
22.0	23.3
25.0	23.3
16.0	13.0
15.0	13.0
15.0	15.0
13.0	15.0
10.0	15.0
3.3	6.4
3.0	6.4
4.8	6.4
10.8	6.4
16.4	6.4
21.0	21.7
26.0	21.7
20.0	21.7

CONTAGEM DE CD8 EM INDIVÍDUOS NORMAIS

VALOR ABSOLUTO: 200 - 800 cels/ ul

VALOR PERCENTUAL: 15 - 45 %

TABELA 8- PROPORÇÃO DE MARCADORES DE SUPERFÍCIE DE LINFÓCITOS T, AUXILIAR E SUPRESSOR (CD4/ CD8), EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS AO MERCÚRIO (n= 33) E INDIVÍDUOS CONTROLE (n= 33)

INDIVÍDUOS (CD4/ CD8)	CONTROLE (CD4/ CD8)
14.7/ 16.6	20.0/ 10.2
13.3/ 9.8	20.0/ 10.2
8.3/ 10.0	20.0/ 10.2
15.0/ 17.0	20.0/ 10.2
14.0/ 9.0	20.0/ 10.2
16.0/ 13.0	20.0/ 10.2
21.5/ 25.0	19.4/ 16.0
11.2/ 13.2	19.4/ 16.0
20.0/ 15.0	19.4/ 16.0
19.7/ 28.0	36.7/ 23.3
40.0/ 21.0	41.0/ 21.7
20.0/ 15.0	22.4/ 16.3
21.0/ 13.3	22.4/ 16.3
14.4/ 15.0	22.4/ 16.3
14.0/ 16.0	19.0/ 13.0
19.0/ 12.0	19.4/ 16.0
24.0/ 15.0	19.0/ 13.0
26.0/ 15.0	24.0/ 15.0
27.0/ 13.0	24.0/ 15.0
15.0/ 10.0	24.0/ 15.0
28.0/ 17.5	36.7/ 23.3
22.0/ 20.0	36.7/ 23.3
23.9/ 19.5	36.7/ 23.3
23.0/ 22.0	36.7/ 23.3
26.7/ 25.0	36.7/ 23.3
5.4/ 3.3	15.0/ 6.4
1.5/ 3.0	15.0/ 6.4
3.4/ 4.8	15.0/ 6.4
5.8/ 16.4	15.0/ 6.4
3.5/ 10.8	15.0/ 6.4
20.9/ 26.0	41.0/ 21.7
29.0/ 23.4	41.0/ 21.7
16.0/ 19.2	22.4/ 16.3

PROPORÇÃO DE CD4/ CD8 EM INDIVÍDUOS NORMAIS: 2.0 ± 1.0

TABELA 9- NÍVEIS SÉRICOS DE IMUNOGLOBULINA E (IgE), EM UI/ ml, EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS AO MERCÚRIO (n= 36)

INDIVÍDUOS	INDIVÍDUOS
2000	315
439	495
2000	63.65
2000	71.22
67.43	580
495	12.32
38.32	13.25
93.48	7.35
492	1840
210	345
172.79	381
78.85	22.04
811	151.19
1259	99.68
63.29	25.76
118.63	9.01
2000	120.17
1026	199.49

VALORES DE REFERÊNCIA PARA IgE: até 200 UI/ ml

TABELA 10- DOSAGEM SÉRICA DE IMUNOGLOBULINA A, IDADE E TEMPO DE EXPOSIÇÃO EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS AO MERCÚRIO (n= 44)

INDIVÍDUOS	IDADE (anos)	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (meses)	MERCÚRIO URINÁRIO (ug Hg/g creat.)	IgA (g / dl)
J.A.S	23	2	12.8	455
L.H.M.	33	8	45.8	410
N.S.F.	34	10	44.5	515
P.C.	35	7	51.7	405
J.M.L.M	41	5	18.5	593
E.P.S.	20	2	62.5	175
J.C.S.	38	3	18.6	405
A.N.A.	23	9	13.7	470
L.F.B.	18	2	20.7	210
E.A.R	23	1	5.7	340
C.B.C.	53	4	3.3	400
E.B.S.	28	1	44.6	210
C.M.X.	21	1	11.6	550
A.A.S.	33	24	44.5	380
F.R.S.	28	30	21.4	700
M.L.B.	31	36	26.2	690
P.V.B.	39	19	67.6	890
A.L.V.	31	58	42.6	265
J.T.O.	28	4	13.0	335
G.F.S.	21	29	67.9	170
W.J.O	25	13	31.3	185
S.L.M.	39	19	18.6	510
S.P.A.	20	14	31.3	380
A.S.C.	31	8	27.8	90
J.R.C.	23	7	49.4	255
G.A.V.	35	5	4.5	324
C.S.	44	43	5.3	470
J.A.C.B.	29	8	26.3	420
N.D.	25	13	41.3	290
M.A.Z.	37	24	38.1	390
J.S.S.	41	5	5.2	233
E.A.C.	19	4	7.7	180
H.V.S	20	4	3.4	260
J.N.B.S.	23	2	1.0	290
J.S.S.	23	4	11.8	288

CONTINUAÇÃO DA TABELA 10

INDIVÍDUOS	IDADE (anos)	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (meses)	MERCÚRIO URINÁRIO (ug Hg/g creat.)	IgA (g/ dl)
F.X.C.	24	5	28.9	240
C.S.	23	5	16.5	305
J.R.A.M.	21	1	17.2	340
V.P.P.	31	2	13.0	245
M.R.O.	20	2	46.0	259
E.R.C.	38	5	1.4	290
C.R.	27	1	5.7	246
L.C.M.	32	5	1.4	230
A.F.V.	29	3	12.0	360

TABELA 11- DOSAGEM SÉRICA DE IMUNOGLOBULINA A, EM DUAS AVALIAÇÕES EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS AO MERCÚRIO (n= 16)

INDIVÍDUOS	INTERVALO ENTRE AVALIAÇÕES (meses)	IgA (g / dl) 1ª Avaliação	IgA (g / dl) 2ª Avaliação
A.N.A.	8	470	590
M.L.B.	11	690	520
P.V.B.	12	890	290
A.L.V.	12	265	110
J.T.O.	3	335	352
G.F.S.	4	170	230
W.J.O	8	185	312
S.L.M.	7	510	310
S.P.A.	12	380	260
A.S.C.	5	90	141
J.R.C.	4	255	240
G.A.V.	4	324	300
C.S.	10	470	485
J.A.C.B.	7	420	300
N.D.	7	290	220
M.A.Z.	11	390	263

TABELA 12- DOSAGEM SÉRICA DE IMUNOGLOBULINA G, IDADE E TEMPO DE EXPOSIÇÃO EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS AO MERCÚRIO (n= 44)

INDIVÍDUOS	IDADE (anos)	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (meses)	MERCÚRIO URINÁRIO (ug Hg/g creat.)	IgG (g / dl)
J.A.S	23	2	12.8	1380
L.H.M.	33	8	45.8	1125
N.S.F.	34	10	44.5	1700
P.C.	35	7	51.7	1500
J.M.L.M	41	5	18.5	1900
E.P.S.	20	2	62.5	1960
J.C.S.	38	3	18.6	1500
A.N.A.	23	9	13.7	1625
L.F.B.	18	2	20.7	1900
E.A.R	23	1	5.7	2550
C.B.C.	53	4	3.3	1850
E.B.S.	28	1	44.6	1700
C.M.X.	21	1	11.6	1700
A.A.S.	33	24	44.5	1850
F.R.S.	28	30	21.4	2530
M.L.B.	31	36	26.2	2270
P.V.B.	39	19	67.6	1970
A.L.V.	31	58	42.6	1970
J.T.O.	28	4	13.0	1560
G.F.S.	21	29	67.9	1620
W.J.O	25	13	31.3	1960
S.L.M.	39	19	18.6	1590
S.P.A.	20	14	31.3	1825
A.S.C.	31	8	27.8	2120
J.R.C.	23	7	49.4	1560
G.A.V.	35	5	4.5	2330
C.S.	44	43	5.3	1500
J.A.C.B.	29	8	26.3	1175
N.D.	25	13	41.3	1125
M.A.Z.	37	24	38.1	1700
J.S.S.	41	5	5.2	2200
E.A.C.	19	4	7.7	1450
H.V.S	20	4	3.4	1450
J.N.B.S.	23	2	1.0	1450
J.S.S.	23	4	11.8	1620

CONTINUAÇÃO DA TABELA 12

INDIVÍDUOS	IDADE (anos)	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (meses)	MERCÚRIO URINÁRIO (ug Hg/g creat.)	IgG (g/dl)
F.X.C.	24	5	28.9	1990
C.S.	23	5	16.5	1990
J.R.A.M.	21	1	17.2	1990
V.P.P.	31	2	13.0	1150
M.R.O.	20	2	46.0	1990
E.R.C.	38	5	1.4	2050
C.R.	27	1	5.7	1700
L.C.M.	32	5	1.4	1400
A.F.V.	29	3	12.0	1850

TABELA 13- DOSAGEM SÉRICA DE IMUNOGLOBULINA G, EM DUAS AVALIAÇÕES, EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS AO MERCÚRIO (n= 16)

INDIVÍDUOS	INTERVALO ENTRE AVALIAÇÕES (meses)	IgG(g / dl) 1ª Avaliação	IgG(g / dl) 2ª Avaliação
A.N.A.	8	1625	1720
M.L.B.	11	2270	1970
P.V.B.	12	1970	1450
A.L.V.	12	1970	1220
J.T.O.	3	1560	1740
G.F.S.	4	1620	1960
W.J.O	8	1960	1825
S.L.M.	7	1590	1450
S.P.A.	12	1825	1720
A.S.C.	5	2120	1440
J.R.C.	4	1560	1370
G.A.V.	4	2030	1900
C.S.	10	1500	1375
J.A.C.B.	7	1175	1200
N.D.	7	1125	1200
M.A.Z.	11	1700	1700

TABELA 14- DOSAGEM SÉRICA DE IMUNOGLOBULINA M, IDADE E TEMPO DE EXPOSIÇÃO EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS AO MERCÚRIO (n= 44)

INDIVÍDUOS	IDADE (anos)	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (meses)	MERCÚRIO URINÁRIO (ug Hg/g creat.)	IgM (g/ dl)
J.A.S	23	2	12.8	257
L.H.M.	33	8	45.8	273
N.S.F.	34	10	44.5	220
P.C.	35	7	51.7	90
J.M.L.M	41	5	18.5	250
E.P.S.	20	2	62.5	275
J.C.S.	38	3	18.6	200
A.N.A.	23	9	13.7	220
L.F.B.	18	2	20.7	385
E.A.R	23	1	5.7	350
C.B.C.	53	4	3.3	315
E.B.S.	28	1	44.6	350
C.M.X.	21	1	11.6	390
A.A.S.	33	24	44.5	68
F.R.S.	28	30	21.4	470
M.L.B.	31	36	26.2	352
P.V.B.	39	19	67.6	250
A.L.V.	31	58	42.6	400
J.T.O.	28	4	13.0	390
G.F.S.	21	29	67.9	195
W.J.O	25	13	31.3	200
S.L.M.	39	19	18.6	273
S.P.A.	20	14	31.3	400
A.S.C.	31	8	27.8	208
J.R.C.	23	7	49.4	335
G.A.V.	35	5	4.5	233
C.S.	44	43	5.3	270
J.A.C.B.	29	8	26.3	450
N.D.	25	13	41.3	179
M.A.Z.	37	24	38.1	273
J.S.S.	41	5	5.2	135
E.A.C.	19	4	7.7	350
H.V.S	20	4	3.4	300
J.N.B.S.	23	2	1.0	190
J.S.S.	23	4	11.8	312

CONTINUAÇÃO DA TABELA 14

INDIVÍDUOS	IDADE (anos)	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (meses)	MERCÚRIO URINÁRIO (ug Hg/g creat.)	IgM (g / dl)
F.X.C.	24	5	28.9	237
C.S.	23	5	16.5	270
J.R.A.M.	21	1	17.2	237
V.P.P.	31	2	13.0	80
M.R.O.	20	2	46.0	200
E.R.C.	38	5	1.4	170
C.R.	27	1	5.7	260
L.C.M.	32	5	1.4	212
A.F.V.	29	3	12.0	200

TABELA 15- DOSAGEM SÉRICA DE IMUNOGLOBULINA M, EM DUAS AVALIAÇÕES EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS AO MERCÚRIO (n= 16)

INDIVÍDUOS	INTERVALO ENTRE AVALIAÇÕES (meses)	IgM (g / dl) 1ª Avaliação	IgM (g / dl) 2ª Avaliação
A.N.A.	8	165	220
M.L.B.	11	352	308
P.V.B.	12	250	140
A.L.V.	12	400	255
J.T.O.	3	315	390
G.F.S.	4	195	165
W.J.O	8	200	195
S.L.M.	7	273	190
S.P.A.	12	400	275
A.S.C.	5	180	208
J.R.C.	4	335	286
G.A.V.	4	233	225
C.S.	10	108	270
J.A.C.B.	7	450	414
N.D.	7	163	175
M.A.Z.	11	273	220

DISCUSSÃO

1-Considerações gerais

A ativação do sistema linfóide por um determinado antígeno resulta em dois tipos de resposta imune: a resposta imune humoral, mediada por anticorpos, e a resposta imune celular, mediada por células.

Toda atividade imune depende de células linfóides sensíveis ao antígeno, que se originam de células pluripotenciais provenientes da medula óssea. Estas células dão origem aos dois tipos de linfócitos, os timo-dependentes ou linfócitos T, responsáveis pela resposta imune celular, e os linfócitos B que são responsáveis pela imunidade humoral. A resposta dos linfócitos B a um grande número de antígenos requer uma cooperação entre células T e B.

À medida que as células pluripotenciais se diferenciam em linfócitos, aparecem na superfície destes, receptores para o antígeno que os comprometem a reagir com um determinante antigênico.

Quando o linfócito é do tipo T, o reconhecimento do antígeno é feito através da presença de estruturas proteicas presentes na membrana celular, conhecidas como receptores de linfócitos T, e do reconhecimento de glicoproteínas codificadas por um conjunto de genes pertencentes ao Complexo de Histocompatibilidade Principal (CHP), através de moléculas da classe I ou II deste complexo, localizadas em outra célula. Os linfócitos T expressam na sua superfície marcadores diferentes usados para distinguir sub-populações de células, muitas destas identificadas com o uso de anticorpos monoclonais. O sistema CD (Cluster Designation) foi criado para identificar as moléculas da superfície dos linfócitos. A imunidade mantida por linfócitos T, ocorre pela ação direta destas células sobre a célula alvo ou através da ação de seus produtos liberados, as linfocinas. Os linfócitos T podem ser divididos funcionalmente em 3 sub-populações: linfócitos T auxiliares T₄ ou CD₄, linfócitos T supressores T₈ ou CD₈, e os linfócitos T citotóxicos. As células CD₄ reconhecem antígenos quando associados

ao CHP da classe II, enquanto as células CD8 reconhecem antígenos associados a moléculas da classe I.

Os linfócitos B de seres humanos se caracterizam por imunoglobulinas de superfície celular prontamente detectáveis. Estas células representam cerca de 5-15% dos linfócitos circulantes e são classicamente definidas pela produção endógena de imunoglobulinas. Estas moléculas estão inseridas na superfície da membrana, onde agem como receptores de antígeno. A principal classe de imunoglobulina no linfócito B circulante é a IgM, mas as imunoglobulinas IgD, IgE, IgA e IgG também estão presentes na membrana desta célula. Os linfócitos B ainda possuem receptor para os complexos antígeno-anticorpo ou para agregados, o qual é específico para uma parte da porção Fc da molécula da imunoglobulina e é conhecido como receptor para Fc.

A maioria destas células apresentam antígenos do CHP de classe II que são importantes na cooperação com células T. Estes marcadores de complemento para C3b (RC1, CD35) e C3d (RC2, CD21) são comumente encontrados nas células B e são associados com ativação e talvez com a localização destas células.

2-EFEITOS DO MERCÚRIO SOBRE A RESPOSTA IMUNE HUMORAL

2a- Imunoglobulinas

As imunoglobulinas ou anticorpos, são um grupo de glicoproteínas presentes no soro e líquidos tissulares. As 5 classes diferem entre si no tamanho, carga, composição de aminoácidos e conteúdo de carboidratos. Cada molécula de Ig é bifuncional, isto é, uma região age na ligação com o antígeno, enquanto outra promove a ligação com os tecidos, inclusive a várias células do sistema imune, células fagocitárias e ao primeiro componente da via clássica do complemento.

A IgG é a principal imunoglobulina no soro humano normal, abrangendo 70-75% do total de imunoglobulina. A classe IgG é distribuída igualmente entre os espaços extra-vasculares, e é o anticorpo principal nas respostas imunes secundárias.

A IgM perfaz aproximadamente 10% no conteúdo sérico, esta é encontrada nos espaços intra-vasculares, sendo a classe dominante nos anticorpos precoces.

A IgA representa 10-15% das imunoglobulinas, e a IgD cerca de 1%. Esta última está presente em grande quantidade na membrana de linfócitos B circulantes.

A IgE é normalmente encontrada no soro humano em baixas concentrações, e se fixa aos tecidos pela porção Fc, para posteriormente em contato com o alérgeno, desencadear a liberação de substâncias farmacologicamente ativas, responsáveis pelos fenômenos anafiláticos.

A IgE combina-se fortemente com os mastócitos, e o contato com o antígeno leva ao recrutamento local de agentes antimicrobianos através da degranulação de mastócitos, e da liberação de mediadores inflamatórios.

Nosso estudo teve início com a dosagem de imunoglobulinas séricas nos indivíduos expostos ao mercúrio. Um aumento significativo nos níveis de IgA, IgG e IgM foi encontrado, quando comparados com um grupo controle.

Achados semelhantes foram descritos por Bencko et al; 1990, no entanto estes autores não correlacionaram estes achados com grau e tempo de exposição. Em nossos

resultados o aumento na concentração de imunoglobulinas foi observado, mesmo em trabalhadores com níveis de mercúrio urinário dentro dos limites de tolerância biológica, ou seja aqueles níveis de exposição considerados seguros no campo profissional. Dos 44 indivíduos estudados, 40 apresentavam concentração de mercúrio urinário abaixo do limite aceitável no campo profissional que é de 50ug Hg/ g creatinina (Roels et al, 1985).

Seis meses após a primeira avaliação, uma segunda foi realizada em 16 indivíduos, sendo que a concentração de imunoglobulinas nestes trabalhadores, se manteve inalterada neste período. Por outro lado em relação à avaliação anterior, houve uma redução significativa na concentração de mercúrio urinário, uma vez que as condições de higiene no local de trabalho tiveram melhorias durante este período. Os níveis séricos de IgA, IgG e IgM não apresentaram correlação com o tempo de exposição e nem com a concentração de mercúrio urinário.

Considerando que um aumento nos níveis de imunoglobulinas pode ser associado a vários fatores, e dentre estes a uma possível disfunção hepática devido ao consumo de álcool ou abuso de drogas, realizamos testes para verificar injúria hepática e síntese proteica, e nenhuma alteração foi encontrada nestes parâmetros. Isto nos possibilitou descartar a função hepática como causadora do aumento destes anticorpos.

A razão do aumento policlonal das imunoglobulinas séricas destes indivíduos, não foi determinado. No período em que este estudo foi realizado não houve evidência clínica de infecção em nenhum trabalhador.

Estudos sugerem que o mercúrio pode modificar a homeostase do sistema imune por ação direta nos linfócitos (Kowolenko et al, 1992) e esta ação direta nestas células pode ser uma hipótese para este aumento policlonal nas imunoglobulinas, uma vez que a ligação do Hg com os linfócitos está baseada na habilidade que tem os metais de reagirem com grupos tióis presentes na superfície das células, ocorrendo com isto um desequilíbrio do sistema imune (Passow et al, 1961; Vallee & Ulmer, 1972).

A posição dos tióis nos linfócitos parece ser importante na ativação celular.

Trabalhos experimentais mostram que variações na posição destes grupos resultaria num decréscimo da ativação celular por mitógenos (Noelle & Lawrence, 1981).

O aumento na formação de anticorpos por ação de metais pesados, é bem documentado experimentalmente (Koller et al, 1980). Ativação das células B pode ser induzida por agentes T-dependentes ou T-independentes (Bonna et al,1979). Tendo em vista que células T supressoras possuem maior número de grupamentos tióis se comparadas com as células T auxiliares (Kowolenko et al, 1992), um desequilíbrio na proporção T auxiliar/ T supressor , poderia explicar o aumento na síntese de imunoglobulinas. Neste sentido, uma estimulação funcional não específica de células B devido à uma intensificação na atividade de células T auxiliares foi sugerida por Druet et al, 1982.

Há trabalhos demonstrando que algumas drogas são responsáveis por desordens autoimunes no homem, agindo primariamente em células imunocompetentes e resultando em ativação policlonal e produção de auto-anticorpos (Holland & Spivack 1992).

A partir destes e de outros dados partimos para um estudo sobre linfócitos T e pesquisa de auto-anticorpos nestes indivíduos, que será descrito posteriormente.

A verificação nos níveis de IgE no soro destes trabalhadores, foi realizada em separado, por necessitar de um método mais sensível para sua detecção. Nossos resultados demonstraram um aumento significativo desta imunoglobulina. Este aumento foi evidente nos primeiros meses de trabalho destes indivíduos, o que foi demonstrado pela correlação negativa moderada de $r = - 0.4280$, entre os níveis de IgE e o tempo de exposição. Estes resultados confirmam a função da IgE, como uma imunoglobulina de hipersensibilidade imediata.

Estudos *In Vitro* demonstram que o mercúrio potencializa seletivamente a produção de células secretoras de IgE. Este fato pode ser explicado por vários

caminhos: através de uma inibição de células T supressoras específicas para IgE, através de estímulo nas células monocitárias, agindo sobre linfócitos B produtores de IgE ou estimulando células T auxiliares específicas para IgE (Kimata et al, 1983).

Prouvost et al, 1991 demonstraram em uma linhagem específica de ratos, que o HgCl₂ potencializa não somente a resposta de IgE mas também uma resposta de IgE anti-ovalbumina em animais imunizados com a proteína.

Aumentos de IgE e IgG1 e outras alterações imunológicas, foram também observadas em animais expostos a doses sub-tóxicas de HgCl₂. Neste trabalho os autores indicaram o recrutamento de células T auxiliares e aumento nos níveis de IL-4 como possíveis mecanismos envolvidos (Ochel et al, 1991). O mecanismo pelo qual o HgCl₂ ativa células T não é bem esclarecido assim como a cooperação entre linfócitos T e B.

2b- Linfócitos B

Estudos realizados em células isoladas indicam que o Hg pode interferir na atividade de células normais através de vários caminhos: alteração na permeabilidade da membrana, um decréscimo no potencial através da membrana plasmática, uma redução da glicose e alterações nas reações de redox nos tióis (Venugopal et al, 1978 & Kramer et al, 1986).

Mais recentemente estudos apontam para um efeito do mercúrio na função de leucócitos, e indicam que baixas doses de mercúrio podem inibir o sistema imune em geral (Nordling 1983 & Iiback 1991).

Em relação aos resultados sobre a quantificação de linfócitos B, observamos uma "redução" significativa no número destas células nos indivíduos expostos ao Hg, quando comparados com o grupo controle. Outros autores através de trabalhos *In Vitro* utilizando doses sub-tóxicas de HgCl₂ e MeHgCl sobre células B humanas (Shenker et al, 1993) observaram uma inibição no crescimento e diferenciação de células B e uma

redução significativa na viabilidade das mesmas. Neste mesmo estudo as células B foram expostas ao Hg e após 24h, através de microscopia eletrônica, apresentaram consideráveis observações morfológicas, como: alterações nucleares caracterizadas por hipercromaticidade, fragmentação celular, condensação do nucleoplasma, destruição de organelas citoplasmáticas com perdas na integridade da membrana, características estas que indicam uma interferência do mercúrio no processo de morte celular fisiológica (apoptose). Esta interferência no processo de apoptose é provavelmente decorrente do efeito do Hg em aumentar os níveis de cálcio intracelular, contribuindo assim para a morte dos genes e ou estimulação das enzimas cálcio dependentes indutoras de morte celular.

Portanto podemos sugerir que a redução no número de linfócitos B, em indivíduos expostos ao mercúrio pode estar relacionada a uma ação tóxica direta deste metal sobre as células.

Por outro lado, o aspecto funcional das células B remanescentes estava normal, no que se refere à síntese de imunoglobulinas, tendo em vista os resultados apresentados anteriormente.

3 - EFEITOS DO MERCÚRIO SOBRE A IMUNIDADE CELULAR

3a- Sub-populações linfocitárias CD₄ e CD₈

Um efeito direto da exposição à tóxicos no sistema imune, sugere alterações na proporção de sub-populações linfocitárias, alterações morfológicas do tecido imune, decréscimo no número total destas células ou alteração da função imune. A interação de agentes tóxicos com constituintes celulares que conduz a uma imunomodulação é influenciada por fatores genéticos de cada indivíduo.

O efeito dos metais sobre as moléculas da classe II do CHP não é bem conhecido, no entanto é possível que a interação destas moléculas com ácidos graxos presentes na membrana celular dos linfócitos, permitiria o reconhecimento do antígeno. Os metais poderiam interferir nesta interação, prejudicando a apresentação do antígeno aos linfócitos.

Estudos realizados por Shenker et al, 1992 utilizando o HgCl₂ e o MeHgCl indicaram que o mercúrio age sobre linfócitos T por meio da função monocitária e também da expressão de interleucina IL-2R, num estágio tardio. Estes dados confirmam que compostos mercuriais alquilados são mais tóxicos que íons mercúrio. A imunotoxicidade destas duas espécies, refletem diferenças na reatividade química e solubilidade dos mesmos. Então uma alta concentração de íons mercúrio ficaria retida na membrana celular, onde inativaria sistemas enzimáticos, especialmente os que exibem grupos tióis livres. Em contraste o MeHgCl passaria facilmente através das camadas lipídicas e poderia influenciar os sistemas enzimáticos do núcleo, retículo endoplasmático e citoplasma.

A inversão na proporção CD₄/ CD₈, observada em nosso trabalho, nos indivíduos expostos, poderia explicar pelo menos em parte, o aumento policlonal nas imunoglobulinas. O maior número de grupos tióis nas células T supressoras como já fora descrito anteriormente, poderia ser a causa da maior susceptibilidade destas células ao ataque do Hg, do que em células T auxiliares. Este desequilíbrio nas sub-populações

linfocitárias poderia resultar ou não, em uma ativação celular policlonal com aumento na síntese de imunoglobulinas (Kowolenko et al, 1992).

Alterações em linfócitos CD₄ e CD₈ podem também ser decorrentes da deficiência de enzimas, a qual foi observada em trabalhadores expostos ao mercúrio, descritos por Moszczynski et al, 1991. Resultados obtidos neste estudo sugerem que esta deficiência poderia justificar a ruptura da proporção entre as sub-populações linfocitárias, em particular entre linfócitos T auxiliares e T supressores.

3b- Transformação blástica de linfócitos frente ao mitógeno fitohemaglutinina

A blastogênese de linfócitos pode ocorrer endogenamente, ou através de substâncias exógenas. Entre estas substâncias destacam-se as lectinas e certos lipopolissacárides bacterianos. As lectinas são proteínas que podem ser extraídas principalmente de sementes e raízes, e agem como mitógenos. A fitohemaglutinina (PHA) é extraída de uma leguminosa e tem especificidade para a N-acetil-D galactosamina. As lectinas são capazes de interagir com células através de um sítio de ligação a um receptor celular, o sítio de ligação é específico para o carboidrato da célula. Em função desta reação as lectinas podem promover aglutinação celular e ativação de linfócitos.

Linfócitos estimulados por estas substâncias apresentam várias características funcionais semelhantes à dos linfócitos estimulados por imunógenos, no entanto as lectinas ativam vários clones de células desde que carreguem o carboidrato em questão.

O estímulo de células T e B resulta na produção de citocinas, as quais em conjunto impulsionam as células através do ciclo celular (proliferação) e, fundamentalmente para a função efetora (maturação).

A ativação dos linfócitos por mitógenos resulta em alterações intra-celulares e subsequente desenvolvimento de um linfoblasto.

Acredita-se que a estimulação mitogênica dos linfócitos *In Vitro* mimetize uma série de eventos que ocorrem *In Vivo* após a estimulação por antígenos específicos.

Estudos *In Vitro* utilizando o $HgCl_2$ como mitógeno em cultura de linfócitos de sangue periférico humano, demonstraram que o mercúrio causa uma transformação blástica não específica (Caron et al, 1970).

Trabalhos experimentais sobre o efeito dos metais pesados *In Vitro* e *In Vivo* sobre a incorporação de timidina por linfócitos, sugerem que metais podem afetar estas células por ação direta na síntese de DNA, o que resultaria em decréscimo da resposta mitogênica (Gaworski et al, 1978).

Em outros trabalhos sugeriu-se que o efeito do mercúrio, estimularia a síntese de DNA de timócitos e linfócitos de sangue periférico (Nordling & Henze 1984), esta ação poderia ocorrer devido a ligação do metal com constituintes presentes no soro.

Ao iniciarmos este estudo investigamos a possível presença de um componente no soro destes trabalhadores que estimulasse ou inibisse a proliferação de linfócitos T normais em presença do mitógeno fitohemaglutinina. No entanto não foi observada qualquer alteração decorrente do efeito do soro, sobre células normais.

Uma tendência à correlação nos níveis de mercúrio urinário e contagem de linfócitos em cpm (contagem por minuto), foi observada $r= 0.4402$.

4 - PESQUISA DE AUTO-ANTICORPOS

Vários trabalhos indicam que o Hg age em parte, modificando a cooperação entre as células T e B, como consequência um desequilíbrio imune ocorreria e auto-anticorpos seriam produzidos, alguns dos quais seriam patogênicos. Isto poderia resultar da interação do mercúrio com a membrana dos linfócitos.

Muitos trabalhos experimentais mostram que doses sub-tóxicas de HgCl₂ desenvolvem a formação de auto-anticorpos anti-núcleo (Mirtcheva et al, 1989). Outros estudos demonstram o aparecimento destes auto-anticorpos em algumas linhagens de animais (Hultman & Enestrom, 1988). Neste mesmo estudo foram pesquisados anti-corpos anti-DNA usando como antígeno a Crithidia lucillae, mas este ensaio foi negativo.

Em nossas análises, não houve positividade para estes auto-anticorpos, no soro dos trabalhadores expostos, indicando que a concentração a que estes indivíduos são expostos não é suficiente para desencadear este tipo de reação, com os auto-anticorpos estudados.

CONCLUSÕES

Este estudo sobre a resposta imunológica humoral e celular de indivíduos expostos ao mercúrio, permitiu-nos chegar às seguintes conclusões:

1- Ao dosarmos a concentração sérica de imunoglobulinas IgA, IgG e IgM encontramos um aumento significativo das mesmas, assim como um aumento de IgE. Esta última quando correlacionada com o tempo de exposição apresentou uma correlação negativa, seus picos maiores foram em indivíduos com menor tempo de exposição, o que demonstra ser uma imunoglobulina de hipersensibilidade imediata.

2- Embora o número de células B estivesse reduzido, com um aumento de imunoglobulinas, uma provável hipótese para estes achados seria a da ação tóxica direta do mercúrio sobre as células B na fase de crescimento e diferenciação.

3- As sub-populações linfocitárias apresentaram uma ruptura na proporção T auxiliar/supressor indicando que o Hg possui maior afinidade com células T supressoras por estas possuírem mais grupos tióis na sua superfície.

4- Para que este estudo englobasse uma avaliação maior da resposta imunológica, verificamos se o soro dos indivíduos expostos continha algum fator inibidor ou estimulador na resposta ao mitógeno PHA sobre linfócitos normais. No entanto nenhuma alteração foi encontrada nesta investigação mostrando que a concentração de Hg no soro dos indivíduos expostos, não é suficiente para modificar a proliferação de células normais.

5- Sabendo que um desequilíbrio no sistema imunológico pode levar a uma produção de auto-anticorpos, pesquisamos a produção destes, no soro dos trabalhadores e as análises foram negativas para a presença de auto-anticorpos anti-núcleo e anti-DNA.

6- Trabalhadores expostos ao mercúrio possuem um comprometimento celular e humoral mesmo sendo assintomáticos e apresentando concentrações de mercúrio urinário, dentro dos limites aceitáveis no campo profissional. Importante salientar que os níveis de HgU foram determinados mensalmente durante o estudo, e que um levantamento foi realizado nos níveis de HgU apresentados nos seis meses anteriores ao início deste trabalho.

RESUMO

Neste estudo verificamos a resposta imune celular e humoral, em trabalhadores expostos ao mercúrio.

Estes indivíduos são assintomáticos ou oligossintomáticos, e possuem níveis de mercúrio urinário dentro dos limites aceitáveis no campo profissional que é de 50ug Hg/g creatinina.

Iniciamos este trabalho com a dosagem de imunoglobulinas séricas IgA, IgG, IgM e IgE no soro dos trabalhadores expostos ao mercúrio. Um aumento policlonal destas imunoglobulinas, foi observado quando comparado com a população não exposta. Por outro lado uma redução no número de linfócitos B foi observada nestes indivíduos, sugerindo uma toxicidade do mercúrio nos estágios de crescimento e diferenciação das células B, por conseguinte os linfócitos B maduros estariam super estimulados na sua função de produzir imunoglobulinas.

A proporção normal de células CD₄/ CD₈ é em torno de 2.0 ± 1.0 . A quantificação destas sub-populações linfocitárias no grupo exposto demonstrou que a proporção de CD₄/ CD₈ estava abaixo de 1.0, em 25 trabalhadores.

A incubação de linfócitos normais com o soro do indivíduo exposto não produziu efeito significativo na resposta linfoblástica à fitohemaglutinina.

Auto-anticorpos anti-DNA e anti-núcleo, não foram encontrados no soro destes indivíduos em estudo.

Efeitos adversos que ocorrem com níveis relativamente baixos de exposição ao mercúrio, são de particular interesse em relação a uma ação preventiva, já que estes efeitos são considerados como um instrumento de informação quando se discute por exemplo, limites de exposição.

Nossos resultados reforçam a importância da eliminação do mercúrio em locais de trabalho. Este estudo indicou que o sistema imune pode ser estabelecido como um indicador funcional sensível a metais pesados e outros contaminantes químicos presentes no meio ambiente.

SUMMARY

In this work the cellular and humoral immune response in mercury exposed workers has been studied. These individuals were asymptomatic and the mercury urinary concentration were below the currently accepted limit of 50ug Hg/ g creatinine.

We began our investigations by determining the levels of immunoglobulins (IgA, IgG, IgM and IgE) in the serum of exposed population. A polyclonal increase of these immunoglobulins was observed when compared to the non-exposed population. On the other hand, a reduction in the numbers of B lymphocytes was observed in the exposed workers, thus suggesting the mercury may be toxic in the early stages of B cell growth and differentiation. However, mature B lymphocytes are overstimulated in their function of immunoglobulins production.

A normal range for CD4/ CD8 ratio is around 2.0 ± 1.0 . Quantitation of these lymphocytes sub-populations in the exposed group demonstrated that the CD₄ : CD₈ cell ratio was lower than 1.0 in 25 individuals.

Incubation of lymphocytes with the serum from the exposed workers produced no significant effect on the lymphoblastic response to phytohaemagglutinin.

Auto antibodies anti-DNA and anti-nuclear were not found in the serum of the workers studied.

Adverse effects that may occur at relatively low levels of exposed to mercury are of particular interest in relation to preventive action, since these effects can be regarded as a critical piece of information when discussing, for example, exposure limits. Our results strengthen further the argument for the elimination of mercury hazard in working places. Furthermore, our studies also indicated that the immune system may provide a sensitive functional indicator of heavy metal and other chemical contaminants present in the environment.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, A. P.; LEIGH, S.; COHN, J. & KAPPAS, A. "Lead and methyl mercury: Effects of acute exposition on cytochrome P-450 and the mixed function oxidase system in the liver". J. Exp. med., 135: 1406-1409, 1972.

BASELT, R. C. "Biological monitoring methods for industrial chemicals". 2d. PSG, Massachussets, 198- 202, 1988.

BASELT, R. C. & CRAVEY, R. H. "Disposition of toxic drugs and chemicals in man". Third edition. Year book medical publishers, Inc. Chicago, 1990.

BENCKO, V.; WAGNER, V.; WAGNEROVA, M.; ONDREJKA, V. "Immunological profiles in workers occupationally exposed to inorganic mercury". J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol., 34: 9-15, 1990.

BERNAUDIN, J. F.; DRUET, E. & MASSE, R. "Inhalation or ingestion of organic or inorganic mercurials produces autoimmune disease in rat". Clin. Immunol. Immunopathol., 20: 129-135, 1981.

BONA, C., BRODER, S., DIMITRIU, A. & WALDAMANN. "Polyclonal activation of human B lymphocytes by Nocardia water soluble mitogen. Immunol. Rev., 45: 69-92, 1979.

CALICH, V. G. L. & VAZ, C. A. C. "Imunologia Básica". 1ª edição. Ed. Artes Médicas, São Paulo- SP, 1989.

CARON, G. A.; POUTALA, S. & PROVOST, T. T. "Lymphocyte transformation induced by inorganic and organic mercury". Int. Arch. Allergy, 37: 76-87, 1970.

CHERIAN, M. G. & GOYER, R. A. "Metallothioneins and their role in the metabolism and toxicity of metals". Life Sciences, 23: 1-10, 1978.

CONTRINO, J.; MARUCHA, P.; RIBAUDO, R.; FERENICE, R.; BIGAZZI, P. E. & KREUTZER, L.; "Effects of mercury on human polymorphonuclear leukocyte function in vitro". Am. J. Pathol., 132: 110-118, 1988.

DRUET, P.; HIRSCH, F.; SAPIN, C.; DRUET, E. & BELLON, B. "Immune dysregulation and auto-immunity induced by toxic agents". Transplantation Proceedings, 14: 482-484, 1982.

ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA. L- mercury world Health Organization Geneva, 1976.

GAWORSKI, C. L. & SHARMA, R. P. "The effects of heavy metals on [^3H] thymidine uptake in lymphocytes". Toxicology and Applied Pharmacology, 46: 305-313, 1978.

HIRSH, F.; COUDERC, J.; SAPIN, C.; FOURNIE, G. & DRUET, P. "Polyclonal effect of HgCl_2 in the rat, its possible role is an experimental autoimmune disease". Eur. J. Immunol., 12: 620-625, 1982.

HOLLAND, K. & SPIVACK, J. L. "Drug -induced immunological disorders of the blood. In: Clinical Immunotoxicology. D. S. Newcombe, N. R. Rose & J. C. Bloom. Raven Press, Ltd., New York, 141-153, 1992.

HULTMAN, P. & ENESTROM, S. "The induction of immune complex deposits in mice by peroral and parenteral administration of mercuric chloride: strain dependent susceptibility". Clin. Exp. Immunol., 67: 283-292, 1987.

HULTMAN, P. & ENESTROM, S. "Mercury induced antinuclear antibodies in mice: characterization and correlation with renal immune complex deposits". Clin. Exp. Immunol., 71: 269-274, 1988.

HUNTER, D. "The disease occupations". 4a ed. The English University Press, London, 1970.

IILBACK, N. "Effects of methyl mercury on spleen and blood natural killer (NK) cell activity in the mouse". Toxicology, 67: 117, 1991.

KIMATA, H.; SHINOMIYA, K. & MIKAWA, H. "Selective enhancement of human IgE production *In Vitro* by synergy of pokeweed mitogen and mercury chloride". Clin. Exp. Immunol., 53: 183-191, 1983.

KOLLER, L. D. "Immunotoxicology of heavy metals". Int. J. Immunopharmacol., 2: 269-279, 1980.

KOWOLENKO, M.; McCABE, M. J. & LAWRENCE, D. A. "Metal-induced alterations of immunity". Clinical Immunotoxicology, D. S. Newcombe, N. R., 1992.

KRAMER, H. J.; GONICK, H. C. & LU, E. "*In vitro* inhibition of Na-K-ATPase by trace metals: relation to renal and cardiovascular damage". Nephron, 44: 329-336, 1986.

KURYAMA, R. & SAKAI, H. "Role of tubulin -SH groups in polymerization to microtubules". J. Biochem., 76: 651-654, 1974.

LANGWORTH, S.; ALMKVIST, O.; SODERMAN, E.; WIKSTROM, B. O. "Effects of occupational exposure to mercury vapour on the central nervous system". British Journal of Industrial Medicine, 49: 545-555, 1992.

LEONARD, A.; JACQUET, P. & LAUWERYS, R. R. "Mutagenicity and teratogenicity of mercury compounds". Mutation Research, 114: 1-18, 1983.

LEVESQUE, P. C. & ATCHISON, W. D. "Interaction of mitochondrial inhibitors with methylmercury on spontaneous quantal release of acetylcholine". Toxicol. Appl. Pharmacol., 87: 315-324, 1987.

MADSEN, K. M. & CHRISTENSEN, E. I. "Effects of mercury on lysosomal protein digestion in the kidney proximal tubule". Laboratory Investigation, 38: 165, 1978.

MAGOUR, S. "Studies on the inhibition of brain synaptosomal Na⁺/ K⁺ ATPase by mercury chloride and methyl mercury chloride. Arch. Toxicol. Suppl., 9: 393-396, 1986.

MANDEMA, E.; ARENDS, & VERNIER, G. "Mercury and kidney". Lancet, 1: 1266-1269, 1963.

MARGEL, S. & HIRSH, J. "Reduction of organic mercury in water, urine and blood by sodium borohydride for direct determination of total mercury". Clin. Chem., 30: 243-245, 1984.

MEYER, B. R.; FISCHBEIN, A.; ROSENMAN, K.; LERMAN, Y.; DRAYER, D. E.; REIDENBERG, M. M. "Increased urinary enzyme excretion in workers exposed to nephrotoxic chemicals". Am. J. Med., 76: 989-998, 1984.

MIRTCHEVA, J.; PFEIFFER, C.; De BRUIJN, J. A.; JACQUESMAT, F. & GLEICHMANN, E. "Immunological alterations inducible by mercury compounds. III. H-2A acts as an immune response and H-2E as an immune suppression locus for HgCl₂ induced antinucleolar autoantibodies. Eur. J. Immunol., 19: 2257-2261, 1989.

MOSZCZYNSKI, P.; MOSZCZYNSKI, P. Jr.; BARTUS, R.; BEM, S. Med. Pracy 42, 121-126, 1991.

MOTTIRONI, V. D.; BANKS, S. M. & LAURENCE, D. A. "Analyses of immunologic parameters in mercury workers. Fed. Proc., 46: 1318, 1986.

NIELSEN, J. B.; ANDERSEN, J. A.; SORENSEN & ANDERSEN, O. "Localization of gastrointestinal of mercuric chloride studied *in vivo*". Pharmacol. Toxicol., 70: 262-267, 1992.

NOELLE, R. J. & LAWRENCE, D. A. "Modulation of T-cell functions. II. Chemical basis for the involvement of cell surface thiol-reactive sites in control of T-cell proliferation. Cell. Immunol., 60: 453-469, 1981.

NORDLING, K. "Inhibition of lymphoid cell DNA synthesis by metal allergens at various concentrations". Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 70: 191, 1983.

NORDLING, K. & HENZE, A. "Stimulating effect of mercuric chloride and nickel sulfate on DNA syntheses of thymocytes and peripheral blood lymphocytes in children. Int. Archs. Allergy Appl. Immunol., 73: 162-165, 1984.

OCHEL, M.; VOHR, H. W.; PFEIFFER, C. & GLEICHMANN, E. "IL-4 is required for the IgE and IgG1 increase and IgG1 autoantibody formation in mice treated with mercuric chloride". The Journal of Immunology, 146: 3006-3011, 1991.

PASSOW, H.; ROTHSTEIN, A. & CLARKSON, T. W. "The general pharmacology of the heavy metals". Pharmacol. Rev., 13: 185-224, 1961.

PERLINGEIRO, R. C. R. & QUEIROZ, M. L. S. "Polymorphonuclear phagocytosis and killing in workers exposed to inorganic mercury". International Journal of Immunopharmacology. (In Press) 1995b.

PERLINGEIRO, R. C. R. & QUEIROZ, M. L.S. "Measurement of the respiratory burst and chemotaxis in polymorphonuclear leukocytes from mercury-exposed workers". Human & Experimental Toxicology, (In Press) 1995a.

PIOTROWSKI, J. K.; SZYMANSKA, J. A.; GAWRYSIAK, M. S.; KOTELO, J. & SPORNY, S. "Intestinal absorption of inorganic mercury in rat". Pharmacol. Toxicol., 70: 53-55, 1992.

PROUVOST-DANON; ABADIE, A.; SAPIN, C. & DRUET, P. "Induction of IgE synthesis and potentiation of anti-ovalbimin IgE antibody response by HgCl₂ in the rat". J. Immunol., 126: 699, 1991.

QUEIROZ, M. L. S.; ALMEIDA, M.; GALLÃO, M. I. & HOERER, N. F. "Defective neutrophil function in workers occupationally exposed to lead. Pharmacol. & Toxicol., 72: 73-77, 1993.

REPORT OF INTERNATIONAL COMITEE (Szoekholn, novembro 1968)
Maximum Allowable Concentration of Mercury Compounds. Arch. Environ. Health, 19: 891-905, 1969.

RICHARDSON, R. A. "Automated method for determination of mercury in urine". Clin. Chem., 22: 1604-1607, 1976.

ROELS, H.; GENNART, J. P.; LAUWERYS, R.; BUCHET, J. P.; MALCHAIRE, J. & BERNARD, A. "Surveillance of workers exposed to mercury vapour: validation of a previously proposed biological threshold limit value for mercury concentration in urine". Am. J. Ind. Med., 7: 45-71, 1985.

ROITT, I.; BROSTOFF, J. & MALE, D. "Imunologia", 2ª edição, Ed. Manole, São Paulo- SP, 1992.

ROSSERT, ET AL. "Autoreactive T cells in mercury-induced autoimmunity. Demonstration by limiting dilution analysis". Eur. J. Immunol., 18: 1761-1766, 1988.

SAGER, P. R.; DOHERTY, R. A. & OLMSTED, J. B. "Interaction of methylmercury with microtubules in cultured cells and *In vitro*". Exp. Cell Research, 146: 127-137, 1983.

SCHOOT, B. M.; PONT, J. J. H. H; BONTING, S. L. "Studies on (Na⁺ + K⁺) activated ATPase. XLII. Evidence for two classes of essential sulfhydryl groups. Biochem. Biophys. Acta., 522: 602-613, 1978.

SCHREINER, G. E. & MAHER, J. F. "Toxic nephropathy". Am. J. Med., 38: 409-411, 1965.

SHARMA, D. C. "Biochemical basis of the toxicity of mercury". Medical Hypotheses, 23: 259-263, 1987.

SHARMA, D. C. & DAVIS, P. S. "Direct determination of mercury in blood by use of sodium borohydride reduction and atomic absorption spectrophotometry". Clin. Chem., 25: 769-772, 1979.

SHENKER, B. J.; BERTHOLD, P.; ROONEY, C.; VITALE, L.; De BOLT, K. & SHAPIRO, I. M. "Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. III. Alterations in B-cell function and viability". Immunopharmacol and Immunotoxicol., 15: 87-112, 1993.

SHENKER, B. J.; ROONEY, C., VITALE, L. & SHAPIRO, I. M. "Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes and monocytes. I. Suppression of T-cell activation". Immunopharmacol. and Immunotoxicol., 14: 539-553, 1992.

STITES, D. P. & TERR, A. I. "Imunologia Básica", 1ª edição, Ed. Prentice-Hall do Brasil, Rio de Janeiro- RJ, 1992.

TODD; SANFORD & DAVIDSOHN. "Diagnósticos clínicos e conduta terapêutica por exames laboratoriais". 16ª edição, vol. 1 e 2, Ed. Manole, São Paulo- SP, 1989.

SKOU, J. C. "Enzymatic basis for active transport of Na⁺ and K⁺ across cell membranes. Physiol. Rev., 45: 596, 1965.

VALLEE, B. L. & ULMER, D. D. "Biochemical effects of mercury, cadmium and lead". Ann. Rev. Biochem., 41: 91-128, 1972.

VENUGOPAL, B. & LUCKEY, T. D. "Metal toxicity in mammals". Plenum Press, 2, 1978.

VERSCHAEVE, L.; VOLDERS, M. K.; HENS, L. & SUSANNE, C. "Comparative *in vitro* cytogenetic studies in mercury-exposed human lymphocytes". Mutation Research, 157: 221-226, 1985.

WARFVINGE, K.; HUA, J. & BERLIN, M. "Mercury distribution in the rat brain after mercury vapor exposure". Toxicol. Appl. Pharmacol., 117: 46-52, 1992.

WEENING, J. J.; HOEDEMAEKER, J. & BAKKER, W. W. "Immunoregulation and anti-nuclear antibodies in mercury-induced glomerulopathy in the rat". Clin. Exp. Immunol., 45: 64-71, 1981.