

MONICA PEREIRA CARDOSO

Este exemplar corresponde a versão final da tese de Mestrado, apresentada a Faculdade de Ciências Médicas, para obtenção do título de *maestre* em Farmacologia, pela médica Mônica Pereira Cardoso.

Campinas, 30 de outubro de 1992.

Mary Luci de Souza Queiroz
Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz

**ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS
AO CHUMBO**

Tese de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de mestre em farmacologia.

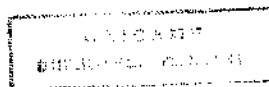
Orientadora: Prof^a Dr^a Mary Luci de Souza Queiroz

Campinas

1992

C179a

18255/BC



O presente estudo vem cumprir com o requisito do curso de pós-graduação, nível de mestrado, do departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de mestre em farmacologia.

Dedico esta tese à minha mãe que
sempre me apoiou nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

Prof^a Dr^a Mary L. de Souza Queiroz, pelo apoio e orientação.
Prof. Dr. Etelvino J. H. Bechara do Instituto de Química da USP, pelas correções e sugestões na redação da tese.

Prof. Dr. Cármino Antônio de Souza da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pelas correções na redação da tese.

Dr. Eduardo Capitani da área de Medicina do Trabalho do H.C. -Unicamp, pelo encaminhamento dos pacientes.

A todos os pacientes, pela colaboração.

Aos funcionários do laboratório de cultura de células do Hemocentro, Mônica, Bel, Francisco e Almir, pelo apoio e colaboração na realização das técnicas.

Aos amigos Normandis, Rossana, Nely e Roberto, pelo incentivo, paciência e carinho.

Aos docentes e funcionários do departamento de farmacologia, pela colaboração.

Ao Centro de Controle de Intoxicações do H.C. da Unicamp, pela realização dos exames de plumbemia e ALA-U.

Ao Hemocentro de Campinas, pelo apoio financeiro.

À Fundação de Amparo à Ciência do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

	Página
Resumo	1
Abstract	2
Introdução	3
Objetivo	11
Material e Métodos	12
1. Reagentes	12
2. Equipamentos	13
3. Pacientes	13
4. Métodos	14
4.1. Dosagens de níveis de chumbo no sangue	14
4.2. Determinação de níveis de ácido delta-amino- levulínico urinário	15
4.3. Capacidade fagocitária e lítica de neutrófilos e monócitos frente aos antígenos <u>Candida albicans</u> e <u>Candida pseudotropicalis</u>	17
4.4. Dosagens de Imunoglobulinas G, A e G	19
4.5. Cultura de linfócitos em presença de fito- hemaglutinina(PHA)	19
4.6. Análises estatísticas	21

RESUMO

Neste trabalho estudamos alguns dos efeitos do chumbo sobre o sistema imunológico. Foram estudados 60 indivíduos expostos ocupacionalmente ao chumbo e 50 indivíduos controle sem história de exposição. Os níveis de chumbo no sangue e de ácido delta-aminolevulínico na urina foram utilizados como índices biológicos de exposição. Os testes imunológicos utilizados foram:

- resposta imune inespecífica através da atividade fagocitária e lítica dos neutrófilos frente aos antígenos Candida albicans e Candida pseudotropicalis e, a atividade fagocitária e lítica dos monócitos frente ao antígeno C. pseudotropicalis;

- resposta imune humoral através das dosagens séricas das imunoglobulinas G, M e A ;

- resposta imune celular através da proliferação blástica de linfócitos estimulados pelo mitógeno fito-hemaglutinina(PHA).

Os resultados obtidos demonstraram uma redução significativa na atividade lítica de neutrófilos frente ao antígeno C. albicans nos indivíduos expostos ao chumbo. As atividades fagocitária e lítica dos neutrófilos e dos monócitos frente ao antígeno C. pseudotropicalis, permaneceram inalterados. Quanto aos níveis de imunoglobulinas, observamos um aumento significativo nos níveis da IgM e IgA nos indivíduos do grupo exposto. Os níveis da IgG não apresentaram alterações significativas. A transformação blástica de linfócitos dos indivíduos expostos não apresentou diferença significativa em relação aos controles.

ABSTRACT

In this work some effects of lead on the immune response were investigated. Sixty lead-acid battery workers were studied, as well as fifty non-exposed control individuals. To monitor exposure we used blood lead levels (PbB) as a measure of internal dose and delta-aminolevulinic acid in urine (ALA-U) as an indicator of effect. Phagocytosis and killing of Candida albicans and Candida pseudotropicalis by neutrophils and Candida pseudotropicalis by monocytes, levels of immunoglobulins G, M and A, and lymphocyte proliferation responses to the mitogen phytohemagglutinin (PHA) were measured.

The results obtained demonstrated that the phagocytic function of neutrophils and monocytes in lead-exposed workers did not differ from that of the controls. On the other hand, lysis of C. albicans by neutrophils was significantly decreased even in those workers with PbB and ALA-U concentrations below the threshold level value. Conversely, the lysis of C. pseudotropicalis by neutrophils and monocytes was not altered. We also observed in the exposed group a significant increase in the levels of IgM and IgA. However, the levels of IgG presented no changes. Blast lymphocyte transformation had no significant alterations, as compared to controls.

The relatively low level lead absorption effects manifested by immunosuppression indicates that immune dysfunction is a sensitive indicator of lead exposure.

INTRODUÇÃO

O chumbo, assim como outros metais pesados, tem sido objeto de inúmeras investigações na área de toxicologia, pois é um metal contaminante ambiental e ocupacional. Tal fato ocorre em consequência do amplo emprego do chumbo na indústria, destacando-se a indústria extrativa, a petrolífera, a de acumuladores, a de tintas e corantes, a de cerâmica, a gráfica e a bélica. A contaminação ambiental pelo chumbo pode ocorrer através da água, do solo, decorrente de minérios naturais, ou de resíduos industriais. A quantidade de chumbo introduzida diariamente no organismo humano está na faixa de 300 a 460 ug (Larini, 1987), correspondente, principalmente, a alimentos contaminados pelo metal. Por esta razão, o chumbo participa intensamente do meio em que o homem vive e sua concentração oscila de local para local. A população urbana se defronta com este problema devido à constante emissão de chumbo por veículos automotores, pelas indústrias ou ainda, pela ingestão de alimentos contaminados. Com a exposição ambiental ou ocupacional do homem ao chumbo podem ocorrer intoxicações crônicas, denominadas de "saturnismo" ou "plumbismo".

A região de Campinas apresenta quatro grandes fábricas de placas de chumbo para bateria elétrica e inúmeras outras clandestinas construídas em "fundo de quintal". Por esta razão, é grande a procura do Hospital das Clínicas da Unicamp para tratamento e ou acompanhamento médico de intoxicados por chumbo.

O monitoramento biológico da exposição ao chumbo envolve a utilização de índices de exposição que fornecem informações quan-

to aos níveis de absorção (chumbo no sangue e urina) e, principalmente, a determinação de alterações causadas pelo metal no sistema hematológico. O chumbo provoca a inibição da produção de hemoglobina devido ao antagonismo com o ferro e a interferência nas reações enzimáticas envolvidas na biossíntese da molécula do heme (Putnam, 1986). Os indicadores de exposição ao chumbo mais utilizados na avaliação do grau de exposição envolvem a determinação da taxa de excreção urinária de ácido delta-aminolevulínico (ALA) e de coproporfirina (CPU); concentração de porfirinas em eritrócitos circulantes e da atividade de enzimas envolvidas na síntese de ALA, como a ALA-desidratase (Tola et al, 1973; Selander & Cramer, 1970; Hammond et al, 1980; Alessio, 1988; Cornelis, 1988; Tomokuni & Ogata, 1976; Pidetcha et al, 1990). Estes índices, no entanto, ocorrem apenas como sinal agudo de exposição a altas concentrações de chumbo e apresentam fraca correlação com os níveis do metal no sangue (PbS) (Goodman & Gilman, 1978), assim como com os efeitos neurológicos (Spivey et al, 1979) e renais (Huang et al, 1988; Hammond et al, 1980) causados pela intoxicação crônica.

Em relação aos efeitos crônicos causados pelo chumbo, podemos mencionar as alterações na função renal com consequente elevação nos níveis de beta-2-microglobulina na urina e as alterações morfológicas e funcionais nas células de revestimento tubular (Putnam, 1986; Huang et al, 1988). Como consequência da insuficiência renal, há uma diminuição da excreção de chumbo, que agrava outros efeitos causados pelo metal (Staessen, J., 1990). Ocorrem também efeitos neurológicos tais como a insônia, a irri-

tabilidade, as alucinações, as convulsões e o coma (Putnam, 1986; Spivey et al, 1979). A síndrome neuromuscular verificada em indivíduos expostos ao chumbo, é manifestação de envenenamento subagudo avançado. Um estado de fraqueza muscular e de fadiga precedem a paralisia e é um sinal de desenvolvimento da síndrome (Goodman & Gilman, 1978). O chumbo também tem a capacidade de se depositar nos ossos. Estudos têm mostrado que, do total de chumbo depositado nos tecidos, 95% aproximadamente encontra-se nos ossos (Barry, 1975). Esta deposição pode estar relacionada aos níveis elevados de chumbo no sangue por longos períodos, mesmo depois de terminada a exposição, mantendo um gradiente de concentração de chumbo nos ossos e no plasma (Putnan, 1986).

Estudos experimentais, *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que a exposição ao chumbo pode alterar a resposta imunológica de forma significativa. Esta sensibilidade se deve, provavelmente, à propriedade do chumbo interagir com o sistema imunológico nos processos de reconhecimento e processamento do antígeno, na cooperação, na regulação, na amplificação, na ativação, na proliferação e na diferenciação celular.

Trabalhos *in vitro* demonstram que o chumbo leva a um aumento no número de células formadoras de anticorpos (PFC) no baço de camundongos; um aumento na atividade proliferativa de linfócitos em presença de mitógenos (Lawrence, 1981; Warner & Lawrence, 1986a; Warner & Lawrence, 1986b), à inibição da capacidade fagocitária de macrófagos alveolares de coelho (Jjan et al, 1985), à supressão na produção de interleucina-2 e a deficiência no sistema de apresentação de antígeno (Smith & Lawrence, 1988). Em estu-

dos mais recentes, MacCabe & Lawrence(1990) observaram um aumento na produção de IgM por células B de camundongos, quando incubadas com chumbo. Estes autores também observaram que este estímulo de células B é independente de células T e que há alterações nos antígenos de superfície a nível de classe II do complexo de histocompatibilidade encontrados na membrana de células B.

Estudos experimentais, em camundongos, demonstram que a administração crônica de chumbo deprime a produção de anticorpos, em resposta a antígenos dependentes de macrófago(Blakey & Archer, 1981). Nestes experimentos, a administração de 2-mercaptoetanol, o qual tem efeito substitutivo de algumas funções dos macrófagos, restitui a resposta deprimida causada pelo chumbo. Por outro lado, Kolowenko et al(1988) observaram que a capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais e esplênicos de camundongos tratados com chumbo em presença do antígeno Listeria monocytogenes, não é afetada. Vale a pena mencionar que a resposta imune à Listeria monocitogenes é mediada por interações entre células T e macrófagos. Os mesmos autores também observaram que a capacidade dos macrófagos destes animais para apresentar antígenos às células T imunes está levemente reduzida sem que haja no entanto, alteração na produção de interleucina-1 por estes macrófagos. Inversamente, Koller & Roan(1977) observaram aumento na capacidade fagocitária e aumento nos níveis de fosfatase ácida em macrófagos peritoneais de animais tratados com chumbo.

Com relação à resposta humoral, a exposição crônica de animais ao chumbo também produziu resultados controversos. Enquanto Lawrence(1981) não observou alteração no número de células forma-

doras de anticorpos (PFC) no baço de camundongos expostos ao chumbo. Koller & Kovacic (1974) verificaram redução no número de PFC em animais tratados. A redução na formação de rosetas EAC por linfócitos B derivados da medula óssea de animais expostos ao chumbo foi documentada por Koller & Brauner (1977).

No estudo da transformação blástica de linfócitos de camundongos expostos ao chumbo, observou-se uma diminuição na proliferação de linfócitos estimulados pelos mitógenos PHA e PWM (Faith et al, 1979; Gaworski & Sharma, 1978; Neilan et al, 1980). Por outro lado, Blakley & Archer (1982) observaram um aumento na resposta aos mitógenos PHA e concanavalina A (Con A), os quais são específicos para linfócitos T. Com a baixa exposição não foram observadas alterações na resposta proliferativa de linfócitos ao mitógeno PHA (Kimber et al, 1986) e Con A (Koller et al, 1979b; Neilan et al, 1980).

Os estudos de certos parâmetros da imunidade celular em presença do chumbo, demonstraram a redução no peso do timo, a supressão da resposta a testes cutâneos de hipersensibilidade tardia (Faith et al, 1978; Muller et al, 1977) e a diminuição na proliferação de linfócitos estimulados pelos mitógenos PHA e PWM (Faith et al, 1979; Gaworski & Sharma, 1978; Neilan et al, 1980). Com a baixa exposição ao chumbo não foram observadas alterações na resposta proliferativa de linfócitos ao mitógeno PHA (Kimber et al, 1986). Por outro lado, Blakley & Archer (1982) observaram um aumento na resposta a mitógenos específicos para linfócitos T (PHA e Con A).

A diminuição da resistência à infecção, em animais tratados com chumbo, foi relatada por alguns autores (Hemphill, 1971; Lawrence, 1981b). Os estudos *in vitro* demonstram uma inibição do metabolismo oxidativo de macrófagos induzidos por zimosan e também, redução na fagocitose de partículas de latex (Hilbertz et al, 1986; Castranova, 1980). Mauel et al e Buchmuller-Rouiller (1989), correlacionaram a redução na atividade microbicida de macrófagos com os efeitos inibitórios do metal sobre a via das pentoses.

Poucos estudos clínicos, sobre o efeito do chumbo em indivíduos expostos foram encontrados na literatura. Alguns estudos estão voltados ao estudo de índices de exposição como a plumbemia e os indicadores de efeito como o ALA-U, a CPU, a PROTO (protoporfirina), a ALA desidratase e a correlação entre eles (Selander & Cramer, 1970; Zielhuis, 1971; Tola, 1973). Zerez (1990) propõe como indicador sensível de exposição, a NAD⁺ sintetase eritrocitária. O autor observou que, mesmo com níveis de plumbemia normais, houve uma diminuição na atividade desta enzima. O chumbo também atua na via das pentoses de eritrócitos inibindo a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, sendo portanto, uma das causas da redução da vida média de eritrócitos na intoxicação pelo metal (Lachant et al, 1984). Monteiro et al (1985) observaram um aumento na atividade das enzimas superóxido dismutase e glutathiona peroxidase eritrocitárias de trabalhadores expostos ao chumbo, sugerindo uma ligação entre o acúmulo de precursores do heme com o aumento da produção de espécies ativas de oxigênio. Outros autores investigam o grau de fidelidade com que estes índices de exposição refletem efeitos tóxicos sobre o sistema nervoso central; o trato

gastrointestinal(Mohamed et al, 1986; Spivey et al, 1979) e o sistema renal(Wedeen et al, 1979; Hamond et al, 1980; Huang et al, 1988).

Em relação ao sistema imunológico, os poucos trabalhos clínicos encontrados na literatura mostram diferentes conclusões. Kimber e colaboradores(1986), estudando os efeitos imunológicos em indivíduos expostos e com baixos níveis de chumbo no sangue, não observaram diferenças significativas nos níveis de imunoglobulinas e na proliferação blástica de linfócitos, quando comparados ao "controle". Também não foram encontradas alterações nos níveis de imunoglobulinas e do complemento sérico no estudo de crianças expostas ao chumbo(Reigart & Graber, 1976). Por outro lado, Jaremin(1983) verificou uma diminuição nas concentrações de IgG e IgM em um grupo de trabalhadores expostos e com níveis altos de plumbemia e de ALA-U. Alguns autores observaram um estímulo na transformação blástica de linfócitos T (Jaremin, 1983) e produção de imunoglobulinas por linfócitos B na presença de mitógenos PHA e PWM(Borella & Giardino, 1991). Estudos *in vitro* e *in vivo*, demonstram que o chumbo causa inibição, dose dependente, da quimiotaxia de polimorfonucleares (Governa et al, 1987; Governa et al 1988). Estes autores observaram uma redução na capacidade quimiotáxica de polimorfonucleares de indivíduos com exposição ocupacional ao chumbo por períodos que variavam de um a seis anos. É importante observar nestes estudos que, a alteração imunológica ocorreu sem que houvessem alterações concomitantes dos parâmetros hematológicos tais como: os níveis de chumbo no sangue, a atividade do ácido delta aminolevulínico desidratase e os

níveis de protoporfirina eritrocitária, e parâmetros metabólicos como níveis de colesterol, de triglicérides, de creatinina, de glicose, do ácido úrico e das bilirrubinas. Estes resultados sugerem que alterações no sistema imunológico refletem de forma sensível o grau de comprometimento celular em indivíduos com exposição crônica ao chumbo.

OBJETIVO

Esta tese tem como objetivo o estudo dos efeitos do chumbo no sistema imunológico de indivíduos com exposição ocupacional ao metal, mesmo com índices biológicos de exposição em níveis considerados de segurança para o trabalhador. Os efeitos imunológicos foram analisados à nível de imunidade inespecífica, imunidade humoral e imunidade celular através das provas de atividade fagocitária e lítica dos neutrófilos e dos monócitos frente aos antígenos C albicans e C pseudotropicalis, dosagens de imunoglobulinas séricas e proliferação blástica de linfócitos em resposta ao mitógeno fitohemaglutinina, respectivamente. Os indivíduos foram classificados de acordo com os níveis de plumbemia e do ácido delta-aminolevulínico urinário.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Reagentes

- Acetoacetato de etila - MERCK
- Acetato de etila - MERCK
- Ácido nítrico concentrado - MERCK
- Ágar Saboraud dextrosado - cod. 107-3 BIOBRAS
- Água deionizada - solvente
- Azur de eosina azul de metileno seg. Giemsa - ECIBRA
- Cloreto de cálcio - MERCK
- Cloreto de magnésio - MERCK
- Cloreto de potássio - MERCK
- Cloreto de sódio - MERCK
- p-dimetilaminobenzaldeído - MERCK
- 2,5-difeniloxazole - SIGMA
- Ficoll 50% - CEME
- Fosfato monopotássico - MERCK
- Fosfato dissódico - RIEDEL
- Heparina sódica 5000 UI/ml - ORGANON
- Hypaque 50% - CEME
- Metilisobutilcetona - MERCK
- [methyl- 3H] Thymidine - 5 Ci/mMol - AMERSLTAM UK
- Nitrato de chumbo II - MERCK
- NOR-Partigen - IgA - BEHRING
- NOR-Partigen - IgG - BEHRING
- NOR-Partigen - IgM - BEHRING
- Phytohemagglutinin P - DIFCO

- Pirrolidina ditiocarbamato de amônio (APDC) - SIGMA
- RPMI 1640 cod. 10.601-20 - SIGMA
- Soro fetal bovino - CULTLAB
- Tolueno - MERCK
- Triton X-100 - SIGMA

2. Equipamentos

- Banho-Maria - FANEM 102/1
- Cell-Harvester - CEB-Unicamp
- Centrifugador - FANEM 204 NR
- Cintilador B - BECKEMAN LS 5801
- Espectrofotômetro de absorção atômica - ZEISS FMD 4
- Espectrofotômetro - BECKEMAN DU-70
- Estufa de cultura à 37°C - FANEM 002 CB
- Estufa de O₂/CO₂ - FORMA SCIENTIFIC model 3159
- Microscópio - OLYMPUS CBA-K
- Vortex - PHOENIX AT 56

3- Pacientes

Foram analisados 60 pacientes com história de exposição ocupacional ao chumbo, encaminhados ao HC da UNICAMP ou por apresentarem sintomas de intoxicação ao metal ou para controle periódico relacionado ao convênio entre as fábricas de baterias elétricas e a área de medicina ocupacional. Indivíduos estes, aparentemente saudáveis apresentando faixa etária entre 18 e 51

anos.

A capacidade funcional de neutrófilos frente à C. albicans foi estudada nos 60 pacientes expostos e 49 indivíduos, não expostos utilizados como controle normal. Em 34 destes indivíduos expostos e em 36 controles foi realizado o estudo da fagocitose e lise dos neutrófilos frente à C. pseudotropicalis. Em 48 dos 60 indivíduos expostos e 55 controles efetuou-se o estudo da atividade fagocitária e lítica dos monócitos frente à C. pseudotropicalis. A pesquisa de imunoglobulinas foi realizada em 33 dos 60 indivíduos expostos e em 30 controles normais. Dos 60 indivíduos expostos foi realizada a cultura de linfócitos em 16 e em 15 controles normais.

4- Métodos

4.1- Dosagem dos níveis de chumbo no sangue

4.1.1- Princípio do método

Consiste em complexar o chumbo com a pirrolidina ditiocarbamato de amônio (APDC) e depois extrai-lo com a solução de metil-isobutil-cetona (MIC), saturada com água desmineralizada. Em seguida determina-se a absorbância através de espectrofotometria de absorção atômica (Salgado, 1977).

4.1.2- Descrição da técnica

Foi feito inicialmente uma curva de calibração com soluções padrão de nitrato de chumbo II.

Coletou-se 10 ml de sangue periférico com heparina. Foram numerados 4 tubos de centrifuga e adicionados 4 ml de sangue em cada um deles.

No tubo 1 (branco) adicionou-se 1 ml de água. No tubo 2, 3 e 4 adicionou-se 1 ml de solução padrão com 4, 10 e 20 ug/ml de nitrato de chumbo. Obtendo-se assim, concentrações de 0, 16, 40 e 80 ug de nitrato de chumbo/dl de sangue, respectivamente.

Transferiu-se 5 ml da amostra para um tubo de centrifuga. Adicionou-se em cada tubo 2 ml da solução de APDC. Os tubos foram agitados em vortex por 30 segundos e deixados em repouso por 10 minutos. Adicionou-se 5 ml da solução de MIC saturada. Agitou-se novamente em vortex e centrifugaram-se os tubos a 2500 rpm por 10 minutos.

As absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro de absorção atômica.

Os níveis de chumbo no sangue considerados aceitáveis na área profissional são abaixo de 40 ug/dl. Níveis entre 40 - 60 ug/dl são considerados dentro de limites "aceitáveis". Níveis excessivos são acima de 60 ug/dl.

4.2- Determinação de Níveis de Acido Delta-Aminolevulínico Urinário

4.2.1- Princípio do método

O ácido delta-aminolevulínico, depois de reagir com o acetoacetato de etila, é extraído com acetato de etila. Posteriormente, é adicionado um reativo de cor, à base de p-dimetilaminobenzaldeído e quantificado por espectrofotometria (Salgado, 1977).

4.2.2- Descrição da técnica

Colher a urina em frasco de polietileno e manter a 4°C por 48 horas.

Em um tubo de ensaio, adicionar 1 ml de urina; 1 ml de solução tampão acetato pH 4.6 e 0.2 ml de acetoacetato de etila.

Em outro tubo fazer o "branco" para urina contendo 1 ml de urina e 1 ml de solução tampão acetato pH 4.6.

Para realizar a curva de calibração, adicionar em 3 tubos de ensaio, 1 ml de solução padrão 4 mg/l, 10 mg/l e 20 mg/l, 1 ml da solução tampão acetato pH 4.6 e 0.2 ml de acetoacetato de etila.

Colocar os tubos em banho-maria a 100°C por 10 minutos.

Resfriar e em seguida adicionar 3 ml de acetato de etila em todos os tubos. Tampar os tubos e agitar em vortex.

Centrifugar a 2000rpm por 3 minutos.

Desprezar a fase aquosa e transferir 2 ml da fase orgânica para outro tubo.

Adicionar 2 ml do reativo de Ehrlich modificado.

Deixar em repouso por 10 minutos e fazer as leituras das absorbâncias em 553nm, contra os respectivos "brancos".

A determinação de ALA-U é feita a partir da curva de calibração.

Os níveis de ALA-U considerados normais são de até 4.5 mg/l. Os níveis dentro dos limites de tolerância biológica estão entre 4.5 a 15 mg/l.

4.3- Capacidade fagocitária e lítica de neutrófilos e monócitos frente aos antígenos Candida albicans e Candida pseudotropicalis

4.3.1- Princípio do método

A capacidade dos leucócitos de fagocitarem microorganismos, pode ser detectada através da incubação *in vitro* de neutrófilos e monócitos com uma suspensão de cândidas visando a fagocitose e consequente lise das leveduras.

4.3.2- Descrição da técnica para detecção da capacidade fagocitária e lítica de neutrófilos:

Sobre uma lâmina com as bordas esmaltadas distribui-se 1 ml de sangue periférico. Incuba-se por 1 hora a 37°C.

Preparar, separadamente, as suspensões em salina de culturas de C. albicans e C. pseudotropicalis, inoculadas no dia anterior. Lavar as suspensões duas vezes em salina, ressuspendendo as leveduras em meio RPMI 1640 na concentração de 5×10^6 /ml. Opsonizar as cândidas em meio RPMI com 10% de soro humano normal do tipo AB.

Remover o coágulo da lâmina e incubar com a suspensão de cândidas 30 minutos a 37°C.

Terminado o tempo de incubação, lavar a lâmina com o meio RPMI.

Deixar secar e corar com corante de Wright.

Levar a lâmina ao microscópio e contar o número de cândidas fagocitadas e lisadas, num total de 100 neutrófilos.

4.3.3- Descrição da técnica para detecção da atividade fagocitária e lítica de monócitos:

Colher 10 ml de sangue periférico heparinizado.

Separar o sobrenadante em gradiente de Ficoll-Hypaque.

Transferir o creme leucocitário para outro tubo e lavar três vezes em meio RPMI 1640 a 1500rpm.

Ressuspender as células em 1ml de meio RPMI e proceder com a contagem de monócitos e de linfócitos. Ajustar o número de células para 3×10^6 /ml em meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino.

Sobre uma lâmina com as bordas esmaltadas, distribuir 1 ml da suspensão de células. Incubar por 1 hora a 37°C, em ambiente úmido, contendo 5% de CO₂.

Preparar as cândidas da mesma forma descrita no item 2.3.

Terminado o tempo de incubação das células, cobrir as lâminas com 1 ml da suspensão de 5×10^6 cândidas por ml. Incubar por 30 minutos.

A seguir, lavar as lâminas, deixar secar e corar com corante de Wright.

Levar ao microscópio e com o auxílio de objetiva de 100x em imersão, contar o número de cândidas fagocitadas e lisadas no

total de 100 monócitos. Expressar o resultado em percentagem

4.4- Dosagem de Imunoglobulinas G, A, M

4.4.1- Princípio do método

A técnica baseia-se na precipitação antígeno-anticorpo em agar. O anticorpo utilizado é o antissoro, já incorporado numa fina camada de agar, e o antígeno é o soro contendo as imunoglobulinas, IgG, IgM e IgA a serem dosadas, inoculado nos orifícios do gel. O antígeno difunde-se radialmente formando um anel de precipitação que forma ao redor dos orifícios. (Hudson, 1984)

4.4.2- Descrição da técnica

Fazer as curvas de padronização utilizando soros com concentrações definidas de imunoglobulinas. Colocar os resultados das leituras em gráficos com as medidas em milímetros e mg/dl e traçar a reta.

Separar o soro por centrifugação.

Inocular 10 ul do soro nos orifícios da placa com gel contendo o anti-soro. Deixar por 48 horas.

Fazer as leituras do raio de precipitação do anel formado, com o auxílio de uma régua em milímetros. Extrapolar estes resultados para a reta determinando, assim, a concentração em mg/dl.

4.5- Cultura de Linfócitos em presença de Fitohemaglutinina

4.5.1- Princípio do método

A transformação blástica e as mitoses de linfócitos T podem ser induzidas pelo mitógeno PHA. A leitura da atividade blástica é realizada através da contagem de células marcadas com timidina tritiada (Hudson, 1984).

4.5.2- Descrição da técnica

As culturas são realizadas em triplicata.

Células mononucleares do sangue periférico são obtidas de forma estéril, por separação em gradiente de Ficoll-Hypaque, e ajustadas a uma concentração de 1×10^6 células/ml em meio RPMI 1640.

Experimentos preliminares realizados com PHA demonstraram que diluições de 1:16 por cultura induzem ao máximo a proliferação de linfócitos.

Às escavações da placa de monocultura são adicionados 100 ul da suspensão, 20 ul da solução 1:16 de PHA, 40 ul de soro humano e 40 ul de meio RPMI, perfazendo um volume total de 200 ul por escavação. Concomitantemente são incubadas também as células de cada amostra sem PHA. As placas são mantidas por 3 dias em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂.

Quatro a seis horas antes do término do período de incubação, as culturas são marcadas com 10 ul de timidina tritiada a 10%.

Ao final, as culturas são mantidas a 4°C ou imediatamente coletadas por método semiautomático em papel de fibra de vidro por meio do coletor de células e lavagem com água destilada.

Após a secagem em estufa a 56°C, os discos, correspondentes a cada cultura, são destacados e transferidos para os frascos de cintilação contendo 2 ml de líquido de cintilação (Difeniloxazole a 0.3% em tolueno), e a incorporação de timidina é contada durante 1 minuto.

Os resultados são expressos pela média aritmética das triplicatas contadas por minuto.

4.6- Análises Estatísticas

Para análise dos resultados foram utilizados os seguintes testes: o "t" de Student, para estudos comparativos entre os grupos exposto e controle; a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan, para determinação de diferenças entre médias dos resultados em relação à plumbemia, o ALA-U e o tempo de exposição e a correlação linear. (Beiguelman, 1988)

O nível de significância foi estabelecido para um $p < 0.05$.

RESULTADOS

1- Capacidade fagocitária e lítica de neutrófilos frente aos antígenos C. albicans e C. pseudotropicalis

Nas tabelas 1 e 2 estão dispostos os resultados da capacidade fagocitária e lítica de neutrófilos frente ao antígeno C. albicans dos controles e, a idade, o tempo de exposição, a plumbemia e o ALA-U de 61 indivíduos expostos ao chumbo, respectivamente. A capacidade fagocitária e lítica de neutrófilos frente ao antígeno C. pseudotropicalis dos controles, idade, tempo de exposição, plumbemia e ALA-U de 34 indivíduos expostos ao chumbo apresentam-se nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

Não houve diferença significativa entre a capacidade fagocitária de neutrófilos dos indivíduos expostos e dos controles frente às duas cândidas (figuras 1 e 2). Por outro lado, a atividade lítica destas células frente à C. albicans estava significativamente reduzida ($p < 0.05$ - teste "t" de Student) nos indivíduos expostos (figura 3 e fotografias 1 e 2). A atividade lítica de neutrófilos dos indivíduos expostos frente à C. pseudotropicalis, no entanto, não apresentou alterações significativas (figura 4 e fotografias 3 e 4).

Para correlacionarmos a atividade lítica de neutrófilos de indivíduos expostos, e que apresentam diferentes níveis de plumbemia, com a atividade lítica dos neutrófilos dos respectivos controles, classificamos o grupo exposto em subgrupos de acordo com os diferentes níveis de PbS a saber: normais (até 40 ug/dl), dentro dos limites de tolerância biológica (LTB) (40-60 ug/dl) e

Tabela 1 - Valores de controles de Capacidade Fagocitária e lítica de neutrófilos frente à *C.albicans*

Controles	Capacidade Fagocitária	Lise (%)	
1	360	27.5	
2	226	35.4	
3	201	58.0	
4	175	37.7	
5	171	57.9	
6	211	43.1	
7	201	41.3	
8	147	56.5	
9	300	20.0	
10	245	35.5	
11	331	10.3	
12	237	21.1	
13	367	36.7	
14	181	35.4	
15	224	26.8	
16	213	35.7	
17	103	28.1	
18	226	16.8	
19	283	30.7	
20	109	46.8	
21	264	47.3	
22	360	29.0	
23	178	16.8	
24	308	18.1	
25	155	20.6	
26	397	9.8	
27	151	19.2	
28	281	15.3	
29	469	24.3	
30	361	26.8	
31	165	29.6	
32	291	15.4	
33	197	10.4	
34	191	29.0	
35	358	19.3	
36	272	12.5	
37	313	26.8	
38	167	23.9	
39	164	29.2	
40	220	27.2	
41	127	11.8	
42	247	13.8	
43	183	18.5	
44	171	26.9	
45	579	19.5	
46	356	8.9	
47	243	10.0	
48	347	7.2	
49	135	23.0	
	Média	Desvio	Erro
Fagocitose:	248	96	14
Lise:	26.4	12.8	1.8

Tabela 2 - Idade, Tempo de Exposição, Plumbemia, ALA-U, Capacidade Fagocitária e lítica de neutrófilos frente à *C. albicans*

Paciente	Idade (anos)	Tempo Expos (meses)	PbS ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	ALA-U (mg/l)	Capac Fag	Lise (%)
E.L.S.	24	48	62	0.0	107	14.0
P.H.F.	18	60	88	16.0	106	14.0
R.P.S.	27	84	63	4.0	136	26.0
M.D.F.	26	72	71	10.0	70	7.4
R.B.	42	12	79	-	99	2.5
A.J.S.	51	120	47	6.6	132	1.4
N.C.	32	290	69	24.0	92	32.6
J.C.C.	30	120	95	13.3	220	4.5
R.C.S.	31	96	41	-	325	21.0
J.J.N.	23	18	64	-	210	1.9
C.A.	25	2	56	-	157	19.1
A.C.C.	30	264	74	-	108	10.0
C.R.M.C.	22	3	61	-	139	7.2
G.B.A.	18	48	119	-	234	4.3
V.B.S.	18	7	104	-	207	5.7
J.C.F.M.	16	27	111	-	211	4.2
J.C.B.	25	7	77	-	198	6.0
A.M.C.	32	290	110	-	251	3.2
C.R.C.	21	9	96	-	271	2.2
M.A.H.	18	3	210	-	242	5.3
A.S.F.	49	132	38	-	297	8.7
B.H.	48	240	82	-	258	42.0
J.L.	27	94	61	-	271	31.0
H.H.L.	25	6	66	-	116	28.4
M.A.H.	23	4	70	-	270	8.0
J.B.S.	29	10	154	64.2	155	41.0
P.R.	39	312	60	-	168	40.5
A.C.S.	27	17	62	2.7	227	21.6
J.H.	40	6	52	13.2	242	14.4
J.F.F.	29	3	50	-	93	13.9
J.F.M.S.	37	18	57	2.3	229	4.8
E.A.P.	24	32	70	6.9	187	9.1
E.F.	33	24	50	-	204	10.3
D.V.C.	34	24	31	1.0	344	10.0
J.C.L.S.	33	6	59	9.3	172	11.1
F.S.P.	19	7	12	4.1	367	12.8
F.E.	35	12	31	4.6	363	10.7
J.V.S.	22	6	25	2.6	357	17.4
A.C.O.B.	26	13	21	4.1	254	32.7
A.J.S.	43	13	21	6.2	180	20.5
D.A.H.	23	3	14	5.6	231	24.2
H.C.C.	43	26	54	0.3	146	7.5
C.R.F.	26	12	74	0.8	313	4.5
A.A.H.	35	120	63	2.0	196	2.3
J.S.N.	24	30	44	1.0	185	5.4
A.C.	51	132	34	3.0	237	6.0
I.C.L.	33	13	38	3.7	180	8.0
E.D.C.	23	44	18	-	308	3.2
G.A.S.	21	15	66	5.2	168	4.8
S.R.	43	12	67	3.7	195	29.2
B.H.	24	24	67	1.0	211	34.6
E.H.	30	60	32	9.0	285	22.0
A.A.A.	43	6	57	50.0	212	34.4
I.G.S.	32	216	51	-	188	21.2
J.E.B.	40	54			338	5.9
D.G.O.	21	3	76	26.5	166	6.0
C.R.B.	23	13		18.7	104	5.8
H.G.D.	24	30		96.0	134	7.5
G.G.S.	23	6		72.0	160	13.1
V.H.S.	25	36		28.2	167	3.6

Valores Normais: Fagocitose = 248 ± 96

Lise = 26 ± 12.8

Tabela 3 - Valores de controles de Capacidade Fagocitária e lítica de neutrófilos frente à C. pseudotropicalis

Controles	Capacidade Fagocitária	Lise (%)	
1	116	22.4	
2	148	8.7	
3	153	13.0	
4	99	22.0	
5	136	20.6	
6	150	8.7	
7	193	13.9	
8	108	25.0	
9	109	16.5	
10	182	8.7	
11	244	9.0	
12	236	17.4	
13	251	24.3	
14	213	33.8	
15	271	15.5	
16	267	8.2	
17	156	23.1	
18	213	14.5	
19	247	18.6	
20	147	10.2	
21	155	14.2	
22	228	16.2	
23	233	10.7	
24	166	16.6	
25	271	15.5	
26	424	19.3	
27	492	10.4	
28	256	14.0	
29	301	40.9	
30	319	28.5	
31	103	11.6	
32	168	15.4	
33	233	28.0	
34	216	20.4	
35	271	7.8	
36	180	7.2	
	Média	Desvio Padrao	Erro
Fagocitose:	213	84	14
Lise:	17	7.6	1.3

Tabela 4 - Idade, Tempo de Exposição, Plumbemia, ALA-U, Capacidade Fagocitária e lítica de neutrófilos frente à C. pseudotropicalis

Paciente	Idade (anos)	Tempo Expos (meses)	PbS (ug/dl)	ALA-U (mg/l)	Capac Fag	Lise (%)
J.C.C.	30	120	95	13.3	114	11.4
J.M.	40	6	52	13.2	225	14.2
J.F.F.	29	3	50	-	363	15.2
J.F.M.S.	39	18	57	2.3	248	10.8
E.A.P.	24	32	70	6.9	322	8.6
E.F.	33	24	50	-	267	4.8
D.V.C.	34	24	31	1.0	348	8.0
J.C.L.S.	33	6	59	9.3	381	5.0
F.S.P.	19	7	12	4.1	439	6.6
F.E.	35	12	31	4.6	355	5.0
J.V.S.	22	6	25	2.6	196	57.0
A.C.O.B.	26	13	21	4.1	163	36.8
A.J.S.	43	13	21	6.2	108	37.0
D.A.M.	23	3	14	5.6	138	32.0
H.C.C.	43	26	54	0.3	208	5.8
C.R.F.	26	12	74	0.8	377	10.0
A.A.M.	35	120	63	2.0	237	9.3
J.S.N.	24	30	44	1.0	256	11.3
A.C.	51	132	34	3.8	279	20.8
I.C.L.	33	13	38	3.7	230	10.0
E.D.C.	23	44	18	-	361	4.1
G.A.S.	21	15	66	5.2	226	3.5
S.R.	43	12	67	3.7	186	11.8
D.M.	24	24	67	1.0	120	26.6
E.M.	30	60	32	9.0	233	10.7
A.A.A.	43	6	57	50.0	211	41.2
I.G.S.	32	216	51	-	202	13.3
J.E.B.	40	54			490	3.2
D.G.D.	21	3	76	26.5	180	7.2
C.R.B.	23	13		18.7	112	3.6
H.G.D.	24	30		96.0	114	16.7
G.G.S.	23	6		72.8	172	15.7
V.M.S.	25	36		28.2	154	15.2

Valores Normais: Fagocitose = 213 + 84

Lise = 17 + 7.6

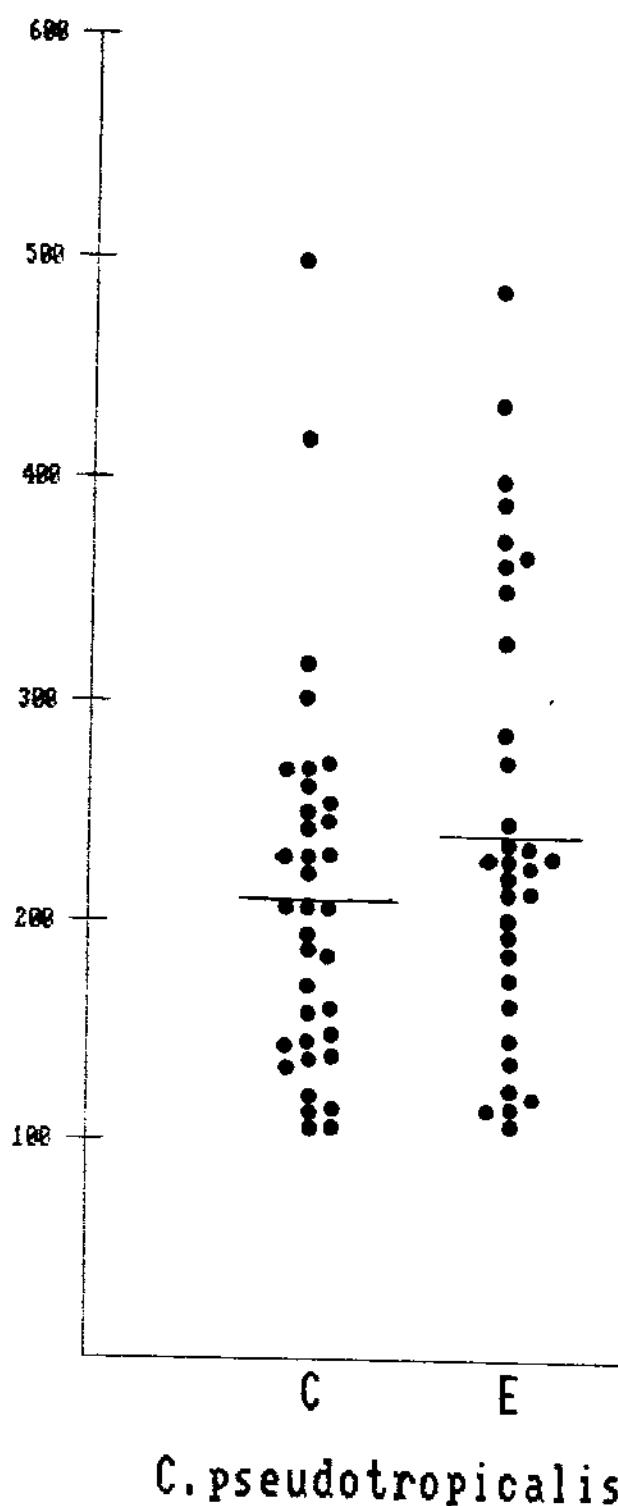
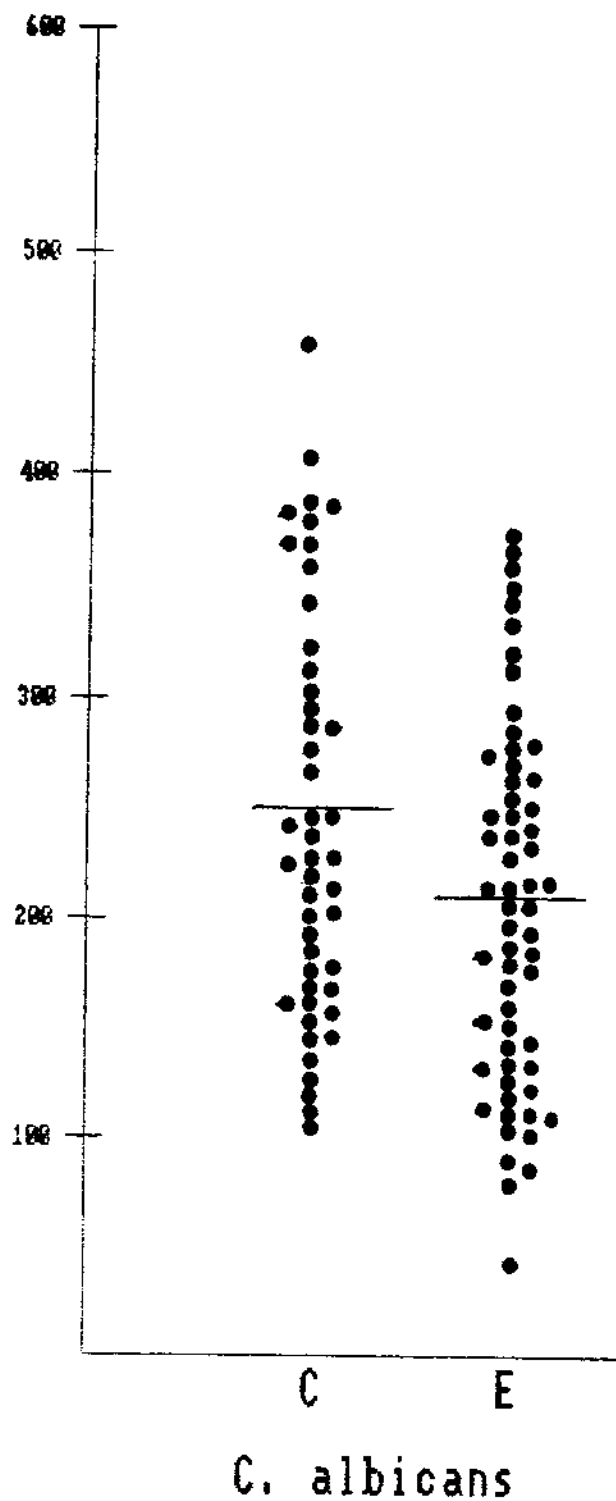


Figura 1 - Atividade fagocitária de neutrófilos frente ao antígeno *Candida albicans* de indivíduos controle (C) e indivíduos expostos ao chumbo (E)
 $p < 0.4$ ("Student" - teste t)

Figura 2 - Atividade fagocitária de neutrófilos frente ao antígeno *Candida pseudotropicalis* de indivíduos controle (C) e indivíduos expostos ao chumbo (E).
 $p < 0.4$ ("Student" - teste t)

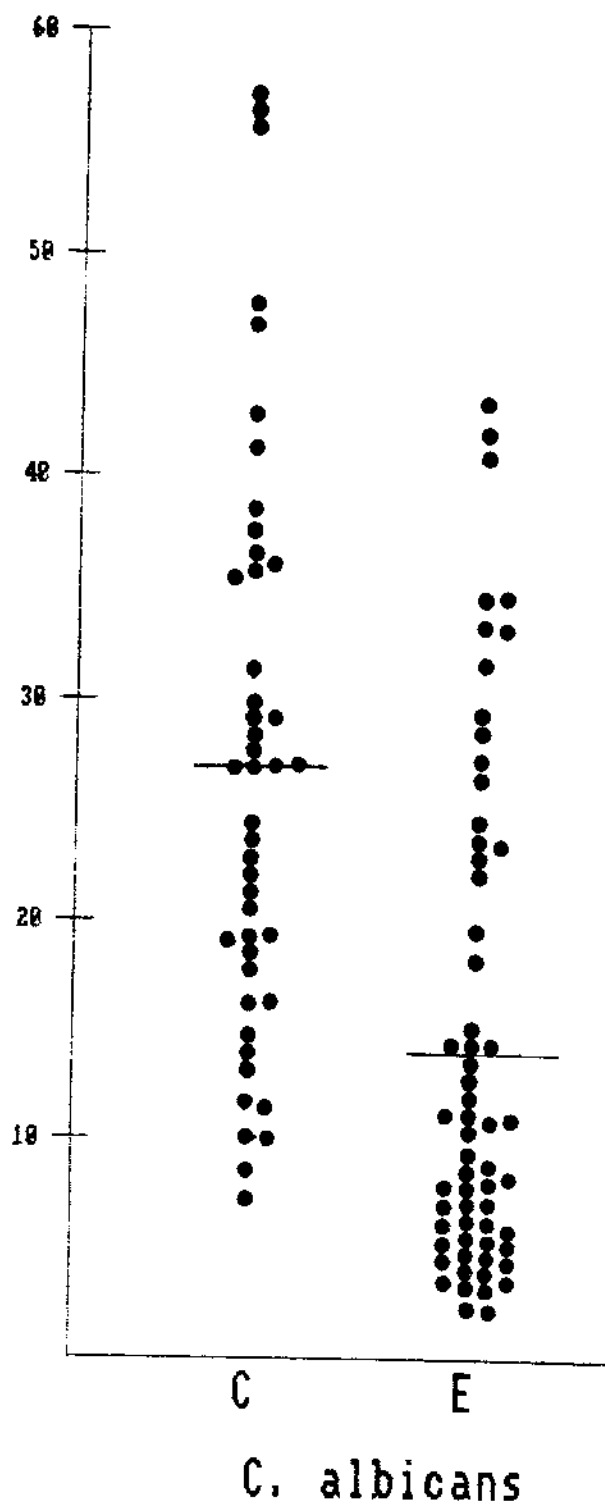


Figura 3 -Atividade lítica de neutrófilos frente ao antígeno *Candida albicans* em indivíduos controle (C) e expostos ao chumbo (E).
 $p < 0.001$ ("Student" - teste t)

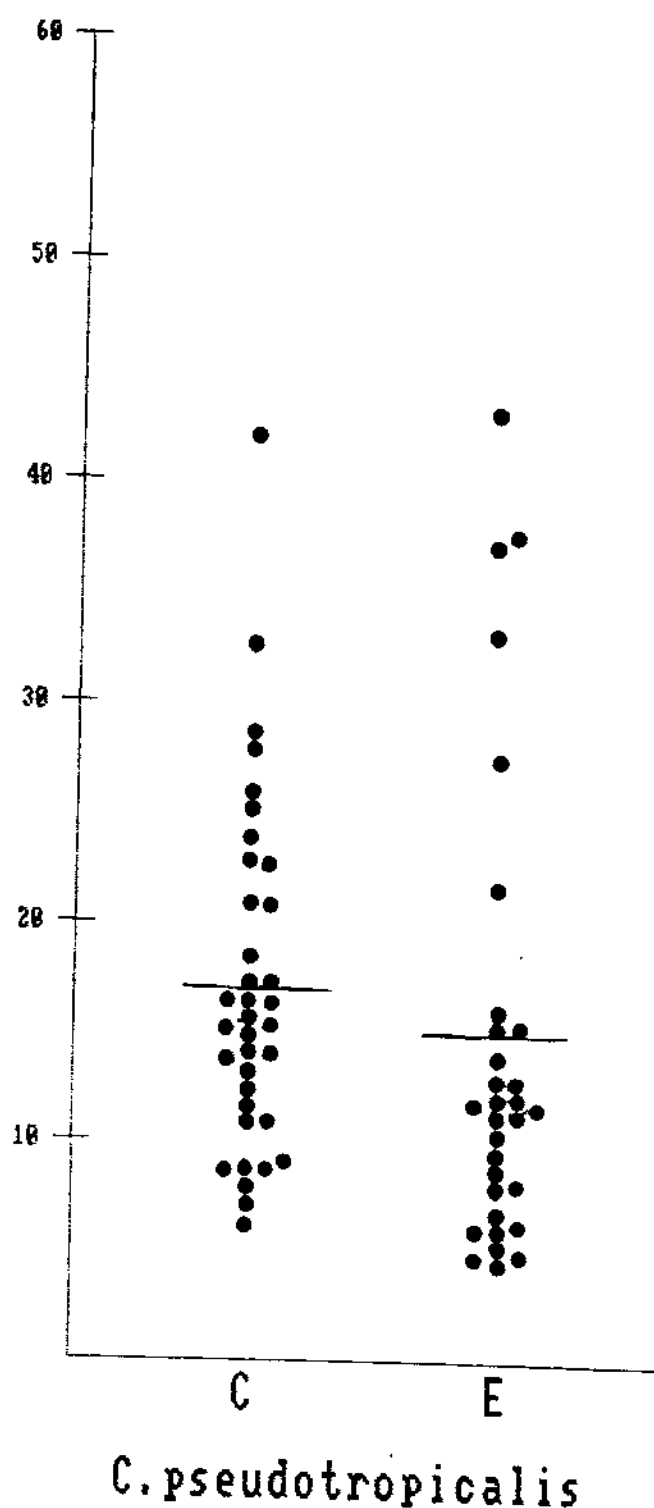
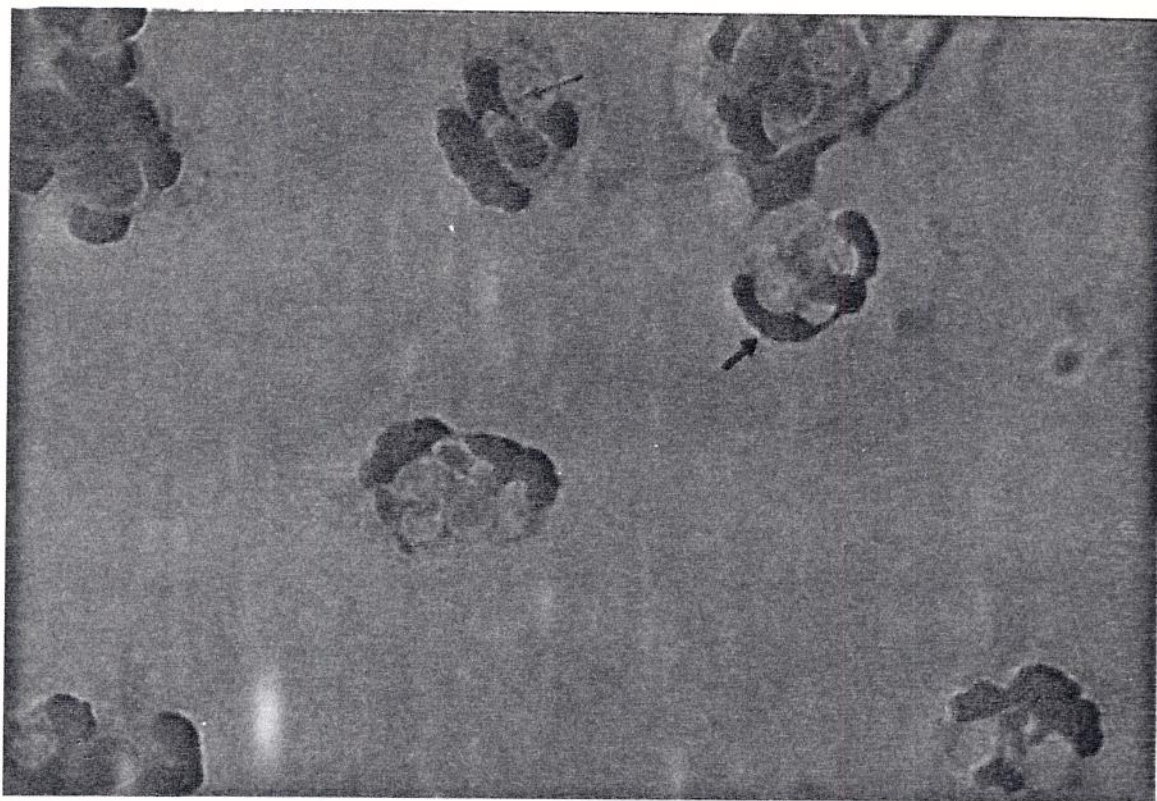
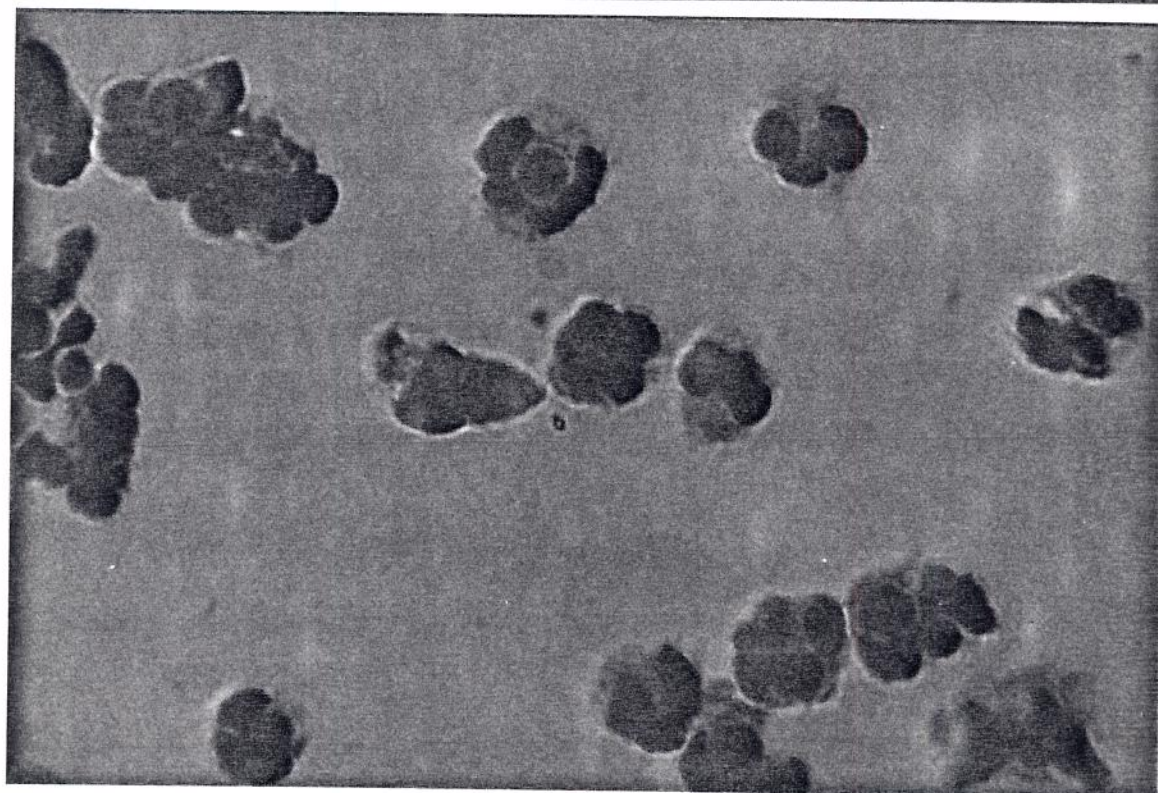


Figura 4- Atividade lítica de neutrófilos frente ao antígeno *Candida pseudotropicalis* em indivíduos controle (C) e indivíduos expostos ao chumbo (E).
 $p < 0.5$ ("Student" - Teste t)

1

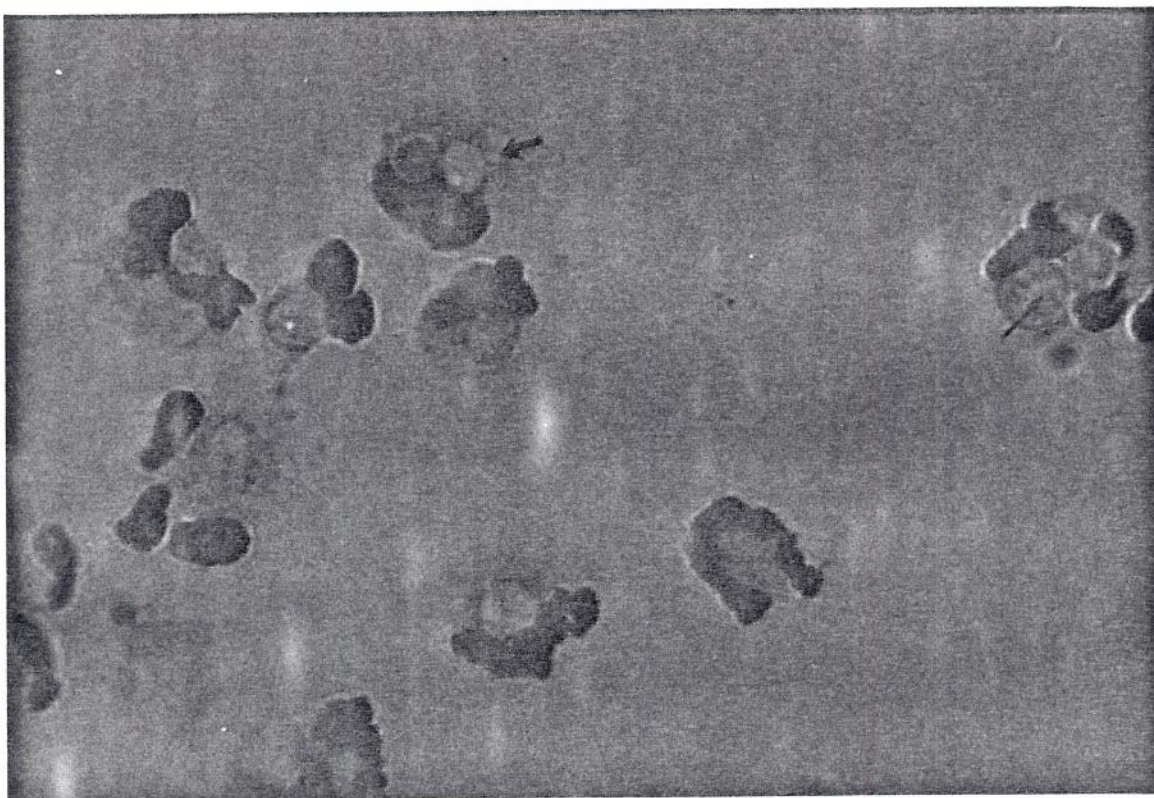


2

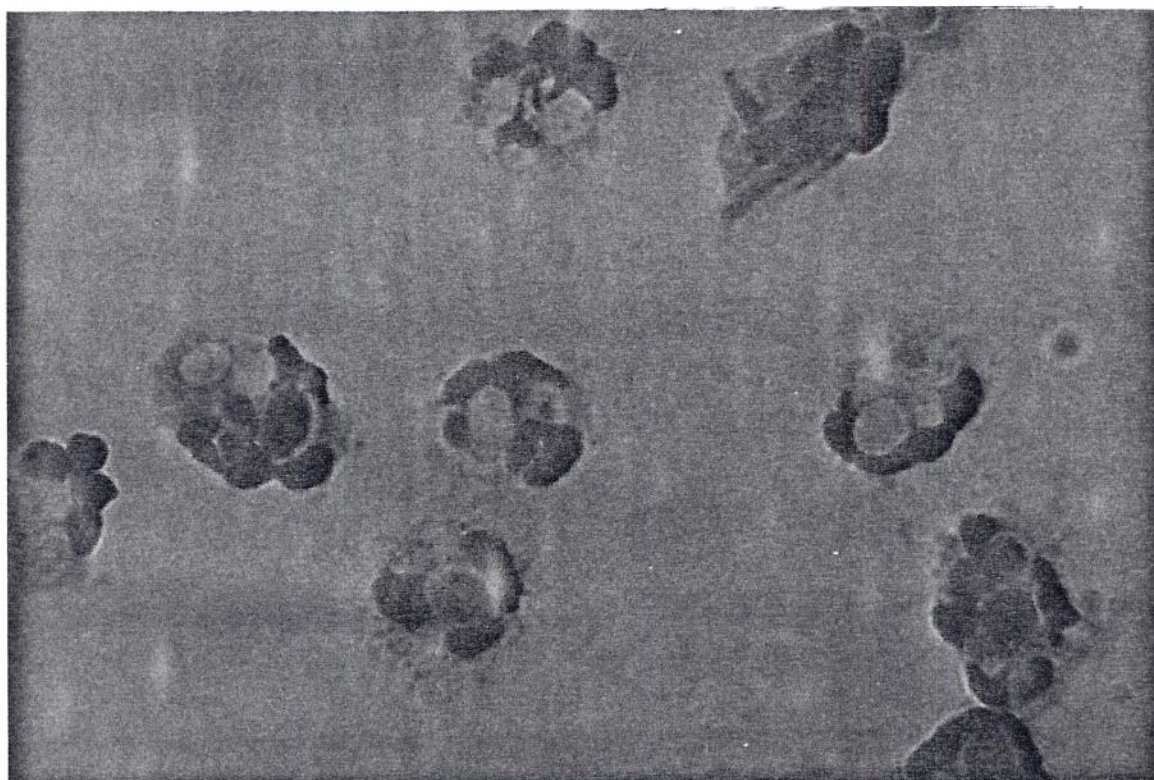


Fotografias 1 e 2 - Aspecto microscópico de fagocitose e lise (←) de C. albicans por neutrófilos (→) de um controle (1) e um indivíduo exposto ao chumbo (2). Aumento 1000x

3



4



Fotografias 3 e 4 - Aspecto microscópico de fagocitose e lise(→) de *C. pseudotropicalis* por neutrófilos(→) de um controle (3) e um indivíduo exposto ao chumbo (4). Aumento 1000x

excessivos (acima de 60 ug/dl). Utilizando o teste de Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Duncan, observamos que as diferenças na atividade lítica de C. albicans dos grupos expostos e respectivos controles são significativas para os três subgrupos estudados (figura 5). Não houve diferenças significativas nos três subgrupos quando comparados entre si. Estes dados estão de acordo com a ausência de correlação observada entre os níveis de plumbemia e a atividade lítica dos neutrófilos (tabela 9).

Em 36 dos indivíduos expostos usamos como indicador de efeito os valores de ALA-U. Os indivíduos foram classificados em grupos com relação aos níveis de ALA-U a saber: normais (até 4.5 mg/l), dentro dos limites de tolerância biológica (4.5-15 mg/l) e excessivos (acima de 15 mg/l). Cada subgrupo apresentou valores da atividade lítica de neutrófilos frente à C. albicans significativamente diminuídos ($p < 0.05$, ANOVA e teste de Duncan) quando relacionados ao controle, mas não houve diferenças das médias dos subgrupos quando comparadas entre si (figura 6). Como ocorreu anteriormente, não verificamos alterações na atividade lítica em presença do antígeno C. pseudotropicalis (figura 7).

Os testes de ANOVA e Duncan foram também utilizados para comparar as médias dos valores de atividade lítica e o tempo de exposição. Os grupos foram classificados de acordo com os seguintes períodos de exposição ao chumbo: até um ano, de um a três anos e mais de três anos. Constatamos diferenças significativas entre os valores de lise de C. albicans nos três grupos quando comparados com o controle (figura 8). Quanto a lise de C. pseudotropicalis não houve alterações com o tempo de exposição (figura 9).

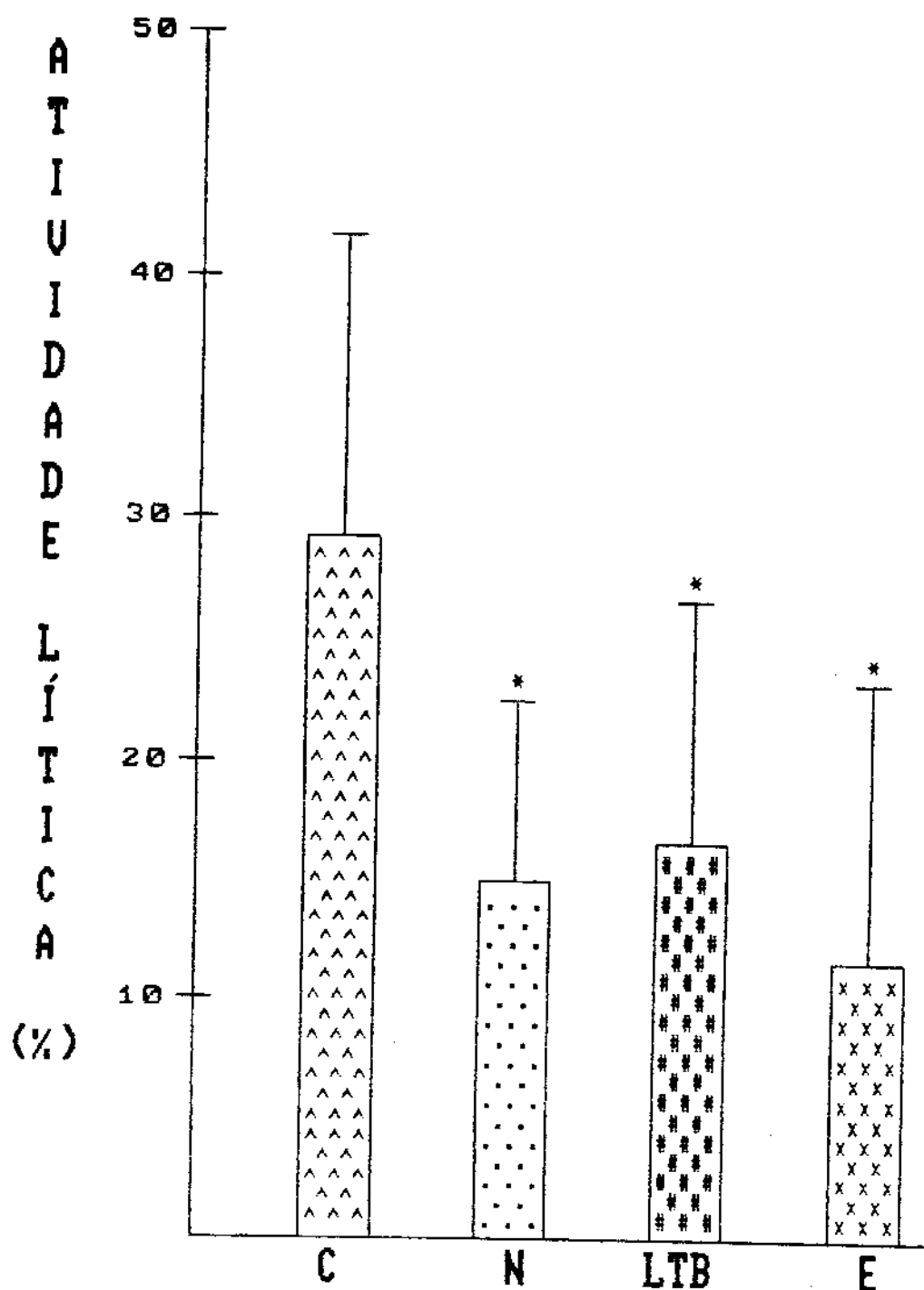


Figura 5 - Percentagem de lise de neutrófilos frente ao antígeno *Candida albicans* em intervalos de PbS nos níveis normais (N), dentro dos limites de tolerância biológica (LTB), excessivos (E) e controle (C). * $p < 0.05$

Tabela 9 - índices de correlação entre Atividade lítica, Imunoglobulinas e Plumbemia

Células	r	p
Neutrófilos		
<u>C. Pseudotrop.</u>	-0.41	-0.70 < p < -0.005
<u>C. albicans</u>	-0.20	-0.56 < p < 0.220
Monócitos		
<u>C. pseudotrop.</u>	0.10	-0.23 < p < 0.87
Imunoglobulinas		
IgG	0.103	-0.249 < p < 0.430
IgM	0.410	0.079 < p < 0.659
IgA	0.037	-0.310 < p < 0.375

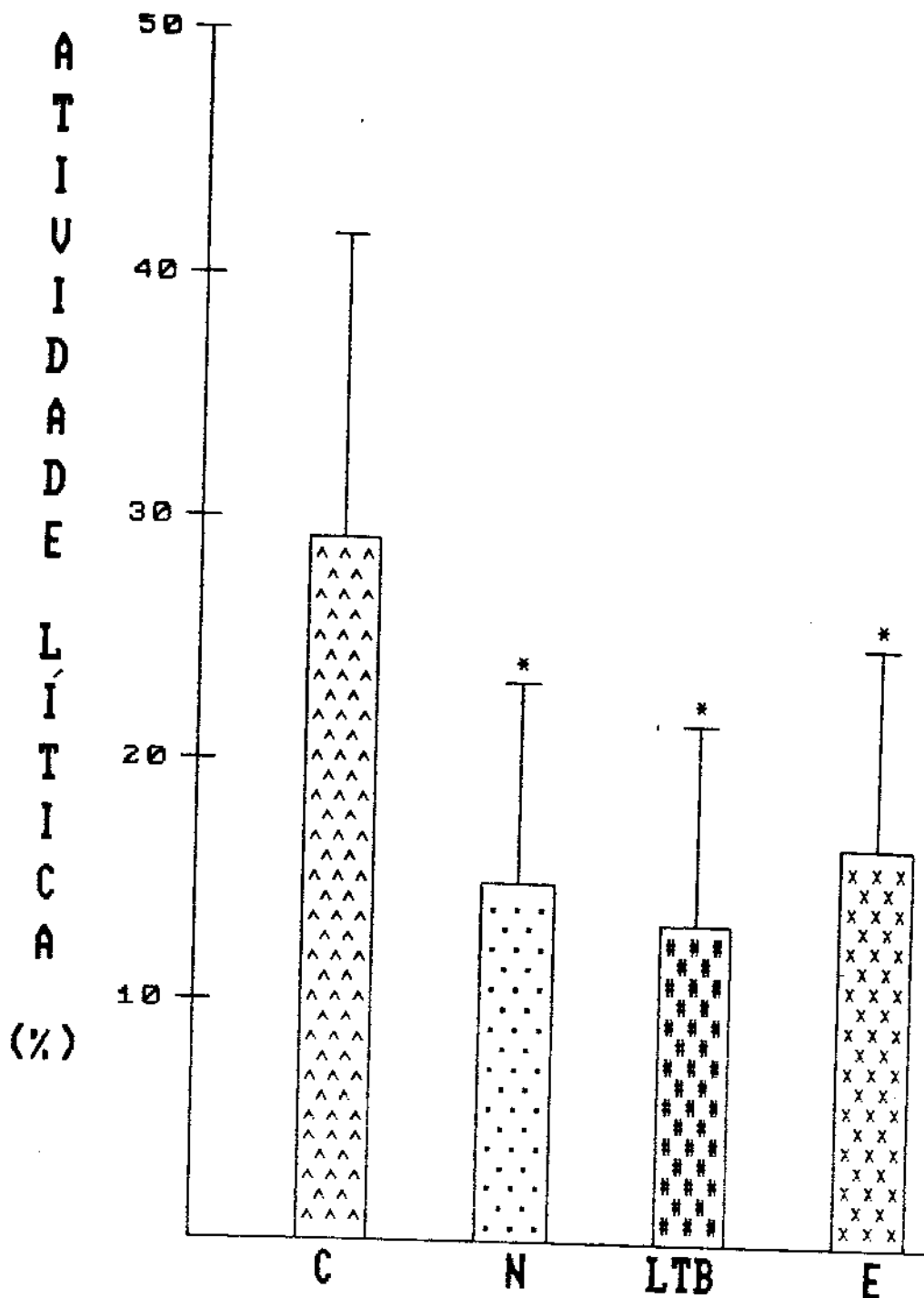


Figura 6 - Percentagem de lise de neutrófilos frente ao antígeno *Candida albicans* em intervalos de ALA-U nos níveis normais (N), dentro dos limites de tolerância biológica (LTB), excessivos (E) e controle (C). * $p < 0.05$

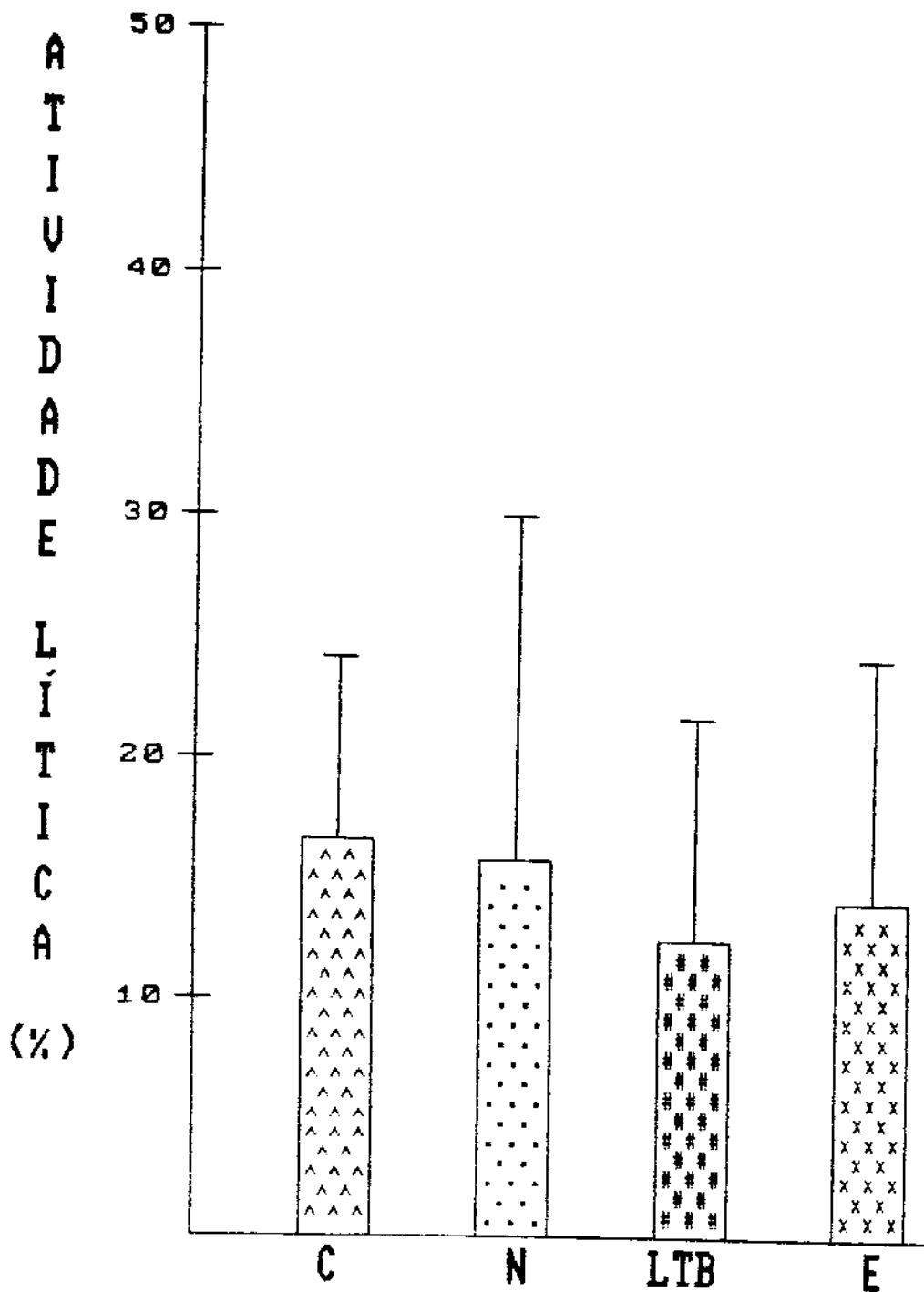


Figura 7 - Percentagem de lise de neutrófilos frente ao antígeno *Candida pseudotropicalis* em intervalos de ALA-U nos níveis normais (N), dentro dos limites de tolerância biológica (LTB), excessivos (E) e controle (C).

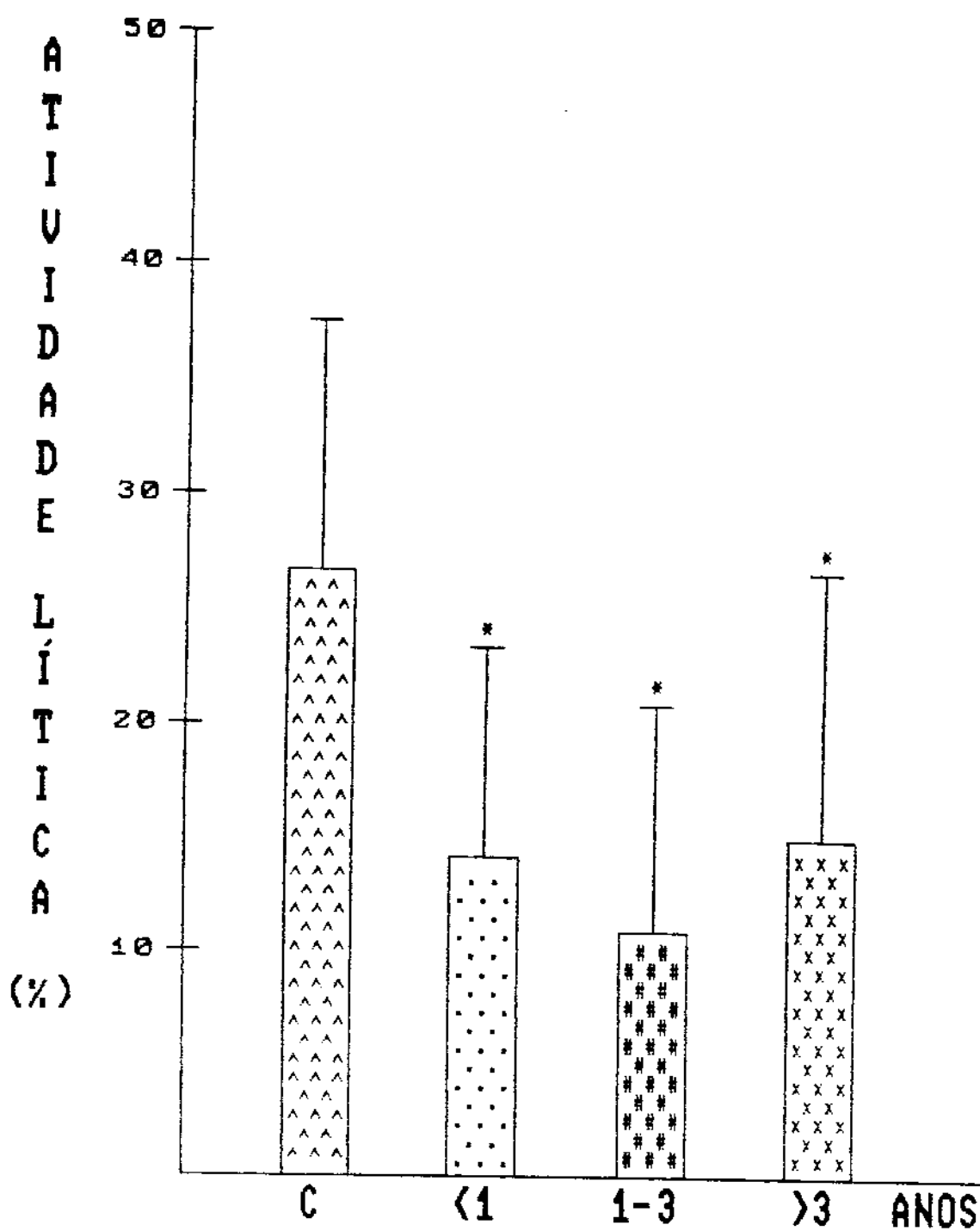


Figura 8 - Percentagem de lise de neutrófilos frente ao antígeno *Candida albicans* em intervalos de tempo de exposição
* $p < 0.05$

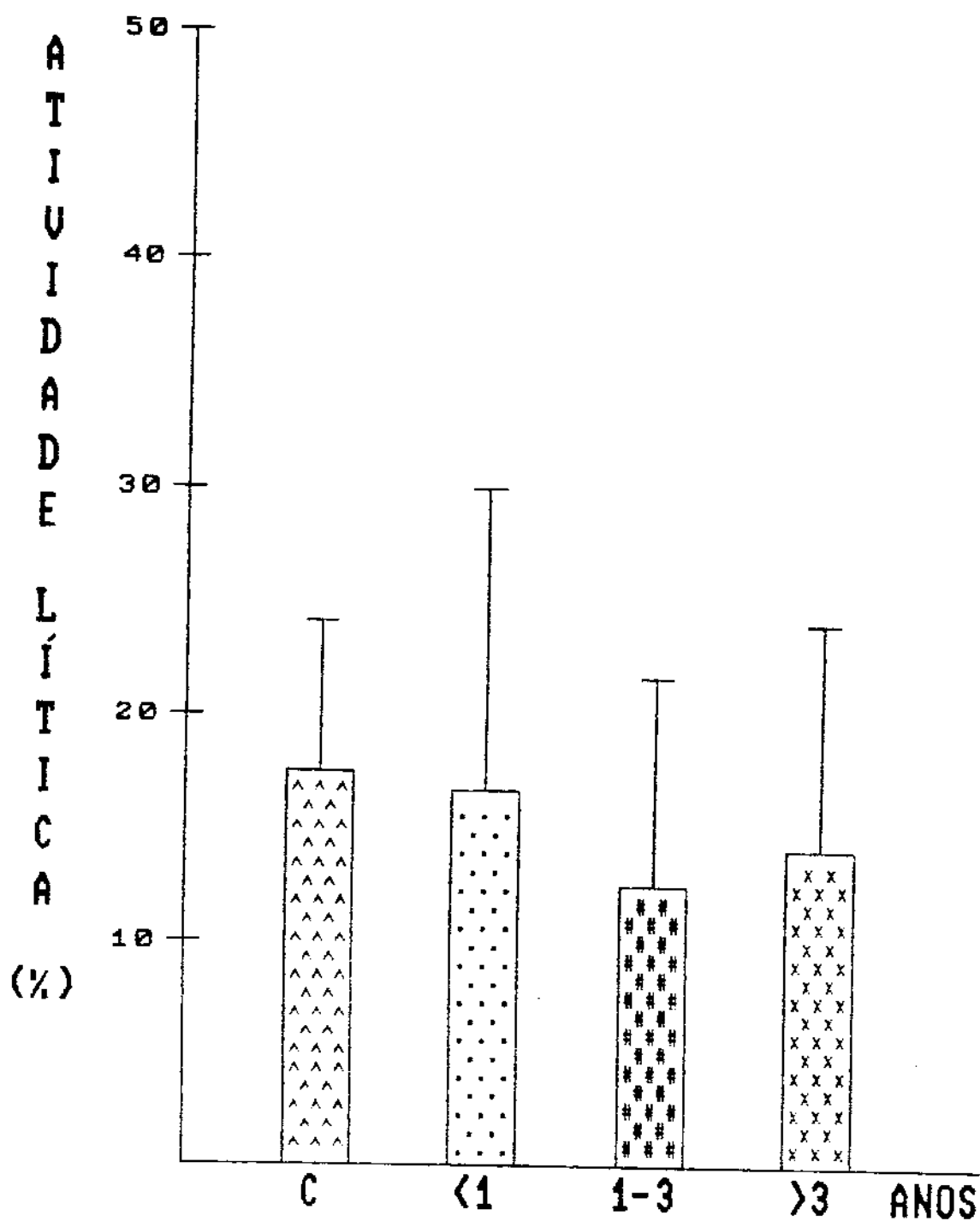


Figura 9 - Percentagem de lise de neutrófilos frente ao antígeno *Candida pseudotropicalis* em intervalos de tempo de exposição.

2- Capacidade fagocitária e lítica de monócitos frente ao antígeno C.pseudotropicalis

Foram estudados 56 indivíduos controles (tabela 5) e 48 indivíduos expostos ao chumbo (tabela 6). Como no caso dos neutrófilos, a capacidade fagocitária e lítica de monócitos frente ao antígeno C.pseudotropicalis também não mostrou diferença significativa em relação aos controles (figura 10, 11 e fotografias 5 e 6). Tal como no caso dos neutrófilos, não houve correlação entre os resultados de fagocitose e lise de monócitos e os níveis de ALA-U e plumbemia (tabela 9).

Os indivíduos foram divididos em subgrupos, de acordo com os diferentes níveis de PbS: normais, dentro dos limites de tolerância biológica e excessivos. Não observamos diferenças significativas entre estes subgrupos e os controles (figura 12). Também não houve diferenças relacionadas ao tempo de exposição (figura 13).

Tabela 5 - Valores de controles de Capacidade fagocitária e lise de monócitos frente à C. pseudotropicalis

Controles	Capacidade Fagocitária	Lise (%)	
1	135	16.3	
2	152	30.1	
3	216	7.4	
4	173	16.7	
5	149	16.0	
6	128	6.2	
7	173	8.6	
8	112	4.2	
9	158	14.5	
10	210	20.0	
11	131	62.5	
12	144	37.5	
13	159	24.5	
14	191	7.3	
15	147	8.0	
16	216	23.0	
17	198	6.0	
18	165	10.0	
19	143	16.1	
20	153	11.1	
21	142	11.0	
22	119	18.0	
23	146	29.5	
24	149	41.6	
25	143	36.0	
26	232	17.6	
27	164	26.2	
28	220	14.5	
29	120	39.2	
30	219	22.8	
31	213	29.1	
32	129	28.7	
33	133	16.0	
34	288	4.2	
35	231	18.6	
36	206	4.8	
37	242	10.0	
38	227	14.1	
39	138	14.4	
40	91	34.0	
41	128	14.8	
42	170	12.1	
43	158	5.1	
44	232	23.2	
45	92	17.3	
46	155	5.2	
47	100	9.0	
48	140	32.8	
49	192	15.1	
50	187	16.6	
51	134	9.7	
52	139	7.9	
53	167	5.9	
54	174	9.7	
55	163	7.3	
	Média	Desvio	Erro
Fagocitose:	163	41	5.6
Lise:	17.2	11.7	1.6

Tabela 6 - Idade, Tempo de Exposição, Plumbemia, ALA-U, Capacidade Fagocitária e lítica de Monócitos frente à *C. pseudotropicalis*

Paciente	Idade (anos)	Tempo Expos (meses)	PbS (ug/dl)	ALA-U (mg/l)	Capac Fag	Lise (%)
R.P.S.	27	84	63			
J.C.C.	30	120	95	4.8	168	10.2
C.A.	25	2	56	13.3	196	17.3
C.R.M.C.	22	3	61	-	202	3.0
G.B.A.	18	48	119	-	154	13.0
V.B.S.	18	7	104	-	221	2.3
J.C.F.M.	16	27	111	-	208	8.6
J.C.B.	25	7	77	-	253	3.5
A.M.C.	32	290	110	-	257	7.4
C.R.C.	21	9	96	-	161	2.5
M.A.M.	18	3	210	-	140	3.6
A.S.F.	49	132	38	-	192	7.3
B.M.	48	240	82	-	155	11.0
J.L.	27	94	61	-	169	9.5
H.H.L.	25	6	66	-	180	11.7
M.A.M.	23	4	70	-	134	22.3
J.B.S.	29	10	154	-	143	17.0
P.R.	39	312	60	64.2	85	43.0
A.C.S.	27	17	62	-	136	34.5
J.M.	40	6	52	2.7	133	33.1
J.F.F.	29	3	50	13.2	137	5.1
J.F.M.S.	39	18	57	-	233	7.1
E.A.P.	24	32	70	2.3	207	4.3
E.F.	33	24	50	6.9	177	7.9
D.V.C.	34	24	31	-	191	4.7
J.C.L.S.	33	6	59	1.0	130	6.9
F.S.P.	19	7	12	9.3	174	13.2
F.E.	35	12	31	4.1	187	18.2
J.V.S.	22	6	25	4.6	223	7.2
A.C.O.B.	26	13	21	2.6	139	9.3
A.J.S.	43	13	21	4.1	176	18.2
D.A.M.	23	3	14	6.2	168	11.9
H.C.C.	43	26	54	5.6	171	10.5
C.R.F.	26	12	74	0.3	199	7.5
A.A.M.	35	120	63	0.8	227	13.6
J.S.N.	24	30	44	2.0	192	24.5
A.C.	51	132	34	1.0	274	5.5
I.C.L.	33	13	38	3.8	132	14.0
E.D.C.	23	44	18	3.7	192	25.5
G.A.S.	21	15	66	-	171	10.0
S.R.	43	12	67	5.2	160	19.4
D.M.	24	24	67	3.7	193	24.3
E.M.	30	60	32	1.0	95	41.0
A.A.A.	43	6	57	9.0	286	5.2
I.G.S.	32	216	51	50.0	159	7.5
J.E.B.	40	54		-	176	22.0
					138	7.9

Valores Normais: Fagocitose = 163 ± 32
Lise = 17 ± 11.8

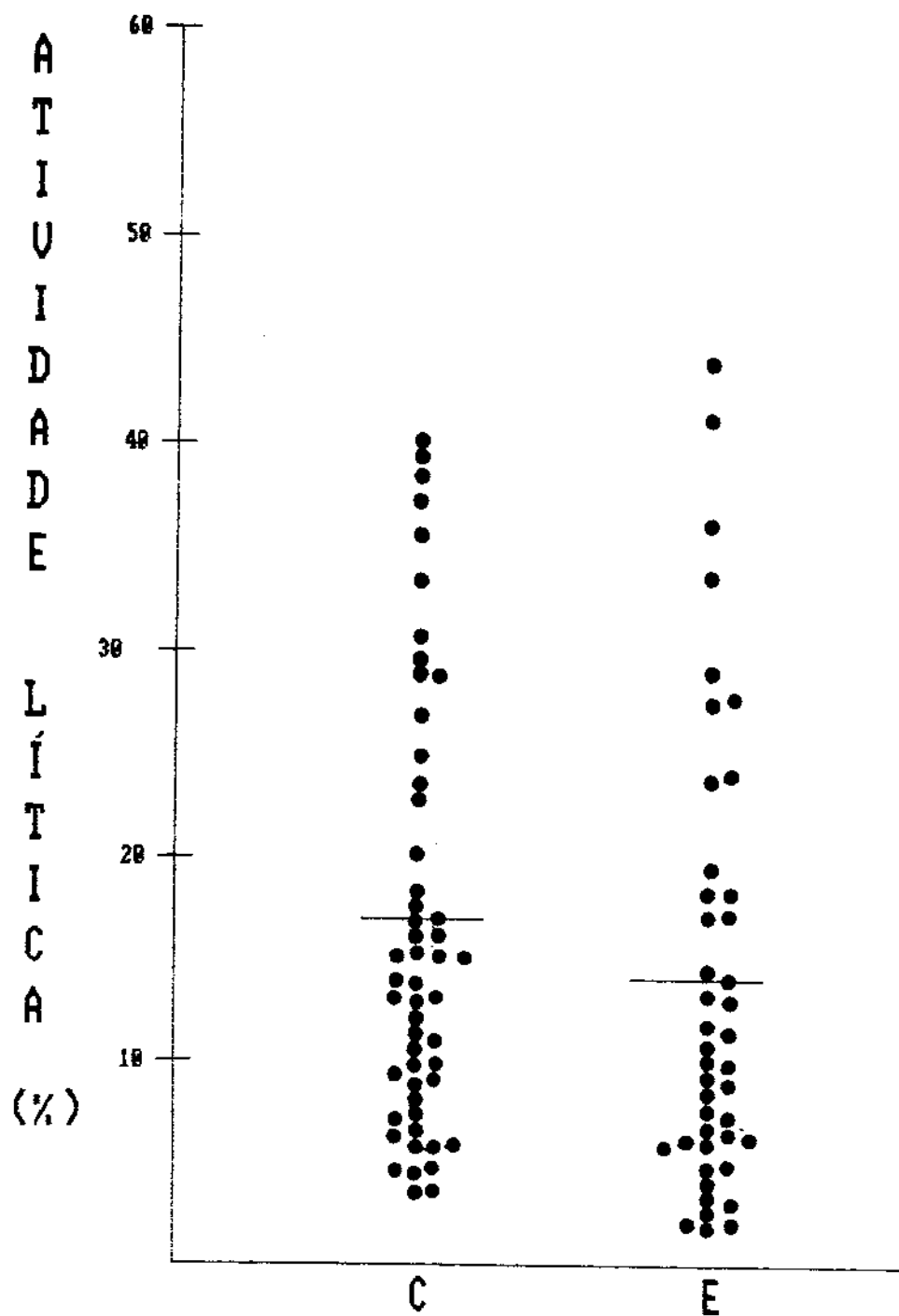


Figura 10- Atividade lítica de monocitos frente ao antígeno Candida pseudotropicalis de indivíduos controle (C) e indivíduos expostos ao chumbo. Teste t de Student ($p < 0.4$)

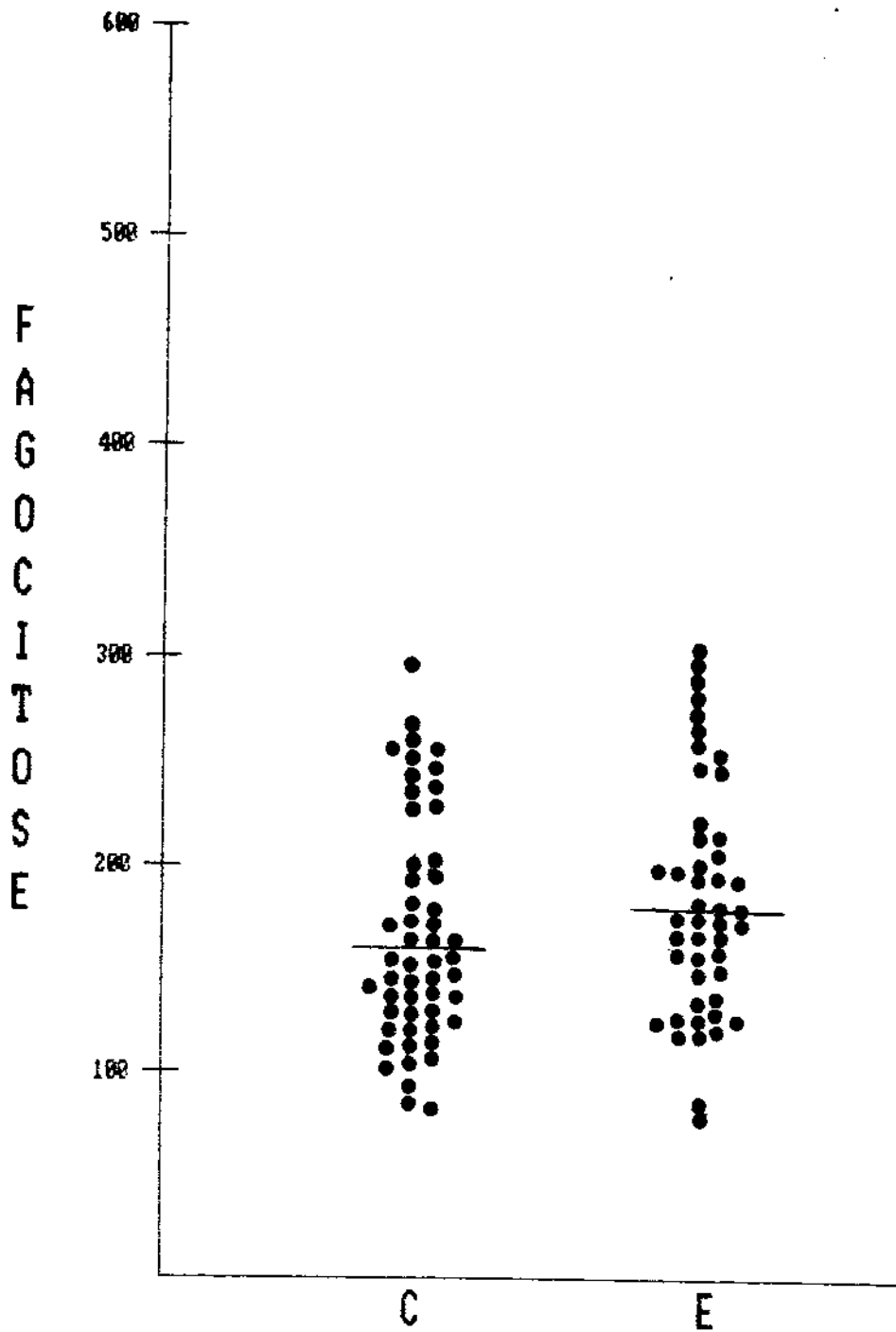
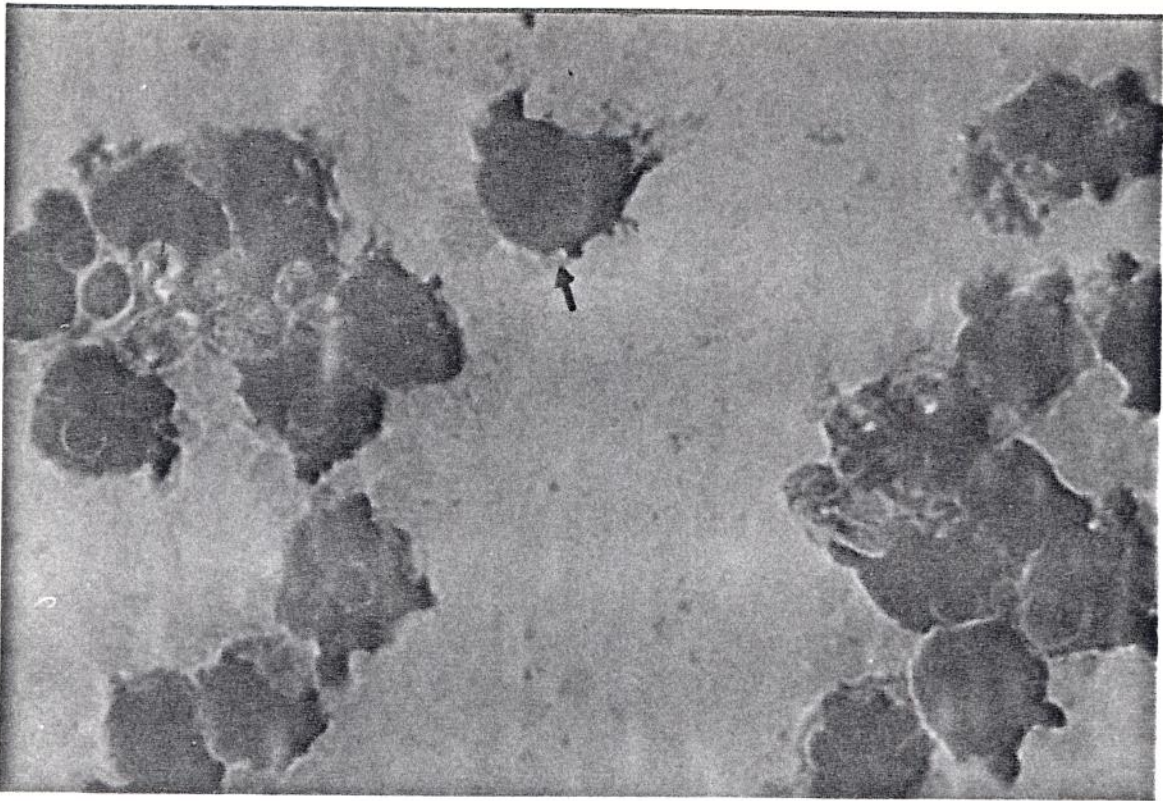
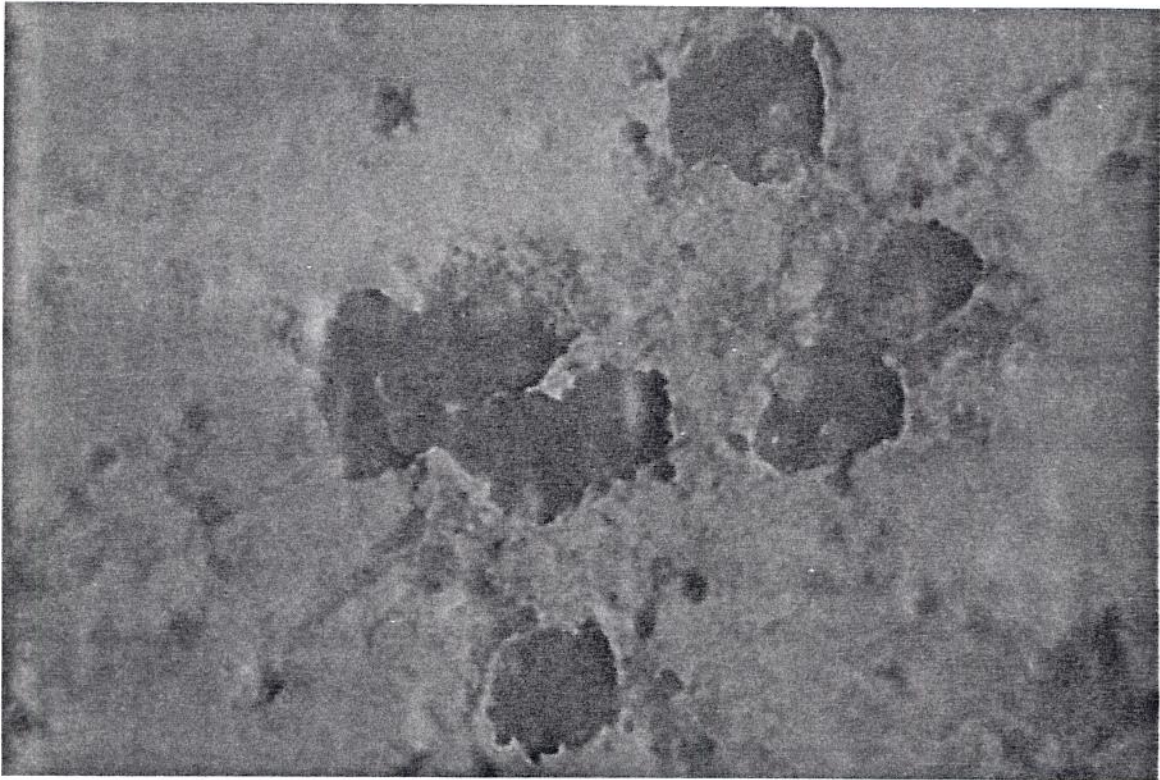


Figura 11- Atividade fagocitária de monócitos frente ao antígeno Candida pseudotropicalis de indivíduos controle (C) e indivíduos expostos ao chumbo. Teste t de Student ($p < 0.4$)

5



6



Fotografias 5 e 6 - Aspecto microscópico de fagocitose e lise (→) de C. pseudotropicalis por monócitos (→) de um controle (5) e um indivíduo exposto ao chumbo (6). Aumento 1000x

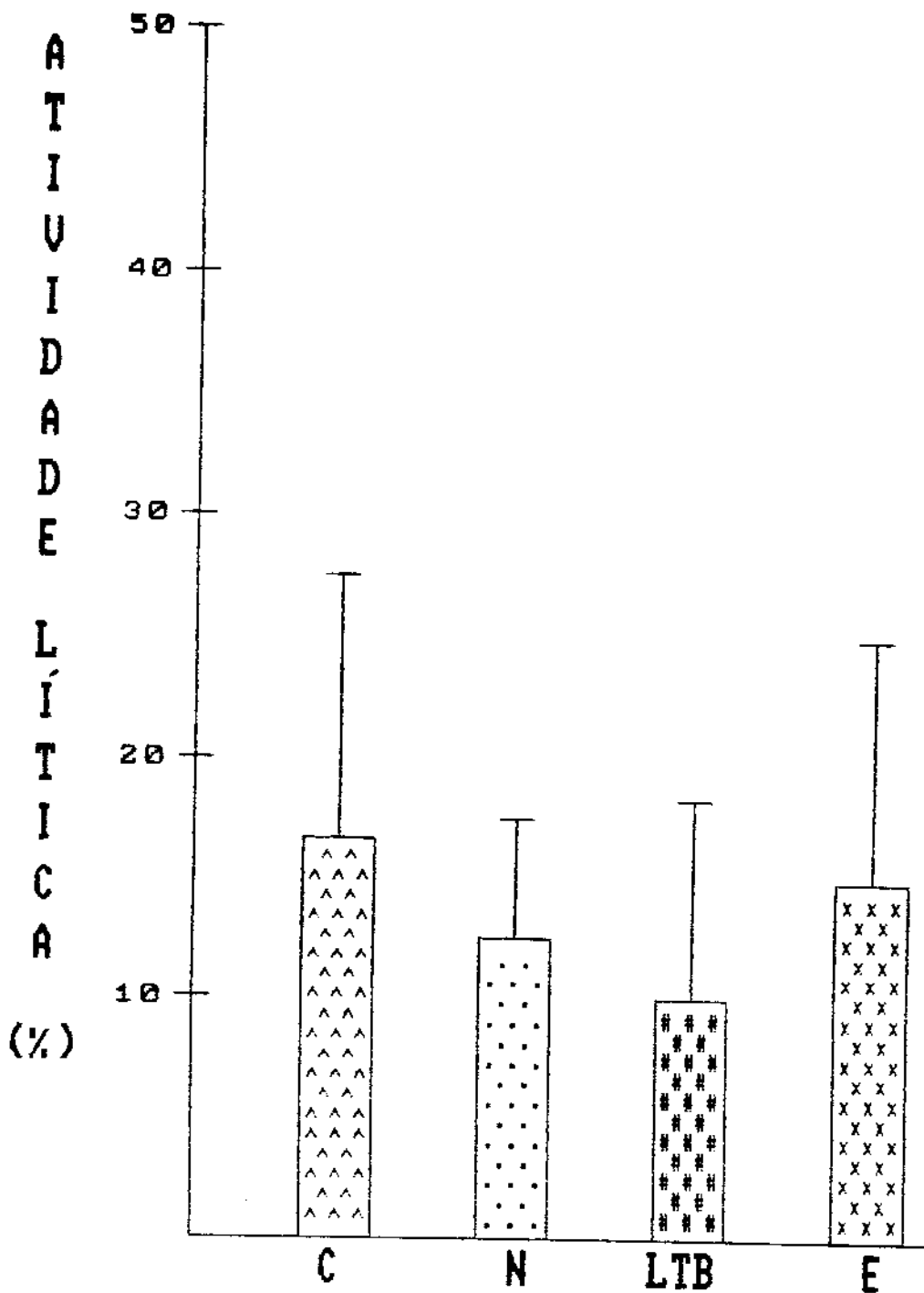


Figura 12- Percentagem de lise de monócitos frente ao antígeno *Candida pseudotropicalis* em intervalos de PbS nos níveis normais(N), dentro dos limites de tolerância biológica(LTB), excessivos(E) e controle(C).

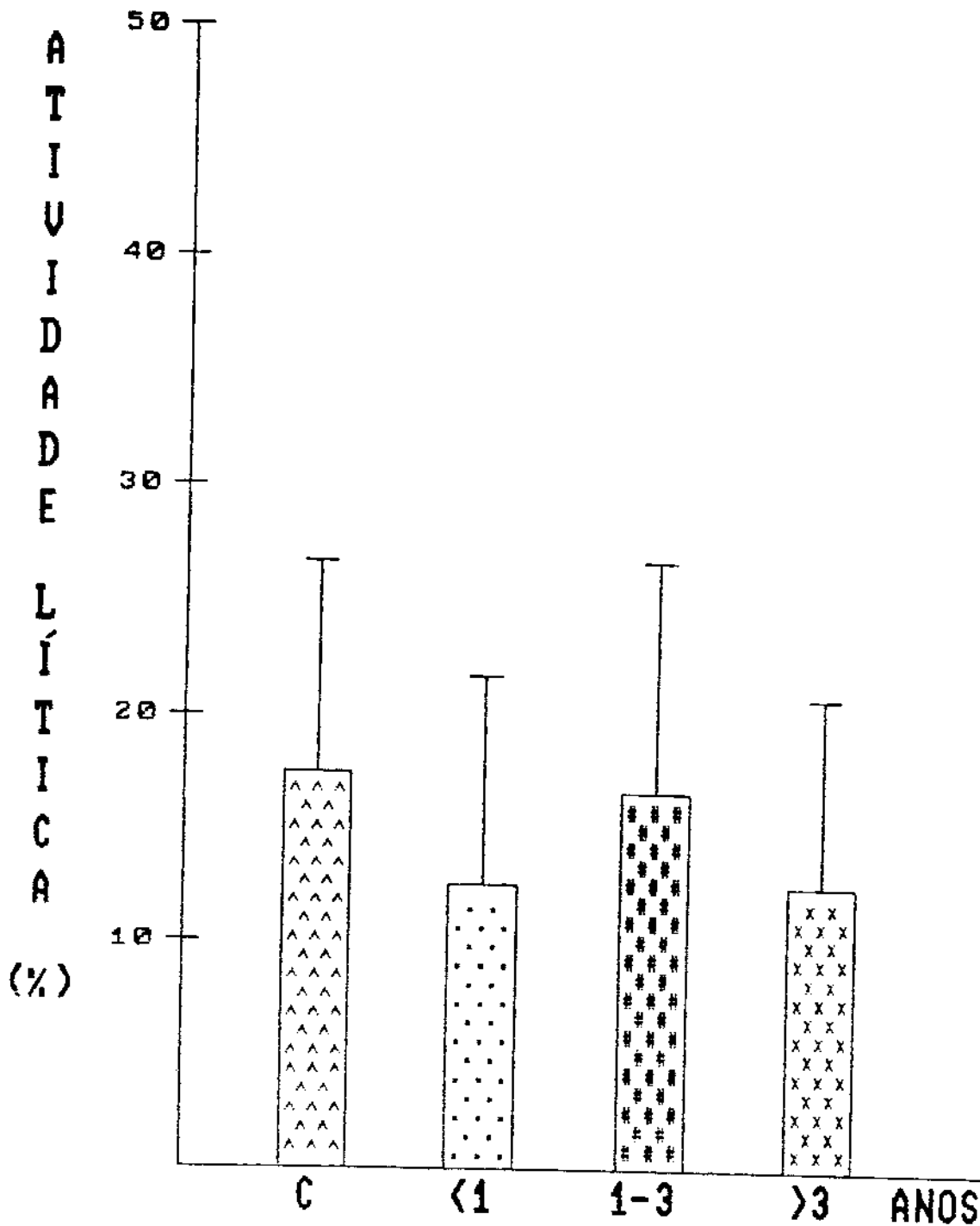


Figura 13- Percentagem de lise de monócitos frente ao antígeno *Candida pseudotropicalis* em intervalos de tempo de exposição.

3- Dosagens de Imunoglobulinas IgG, IgM, IgA

Analisamos as concentrações de IgG, IgM e IgA através do método de imunodifusão radial simples em 33 indivíduos com exposição ao chumbo (tabela 7) e 30 controles. Utilizando o teste "t" nos resultados obtidos, constatamos um aumento significativo nas concentrações de IgM e IgA ($p < 0.05$) dos indivíduos expostos (figura 14). Os níveis de IgG mantiveram-se inalterados (figura 14). Ao dividirmos os indivíduos em subgrupos de acordo com os diferentes níveis de PbS: normal, dentro dos limites de tolerância biológica e excessivos, observamos que, apenas os níveis de IgM apresentaram-se significativamente aumentados ($p < 0.05$, ANOVA e teste de Duncan) nos três subgrupos (figura 16). Em relação ao tempo de exposição, os níveis de IgM apresentaram aumento significativo a partir de três meses até mais de três anos de exposição (figura 15). Os níveis de IgA e IgG mantiveram-se inalterados nos diferentes níveis de PbS e com o tempo de exposição (figuras 17 e 18).

Com relação a ALA-U os resultados foram semelhantes aos de PbS. Houve um aumento significativo de IgA e IgM quando divididos em subgrupos, apenas os níveis de IgM apresentaram aumento significativo nos dois subgrupos: nos níveis normais e dentro dos limites de tolerância biológica (figura 19). Os níveis de IgG e IgA permaneceram dentro dos níveis normais com o tempo de exposição e nos diferentes níveis de PbS.

Não houve correlação entre as concentrações das imunoglobulinas G, M e A e os níveis de plumbemia e ALA-U (tabela 9).

Tabela 7 - Idade, Tempo de Exposição, Plumbemia, ALA-U e concentrações de Imunoglobulinas IgG, IgA, IgM

Paciente	Idade (anos)	Tempo Expos (meses)	PbS (ug/dl)	ALA-U (mg/l)	IgG (mg/dl)	IgA (mg/dl)	IgM (mg/dl)
E.L.S.	24	48	61	8.8	1450	230	210
P.H.F.	18	60	80	16.0	1250	290	170
R.B.	42	12	79	-	1300	250	190
A.J.S.	51	120	47	6.6	1400	440	190
R.F.	71	600	50	13.9	1150	130	135
N.C.	32	300	69	24.8	1680	520	195
A.M.C.	30	300	110	-	1800	420	110
J.J.N.	23	18	64	-	1350	280	420
A.C.C.	30	264	77	-	1150	180	220
F.S.P.	19	7	12	4.1	1955	568	190
A.C.	51	132	34	3.8	955	265	58
I.C.L.	33	13	38	3.7	1350	185	105
D.M.	24	24	67	1.0	1400	355	190
H.C.C.	43	26	54	0.3	1600	522	308
J.S.N.	24	30	44	1.0	1660	420	208
E.D.C.	23	44	18	-	800	220	400
J.V.S.	22	6	25	2.6	1650	338	190
A.A.M.	35	120	63	2.0	1155	392	255
D.V.C.	34	24	31	0.7	1350	265	98
A.A.	43	6	56	50.0	1340	338	217
J.C.L.S.	33	6	59	9.3	1400	432	217
F.E.	35	12	50	4.6	1550	168	208
G.A.S.	21	15	65	5.2	850	175	268
E.A.P.	24	30	70	6.9	1400	327	132
J.M.	40	6	52	13.2	1400	555	155
E.F.	33	24	50	-	1550	275	228
J.F.M.F.	39	18	57	2.3	1400	587	228
J.F.F.	29	3	50	-	1650	150	100
A.J.S.	43	13	21	6.2	1155	198	157
E.M.	30	60	32	9.0	900	355	255
A.C.O.B.	26	13	21	4.1	1600	198	248
D.A.M.	23	3	14	5.6	1400	598	422
C.R.M.C.	22	3	61	-	2100	232	248

Valores Normais: IgG = 1245 + 293
 IgA = 256 + 103
 IgM = 122 + 49

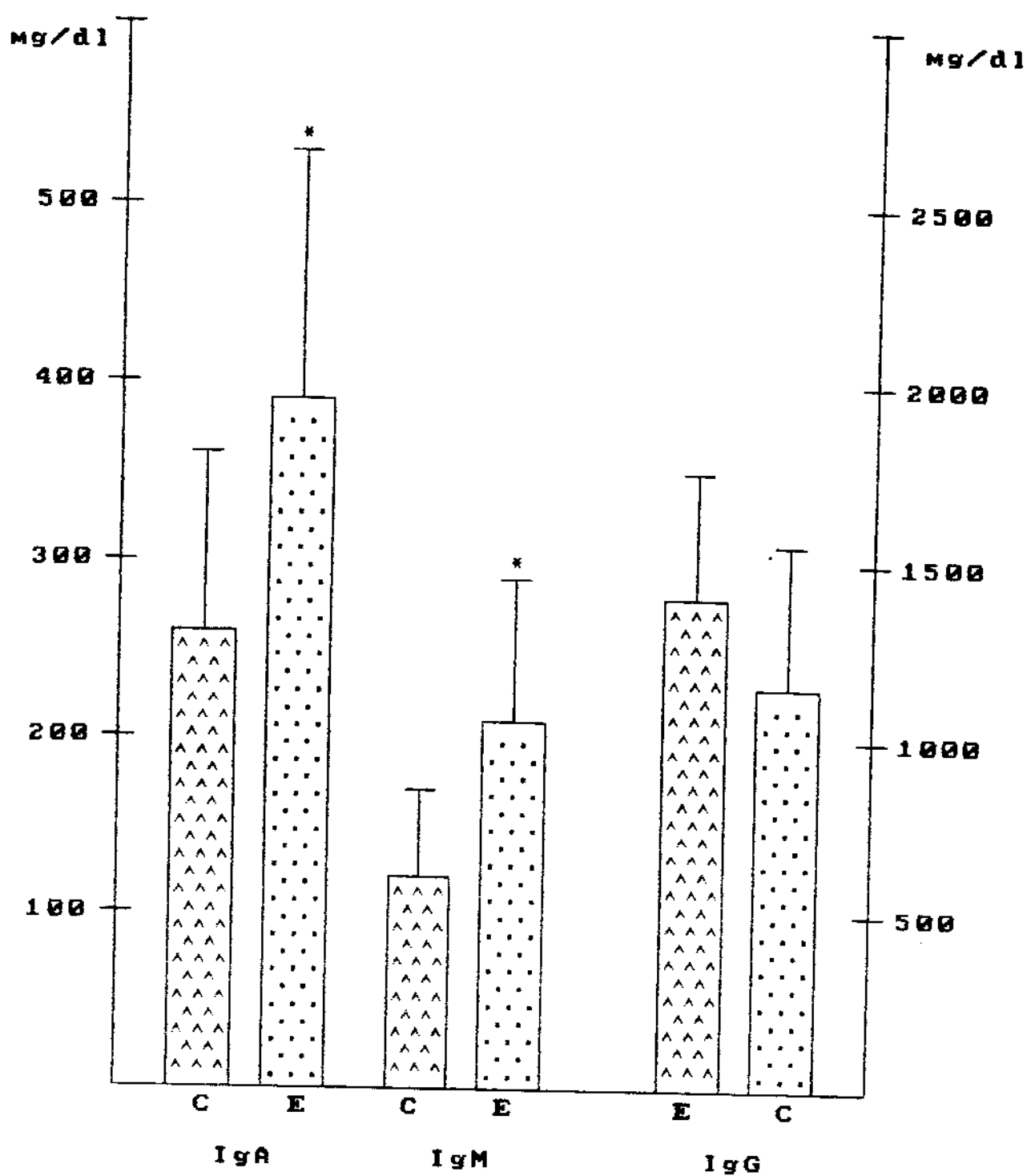


Figura 14 - Concentrações de Imunoglobulinas IgG, IgM e IgA de indivíduos expostos (E) e controle (C) em relação à plumbemia. * $p < 0.05$

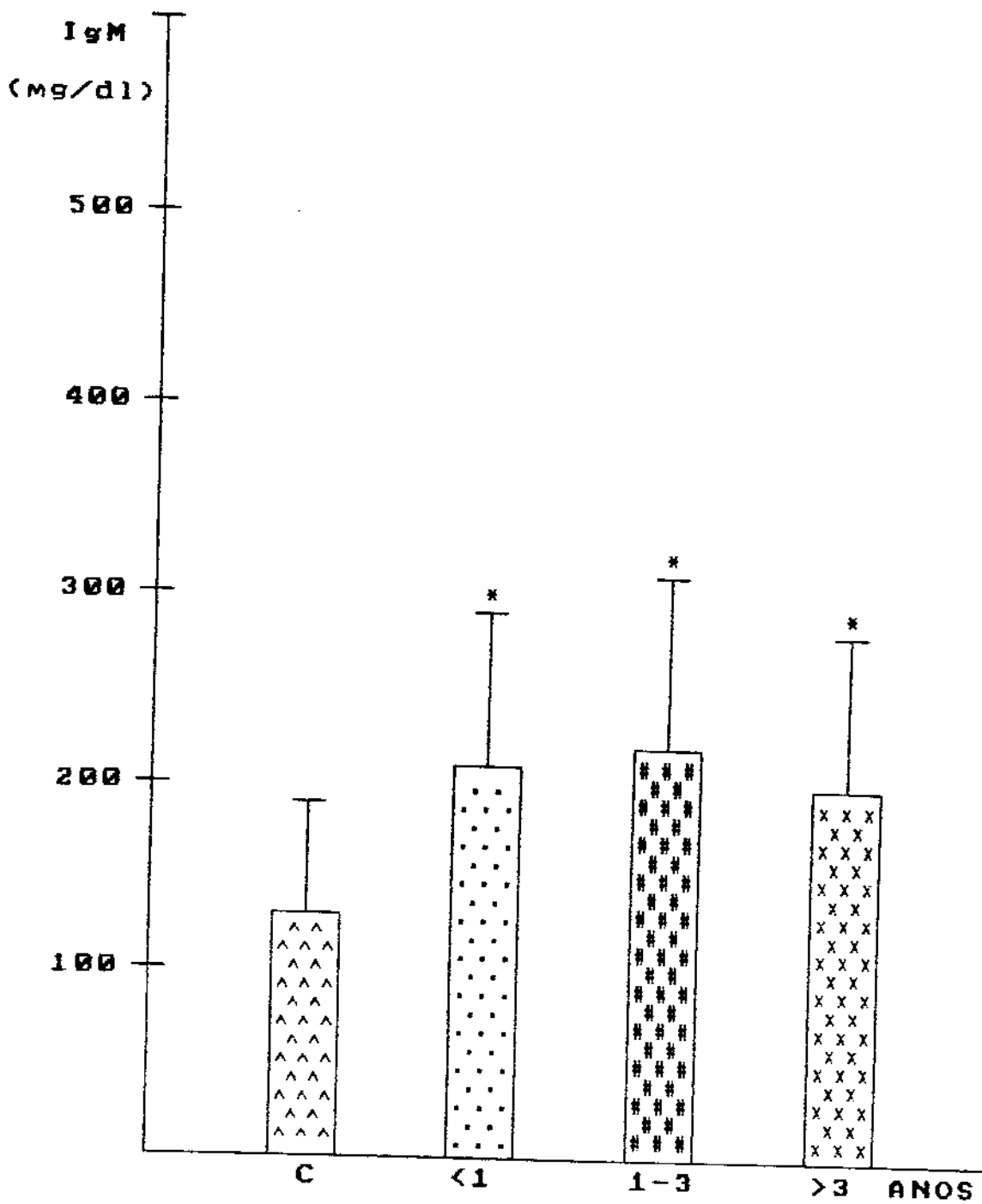


Figura 15 - Concentrações de IgM em intervalos de tempo de exposição.
* $p > 0.05$

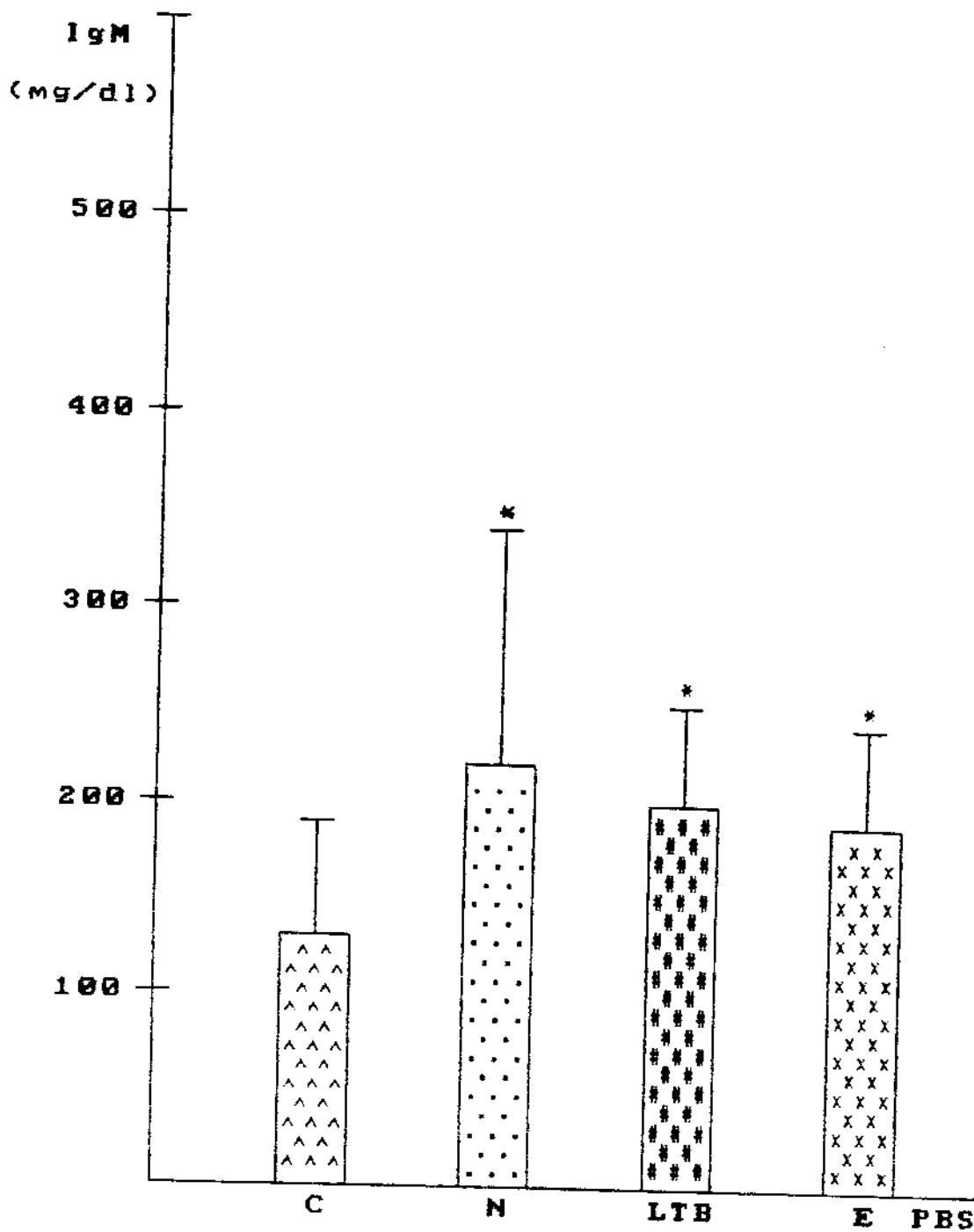


Figura 16 - Concentrações de IgM em intervalos de plumbemia nos níveis normais(N), dentro dos limites de tolerância biológica(LTB) e excessivos(E). * $p < 0.05$

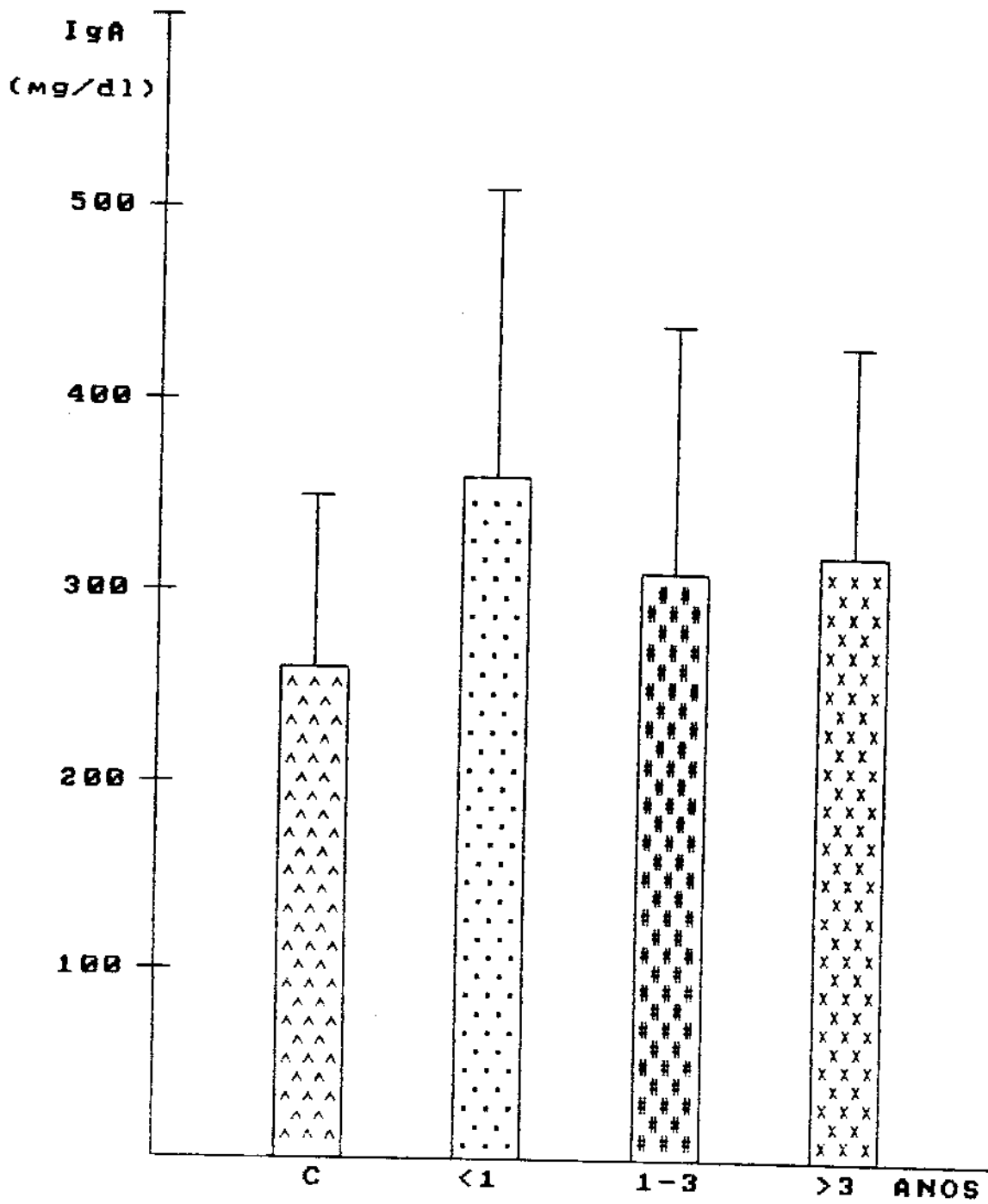


Figura 17 - Concentrações de IgA em intervalos de tempo de exposição.

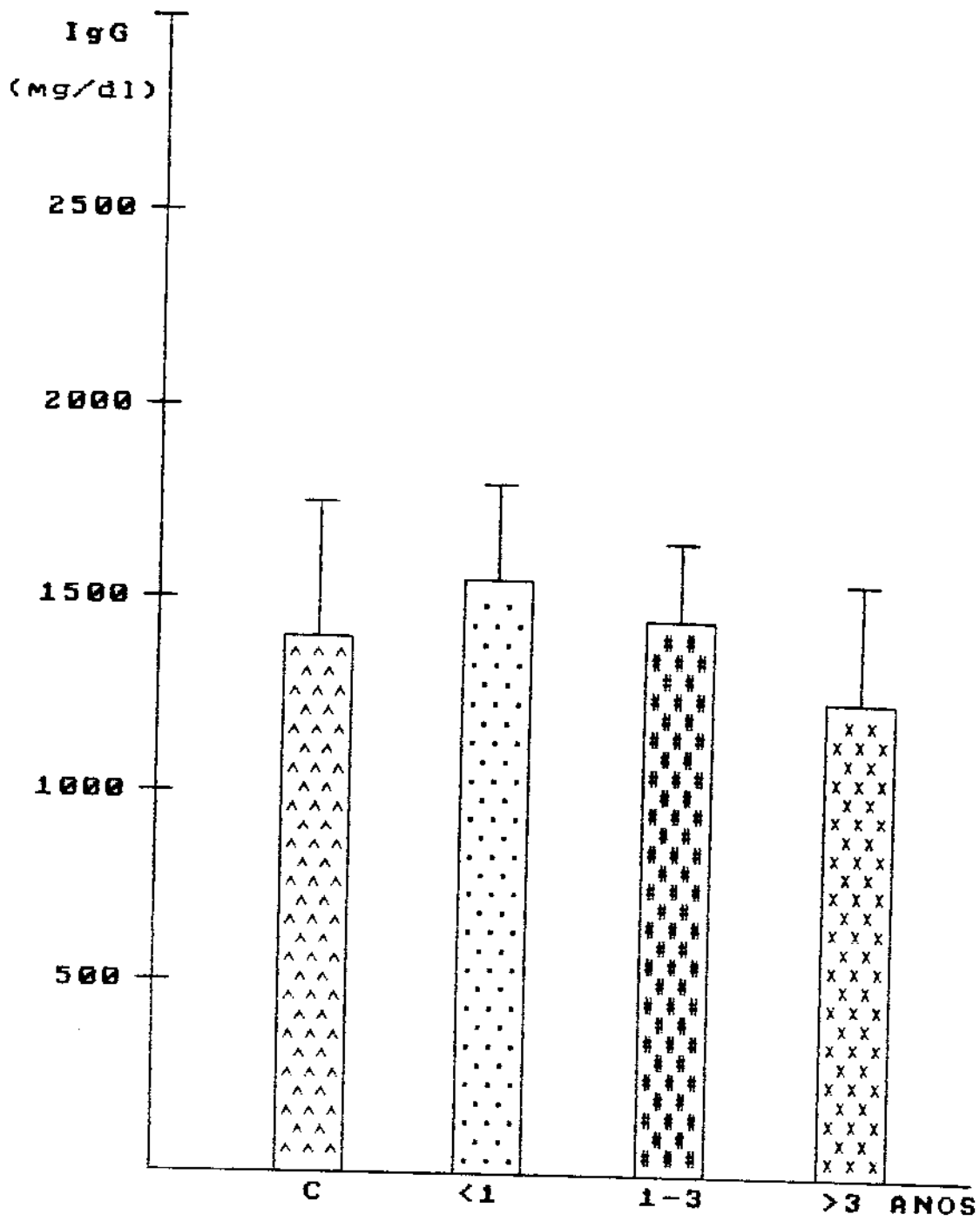


Figura 18 - Concentrações de IgG em intervalos de tempo de exposição.

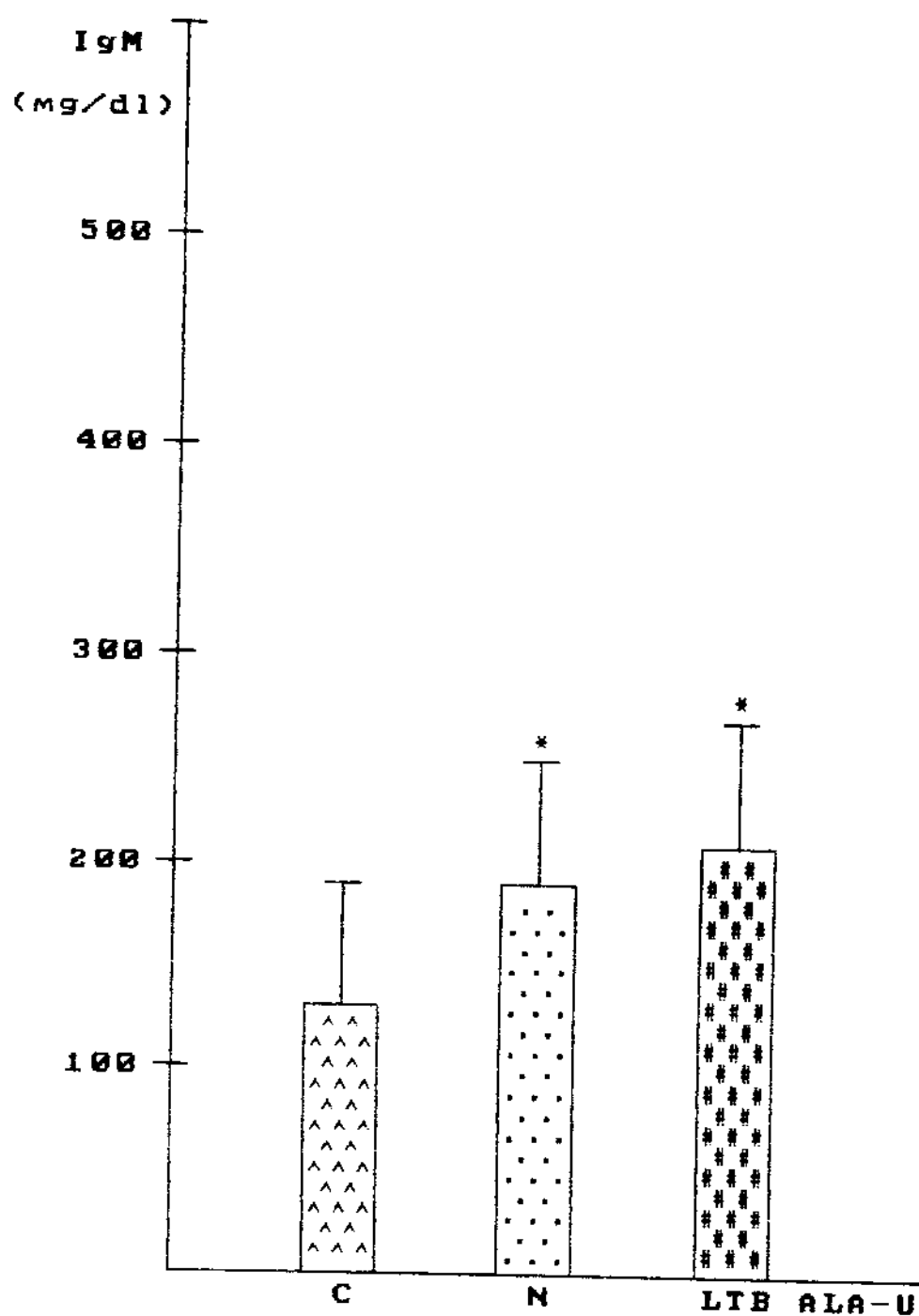


Figura 19 - Concentrações de IgM em intervalos de ALA_U nos níveis normais(N) e dentro dos limites de tolerância biológica(LTB). * $p < 0.05$

4- Cultura de Linfócitos

A transformação blástica de linfócitos frente a phytohemaglutinina (PHA, um mitógeno que estimula a proliferação de linfócitos T) foi estudada em 16 indivíduos com exposição ao chumbo. Os resultados apresentados na tabela 8 nos mostram que em 43% dos indivíduos houve redução na proliferação blástica e 50% foi normal em relação ao controle.

Aplicando o teste "t" de Student nestes resultados não observamos alteração significativa na proliferação blástica de linfócitos em relação aos controles (figura 20).

Classificando os indivíduos de acordo com os níveis de chumbo no sangue (normais, dentro dos LTB e excessivos), os níveis de ALA-U e o tempo de exposição, também não constatamos diferenças significativas entre os grupos expostos e o grupo controle.

Tabela 8 - Idade, Tempo de Exposição, Plumbemia, ALA-U, Transformação Blástica de linfócitos(TBL) com e sem estímulo com PHA de indivíduos expostos ao chumbo

Paciente	Idade (anos)	Tempo expos (meses)	PbS (ug/dl)	ALA-U (mg/l)	TBL s/ PHA (cpm)	TBL c/ PHA (cpm)
A.C.	51	132	32	3.8	257	21720
I.C.L.	33	12	39	3.7	325	40343
E.D.C.	23	44	21	-	388	52005
G.A.S.	21	15	44	5.2	313	71004
V.F.	20	19	30	-	629	37865
L.F.S.	21	42	28	-	774	52865
controle	-	-	-	-	774	118841
S.R.	43	12	57	3.7	4734	10254
controle	-	-	-	-	5455	10009
D.M.	24	24	52	1.0	107	2946
controle	-	-	-	-	223	3106
E.M.	30	60	32	9.0	683	12592
controle	-	-	-	-	822	2708
I.G.S.	32	216	128	-	213	52107
controle	-	-	-	-	254	26113
D.G.O.	21	3	76	26.5	280	56642
C.R.B.	23	2	-	18.7	278	40716
controle	-	-	-	-	146	49424
H.G.O.	24	30	-	106.0	215	47827
G.G.S.	23	6	-	72.8	249	33565
V.M.S.	25	36	-	28.2	146	47023
controle	-	-	-	-	210	42351

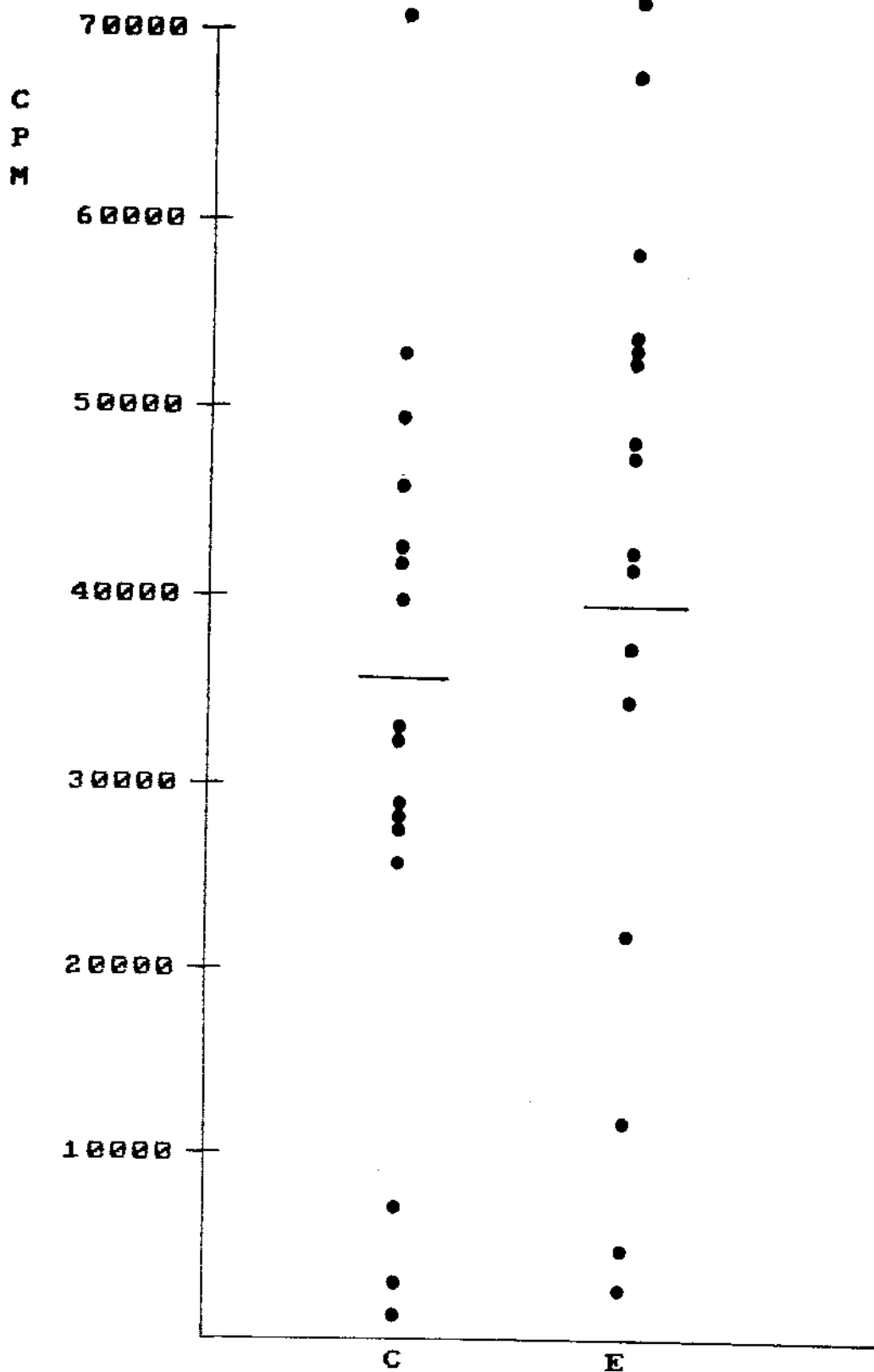


Figura 20 - Transformação blástica de linfócitos, estimulados por PHA de indivíduos expostos (E) ao chumbo e controle (C) em relação a plumbemia.

DISCUSSÃO

Estudamos, neste trabalho, alguns parâmetros da resposta imunológica em indivíduos com exposição ocupacional ao chumbo. Os níveis de plumbemia e de ácido delta-aminolevulínico urinário (ALA-U) foram utilizados como indicadores de exposição e de efeito, respectivamente.

O índice biológico de exposição pode ser avaliado em função dos teores de chumbo ou dos efeitos de exposição no plasma ou na urina. Com estes índices, há o estabelecimento dos limites de tolerância biológica (LTB) que expressam as concentrações limites do agente tóxico ou de seus produtos nos fluidos biológicos. Estas concentrações são aceitas como aquelas que não produzem efeitos danosos à saúde do indivíduo ocupacionalmente exposto.

No Brasil, os limites de tolerância biológica são determinados pela portaria No 12/83 (norma regulamentadora N07-Anexo II) do Ministério do Trabalho. Esta portaria regulamenta os níveis de chumbo no sangue, padronizando os valores normais em até 40 ug/dl e os limites de tolerância biológica em até 60 ug/dl. O ALA-U é considerado normal com valores até 4.5 mg/l, sendo que o limite de tolerância biológica (LTB) é de 15 mg/l (Larini 1987).

O chumbo apresenta uma configuração eletrônica que lhe confere estado de oxidação +2 e um orbital 6p livre, tendo então, a capacidade de coordenar átomos de enxofre de compostos biológicos e, também grupos amínicos, carboxílicos e imidazólicos. Nestas circunstâncias, o chumbo pode provocar alterações nas estruturas terciárias de moléculas bioquímicas e, ao mesmo tempo, alterar ou

destruir a função bioquímica normal.

Na biossíntese da molécula do heme, o chumbo pode interferir inibindo a síntese do ácido delta-aminolevulínico (ALA), um dos produtos intermediários, através do bloqueio da enzima ALA desidratase que catalisa a reação do ALA em porfobilinogênio (figura 21). Desta forma, há um acúmulo de ALA no plasma, o qual sofre filtração glomerular sendo então eliminado pela urina. Este produto pode ser detectado por espectrofotometria. (Larini, 1987)

Outras duas enzimas envolvidas na síntese do heme são inibidas pelo chumbo. Uma, é a coproporfobilinogênio descarboxilase, inibição esta observada pela eliminação excessiva de coproporfirina na urina (Copro-U). A outra enzima, é a hemesintetase, a última enzima envolvida na biossíntese do heme. Sua inibição pode contribuir para o aparecimento de anemia sideroblástica durante a intoxicação por chumbo (saturnismo) e no acentuado aumento da síntese de protoporfirina (Putnan, 1986).

Para as correlações entre os parâmetros imunológicos e os níveis de plumbemia e de ALA-U, os indivíduos expostos foram divididos em três subgrupos de acordo com os diferentes níveis destes indicadores no sangue e na urina a saber: indivíduos com valores normais, com valores dentro dos limites de tolerância biológica e com valores excessivos de PbS e de ALA-U. Foram estudados 60 indivíduos. A plumbemia foi avaliada nos 60 indivíduos e ALA-U em 38 destes indivíduos.

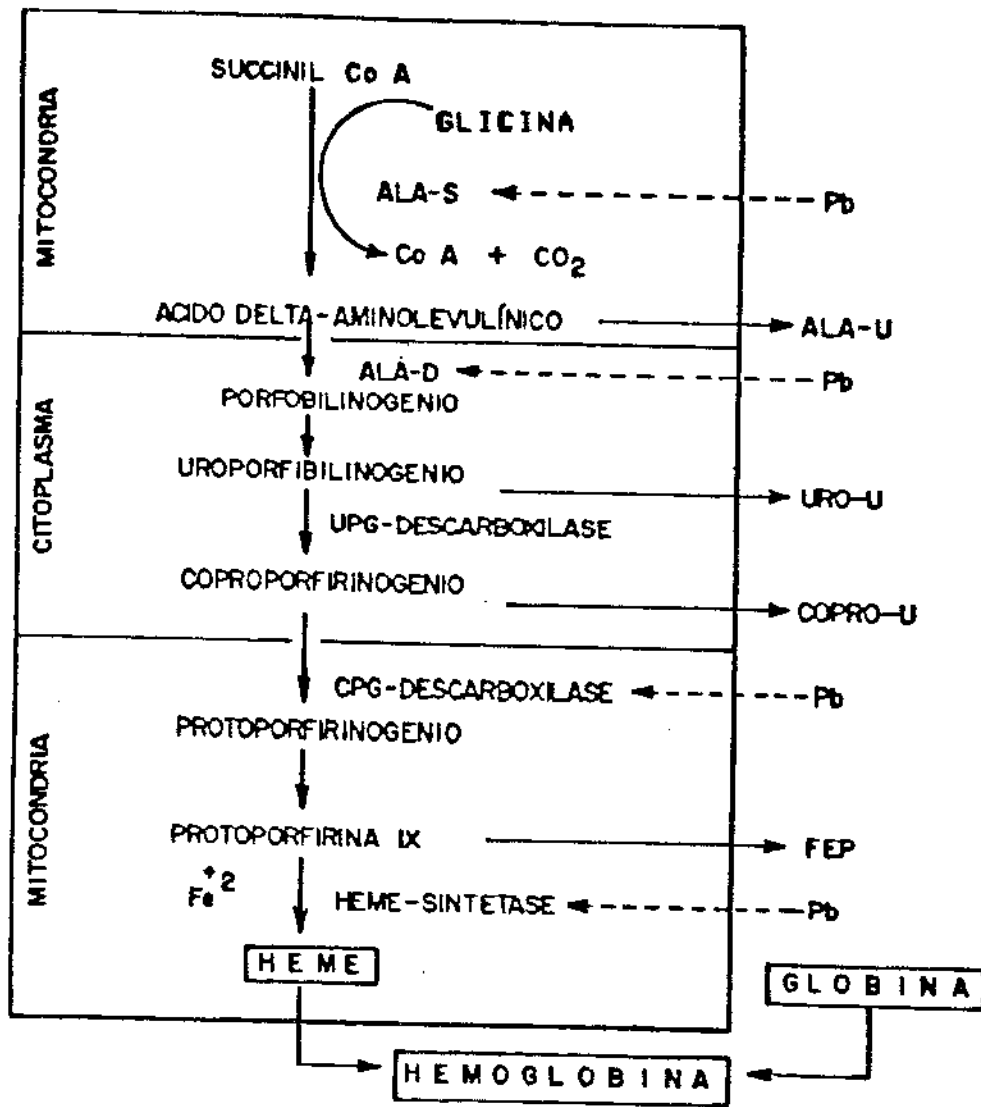


Figura 21- Síntese do Heme e as interferências causadas pelo chumbo

1- Capacidade fagocitária e lítica de neutrófilos frente às C. albicans e C. pseudotropicalis e monócitos frente à C. pseudotropicalis

O estudo da capacidade fagocitária permite avaliar o sistema de defesa do organismo onde estão envolvidos processos de engolfamento e de digestão de antígenos. Estes processos são realizados por células chamadas fagocíticas mononucleares, os monócitos e os macrófagos além de polimorfonucleares, os neutrófilos e

os eosinófilos.

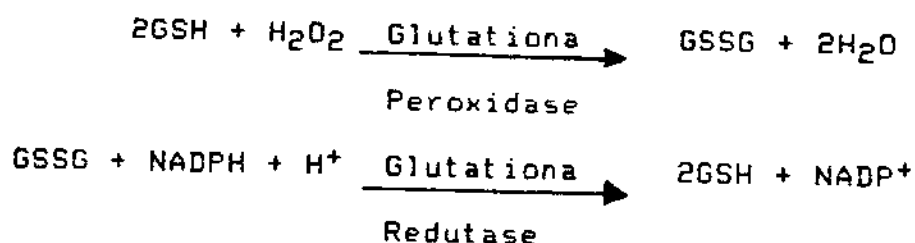
O antígeno recebe um pré-tratamento, antes de ser fagocitado, denominado de opsonização, onde constituintes do soro (as opsoninas) se ligam ao antígeno com a função de facilitar o processo de engolfamento. Dentre as opsoninas estão as imunoglobulinas da classe IgG, reconhecidas por receptores Fc de células fagocíticas e os fragmentos de complemento C (Stites, 1987).

No engolfamento é estabelecido o contato do antígeno com a célula fagocítica e sua conseqüente invaginação, formando-se assim o vacúolo fagocítico ou fagossoma. A seguir ocorre a digestão do antígeno. A digestão se dá em 2 etapas:

1- Degranulação dos constituintes lisosomais no vacúolo fagocítico com a formação do fagolisossoma : neste processo há a fusão do fagossoma e das granulações específicas ou inespecíficas. As granulações específicas atuam em condições anaeróbicas e são constituídas de enzimas como a lisozima, a lactoferrina, a collagenase e a fosfatase alcalina. Nas granulações inespecíficas (azurófilas) encontram-se as enzimas mieloperoxidase, as hidrolases ácidas, as proteínas catiônicas e a NADPH-oxidase, todas funcionando em pH ácido.

2- Atividade bactericida dependente de oxigênio : concomitante à ingestão e à formação do fagolisossoma, ocorrem alterações no metabolismo oxidativo, resultando numa "explosão respiratória" caracterizada por um aumento acentuado no consumo de oxigênio, da oxidação da glicose pela via das pentoses e da geração de grandes quantidades de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de superóxidos (O_2^-), ambos altamente reativos (figura 22) (Bier, 1989).

O sistema "glutathiona" protege os componentes da célula do excesso das moléculas reativas de peróxido de hidrogênio através da seguinte reação:



onde: GSH = glutathiona reduzida

GSSG = glutathiona oxidada

A base bioquímica para a explosão respiratória é a ativação inicial da NADPH-oxidase. O NADPH é gerado pela via das pentoses. Nesta reação, os ânions superóxidos ocorrem como intermediários e podem dar origem ao oxigênio e peróxido de hidrogênio, através da reação de dismutação espontânea ou catalisada pela enzima superóxido dismutase (figura 22).

Os mecanismos microbicidas oxidativos podem ser mediados ou não, pela mieloperoxidase (MPO-dependente ou MPO-independente). Nos processos MPO-dependentes, a mieloperoxidase combina-se com seu substrato, o H_2O_2 , formando um complexo enzima-substrato, que pode oxidar uma variedade de compostos doadores de elétrons, entre eles os haletos (Cl^- , I^-). Este processo pode resultar em: halogenação, formação de hipoclorito e geração de O_2 . Estes compostos podem lesar o microorganismo através da oxidação de grupos sulfidrílicos ou pela peroxidação de lipídios e também pela formação de aldeídos e cloraminas, potentes agentes bactericidas (Klebanoff, 1980).

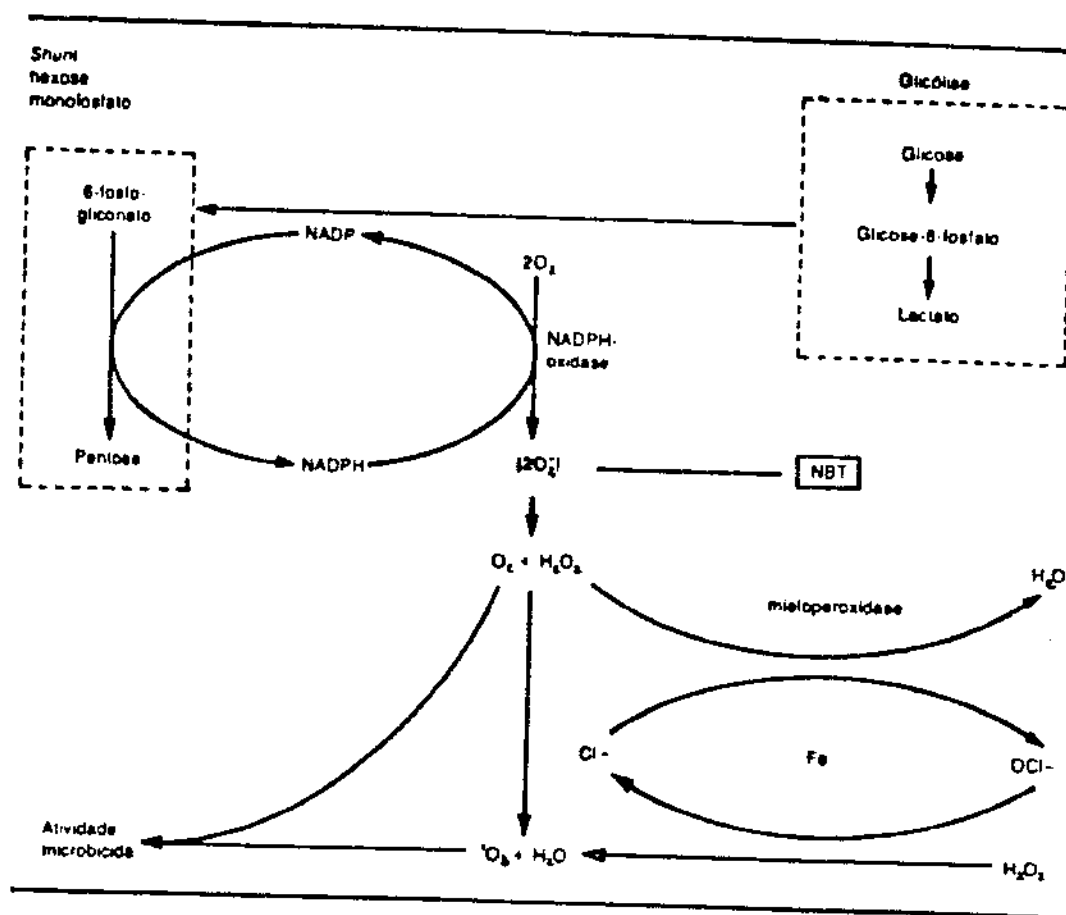


Figura 22- Metabolismo oxidativo e mecanismos microbicidas em fagócitos

Apenas trabalhos *in vitro* e experimentais foram encontrados na literatura sobre efeitos do chumbo na atividade fagocitária. Enquanto alguns estudos *in vitro* mostram uma inibição da fagocitose em presença do chumbo (Jian et al, 1985), outros demonstram que a atividade fagocitária não está alterada (Kowolenko et al, 1988). Koller e Roan também não observaram alterações, *in vivo*, na fagocitose de macrófagos de ratos expostos ao chumbo.

Quanto ao processo intracelular de lise, Castranova et al (1980) encontraram efeitos supressores no metabolismo oxidativo de macrófagos expostos ao chumbo, com diminuição no consumo de

oxigênio, depressão no metabolismo da glicose e na liberação de formas ativas de oxigênio. Um mecanismo proposto pelo autor é a inibição da atividade da enzima formadora de superóxido (NADPH-oxidase) ligada à membrana celular, através da ligação do chumbo à membrana. Considerando que a mitocôndria constitui uma das principais fontes de superóxido na maioria das células aeróbicas *in vivo* (Halliwell & Gutteridge, 1989) e que o aumento do estresse oxidativo provocado por níveis plasmáticos elevados de ALA pode levar a lesão e conseqüente redução nas funções mitocondriais (Pereira et al, 1992), podemos também supor que a redução na formação de superóxido ocorra devido a lesões mitocondriais provocadas pelos níveis plasmáticos aumentados de ALA em indivíduos expostos ao chumbo. Outro possível mecanismo para os efeitos do chumbo na atividade lítica de macrófagos é proposto por Buchmuller-Rouiller (1989) e Mauel et al (1989) onde o chumbo atuaria a nível de fator ativador de macrófagos (MAF) levando a uma inibição do metabolismo oxidativo e produção de radicais livres de oxigênio estimulados por este fator.

Nossos resultados mostram que não houve alterações na fagocitose de monócitos e de neutrófilos em indivíduos expostos ao chumbo (figuras 1 e 2). No entanto, a atividade lítica de neutrófilos apresentou redução significativa em presença do antígeno C. albicans, mas não em presença do antígeno C. pseudotropicalis (figuras 3 e 4). Esta redução na lise de C. albicans ocorreu mesmo naqueles indivíduos com níveis de plumbemia dentro e abaixo dos limites de tolerância biológica (figura 5). A enzima mieloperoxidase está presente em neutrófilos e monócitos, mas não em ma-

crófagos, e é uma enzima importante no processo de lise de C.albicans (Lehrer, 1969 e 1978). Por outro lado, na lise de C.pseudotropicalis as células fagocíticas utilizam-se de outros mecanismos MPD-independentes (Lehrer, 1972). Sendo a lise de C.albicans dependente da mieloperoxidase, nossos resultados sugerem que o chumbo deve atuar inibindo a atividade da mieloperoxidase com consequente redução na lise desta candida pelos neutrófilos. Reafirmam esta hipótese os resultados do estudo da atividade lítica de neutrófilos e monócitos frente à C.pseudotropicalis, que demonstram não haver diferenças, neste aspecto funcional, destas células comparadas aos controles (figuras 4 e 10).

A ausência de correlação entre os nossos resultados de atividade lítica dos neutrófilos frente à C.albicans e os níveis de plumbemia e ALA-U (tabela 9) demonstram que estas alterações ocorrem, em indivíduos expostos, mesmo quando os níveis destes indicadores biológicos estão situados dentro ou mesmo abaixo dos limites aceitáveis de tolerância biológica.

A ausência de correlação com o tempo de exposição e a presença de alterações nos diferentes subgrupos, mesmo naqueles com maior tempo de exposição, sugerem que as alterações observadas não são reversíveis.

2- Dosagens de Imunoglobulinas

As imunoglobulinas, ou anticorpos, são proteínas sintetizadas e secretadas por plasmócitos, que são derivados de linfócitos B quando estimulados por antígenos. Os anticorpos combinam-se com antígenos neutralizando-os, numa tentativa de destruí-los. Essen-

cialmente, cada tipo de imunoglobulina, isto é IgG, IgA, IgM e IgE são bifuncionais, ou seja, uma região da molécula liga-se ao antígeno e outra liga-se ao tecido do hospedeiro. São incluídas nesta ligação várias células do sistema imunológico e o primeiro componente do sistema do complemento (Roitt et al, 1987).

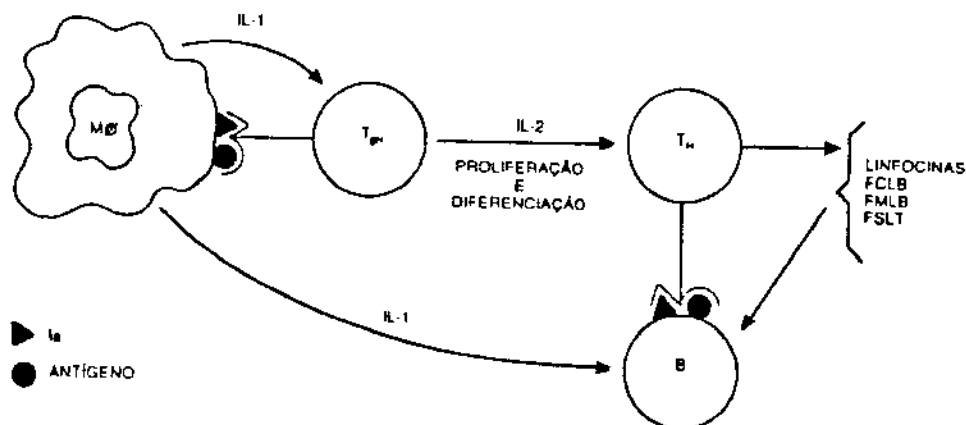
A IgG está em maior quantidade no plasma e tem função opsonizante para os polimorfonucleares e os macrófagos. A IgM é o primeiro anticorpo secretado no processo infeccioso e é capaz de fixar complemento e produzir aglutinação e aderência opsônica. A IgA faz parte das secreções de glândulas exócrinas, como as glândulas salivares.

Os experimentos *in vitro* demonstram um aumento da resposta imune humoral na presença do chumbo (Lawrence, D.A. 1981; Warner & Lawrence, 1986; McCabe & Lawrence, 1990). Por outro lado, resultados controversos têm sido observados em estudos experimentais *in vivo*. Alguns autores (Blakley, 1980; Hilliam & Ozkan, 1986; Koller, 1974) observaram que o chumbo pode diminuir a resposta imune humoral com a redução na produção de anticorpos. Outros autores (Madzinski et al 1986; Lawrence, D.A. 1981), no entanto, não verificaram alterações em células formadoras de anticorpos do tipo IgM, IgA e IgG.

Alguns autores (Kimber et al 1986), avaliando as imunoglobulinas plasmáticas de indivíduos expostos e com baixas concentrações de chumbo no sangue (abaixo de 40 ug/dl), não encontraram diferenças significativas nas concentrações de IgG, IgA e IgM comparando o grupo exposto e o grupo controle. Por outro lado, Jaremin (1983) observou uma diminuição nas concentrações de IgG e IgM

em um grupo de trabalhadores com altos níveis de plumbemia(>36 ug/dl) e ALA-U(>8 mg/l).

Os nossos resultados mostram um aumento significativo nas concentrações de IgM e IgA em indivíduos expostos ao chumbo comparados ao grupo controle. Quanto aos níveis de IgG, não notamos alterações significativas (figura 14). McCabe (1990) propôs dois mecanismos para explicar o aumento na atividade de linfócitos B produtores de anticorpos provocado pelo chumbo. O primeiro mecanismo sugere que a imunopotenciação causada pelo chumbo se deva a um aumento na interação entre a célula T auxiliar e célula B, provocando um aumento na densidade de antígenos Ia na superfície das células B. Os antígenos Ia de superfície, são produtos codificados pela região I de genes da classe II do complexo de histocompatibilidade principal. O segundo mecanismo proposto aponta para o efeito direto do chumbo na expressão dos antígenos Ia, ou na própria estrutura destes antígenos. Os nossos resultados parecem reforçar a hipótese do efeito direto do chumbo na expressão de antígenos Ia, pois nenhuma alteração na resposta de linfócitos T frente a PHA foi observada em relação aos controles (item 4 - Resultados)



3. Cultura de linfócitos

As células T ou B, quando em contato com antígenos específicos, são estimulados a sofrer divisões. Esta resposta mitogênica é acompanhada de mudanças morfológicas na célula blástica.

Os fitomitógenos são lecitinas derivadas de plantas e têm a capacidade de induzir a transformação blástica e provocar as mitoses de maneira semelhante aos antígenos. O mitógeno se liga ao receptor específico da superfície da célula, e o sinal gerado faz com que o linfócito inicie o ciclo celular. As evidências sugerem que a fito-hemaglutinina (PHA) solúvel estimula somente as células T, e que, os linfócitos T ativados secretam linfocinas que ativam linfócitos B. Como a transformação blástica de linfócitos está relacionada às sínteses de DNA e de RNA. A medida destas sínteses tem sido utilizada como um indicador de imunointegridade e imunocompetência do organismo.

Alguns trabalhos experimentais demonstram que, há um aumento *in vitro* na proliferação de linfócitos esplênicos na presença de LPS (mitógeno para linfócitos B) quando estes são expostos ao chumbo (Shenker et al, 1977). Também foi observado, em camundongos tratados com chumbo, um aumento *in vivo* na proliferação de linfócitos T em presença de PHA e Con A (Gaworski & Sharma, 1978; Blakley & Archer, 1982). Os autores sugerem uma ação direta do chumbo sobre o linfócito, alterando desta forma, a síntese de DNA.

Em estudo clínico realizado por Jaremin (1983) o chumbo atua como agente mitogênico de linfócitos T *in vitro*. A proliferação de linfócitos de pessoas expostas ao chumbo em presença de PHA a

é aumentada. Porém, este aumento não é tão intenso em indivíduos com níveis elevados de plumbemia. Por outro lado, neste mesmo experimento, os linfócitos de indivíduos expostos cultivados em presença de PHA e os íons chumbo apresentam uma redução na sua proliferação, sugerindo uma competição da PHA e o chumbo por um mesmo sítio de ligação na membrana da célula T. Por outro lado, Kimber et al(1986), não observaram alterações na transformação blástica de linfócitos estimulados por PHA em indivíduos com baixos níveis de plumbemia.

Em nossos experimentos, não observamos alterações significativas na proliferação de linfócitos T no grupo exposto (figura 20), mesmo quando analisamos em relação aos diferentes subgrupos de acordo com os níveis de plumbemia e ALA-U. Estes dados sugerem que o chumbo não interfere neste nível da resposta imune celular.

CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho demonstram que as alterações imunológicas ocorrem em indivíduos com exposição ocupacional com níveis relativamente baixos de chumbo. O conhecimento destes efeitos "subclínicos" é de grande interesse em relação a medidas preventivas, uma vez que podem ser consideradas como informações de importância ao se discutir o estabelecimento de medidas relacionadas com os limites de exposição.

Finalmente, nossos estudos também demonstram que o sistema imunológico pode representar um indicador funcional sensível do efeito tóxico do chumbo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALESSIO, L.: Relationship between "chelatable" and the indicators of exposure and effect in current and past occupational exposure. *Sci. Total Environ.* 71(3):293-299, 1988.
2. BARRY, P.S.I.: A comparison of concentrations of lead in human tissues. *Br. J. Ind. Med.* 32:119-139, 1975.
3. BEIGUELMAN, B. **Curso Prático de Bioestatística**. Ribeirão Preto SP. Pub. Revista Brasileira de Genética, 1987. 230p.
4. BIER, D.G.; MOTA, I.; SILVA, W.D. **Imunologia Básica e Aplicada**. 6.ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 1989. 600p.
5. BLAKLEY, B.R. & ARCHER, D.L.: The effect of lead acetate on the immune response in mice *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 61:18-26, 1981.
6. BLAKLEY, B.R. & ARCHER, D.L.: Mitogen stimulation of lymphocytes exposed to lead. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 62:183-187, 1982
7. BLAKLEY, B.R.; SISODIA, C.S. & MUKKUR, T.K. The effect of methylmercury, tetraethyl lead and sodium arsenite on the

- humoral immune response in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **52**:245-254, 1980.
8. BUCHMULLER-ROUILLER, I.; RANSIJN, A. & MAUEL, J. Lead inhibits oxidative metabolism of macrophage-activating factor. *Biochem. J.* **260**: 325-332, 1989.
9. CASTRANDVA, V.; BOWMAN, L.; REASON, M. J. & MILES, P. R. Effects of heavy metal ions on selected oxidative metabolic processes in rat alveolar macrophages. *Toxicol. Appl. Immunol.* **53**: 14-23, 1980.
10. CORNELIS, R. Analytical procedures and clinical reference materials in monitoring human exposure to trace metals with special reference to Cr, Pb and Tl. *Sc. Total Environ.* **71**:269-283, 1988.
11. FAITH, R. E.; LUSTER, M. I. & KIMMEL, D. A. Effect of chronic developmental lead exposure on cell-mediated immune functions. *Clin. Exp. Immunol.* **35**:413-420, 1979.
12. GAWORSKI, C. L. & SHARMA, R. P. The effects of heavy metals on [³H] thymidine uptake in lymphocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **46**:305-313, 1978.
13. GOODMAN, S. & GILMAN, A.: *As bases farmacológicas da terapêutica*. 5. ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan,

1978. pp. B32-B34.

14. GOVERNA, M., VALENTINO, M., VISONA, I. & SCIELSO, R.: Impairment of chemotaxis of polymorphonuclear leucocytes from lead leucocytes acid battery workers. *Sci Total Environ.* 71(3): 543-546, 1988.
15. HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C.: *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed. Oxford, Clarenton Press, 1989. pp142.
16. HAMMOND, P.B., LERNER, S.L., GARISIDE, P.S., HANENSON, I.B., RODA, S.B., FOULKES, E.C., JOHNSON, D.R. & PESCE, A.J.: The relationship of biological indices of lead exposure to the health status of workers in a secondary lead smelter. *J. Occup. Med.* 22(7): 475-484, 1980.
17. HEMPHILL, F.E., KAEBERLE, M.L. & BUCK, W.B.: Lead supression of mouse resistance to *Salmonella typhimurium*. *Science*. 172:1031-1032, 1971.
18. HILBERTZ, U., KRAMER, U., DE RUITER, N. & BAGINSK, B. Effects of Cadmium and Lead on oxidative metabolism and phagocytosis by mouse peritoneal macrophages. *Toxicology*, 39: 47, 1986.
19. HILLIAM, R.P. & OZKAN, A.N. Comparison of local systemic immunity after intratracheal, intraperitoneal and intravenous immunization of mice exposed to either

- aerosolized or ingested lead. *Environ. Res.* **39**:265-277, 1986.
20. HUANG, J., HE, F., WU, Y. & ZHANG, S.: Observations on renal function in workers exposed to lead. *Sci Total Environ.* **71**(3): 535-538, 1988.
21. HUDSON, L. & HAY, F. C. *Practical Immunology*. 3 ed. London, Blackwell Scientific Publications, 1989. 495p.
22. JAN, Z., YING-HAN, X. & HONG-FU, C.: The effects of lead on immune function of rabbit alveolar macrophages: quantification of immune phagocytosis and rosette formation by ^{51}Cr *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **78**:484-487, 1985.
23. JAREMIM, B. Blast lymphocyte transformation (LTT), rosette (E-RFC) and leukocyte migration inhibition (MIF) tests in persons exposed to the action of lead during work. Report II. *Bull. Inst. Marit. Trop. Med. Gdynia.* **34**:189-197, 1983.
24. KIMBER, I., JACKSON, J. A., & STONARD, M. D.: Failure of inorganic lead exposure to impair natural killer (NK) cell and T lymphocyte function in rats. *Toxicol. Lett.* **31**:211-218, 1986.

25. KIMBER, I.; STONARD, M. D.; GIDLOW, D. A. & NIEWOLA, Z. Influence of chronic low-level exposure to lead on plasma immunoglobulin concentration and cellular immune function in man. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **57**:117-125, 1986.
26. KLEBANOFF, S. J. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann. Int. Med.* **93**:480-489, 1980.
27. KOLLER, L. D.: Humoral antibody response in mice after single dose exposure to lead or cadmium. *Proc. Exp. Biol.* **151**:399, 1976.
28. KOLLER, D. L. The immunotoxic effects of lead exposed laboratory animals. *Ann. N. Y. Sc.* **587**:160-167, 1990.
29. KOLLER, L. D. & BRAUNER, J. A. Decreased B-lymphocyte response after exposure to lead and cadmium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **42**:621-624, 1977.
30. KOLLER, L. D. & KOVACIC, S. Decreased antibody formation in mice exposed to lead. *Nature*. **250**:148, 1974.
31. KOLLER, L. D. & ROAN, J. G. Effects of lead and cadmium on mouse peritoneal macrophages. *J. Reticuloendothel. Soc.* **21**:7-13, 1977.

32. KOLLER, L.D.; ROAN, J.G. & KERKULIET, N.I.: Mitogen stimulation of lymphocytes in CBA mice exposed to lead and cadmium. *Environ. Res.* **19**:177, 1979b.
33. KOWDLENKO, M., TRACY, L., MUDZINSKI, S. & LAWRENCE, D.A.: Effect of lead on macrophage function. *J. Leukocyte Biol.* **43**: 357-364, 1988.
34. LACHANT, N.A., TOMODA, A. & TANAKA, K.R.: Inhibition of the pentose phosphate shunt by lead: a potential mechanism for hemolysis in lead poisoning. *Blood* **63**: 518-524, 1984.
35. LARINI, L. *Toxicologia*. São Paulo, Manole LTDA, 1987. 250p.
36. LAWRENCE, D.A. Heavy metal modulation of lymphocyte activities. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **57**:439-451, 1981.
37. LAWRENCE, D.A. *In vivo* and *in vitro* effects of lead on humoral and cell-mediated immunity. *Infect. Immun.* **31**:136-143, 1981.
38. LEHRER, R.I. & CLINE, M.J. Interaction of Candida albicans with human leukocytes and serum. *J. Bacteriol.* **98**:996-1004, 1969.
39. LEHRER, R.I. The fungicidal mechanisms of human monocytes I. Evidence for myeloperoxidase-linked and myeloperoxidase-

- independent candidacidal mechanisms. *J. Clin. Invest.* 55:338-346, 1975.
40. LEHRER, R.I. Functional aspects of a second mechanisms of a second mechanisms of candidacidal activity by human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 48: 1478-1488, 1978
41. MACCABE, M.J. & LAWRENCE, D.A. The heavy metal lead exhibits B cell-stimulatory factor activity by enhancing B cell Ia expression and differentiation. *J. Immunol.* 145:671-677, 1990.
42. MADZINSKI, S.P.; RUDOFSKY, U.H.; MITCHELL, D.G. & LAWRENCE, D. A. Analysis of lead effects on *in vivo* antibody-mediated immunity in several mouse strains. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 83:321-330, 1986.
43. MAUEL, J., RANSIJN, A. & BUCHMULLER-ROUILLER, Y. Lead inhibits intracellular killing of Leishmania parasites and extracellular cytolysis of target cells by macrophages exposed to macrophage activating factor. *J. Leukocyte Biol.* 45: 401-409, 1989.
44. MOHAMED, A., HAMED, A.S., ELHAIM, A.A. & OSMAN, Y. Effects of exposure to lead among lead-acid battery factory workers in Sudan. *Arch. Environ. Health.* 41(4): 261-265, 1986.

45. MONTEIRO, H.P.; ABDALLA, D.S.P.; ARCURI, A.S. & BECHARA, E.J.H.
Oxygen toxicity related to exposure to lead. *Clin. Chem.*
31: 1673-1676, 1985
46. MULLER, S.; GILLERT, K.E.; KRAUSE, C.; GROSS, U.; LAGE-STEHR, J.
& DIAMANTSTEIN, T. Suppression of delayed type
hypersensitivity of mice by lead. *Experientia*, *33*: 667-668
1977.
47. NEILAN, B.A.; TADDEINI, C.; McJILTON, C.E. & HANDWERGER, B.S.
Decreased T cell function in mice exposed to chronic, low
levels of lead. *Clin. Exp. Immunol.* *39*: 746-749, 1980.
48. PEREIRA, B.; CURI, R.; KOKUBUN, E. & BECHARA, E.J.H.
5-Aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative
metabolism in sedentary and exercise trained rats. *J.*
Appl. Physiol. *72*: 226-230, 1992
49. PUTMAN, R.D.: Review of toxicology of inorganic lead. *Am. Ind.*
Hyg. Assoc. *47*(11): 00-703, 1986.
50. ROITT, I.; BROSTOFF, J. & MALE, D. *Immunology*. London. Churchill
Livingstone. 1v. 1985.
51. SALGADO, P.E.T.: Diagnóstico laboratorial da intoxicação por
chumbo. *Rev. Bras. Saúde Ocup.* *18*: 1-80, 1977.

52. SELANDER, S. & CRAMER, K.: Interrelationships between lead in blood, lead in urine and ALA in urine during work. *Br. J. Ind. Med.* **27**: 28-30, 1970.
53. SHENKER, B. J.; MATARAZZO, W. J.; HIRSCH, R. L. & GRAY, I. Trace metal modification of immunocompetence. I. Effect of trace metals in the cultures on *in vitro* transformation of B lymphocytes. *Cell. Immunol.* **34**:19-24, 1977.
54. SILVERSTEIN, S. C., STEINMAN, R. M. & COHN, Z. A. Endocytosis. *Ann. Rev. Bioch.* **46**: 669-722, 1977.
55. SMITH, K. L. & LAWRENCE, D. A.: Immunomodulation of *in vitro* antigen presentation by cations. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **96**: 476-484, 1988.
56. SPIVEY, G. H., BROWN, C. P., BALOH, R. W., CAMPION, D. S., VALENTINE, J., MASSEY, F. J., BROWDY, B. L. & CULVER, B. D.: Subclinical effects of chronic increased lead absorption - a prospective study. *J. Occup. Med.* **21**(6): 423-429, 1979.
57. STAESSEN, J.; YEOMAN, W. B.; FLETCHER, A. E.; MARKOWE, H. L.; MARMOT, M. G.; ROSE, G.; SEMMENCE, A.; SHIPLEY, M. J. & BULPITT, C. J.: Blood lead concentration, renal function and blood pressure in London civil servants. *Br. J. Ind. Med.* **47**:442-447, 1990.

58. STITES, D.P., STOBO, J.D. & WELLS, J.V. **Basic & Clinical Immunology**. 6 ed, Appleton & Lange, 1987. 96p
59. TERRITO, M.C. & CLINE, M.J. Monocyte function in man. *J. Immunol.* **118**: 187-192, 1977.
60. TOLA, S., HERNBERG, S., ASP, S. & NIKKANEN, J.: Parameters indicative of absorption and biological effect in new lead exposure: a prospective study. *Br. J. Industr. Med.* **30**: 134-141, 1973.
61. TOMOKUNI, K. & OGATA, M.: Relationship between lead concentration in blood and biological response for porphyrin metabolism in workers occupationally exposed to lead. *Arch. Toxicol.* **35**: 239-246, 1976.
62. WARNER, G.L. & LAWRENCE, D.A. Stimulation of murine lymphocyte responses by cations. *Cell. Immunol.* **101**: 425-439, 1986a.
63. WARNER, G.L. & LAWRENCE, D.A.: Cell surface and cell cycle analysis of metal - induced murine T cell proliferation. *Eur. J. Immunol.* **16**: 1337-1342, 1986.
64. WEDDEN, R.P., MALLIK, D.K. & BATUMAN, V.: Detection and treatment of occupational lead nephropathy. *Arch. Intern. Med.* **139**: 53-57, 1979

65. WESTERMAN, M. P.; PFITZER, E. & ELLIS, I. D. Concentrations of lead in blood in plumbism. *New Engl. J. Med.* **273**:1246-1250, 1965.

66. ZIELHUIS, R. L. Interrrelationship of biochemical responses to the absorption of inorganic lead. *Arch. Environ. Health.* **23**:299-311, 1971.