

RITA DE CÁSSIA RAMOS / PERLINGEIRO ^{nº} 491

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação de Mestrado, apresentada a Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia da Médica RITA DE CÁSSIA RAMOS PERLINGEIRO.

Mary Luci Souza Queiroz
Profª. Drª. Mary Luci Souza Queiróz
- Orientadora -

FUNÇÃO CELULAR EM INDIVÍDUOS COM EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO MERCÚRIO

Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas

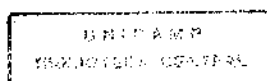
Orientadora: Profa. Dra. Mary Luci de Souza/Queiroz ¹

Campinas

1993

P421f

19341/BC



DEDICO

`À minha mãe Olga,
pelo seu amor e incentivo.

`À memória de meu pai, Gilberto

AGRADECIMENTOS

\A orientadora e amiga, Profª Drª Mary Luci de Souza Queiroz, pelo seguimento atento e cuidadoso do desenvolvimento deste trabalho.

\A Profª Nelci Fenalti Höehr, pela amizade demonstrada e pelo valioso estímulo desde o início desta jornada.

\A amiga, Profª Heloísa Blotta e funcionários do setor de Imunologia do Departamento de Patologia Clínica, pelo apoio sempre demonstrado e colaboração neste trabalho.

Ao Dr. Eduardo Mello De Capitanni, do Departamento de Medicina Ocupacional, pelo encaminhamento dos trabalhadores expostos ao mercúrio.

Aos profissionais e colegas: Mônica, Isabel, Almir, Cláudia e Denise do Laboratório de Cultura de Células do Hemocentro, pela cooperação no decorrer das minhas atividades de mestrado e pelo ambiente de trabalho profundamente agradável e estimulante que me proporcionaram.

Aos profissionais da área de Informática: Emilton, Estefane, Fernando, Jorge, Leonardo, e Renata pelo uso do computador e orientação.

\ A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro.

Ao Hemocentro, pelo apoio financeiro, o qual foi imprescindível para a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Farmacologia, que possibilitou a elaboração desta tese de mestrado.

A todos os trabalhadores da firma Apliquim que contribuíram de forma valiosa para a execução deste trabalho

A muitas outras pessoas que me auxiliaram na realização deste trabalho e não estão aqui citadas.

ÍNDICE:

I-	INTRODUÇÃO.....	1
II-	OBJETIVOS.....	9
III-	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	11
IV-	RESULTADOS.....	23
V-	DISCUSSÃO.....	54
VI-	CONCLUSÕES.....	70
VII-	RESUMO.....	73
VIII-	SUMMARY.....	76
IX-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

I - INTRODUÇÃO

Um grande número de contaminantes ambientais e ocupacionais tem sido extensivamente estudado e um contínuo esforço tem sido feito nas últimas décadas para detectar efeitos biológicos de substâncias ou componentes tóxicos que podem ocasionar efeitos indesejados na saúde humana.

O mercúrio (Hg) e seus compostos são intensamente explorados pelo homem desde 1557, quando Bartolomeu de Medina desenvolveu o processo de obtenção da prata pela amalgamação. A intoxicação por mercúrio é, provavelmente, a mais antiga das doenças profissionais e desde o século XVII procura-se o antídoto ideal para este veneno (FAINTUCH & ROCHA, 1990; NASCIMENTO et al, 1990 e ATTA et al, 1992).

O mercúrio existe em 3 estados: metálico (Hg^0), mercuroso (Hg_2^{++}) e mercúrico (Hg^{++}), podendo formar compostos organometálicos (JARDIM, 1988 e WHO, 1991). As fontes naturais de mercúrio, decorrentes da atividade humana, são oriundas da mineração de mercúrio, da combustão de fluidos fósseis, da refinação do ouro, da produção de cimento, da incineração de lixo e da aplicação industrial desse metal, estimando-se uma emissão anual para a atmosfera de 3000 toneladas (WHO, 1991). Mercúrio é largamente utilizado na produção de aparatos elétricos, indústrias de cloro-soda, manufatura de tubos fluorescentes, produção de termômetros e nas obturações dentárias constituídas de amálgama de mercúrio (LÉONARD et al, 1983; ZALUPS & BARFUSS, 1990; BARREGARD et al, 1991; LANGWORTH et al, 1991; LORSCHIEDER & VIMY, 1991; MOLIN et al, 1991 e ZAMM, 1991).

A forma metálica do mercúrio é a que representa maior risco de intoxicação ocupacional, uma vez que os vapores formados (inodoros e incolores), possuem grande facilidade de penetração e absorção pela via respiratória. O mercúrio elementar (Hg^0) é facilmente absorvido através dos pulmões devido à sua alta difusibilidade e solubilidade lipídica. A absorção do vapor de mercúrio do ar alveolar equivale a aproximadamente 80% da dose inalada em presença de taxas moderadas de ventilação. Uma vez na corrente sanguínea, o metal liga-se aos glóbulos vermelhos e é prontamente oxidado a íon mercúrio (Hg^{++}), sendo a catalase a enzima ativa neste processo (CLARKSON et al, 1961; PASSOW et al, 1961; MAGOS et al, 1978; ROELS et al, 1982; LÉONARD et al, 1983; AIKOH & OGATA, 1988; ZALUPS & BARFUSS, 1990; BARREGARD et al, 1991; MOLIN et al, 1991 e WHO, 1991). Esta é uma etapa crítica no controle da quantidade de mercúrio elementar (Hg^0) que pode difundir-se e atravessar as barreiras placentária e hematoencefálica, onde o metal sofre oxidação (Hg^{++}) e liga-se aos tecidos (MAGOS et al, 1978; ROELS et al, 1982; BARREGARD et al, 1991 e MOLIN et al, 1991)

O íon mercúrio (Hg^{++}) apresenta existência efêmera em meio biológico pois, logo após a sua formação nos glóbulos vermelhos, liga-se com relativa facilidade aos grupos sulfidril -SH de proteínas ou de seus grupamentos prostéticos. 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. Diminuição na atividade da enzima acetilcolinesterase foi observada, principalmente a partir de uma excreção urinária de 200ug de Hg/g de creatinina (HENDERSON & HAGGARD, 1960 e WADA, 1969).

O mercúrio ligado à estrutura da membrana celular, a qual contém grupos sulfidríla, pode originar alterações na permeabilidade à certos nutrientes (REPORT OF AN INTERNATIONAL COMITEE, 1969 e BLAZKA & SHAIKH, 1992) e alguns trabalhos indicam a membrana celular como o primeiro sítio de ataque dos metais pesados (ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA, 1976 e AZEVEDO, 1989).

A ação tóxica do mercúrio sobre as células do sistema nervoso central origina manifestações características do mercurialismo, como tremor bilateral dos dedos, pálpebras e lábios, agitação, fadiga e também o quadro de eretismo, que é um comportamento anormal e introvertido com mudanças na personalidade, perda de memória e outros sintomas (HUNTER, 1970 e ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA, 1976)

Tem sido observado que vapores de mercúrio em altas concentrações produzem lesões pulmonares com irritação traqueo-bronquial, podendo evoluir de edema lesional à fibrose intersticial difusa. Tais alterações parecem estar relacionadas com a capacidade do íon mercúrio de inativar, a nível pulmonar, enzimas como a superóxido dismutase (SOD). Isto resulta em menor

eliminação de radicais livres, os quais passam então a induzir lesões pulmonares. Por outro lado, os vapores de mercúrio parecem não afetar a atividade da superóxido dismutase (SOD) na corrente sanguínea (LIVARDJANI et al, 1991)

As lesões renais produzidas pelo mercúrio são progressivas e estão confinadas, em grande parte ao epitélio tubular, especialmente o túbulo proximal (SCHEREINER & MAHER, 1965; ROELS et al, 1982; LÉONARD et al, 1983; ZALUPS & BARFUSS, 1990 e MOLIN et al, 1991) mas os glomérulos também são lesados (MANDEMA et al, 1963). A nefrotoxicidade do mercúrio deve-se à sua interação direta com as células tubulares renais e sua concentração relativa dentro delas. Proteinúria é frequente (BUCHET et al, 1980 e KOSUDA et al, 1991) mas, não parece haver relação entre níveis urinários elevados de mercúrio e proteinúria (HUMES & WEINBERG, 1986). Foi demonstrado que as lesões provocadas pelo mercúrio a nível renal se devem à deposição de imunocomplexos e produção de autoanticorpos reativos com a membrana basal e glomérulo (WEENING et al, 1981; BELLON et al, 1982; HIRSCH et al, 1982; BOWMAN et al, 1984; CHALOPIN & LOCKWOOD, 1984; PELLETIER et al, 1985; HENRY et al, 1988; KOSUDA et al, 1991 e ATTA et al, 1992)

O efeito genotóxico do mercúrio tem sido demonstrado por vários autores. A ligação do íon Hg^{++} a proteínas nucleares parece induzir quebra cromossômica e produção de C-mitose, resultando em aneuploidia e poliploidia (POPESCU et al, 1979; LÉONARD et al, 1983 e BARREGARD et al, 1991). No entanto, a

capacidade do mercúrio inorgânico de induzir mutações gênicas parece ser baixa (LÉONARD et al, 1983 e BARREGARD et al, 1991).

Trabalhos experimentais utilizando doses subtóxicas de mercúrio demonstrou alterações imunopatológicas caracterizadas por reações autoimunes resultantes da ativação de linfócitos B dependentes de células T. Nestes animais foram verificados quadros de linfoproliferação (PAULY et al, 1969; OHSAWA & KIMURA, 1979; HIRSH et al, 1982; PELLETIER et al, 1985a; PELLETIER et al, 1988b; ROSSERT et al, 1988 e HULTMAN & JOHANSSON, 1991), linfadenopatia (NEWCOMBE et al, 1992), hipergamaglobulinemia, afetando principalmente os níveis de IgE e IgG (PROUVOST et al, 1981; CHALOPIN & LOCKWOOD, 1984; PELLETIER, et al, 1985a; PELLETIER et al, 1988b e NEWCOMBE et al, 1992). Além disso, foi observada a produção de autoanticorpos antinúcleo, antinucléolo (WEENING et al, 1981; MIRTICHEVA et al, 1989 e NEWCOMBE et al, 1992) e aqueles reativos com o tecido renal (BELLON et al, 1982; HIRSCH et al, 1982; BOWMAN et al, 1984; CHALOPIN & LOCKWOOD, 1984; HENRY et al, 1988; PELLETIER et al, 1988b e KOSUDA et al, 1991).

Estudos "in vitro" sobre os efeitos de pequenas concentrações de mercúrio em leucócitos polimorfonucleares de indivíduos normais levaram à 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).

Embora a literatura demonstre que o sistema imune é um

alvo que reflete de forma sensível os efeitos causados pelo mercúrio a nível celular, apenas um trabalho foi encontrado na literatura em indivíduos com exposição ocupacional ao metal (BENCKO et al, 1990), no qual foi observado um aumento na produção de imunoglobulinas IgG, IgM e IgA .

Neste trabalho investigamos as alterações provocadas pelo mercúrio a nível celular através da utilização de metodologia sensível, para a determinação do grau de comprometimento do organismo em presença do agente tóxico. Para isto estudamos indivíduos expostos assintomáticos ou oligossintomáticos, os quais apresentavam níveis de mercúrio na urina dentro dos limites de tolerância biológica (LTB), ou seja, dentro dos níveis aceitáveis no campo profissional. Neste particular, gostaríamos de ressaltar que são considerados valores normais de Hg^{++} urinário, em indivíduos sem exposição ocupacional, uma taxa de até 5ug/g de creatinina. No entanto, em trabalhadores de indústrias de cloro-soda e correlatas, uma taxa de até 50ug/g de creatinina é considerada aceitável, ou seja, dentro dos limites de tolerância biológica (BUCHET et al, 1980; ROELS et al, 1985; WHO, 1991 e LANGWORTH et al, 1992).

Os efeitos adversos que ocorrem em presença de concentrações urinárias consideradas aceitáveis no campo profissional 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. Assim foram estudados os efeitos críticos relacionados

com a resposta imunológica dos indivíduos expostos, uma vez que, conforme já foi dito anteriormente, o sistema imune é alvo sensível a doses subtóxicas do mercúrio.

II - OBJETIVOS

- 1- O objetivo deste trabalho foi detectar alterações imunológicas subclínicas a nível celular em trabalhadores expostos ao mercúrio.
- 2- Para isto, estudamos indivíduos expostos assintomáticos ou oligossintomáticos, os quais apresentavam níveis de mercúrio na urina dentro dos limites de tolerância biológica.
- 3- Foi avaliada a imunidade inespecífica através dos estudos da capacidade fagocitária e lítica de neutrófilos frente aos antígenos Candida albicans e Candida pseudotropicalis e da atividade quimiotática de neutrófilos.
- 4- A imunidade celular foi avaliada através do estudo da transformação blástica de linfócitos T em resposta à fitohemaglutinina (PHA).
- 5- A fim de avaliar o comprometimento esplênico foi realizada a contagem de hemácias com irregularidades de superfície (pits).

III - CASUÍSTICA & MÉTODOS

III.1- CASUÍSTICA:

Os indivíduos estudados neste trabalho são funcionários de uma fábrica onde efetua-se o reaproveitamento do mercúrio metálico liberado nos afluentes líquidos de indústrias de cloro-soda. Este reaproveitamento ocorre através da adição de sulfeto no tratamento da água, com isto o mercúrio 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. Nesta fábrica, a terra diatomita contendo sulfeto de mercúrio passa por vários processos físico-químicos, que tem por objetivo a obtenção do mercúrio metálico puro.

Após exame médico geral, obteve-se de cada trabalhador, uma história ocupacional completa, incluindo sintomas possivelmente relacionados à exposição ao mercúrio observados nos 6 meses precedentes, história de intoxicação por mercúrio e terapia de quelação desde o início das atividades com mercúrio, assim como dados sobre incidência de infecções. Um questionário similar foi utilizado para o grupo controle. Este grupo foi constituído por doadores de sangue que vêm ao Hemocentro da UNICAMP e são indivíduos clinicamente normais, sem história de exposição ao mercúrio e níveis urinários do mesmo dentro da faixa de normalidade (até 5µg/g de creatinina). Estes doadores foram avaliados clinicamente e laboratorialmente através do hemograma e foram escolhidos de acordo com a raça e faixa etária dos trabalhadores expostos.

Todos os indivíduos consentiram espontaneamente para realização dos experimentos após amplo esclarecimento sobre os procedimentos a serem empregados.

III.2- MÉTODOS:

2.1- 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 ôco 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^{++} por grama de creatinina. Esta correção é importante pois ajusta a eliminação de Hg^{++} 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).

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

2.2.1- Princípio do método:

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

2.2.2- Descrição da técnica:

1 ml de sangue periférico é distribuído sobre uma lâmina com as bordas esmaltadas, para que não haja extravasamento de sangue. Esta lâmina é incubada por 2 horas a 37°C. São preparadas suspensões em meio Eagle(Sigma cod:M1018) de uma cultura de Candida albicans e de Candida pseudotropicalis inoculadas no dia anterior em meio ágar Saboraud dextrosado(Biobrás cod:107-3). As suspensões são lavadas duas vezes em meio Eagle e ressuspensas em meio Eagle na concentração de 5×10^6 /ml.

As leveduras são opsonizadas em meio Eagle com 10% de soro humano normal tipo AB, as quais são mantidas por 30 minutos a 37°C.

Passado o tempo de incubação, o coágulo formado sobre a lâmina é removido cuidadosamente e o excesso é lavado com meio Eagle.

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

Terminado o tempo de incubação, a lâmina é lavada com meio Eagle e corada com corante de Giemsa (Ecibra).

A lâmina é observada em microscópio e o número de leveduras fagocitadas e lisadas num total de 100 neutrófilos são contados (BALLART et al, 1987).

2.3- Atividade quimiotática de neutrófilos

2.3.1- Princípio do método:

Quimiotaxia é um método utilizado para o estudo quantitativo da locomoção de leucócitos. Basicamente consiste em colocar uma suspensão de leucócitos num compartimento e um agente quimiotático no outro compartimento de uma câmara de migração, sendo estes compartimentos divididos por um filtro com microporos de 3 um para neutrófilos e 8 um a 12 um para monócitos/macrófagos. O tamanho dos microporos tem que ser

suficiente para permitir a migração da célula em estudo, sem no entanto, permitir sua passagem passivamente (TODD et al, 1989)

2.3.2- Descrição da técnica:

5 ml de sangue é colhido em heparina (Roche). Separa-se cerca de 0,8 ml de plasma. O sangue é centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm e o sobrenadante é separado juntamente com o creme leucocitário. Adiciona-se 1 ml de dextran (Sigma cod:D-4876) e incuba-se por 25 minutos a 37°C. Lava-se 3 vezes em meio TC199 com bicarbonato de sódio (Sigma), contendo 10 mM HEPES (Inlab cod:4640), 200 UI de penicilina/ml de água destilada e 0,1 mg de estreptomicina. As células são ajustadas para 2×10^6 /ml.

Do plasma separado inicialmente, toma-se 0,5 ml e adiciona-se 0,1 ml de endotoxina 2,5% em PBS (endotoxina Escherichia coli-Difco). Incuba-se por 30 minutos a 37°C e a seguir, adiciona-se 4,4 ml de meio TC199.

A câmara quimiotática é montada colocando-se um pré-filtro (Millipore AP 2501300) e um filtro (Millipore SSWPO 1300) no interior de um dos orifícios de uma placa de cultura (Costar catálogo n^o3424). Para cada indivíduo são preparadas duas câmaras, uma contendo 0,25 ml de plasma com endotoxina e a outra 0,25 ml de meio TC199. A seguir adiciona-se 0,2 ml da suspensão de 2×10^6 células/ml num receptáculo raso e circular, de diâmetro ligeiramente menor ao do orifício da placa e em seguida, inverte-

se este sobre o filtro no interior do orifício. Incuba-se por 30 minutos a 37°C em câmara úmida.

Os filtros são lavados em meio TC199 e fixados por 20 minutos em propanol 2 (álcool isopropílico). A coloração é realizada passando-se os filtros pela seguinte bateria (2 minutos cada etapa): água destilada, hematoxilina, água destilada, propanol 2, xilol.

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

2.4- Capacidade proliferativa de linfócitos

2.4.1- Princípio do método:

A capacidade proliferativa de linfócitos é uma prova que avalia as propriedades funcionais dos linfócitos de acordo com sua resposta "in vitro" a mitógenos, como a fitohemaglutinina (PHA). Nesta prova é verificada a competência funcional dos linfócitos e não o seu número, determinando desta forma a resposta imunológica, através da incorporação de timidina tritiada.

2.4.2- Descrição da técnica:

Sangue periférico foi colhido assepticamente, utilizando-se heparina como anticoagulante. Células mononucleares do sangue periférico foram obtidas esterilmente por separação em gradiente de Ficoll-Hypaque (Ficoll400-Pharmacia e Hypaque 50%-CEME) e ajustadas a uma concentração de 1×10^6 células/ml em meio RPMI 1640 (Sigma cod:r6504).

Nos orifícios da placa de microcultura são adicionados 200 μ l da suspensão celular enriquecida com 10% de soro humano normal tipo AB e 10 μ l de solução de PHA (60 μ g/ml) (Difco). Concomitantemente são também incubadas células de cada amostra sem PHA (triplicata)

As placas são mantidas 48 horas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, as culturas são marcadas com Timidina tritiada (1 μ Ci/orifício) (185GBq/mmol, 5Ci/mmol-Amersham UK) e incubadas novamente a 37°C em ambiente com 5% de CO₂ no ar por mais 24 horas.

Ao final, as culturas são coletadas semi-automaticamente em papel de filtro (Millipore) por meio de coletor de células e lavadas com água destilada. Então os discos são destacados e transferidos para frascos de cintilação contendo 3 ml de líquido de cintilação (3g do sal 2,5 difeniloxazole -Sigma- em 1000ml de tolueno P.A. -Merck-)

Cada frasco é contado em cintilador beta (Beckman modelo LS-5000) durante 1 minuto. Os resultados são expressos

pela média aritmética das triplicatas de cada amostra em contagem por minuto (NAGEL et al, 1981).

2.5- Contagem de hemácias com irregularidades de superfície("pits")

2.5.1- Princípio do método:

Eritrócitos morfológicamente anormais têm sua passagem impedida através dos poros das células endoteliais, resultando em destruição eritrocitária prematura, sendo que esta destruição ocorre predominantemente na rede esplênica. Portanto, em indivíduos com baço hipofuncionante, pode-se encontrar hemácias com irregularidades de superfície. Estas hemácias permanecem na circulação e podem ser visualizadas através de microscopia de interferência (HOLROYDE et al, 1969; PRESTON & SHAHANY, 1970; GROTTTO, 1987 e GROTTTO & COSTA, 1991)

2.5.2- Descrição da técnica:

Uma gota de sangue colhida sem anticoagulante é adicionada a 0,5 ml de formaldeído a 3% em salina tamponada pH 7,4. Uma gota desta solução é transferida para uma lâmina,

coberta com lamínula e a preparação observada no microscópio de contraste de interferência (óptica de Nomarski). De 500 hemácias analisadas, determina-se a percentagem de hemácias com irregularidades de superfície (ZAGO, 1981; GROTO, 1987 e GROTO & COSTA, 1991).

2.6- Hemograma

A dosagem de hemoglobina e a contagem de glóbulos brancos, foram obtidos através do contador eletrônico Coulter modelo SSr.

2.7- Métodos estatísticos

2.7.1- Teste de Student (teste t):

As variáveis foram medidas no grupo normal e no grupo exposto. Os testes efetuados visaram comparar:

- grupo normal x grupo exposto, utilizando-se teste t para contraste entre duas médias de amostras independentes.
- grupo exposto na 1ª avaliação x grupo exposto na 2ª avaliação, após 6 meses, utilizando-se teste t para contraste entre duas médias de amostras dependentes.

2.7.2- Teste de Mann-Whitney (teste U):

Foi utilizado este teste não paramétrico para comparar resultados expressos em cpm (contagem por minuto) entre grupo normal e grupo exposto, isto é, amostras independentes.

2.7.3. Teste do sinal:

Este teste não paramétrico foi utilizado com o intuito de comparar amostras dependentes cujos resultados são expressos em cpm, como é o caso da comparação da capacidade linproliferativa em presença de soro AB e soro autólogo.

IV - RESULTADOS

1- Dosagem de mercúrio urinário:

Foi realizada a dosagem de mercúrio urinário (HgU) nos 51 trabalhadores expostos ao mercúrio, dentre os quais, 47 (92%) apresentaram níveis urinários do metal dentro dos limites considerados aceitáveis no campo profissional (até 50 ug/g de creat.) ($\bar{x} = 24,4 \pm 18,2$).

No decorrer deste trabalho, foram efetuadas melhorias nas condições de higiene da firma, como por exemplo, mudanças no sistema de ventilação bem como, uma maior utilização de equipamento protetor pelos trabalhadores. Os efeitos desta melhoria foram bastante evidentes nos níveis urinários de mercúrio reavaliados, 6 meses após a 1ª investigação, em 27 trabalhadores remanescentes.

Os resultados de HgU obtidos na 2ª avaliação apresentaram-se significativamente reduzidos em relação à 1ª ($p < 0,05$ - teste T de Student) (tabela 1 e figura 2). Como veremos à seguir, esta redução encontrada nos níveis de mercúrio não resultou em mudanças nos parâmetros imunológicos estudados neste trabalho, assim como, não foi encontrada correlação entre níveis de mercúrio urinário e tais parâmetros.

TABELA 1- Estudo comparativo dos níveis de mercúrio urinário após 2 avaliações

INDIVÍDUO	1ª AVALIAÇÃO (ug/g creat)	2ª AVALIAÇÃO (ug/g creat)
N.D.	41,3	10,8
M.A.Z.	38,1	5,0
C.S.	3,5	5,3
M.L.B.	26,2	2,1
A.S.C.	27,8	8,5
J.R.M.C.	49,4	14,3
G.A.V.	5,4	4,6
J.T.O.	13,0	6,0
J.A.C.B.	26,3	3,6
G.F.S.	67,9	29,3
A.A.S.	44,5	11,5
M.E.B.L.	37,4	6,2
P.V.B.	67,6	6,9
A.L.V.	42,6	5,8
A.N.A.	13,7	7,7
S.P.A.	28,4	31,3
E.A.C.	7,7	34,4
H.V.S.	3,4	5,5
J.N.B.S.	1,0	6,6
J.S.S.	11,8	39,2
F.X.C.	28,9	4,6
C.S.	16,5	13,9
J.R.A.M	17,2	13,7
M.R.O.	27,3	46,0
E.R.C.	1,4	5,0
A.F.V.	3,4	17,3
C.G.D.	6,9	5,2
	$\bar{x}=24,4$	$\bar{x}=13,0$

Mercúrio Urinário:

Valor de referência: até 5ug/g de creatinina

Limite de tolerância biológica: até 50ug/g de creatinina

Obs: O intervalo entre as duas avaliações foi de 6 meses

2- Atividade fagocitária e lítica de neutrófilos:

Foram estudadas as atividades fagocitária e lítica de neutrófilos frente à Candida albicans (n= 51) e à Candida pseudotropicalis (n= 37) em indivíduos expostos ao mercúrio (tabelas 2 e 3).

De acordo com os histogramas (figuras 2 e 3), podemos observar que a capacidade fagocitária apresentou-se normal frente as 2 leveduras. Por outro lado, em relação a atividade lítica destes fagócitos, observamos nas mesmas figuras uma redução significativa tanto frente à Candida albicans quanto à Candida pseudotropicalis ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente - teste T de Student).

Uma 2ª avaliação, nos mesmos indivíduos, da atividade fagocitária e lítica de neutrófilos frente aos dois antígenos foi realizada 6 meses após a primeira investigação (tabelas 4 e 5). A atividade fagocitária manteve-se normal (figuras 4 e 5). Em relação à atividade lítica, não observamos diferença significativa na redução da atividade lítica de neutrófilos frente à Candida pseudotropicalis, nas 2 avaliações realizadas (figura 5). Por outro lado, a atividade lítica frente ao antígeno Candida albicans (figura 4) apresentou-se ainda mais reduzida durante a 2ª avaliação ($p < 0,05$ - teste T pareado de Student). Essa tendência é reforçada pela correlação linear observada entre tempo de exposição e atividade lítica frente a este segundo antígeno ($r = 0,457$ e intervalo de confiança: 0,207 a 0,649).

Nas figuras 6 e 7, podemos observar o aspecto microscópico da fagocitose e lise frente aos antígenos Candida albicans e Candida pseudotropicalis, respectivamente, de um controle. A fagocitose e lise frente à Candida albicans de indivíduos expostos, durante a 1ª e 2ª avaliação, respectivamente, podem ser visualizadas nas figuras 8 e 9. Em relação à Candida pseudotropicalis, podemos visualizar nas figuras 10 e 11, o aspecto microscópico de fagocitose e lise durante a 1ª e 2ª avaliação no grupo exposto, respectivamente.

TABELA 2- Atividade fagocitária e lítica de neutrófilos frente ao antígeno Candida albicans

INDIVÍDUO	IDADE (anos)	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (meses)	MERCÚRIO URINÁRIO (ug/g creat.)	FAGOCITOSE	LISE (%)
N.D.	24	6	41,3	107	27,10
M.Z.	37	13	38,1	104	21,15
C.S.	43	33	10,0	116	54,31
M.L.B.	30	25	26,2	117	35,04
A.S.C.	31	3	27,8	246	15,44
E.A.R.	23	0,5	5,7	390	14,30
J.R.M.C.	23	3	49,4	276	12,68
G.A.V.	38	1	4,5	150	23,33
C.B.C.	53	4	8,0	334	16,10
J.T.O.	28	1	13,0	235	23,40
J.A.S.	23	2	12,8	197	22,30
J.M.L.M.	41	5	18,5	433	9,60
J.A.C.B.	28	1	26,3	108	12,00
L.H.M.	33	8	45,8	94	53,02
N.S.F.	34	10	44,5	183	8,10
G.F.S.	20	25	67,9	264	23,48
W.J.O.	24	5	31,3	292	32,87
S.L.M.	38	12	18,6	336	9,80
E.B.S.	28	1	44,6	163	10,00
F.G.S.	26	2	19,2	142	8,40
C.M.X.	21	1	11,6	32	6,20
A.A.S.	39	24	44,5	126	11,00
M.A.S.	23	3	33,6	209	44,49
E.S.	18	3	22,7	195	63,58
F.R.S.	28	30	21,4	156	56,41
M.P.S.F.	23	2	51,1	124	58,87
M.E.B.L.	28	15	37,4	167	33,53
P.V.B.	38	7	67,6	276	48,91
A.L.V.	30	46	42,6	121	37,19
E.P.S.	20	2	62,5	145	23,44
J.C.S.	38	3	32,0	50	22,00
A.N.A.	22	1	13,3	104	15,38
L.F.B.	18	2	20,4	130	33,07
S.P.A.	20	14	28,4	219	13,60
J.S.S.	41	5	5,2	215	12,50
E.A.C.	19	4	7,7	349	9,70
H.V.S.	20	4	3,4	521	9,20
J.N.B.S.	23	2	1,0	328	3,30
J.S.S.	23	4	11,8	257	3,10
F.X.C.	24	5	28,9	269	1,30
C.S.	23	1	16,5	152	17,10
J.R.A.M.	21	1	17,2	182	5,40
V.P.P.	31	2	13,0	309	10,67
M.R.O.	20	2	46,0	181	9,30
E.R.C.	38	3	1,4	357	8,90
C.R.	27	1	5,7	133	20,30
L.C.M.	32	5	1,4	207	18,35
A.F.V.	29	3	3,4	252	18,65
C.G.D.	25	30	5,2	157	67,51
A.Q.O.	40	1	9,7	249	11,11
V.O.S.	25	2	14,0	204	14,70
				x=209	x=22,0

Valores normais:

Candida albicans

fagocitose: 138,9 a 317,1

% lise: 20,2 a 59,4

Mercúrio Urinário

Valor de referência: até 5ug/g de creatinina

Limite de tolerância biológica: até 50 ug/g de creatinina

TABELA 3- Atividade fagocitária e lítica de neutrófilos frente ao antígeno Candida pseudotropicalis

INDIVÍDUO	IDADE (anos)	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (meses)	MERCÚRIO URINÁRIO (ug/g creat.)	FAGOCITOSE	LISE (%)
N.D.	24	13	41,3	228	16,20
M.Z.	37	24	38,1	230	4,80
C.S.	43	43	10,0	509	2,10
M.L.B.	30	36	26,2	280	1,42
A.S.C.	31	3	27,8	237	12,23
E.A.R.	23	0,5	5,7	369	8,40
J.R.M.C.	23	3	49,4	232	4,30
G.A.V.	38	1	4,5	180	3,90
C.B.C.	53	4	8,0	185	2,10
J.T.O.	28	1	13,0	127	15,70
J.A.S.	23	2	12,8	306	4,90
J.M.L.M.	41	5	18,5	176	7,30
J.A.C.B.	28	8	26,3	186	11,00
G.F.S.	20	25	67,9	336	28,80
W.J.O.	24	13	31,3	394	9,64
S.L.M.	38	19	18,6	388	8,24
S.P.A.	19	14	28,4	349	8,30
A.A.S.	39	24	44,5	121	10,70
M.E.B.L.	28	27	37,4	116	6,00
A.L.V.	30	58	42,6	215	1,80
A.N.A.	22	1	13,3	313	5,70
J.S.S.	41	5	5,2	244	24,60
E.A.C.	19	4	7,7	506	13,20
H.V.S.	20	4	3,4	399	17,20
J.N.B.S.	23	2	1,0	159	2,00
J.S.S.	23	4	11,8	244	2,46
F.X.C.	24	5	28,9	237	1,30
C.S.	23	1	16,5	241	12,86
J.R.A.M.	21	1	17,2	151	6,60
V.P.P.	31	2	13,0	247	10,12
M.R.O.	20	2	46,0	201	16,90
E.R.C.	38	3	1,4	224	14,73
C.R.	27	1	5,7	177	12,42
A.F.V.	29	3	3,4	227	12,77
C.G.D.	25	30	5,2	218	2,75
A.Q.O.	40	1	9,7	229	19,21
V.O.S.	25	2	14,0	223	6,27
				$\bar{x}=254$	$\bar{x}=9,4$

Valores normais:

Candida pseudotropicalis fagocitose: 126,4 a 269,6
% lise: 7,8 a 21,4

Mercúrio Urinário

Valor de referência: até 5 ug/g de creatinina

Limite de tolerância biológica: até 50 ug/g de creatinina

NE = não exposto
E = exposto

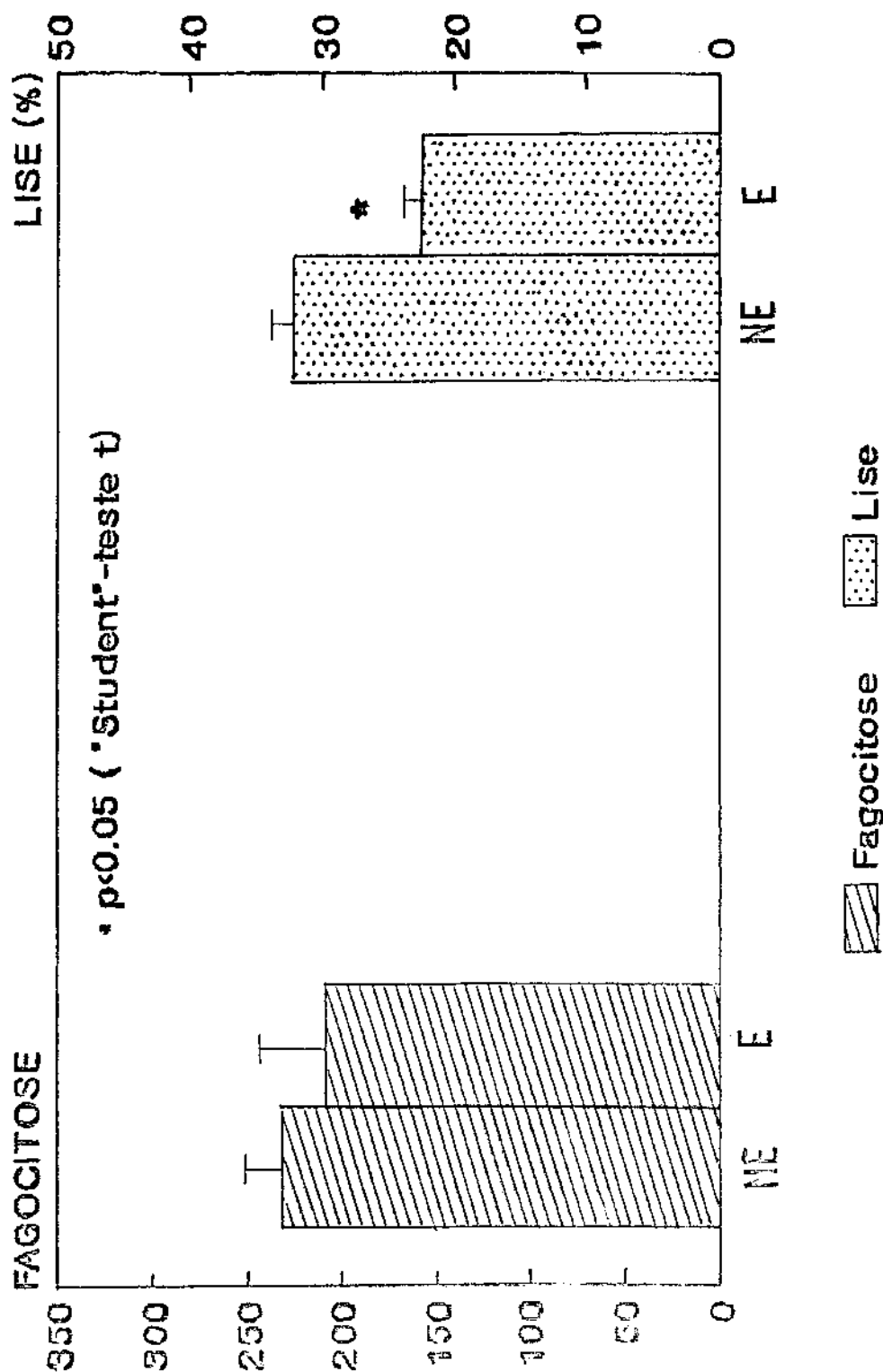


Fig. 2 - Atividade fagocitária e lítica de neutrófilos frente ao antígeno Candida albicans em trabalhadores expostos ao mercúrio (n=51).

NE = não exposto
E = exposto

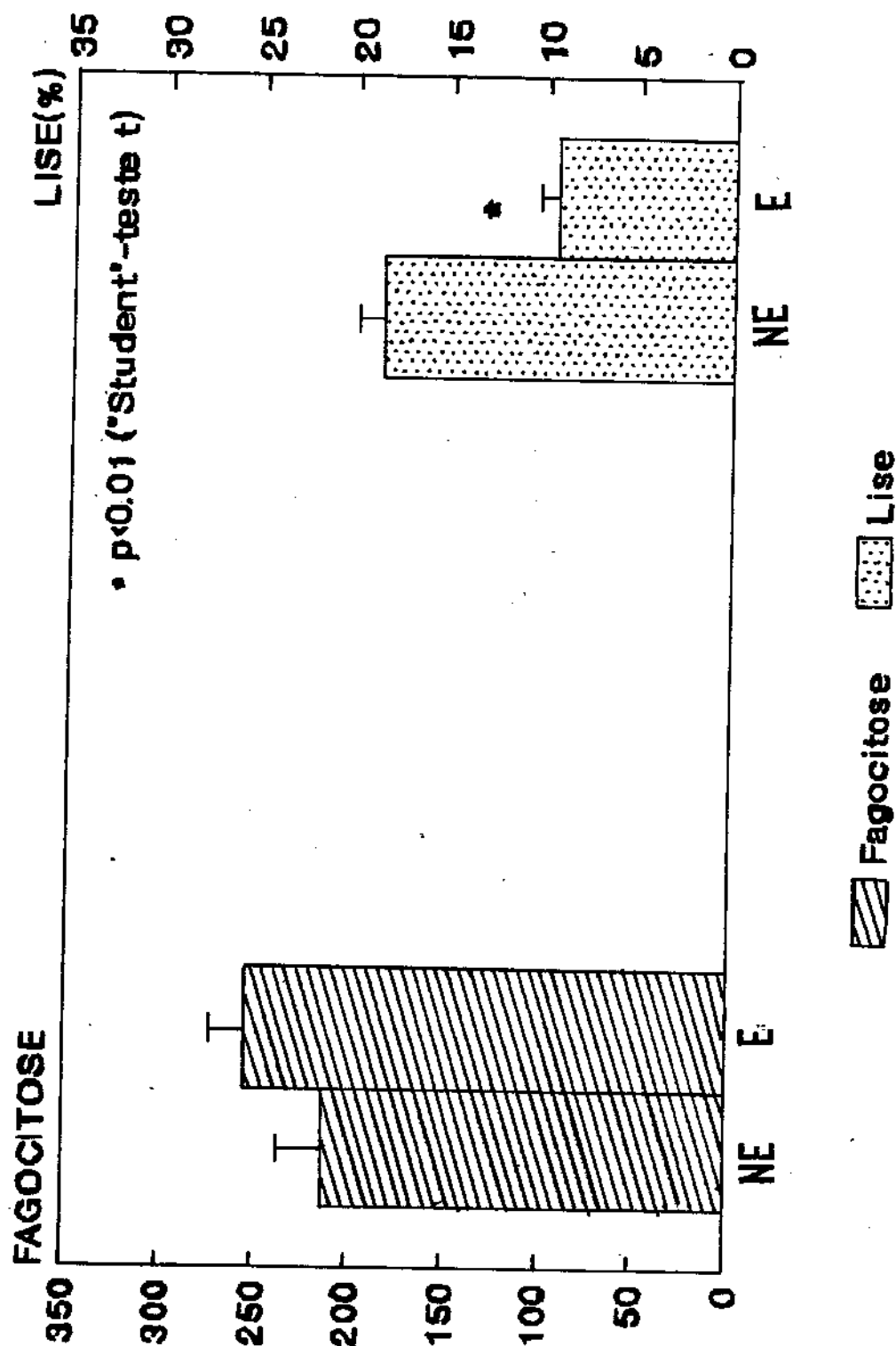


Fig. 3 - Atividade fagocitária e lítica de neutrófilos frente ao antígeno Candida pseudotropicalis em trabalhadores expostos ao mercúrio (n=37).

TABELA 4- Estudo comparativo da atividade fagocitária e lítica de neutrófilos frente ao antígeno Candida albicans após 2 avaliações

INDIVÍDUO	FAGOCITOSE		LISE	
	1ªaval.	2ªaval	1ªaval.	2ªaval. (%)
N.D.	107	367	27,10	14,16
M.Z.	104	241	21,15	7,05
C.S.	116	520	54,31	2,10
M.L.B.	117	393	35,04	3,30
A.S.C.	246	488	15,44	1,16
J.R.M.C.	276	488	12,68	2,20
G.A.V.	150	85	23,33	32,94
J.T.O.	235	149	23,40	9,40
J.A.C.B.	108	334	12,00	2,30
G.F.S.	264	130	23,48	20,50
A.A.S.	126	137	11,00	18,20
M.E.B.L.	167	210	33,53	1,00
P.V.B.	276	186	48,91	17,60
A.L.V.	121	263	37,19	8,70
A.N.A.	104	148	15,38	18,90
E.A.C.	349	269	9,70	6,70
J.S.S.	257	213	3,10	10,79
E.R.C.	357	213	8,96	6,10
C.G.D.	157	212	67,51	13,67
C.S.	152	258	17,10	7,75
M.R.O.	181	401	9,30	15,46
A.F.V.	252	330	18,65	10,90
H.V.S.	521	245	9,20	17,55
J.N.B.S.	328	242	3,30	17,76
F.X.C.	269	200	1,30	8,50
J.R.A.M.	182	265	5,40	11,32
	$\bar{x}=212$	$\bar{x}=269$	$\bar{x}=21$	$\bar{x}=11$

valores normais:

Fagocitose: 138,9 a 317,1

% lise: 20,2 a 59,4

Obs: O intervalo de tempo entre as duas avaliações foi de 6 meses

TABELA 5- Estudo comparativo da atividade fagocitária e lítica de neutrófilos frente ao antígeno Candida pseudotropicalis após 2 avaliações

INDIVÍDUO	FAGOCITOSE		LISE	
	1ªaval.	2ªaval	1ªaval. (%)	2ªaval.
A.S.C.	237	248	12,23	10,48
J.R.M.C.	232	435	4,30	2,70
G.A.V.	180	248	3,90	27,00
J.T.O.	127	152	15,70	20,00
G.F.S.	336	240	28,80	8,30
E.A.C.	506	183	13,20	13,11
J.S.S.	244	217	2,46	8,75
E.R.C.	224	118	14,73	18,60
C.S.	241	234	12,86	26,92
M.R.O.	201	254	16,90	10,23
A.F.V.	227	231	12,77	2,16
H.V.S.	399	229	17,20	4,80
J.N.B.S.	159	207	2,00	12,56
F.X.C.	237	192	1,30	8,85
J.R.A.M.	151	206	6,60	11,16
	$\bar{x}=247$	$\bar{x}=226$	$\bar{x}=11$	$\bar{x}=12,3$

Valores normais:

Fagocitose: 126,4 a 269,6

% lise: 7,8 a 21,4

Obs: O intervalo entre as duas avaliações foi de 6 meses

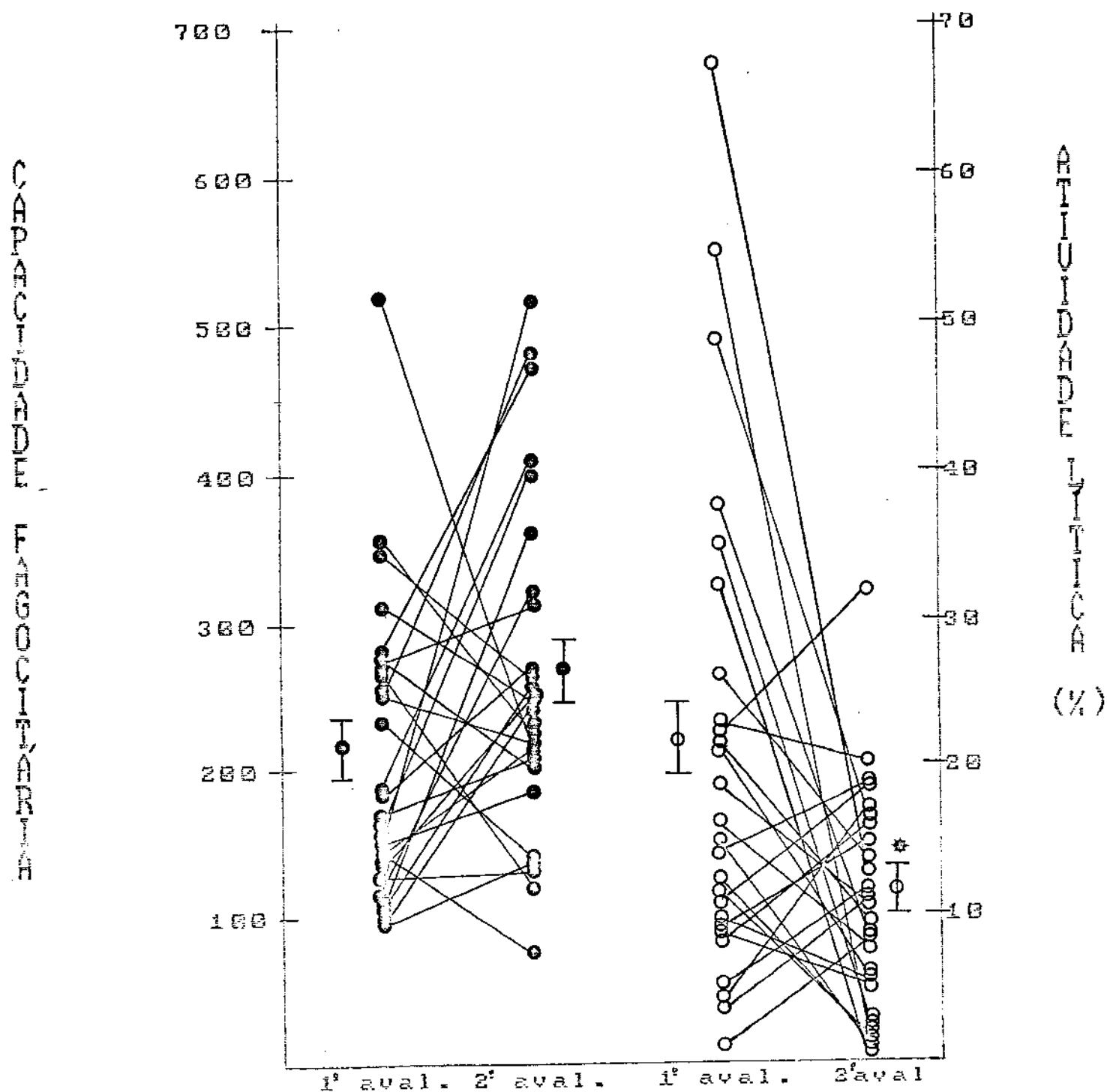


Fig. 4 - Estudo comparativo da atividade fagocitária (●) e lítica (○) de neutrófilos frente ao antígeno Candida albicans em indivíduos expostos ao mercúrio (n=26)

Obs: O intervalo entre as 2 avaliações foi de 6 meses

* $p < 0,05$ (Student-teste T)

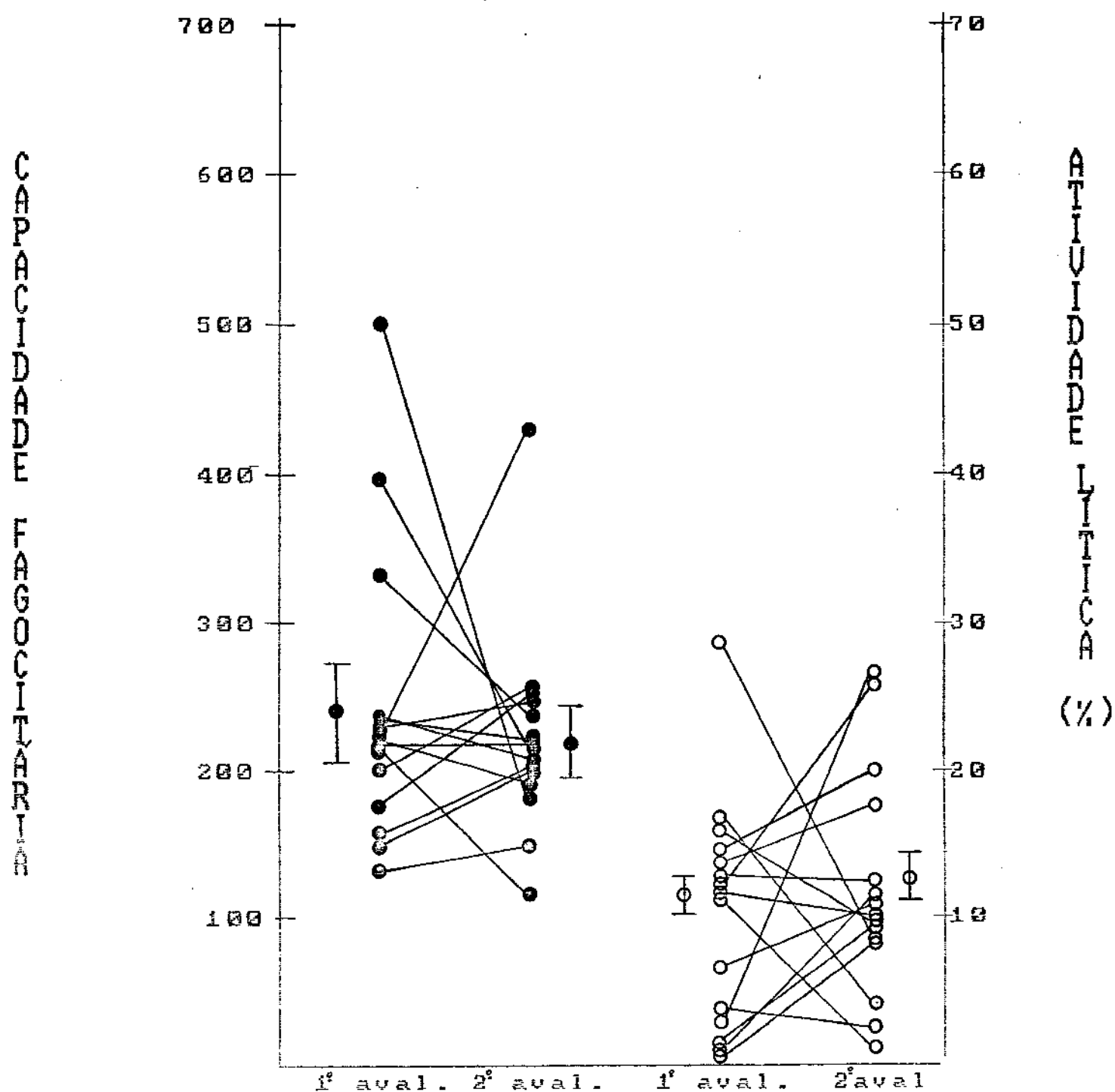
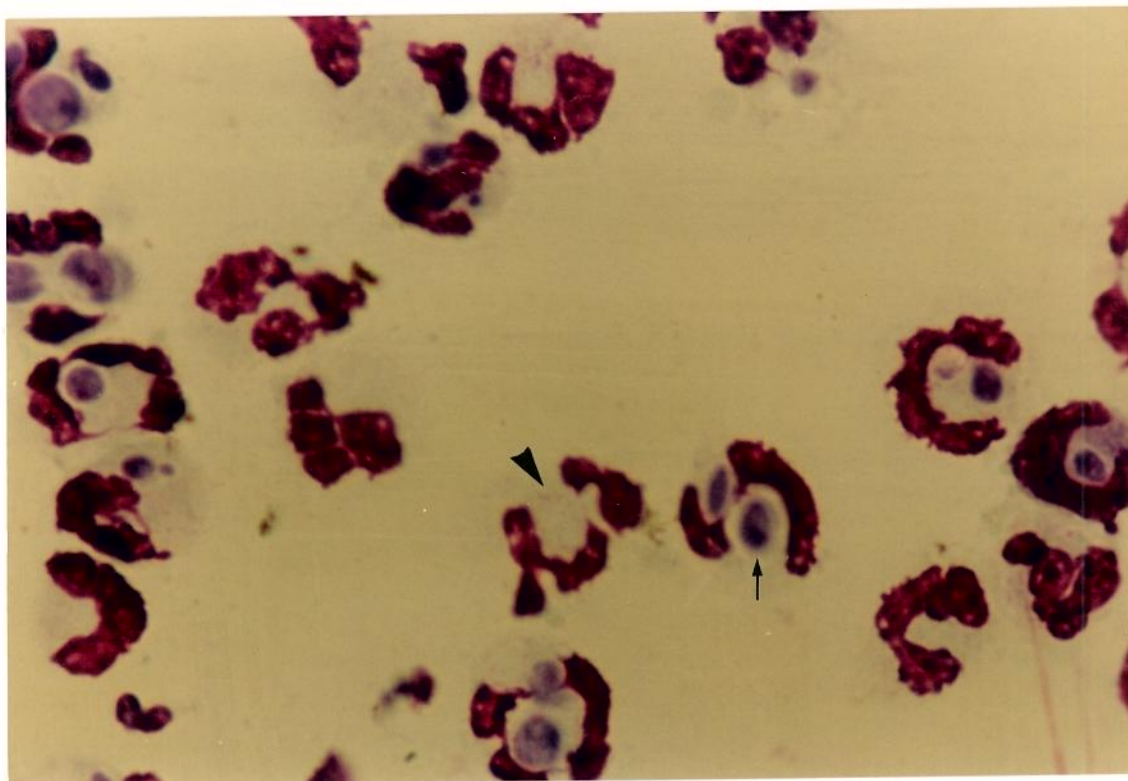
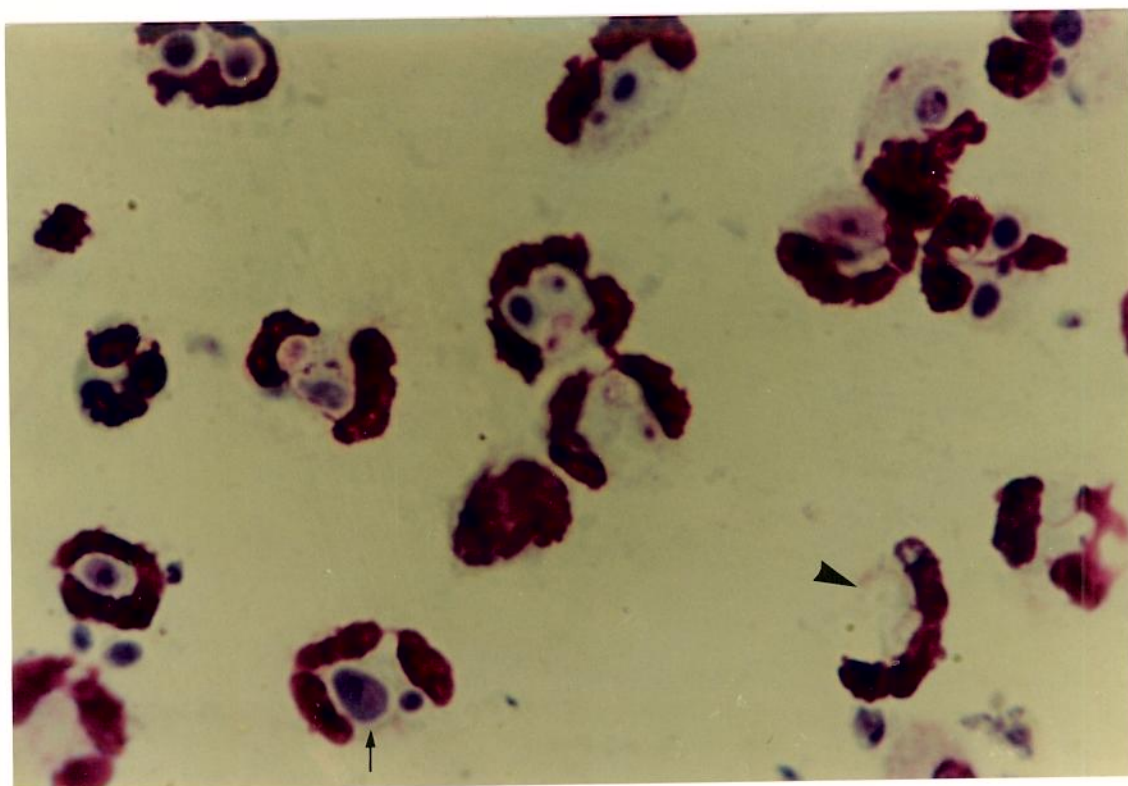


Fig. 5 - Estudo comparativo da atividade fagocitária(●) e lítica(O) de neutrófilos frente ao antígeno Candida pseudotropicalis em indivíduos expostos ao mercúrio(n=15)
Obs: O intervalo entre as 2 avaliações foi de 6 meses

6

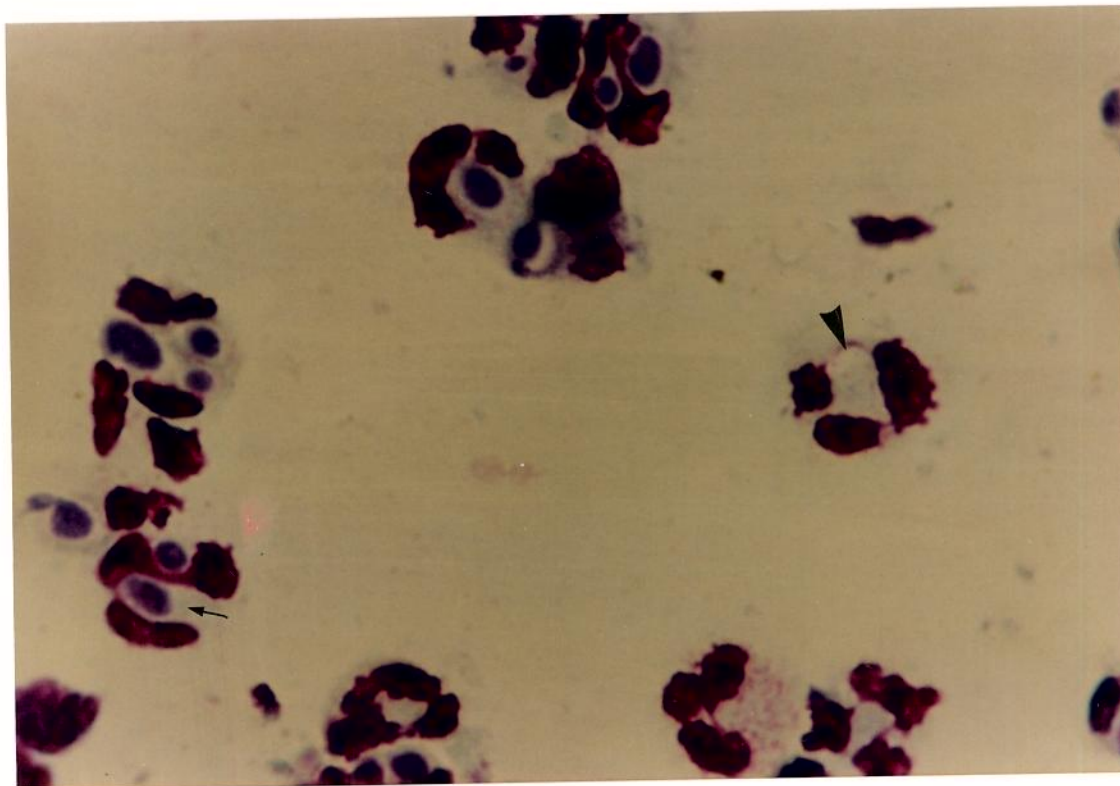


7

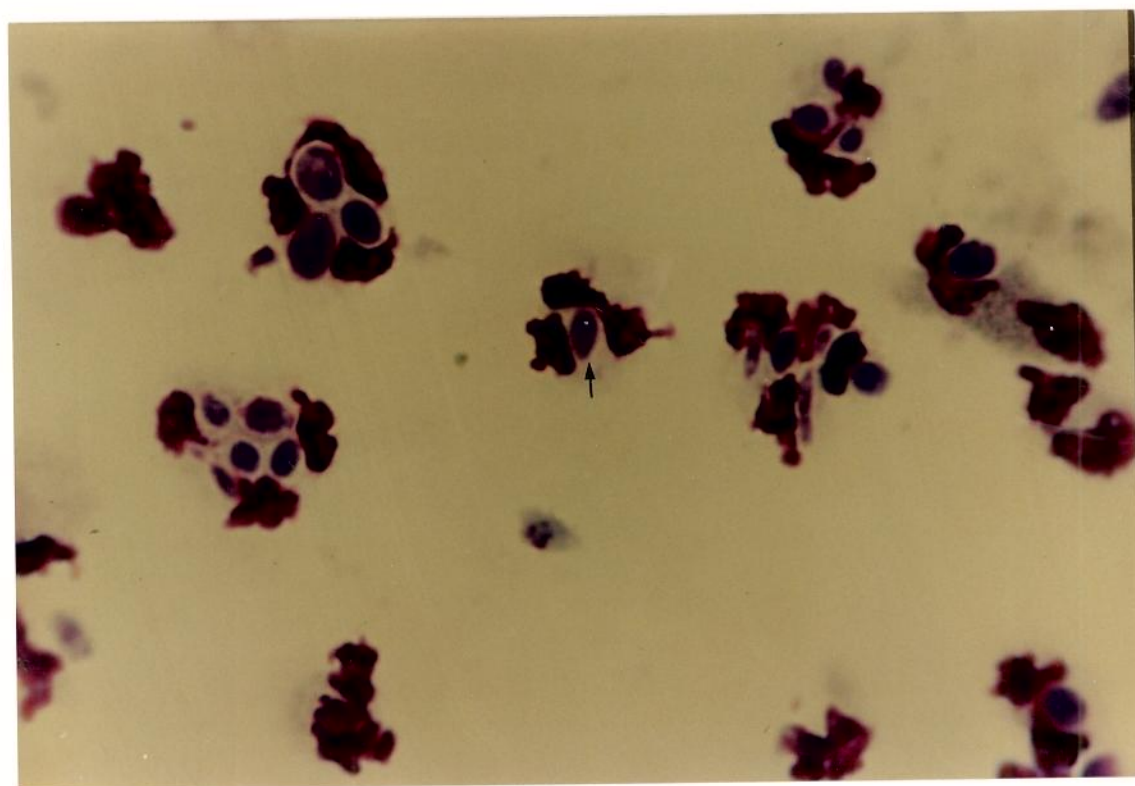


Figuras 6 e 7 - Aspecto microscópico de fagocitose (→) e lise(▷) de Candida albicans (6) e Candida pseudotropicalis (7) por neutrófilos de um controle. Aumento 1000x.

8

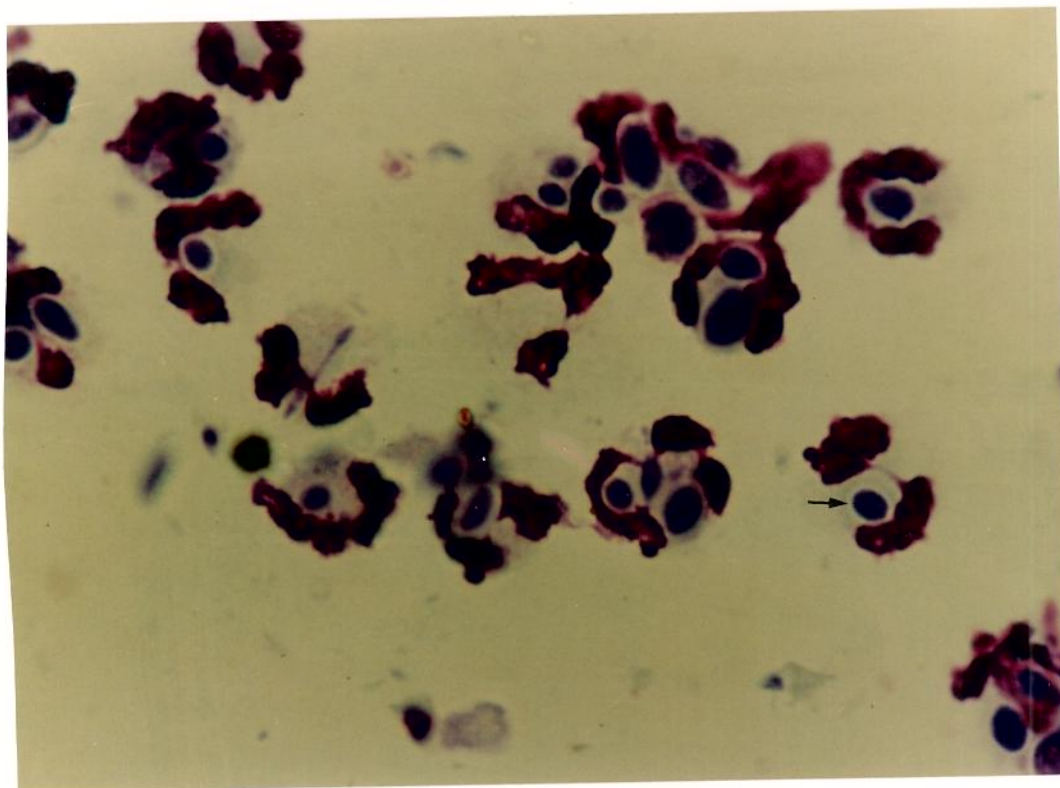


9

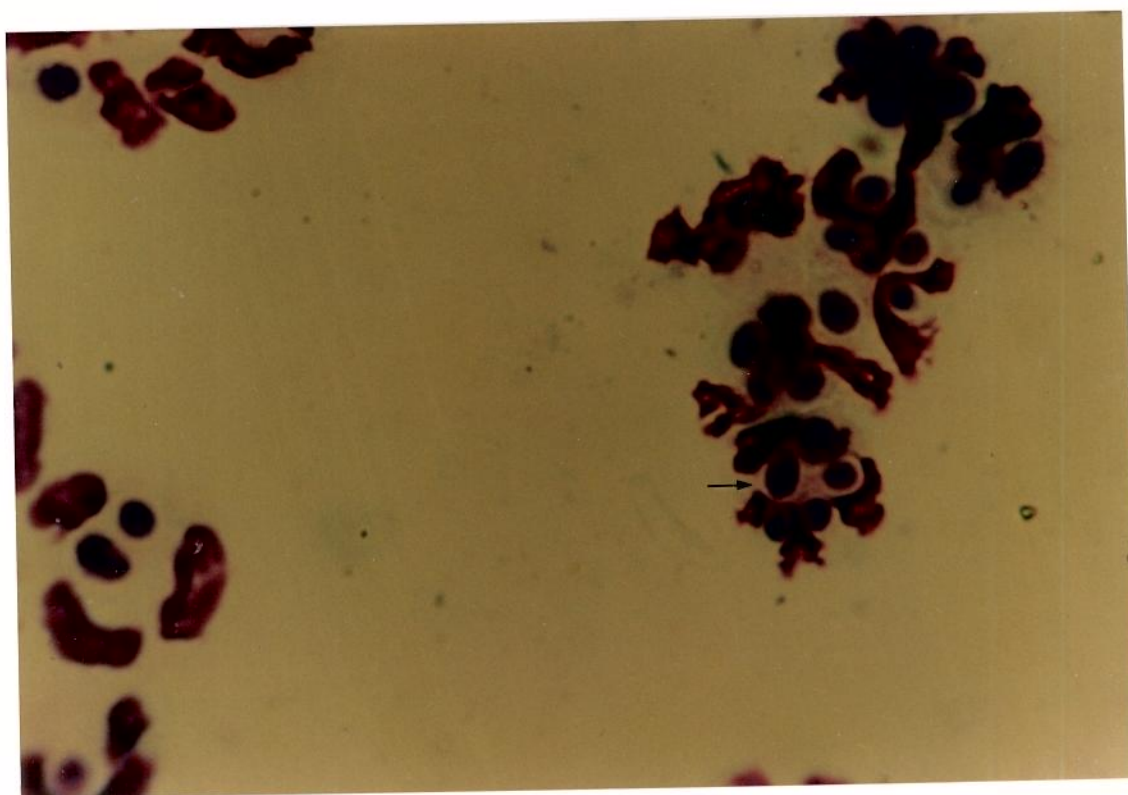


Fotografias 8 e 9 - Aspecto microscópico de fagocitose (→) e lise(▷)de Candida albicans por neutrófilos de indivíduos expostos ao mercúrio na 1ª avaliação (8) e após 6 meses, na 2ª avaliação (9). Aumento 1000x.

10



11



Fotografias 10 e 11 - Aspecto microscópico de fagocitose(→) e lise(→) de Candida pseudotropicalis por neutrófilos de indivíduos expostos ao mercúrio na 1ª avaliação (10) e após 6 meses, na 2ª avaliação (11). Aumento 1000x.

3- Atividade quimiotática de neutrófilos:

A atividade quimiotática de neutrófilos foi estudada em 48 indivíduos expostos ao mercúrio (tabela 6). Como pode ser visto na figura 12, esta atividade encontra-se significativamente reduzida em relação ao grupo controle ($p < 0,01$ - teste T de Student).

Como no caso anterior, uma 2ª avaliação na atividade quimiotática de neutrófilos foi realizada 6 meses após o 1º estudo (tabela 7), a qual manteve-se tão reduzida quanto na 1ª avaliação (figura 13).

TABELA 6- Atividade Quimiotática de neutrófilos

INDIVÍDUO	IDADE (anos)	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (meses)	MERCÚRIO URINÁRIO (ug/g creat.)	ATIVIDADE QUIMIOTÁTICA (um)
N.S.F.	34	6	44,5	83,0
G.F.S.	20	14	67,9	74,0
W.J.O.	24	5	31,3	28,0
J.E.G.	27	5	32,3	1,0
P.C.	35	7	51,7	5,0
S.L.M.	38	12	18,6	33,0
E.D.S.	32	12	49,8	42,0
E.B.S.	28	1	44,6	6,0
F.G.S.	26	2	19,2	3,0
C.M.X.	21	1	11,6	10,0
M.E.L.	28	15	97,4	1,0
M.L.B.	30	25	26,2	13,5
P.V.B.	38	7	67,6	14,5
A.L.V.	30	46	42,6	2,0
A.S.C.	31	3	27,8	10,0
J.R.M.C.	23	3	49,4	8,0
S.P.A.	19	2	28,4	2,5
A.A.S.	39	36	44,5	4,0
J.A.C.B.	28	1	26,3	5,0
N.L.D.	24	6	41,3	9,5
M.A.Z.	37	13	38,1	6,0
C.S.	43	33	3,5	2,5
F.R.S.	28	30	21,4	13,0
J.C.S.	38	3	4,4	13,0
A.N.A.	22	1	13,7	3,5
E.A.R.	23	0,5	5,7	33,0
J.M.L.M.	41	5	18,5	9,0
J.A.S.	23	2	12,8	19,0
J.T.O.	28	1	13,0	12,0
C.B.C.	53	4	3,3	20,0
G.A.V.	35	1	4,5	9,0
J.S.S.	41	5	5,2	9,0
E.A.C.	19	4	7,7	3,0
H.V.S.	20	4	3,4	19,0
J.N.B.S.	23	2	1,0	34,5
J.S.S.	23	4	11,8	55,7
F.X.C.	24	5	28,9	8,2
C.S.	23	1	16,5	14,2
J.R.A.M.	21	1	17,2	14,7
V.P.P.	31	2	13,0	18,5
M.R.O.	20	2	46,0	17,0
E.R.C.	38	3	1,4	19,5
C.R.	27	1	5,7	18,5
L.C.M.	32	5	1,4	18,5
A.F.V.	29	3	3,4	11,5
C.G.D.	25	30	5,2	20,0
A.Q.O.	40	1	9,7	18,0
V.O.S.	25	2	14,0	25,0
				$\bar{x}=17,0$

Valores normais: 33,42um a 79,7um

Mercúrio Urinário

Valor de referência: até 5ug/g de creatinina

Limite de tolerância biológica: até 50ug/g de creatinina

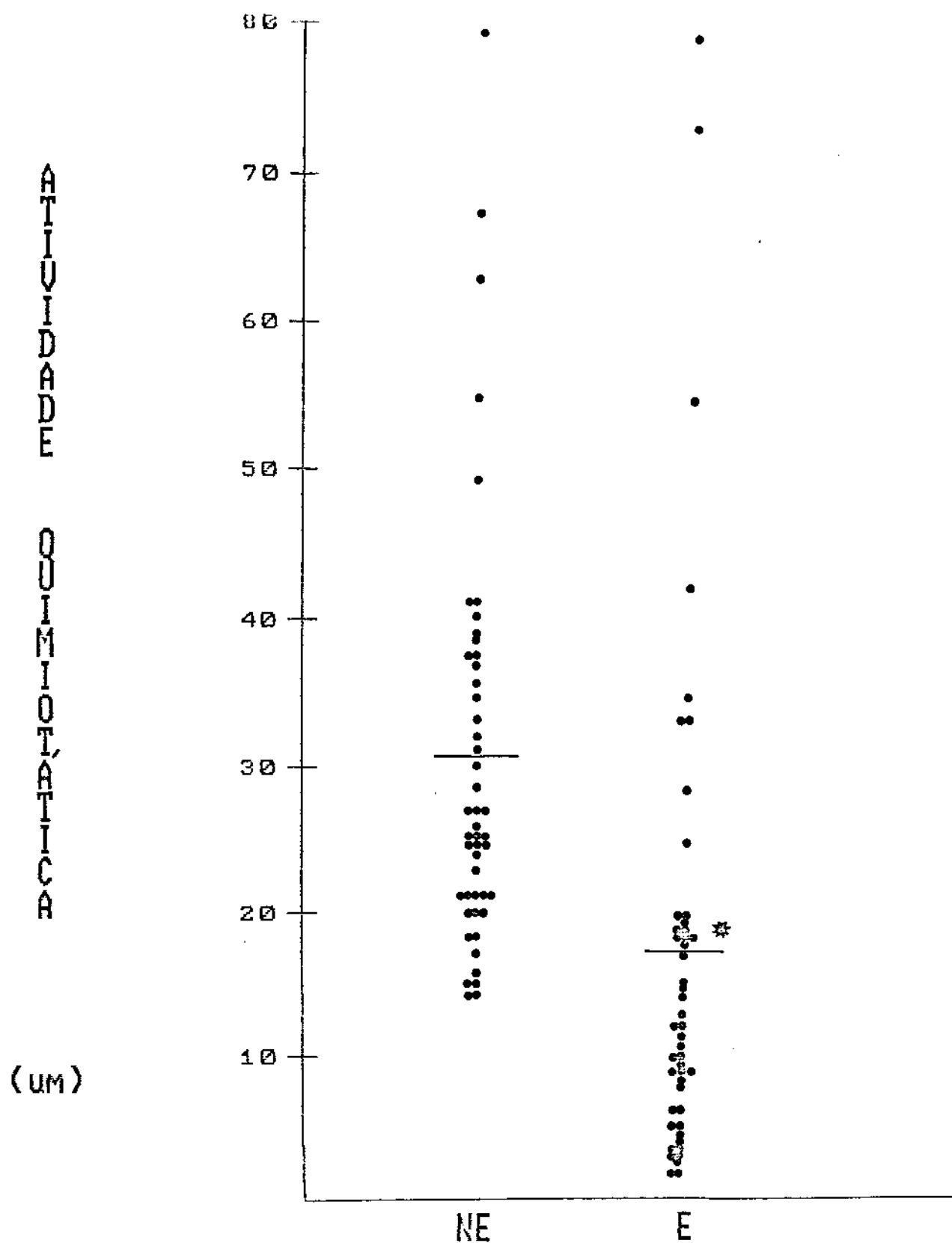


Fig.12 - Atividade quimiotática de neutrófilos em indivíduos com exposição ocupacional ao mercúrio (n=48). *p<0.01 ("Student"-T teste)
E = exposto NE = não exposto (controle)

TABELA 7- Estudo comparativo da atividade quimiotática de neutrófilos após 2 avaliações

INDIVÍDUO	1ª AVALIAÇÃO (um)	2ª AVALIAÇÃO (um)
G.F.S.	74,0	44,0
W.J.O.	28,0	30,0
S.L.M.	33,0	15,5
M.E.L.	1,0	22,5
M.L.B.	13,5	10,0
P.V.B.	14,5	27,5
A.L.V.	2,0	13,7
A.S.C.	10,0	14,0
J.R.M.C.	8,0	11,2
S.P.A.	2,5	2,0
J.A.C.B.	5,0	13,0
N.D.	9,5	36,2
M.Z.	6,0	9,5
C.S.	2,5	14,0
A.N.A.	3,5	16,0
J.T.O.	12,0	11,2
G.A.V.	9,0	1,0
E.A.C.	3,0	15,0
J.S.S.	55,7	40,0
E.R.C.	19,5	5,0
C.G.D.	20,0	7,0
C.S.	14,2	5,0
M.R.O.	17,0	37,0
A.F.V.	11,5	11,0
H.V.S.	19,0	6,0
J.N.B.S.	34,5	12,5
F.X.C.	8,2	37,5
J.R.A.M.	14,7	10,0
	$\bar{X}=16,11$	$\bar{X}=17,04$

Valores normais: 33,42 a 79,7

Obs: O intervalo entre as duas avaliações foi de 6 meses

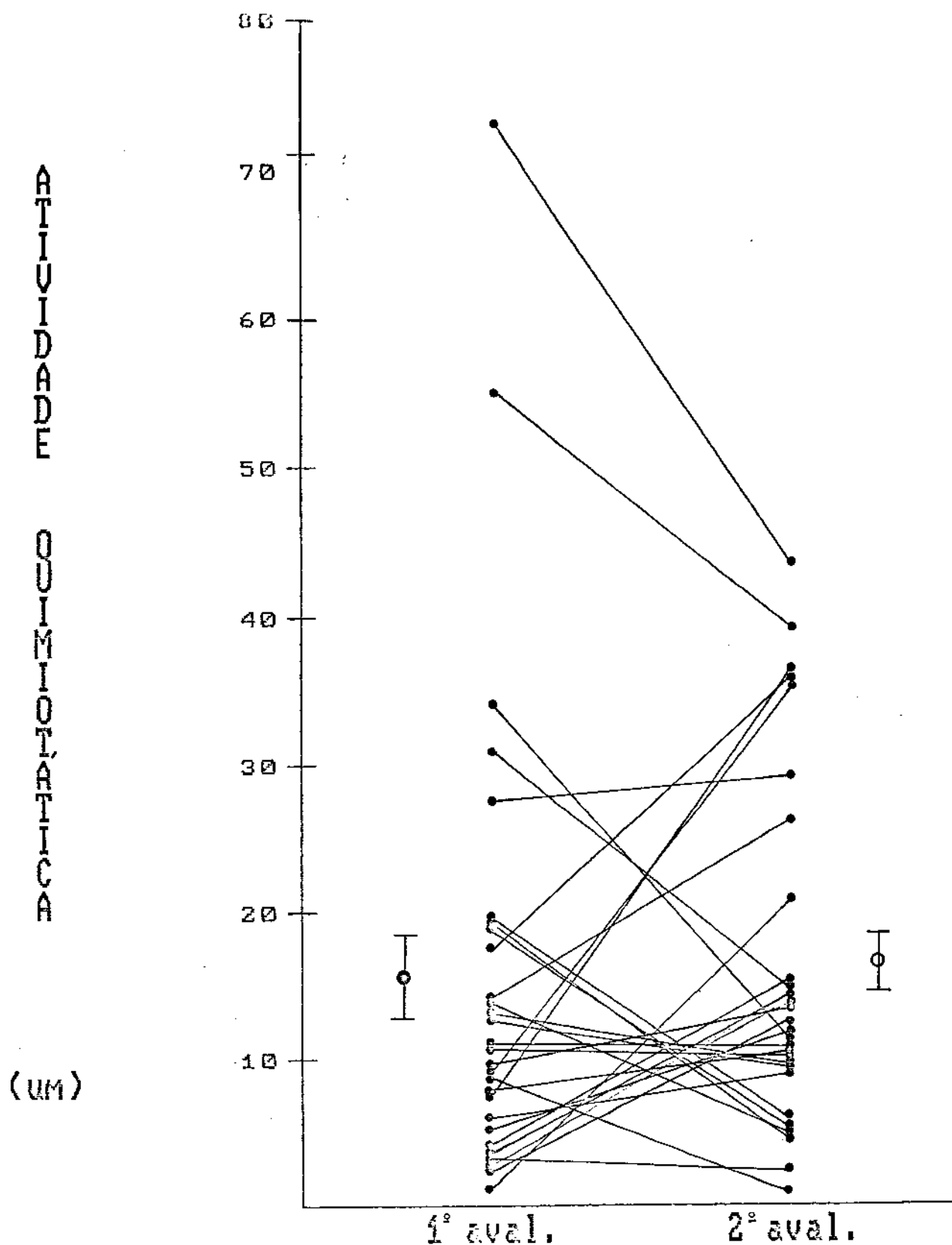


Fig.13 - Estudo comparativo da atividade quimiotática de neutrófilos em indivíduos expostos ao mercúrio (n=20)

Obs: O intervalo entre as 2 avaliações foi de 6 meses

4- Transformação blástica de linfócitos em resposta à fitohemaglutinina:

A capacidade proliferativa de linfócitos foi estudada em 31 indivíduos expostos ocupacionalmente ao mercúrio (tabela 8).

De acordo com os resultados obtidos (figura 14), podemos observar que não houve alteração significativa na capacidade proliferativa de linfócitos em resposta à PHA nestes trabalhadores em presença de soro AB normal. No entanto, quando os linfócitos foram incubados em presença de soro autólogo (tabela 9 e figura 15), observamos uma redução na capacidade linfoproliferativa ($p < 0,05$ - teste do sinal).

TABELA 8- Transformação blástica de linfócitos em resposta à fitohemaglutinina

INDIVÍDUO	IDADE (anos)	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (meses)	MERCÚRIO URINÁRIO (ug/g creat)	EXPOSTO (CPM)	CONTROLE (CPM)
G.F.S.	20	24	67,9	49328	30214
W.J.O.	24	13	31,3	37320	30214
S.L.M.	38	19	18,6	42900	30214
J.A.C.B.	28	8	26,3	2583	14729
M.A.Z.	37	22	18,1	14058	14729
G.A.V.	38	4	4,5	12467	14729
C.S.	43	43	10,0	16855	28821
M.L.B.	30	36	26,2	19291	28821
M.E.B.L.	28	15	97,4	23569	39395
A.A.S.	39	24	44,5	23977	39395
S.P.A.	20	14	28,4	42201	41940
A.N.A.	22	1	13,3	24515	41940
P.V.B.	38	7	67,6	73422	32311
A.L.V.	30	44	42,6	51772	32311
J.S.S.	41	5	5,2	9471	14208
E.A.C.	19	4	7,7	22958	23983
H.V.S.	20	4	3,4	17742	14208
J.N.B.S.	23	2	1,0	38205	26659
J.S.S.	23	4	11,8	31568	26659
F.X.C.	24	5	15,0	24864	26659
C.S.	23	1	12,5	29500	17032
J.R.A.M.	23	1	17,2	27392	17032
V.P.P.	31	2	13,0	55533	45407
M.R.O.	20	2	46,0	45050	45407
E.R.C.	38	3	1,4	27936	45407
C.R.	27	1	5,7	30152	50254
L.C.M.	32	5	1,4	88763	50254
C.G.D.	25	30	3,4	45617	50134
A.Q.O.	40	1	5,2	71888	34523
A.F.V.	29	5	9,7	54370	34523
V.O.S.	25	2	14,0	44450	35528
				$\bar{X}=35474$	$\bar{X}=31536$

CPM = contagem por minuto

Mercúrio Urinário:

Valor de referência: até 5ug/g de creatinina

Limite de tolerância biológica: até 50ug/g de creatinina

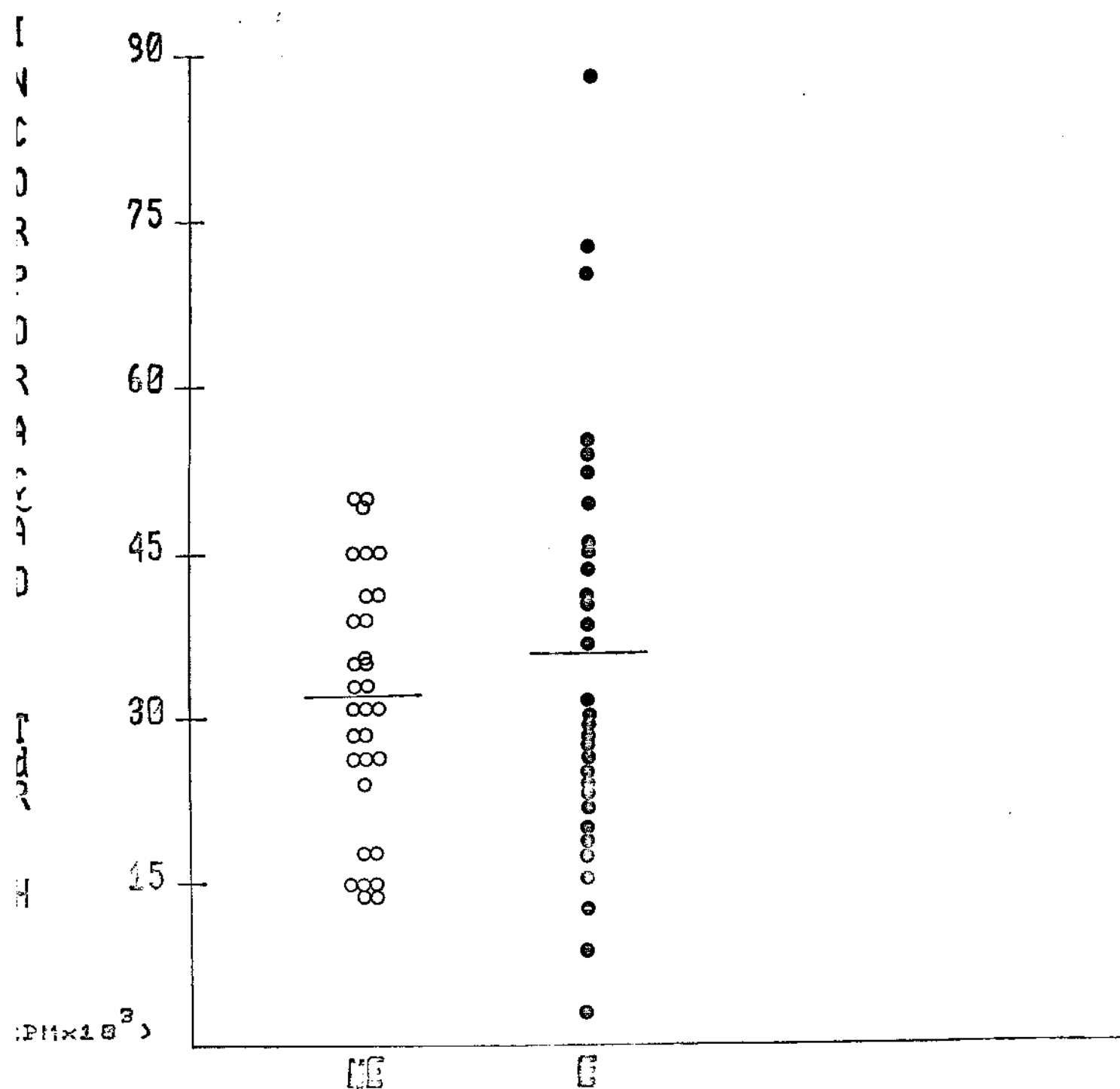


Fig. 14 Transformação blástica em resposta a fitohemaglutinina (PHA) em indivíduos expostos ocupacionalmente ao peróxido (n=31).
 (•) indivíduo exposto (○) indivíduo não exposto

TABELA 9- Transformação blástica de linfócitos em resposta à fitohemaglutinina

INDIVÍDUO	IDADE (anos)	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (meses)	MERCÚRIO URINÁRIO (ug/g creat)	INDIVÍDUO EXPOSTO soro AB (CPM) soro autólogo	
G.F.S.	20	24	67,9	49328	48983
W.J.O.	24	13	31,3	37320	47843
S.L.M.	38	19	18,6	42900	69051
G.A.V.	38	4	4,5	12467	14452
M.E.B.L.	28	15	97,4	23569	14194
A.A.S.	39	24	44,5	23977	18648
S.P.A.	20	14	28,4	42201	44115
A.N.A.	22	1	13,3	24515	27112
P.V.B.	38	7	67,6	73422	62618
A.L.V.	30	44	42,6	51772	33884
J.S.S.	41	5	5,2	9471	16149
E.A.C.	19	4	7,7	22958	28632
H.V.S.	20	4	3,4	17742	8172
J.N.B.S.	23	2	1,0	38205	28558
J.S.S.	23	4	11,8	19768	14744
F.X.C.	24	5	28,9	24864	29912
C.S.	23	1	16,5	29500	13553
J.R.A.M.	23	0	17,2	27392	5842
V.P.P.	31	2	13,0	55533	45346
M.R.O.	20	2	46,0	45050	36613
E.R.C.	38	3	1,4	27936	14446
C.R.	27	1	5,7	30152	27950
L.C.M.	32	5	1,4	88763	66632
C.G.D.	25	30	5,2	45617	47724
A.Q.O.	40	1	9,7	71888	48739
A.F.V.	29	5	3,4	54370	51173
V.O.S.	25	2	14,0	44540	28771
				$\bar{x}=38321$	$\bar{x}=33105$

CPM = contagem por minuto

Mercúrio Urinário:

Valor de referência: até 5ug/g de creatinina

Limite de tolerância biológica: até 50ug/g de creatinina

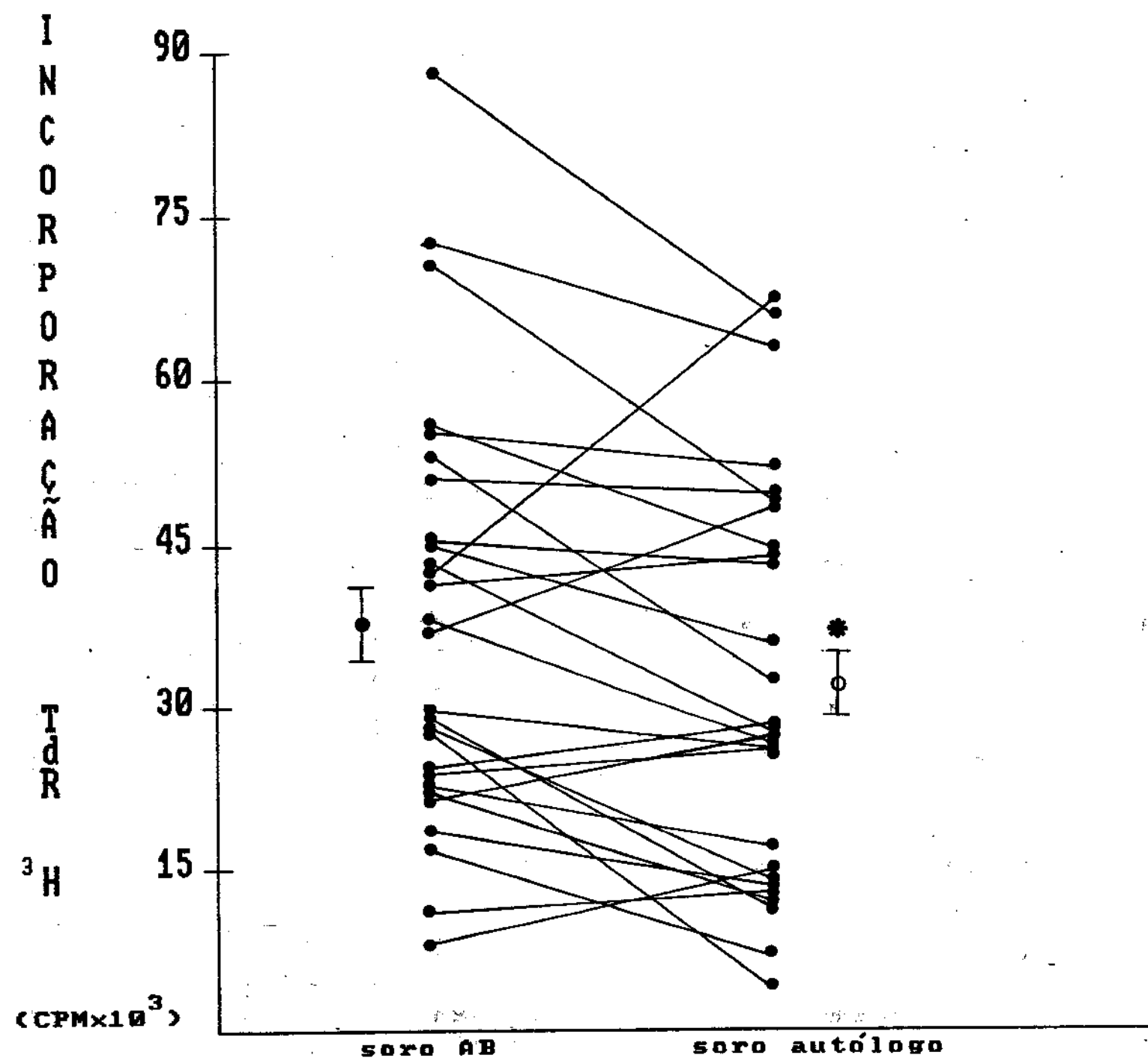


Fig. 15 Estudo comparativo da capacidade proliferativa de linfócitos em resposta a fitohemaglutinina em presença de soro AB e soro autólogo em trabalhadores expostos ao mercúrio (n=27) *p < 0,05

5- Contagem de hemácias com irregularidades de superfície ("Pits"):

Foi realizado o estudo da contagem de hemácias com irregularidades de superfície em 33 trabalhadores expostos ao mercúrio (tabela 10). Todos os indivíduos analisados apresentaram resultados dentro da normalidade, isto é, até 2%.

6- Hemograma:

Todos os indivíduos estudados apresentaram concentração sanguínea de hemoglobina e número de glóbulos brancos dentro dos valores de referência para normalidade (tabelas 11 e 12)

TABELA 10- Contagem de hemácias com irregularidades de superfície ("pits")

INDIVÍDUO	IDADE (anos)	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (meses)	MERCÚRIO URINÁRIO (ug/g creat.)	"PITS" (%)
N.D.	24	6	41,3	0,2
M.Z.	37	13	38,1	0,0
C.S	43	36	10,0	0,2
M.L.B.	30	25	26,2	0,2
A.S.C.	31	3	27,8	0,2
E.A.R.	23	1	5,7	0,2
J.R.M.C.	23	3	49,4	0,2
G.A.V.	38	1	4,5	0,2
C.B.C.	53	4	8,0	0,4
J.T.O.	28	1	13,0	0,4
J.A.S.	23	2	12,8	0,0
J.M.L.M.	41	5	18,5	0,2
J.A.C.B.	28	1	26,3	0,4
L.H.M.	33	8	45,8	0,4
N.S.F.	34	6	44,5	0,2
G.F.S.	20	14	67,9	1,4
W.J.O.	24	5	31,3	0,6
S.L.M.	38	12	18,6	1,2
E.B.S.	28	1	44,6	0,0
F.G.S.	26	2	19,2	0,0
C.M.X.	21	1	11,6	0,0
A.A.S.	39	24	44,5	0,2
M.A.S.	23	3	33,6	0,0
E.S.	18	3	22,7	0,2
F.R.S.	28	30	21,4	0,2
M.P.S.F.	23	2	51,1	0,2
M.E.B.L.	28	15	97,4	0,2
P.V.B.	38	7	67,6	0,4
A.L.V.	30	44	42,6	0,4
E.P.S.	20	2	62,5	0,2
J.C.S.	38	3	32,0	0,2
A.N.A.	22	1	13,3	0,0
L.F.B.	18	2	20,4	0,2

 $\bar{x}=0,3$ Valores normais: até 2%

Mercúrio Urinário:

Valor de referência: até 5ug/g de creatinina

Limite de tolerância biológica: até 50ug/g de creatinina

TABELA 11- Hemoglobimetria e leucometria em indivíduos com exposição ocupacional ao mercúrio

INDIVÍDUO	IDADE (anos)	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (meses)	MERCÚRIO URINÁRIO (ug/g creat.)	HEMOGLOBINA (g/dl)	LEUCOMETRIA (cel/mm ³)
N.D.	24	6	41,3	14,8	4100
M.Z.	37	13	38,1	16,5	5900
C.S.	43	33	10,0	16,2	8600
M.L.B.	30	25	26,2	13,8	4600
A.S.C.	31	3	27,8	15,4	4900
E.A.R.	23	0,5	5,7	13,6	5100
J.R.M.C.	23	3	49,4	14,7	11700
G.A.V.	38	1	4,5	15,0	9300
C.B.C.	53	4	8,0	14,9	5400
J.T.O.	28	1	13,0	14,7	8900
J.A.S.	23	2	12,8	14,2	12300
J.M.L.M.	41	5	18,5	15,2	8800
J.A.C.B.	28	1	26,3	17,0	7400
L.H.M.	33	8	45,8	16,3	7800
N.S.F.	34	10	44,5	14,2	4900
G.F.S.	20	25	67,9	15,6	5500
W.J.O.	24	5	31,3	16,1	5700
S.L.M.	38	12	18,6	14,7	5300
E.B.S.	28	1	44,6	15,9	8400
F.G.S.	26	2	19,2	16,2	9300
C.M.X.	21	1	11,6	14,1	4000
A.A.S.	39	24	44,5	15,2	4200
M.A.S.	23	3	33,6	15,9	2200
E.S.	18	3	22,7	14,5	7000
F.R.S.	28	30	21,4	15,8	5300
M.P.S.F.	23	2	51,1	16,1	6700
M.E.B.L.	28	15	37,4	14,2	4700
P.V.B.	38	7	67,6	14,1	6200
A.L.V.	30	46	42,6	15,0	11000
E.P.S.	20	2	62,5	15,8	8000
J.C.S.	38	3	32,0	14,5	7500
A.N.A.	22	1	13,3	15,9	3400
L.F.B.	18	2	20,4	15,8	7300
S.P.A.	20	14	28,4	15,1	4700
J.S.S.	41	5	5,2	15,5	10900
E.A.C.	19	4	7,7	15,4	7000
H.V.S.	20	4	3,4	15,9	7400
J.N.B.S.	23	2	1,0	16,0	7800
J.S.S.	23	4	11,8	15,4	8300
F.X.C.	24	5	28,9	15,6	8500
C.S.	23	1	16,5	15,9	7100
J.R.A.M.	21	1	17,2	15,0	7400
V.P.P.	31	2	13,0	15,5	8300
M.R.O.	20	2	46,0	15,0	8900
E.R.C.	38	3	1,4	15,4	7800
C.R.	27	1	5,7	15,2	10700
L.C.M.	32	5	1,4	13,6	6300
A.F.V.	29	3	3,4	16,4	8200
C.G.D.	25	30	5,2	16,2	7000
A.Q.O.	40	1	9,7	14,8	8000
V.O.S.	25	2	14,0	15,2	10700

VALORES NORMAIS

Hemoglobina:

Masc.: 14,0 a 18,0 g/dl

Leucometria: 4.500 a 11.000 cel/mm³Mercurio Urinário:

Valor de referência: até 5ug/g de creatinina

Limite de tolerância biológica: até 50ug/g de creatinina

TABELA 12- Estudo comparativo da hemoglobinometria e leucometria após 2 avaliações

INDIVÍDUO	HEMOGLOBINOMETRIA (g/dl)		LEUCOMETRIA (cel/mm ³)	
	(1ª.aval.)	(2ª.aval.)	(1ª.aval.)	(2ª.aval.)
G.F.S.	15,6	15,5	5500	5600
W.J.O.	16,1	15,3	5700	6300
S.L.M.	14,7	15,2	5300	6200
M.E.L.	14,2	16,4	4700	5200
M.L.B.	13,8	11,3	4600	6500
P.V.B.	14,1	15,6	6200	6900
A.L.V.	15,0	14,2	11000	8800
A.S.C.	15,4	14,2	4900	4700
J.R.M.C.	14,7	14,2	11700	10100
J.A.C.B.	17,0	15,7	7400	7700
N.D.	14,8	16,0	4100	5200
M.Z.	16,5	15,9	5900	9100
C.S.	16,2	14,0	8600	6900
J.T.O.	14,7	14,4	8900	9700
G.A.V.	15,0	16,4	9300	10200
E.A.C.	15,4	15,2	7000	7100
J.S.S.	15,4	15,4	8300	7400
E.R.C.	15,4	14,5	7800	6600
C.G.D.	16,2	16,5	7000	7400
C.S.	15,9	16,0	7100	7200
M.R.O.	15,0	15,1	8900	6200
A.F.V.	16,4	16,2	8200	6700
H.V.S.	15,9	16,5	7400	6000
J.N.B.S.	16,0	15,9	7800	5400
F.X.C.	15,6	16,1	8500	8700
J.R.A.M.	15,0	16,6	7400	7200

VALORES NORMAIS

Hemoglobina:

Masc.: 14,0 a 18,0 g/dl

Leucometria: 4.500 a 11.000 cel/mm³

Obs: O intervalo entre as duas avaliações foi de 6 meses

V - DISCUSSÃO

1- Atividade fagocitária e lítica de neutrófilos:

A defesa do ser humano contra microorganismos invasores é executada por uma série de mecanismos humorais e celulares. A primeira barreira efetiva do organismo contra estes patógenos é a produção de ácido láctico e ácidos graxos na pele assim como secreções do tecido mucóide. Nos fluidos secretórios, lisozimas, fosfolipases e imunoglobulinas da classe IgA constituem outra linha de defesa. No sangue e tecido linfóide, anticorpos específicos da classe IgG e IgM, e componentes do sistema complemento formam o sistema humoral de defesa, enquanto linfócitos citotóxicos e secretores de linfocinas caracterizam a imunidade celular. Finalmente, as células fagocitárias do sangue e tecidos formam uma última e eficiente linha de resistência contra patógenos (ROOS & WEENING, 1979)

As células fagocitárias (neutrófilos e monócitos) são capazes de se locomoverem até o local onde o microorganismo está presente. Este processo é conhecido como quimiotaxia, no qual as células fagocitárias migram em direção ao foco inflamatório, obedecendo um gradiente de concentração de certas substâncias, denominadas fatores quimiotáticos. O microorganismo encontra-se coberto por proteínas derivadas do hospedeiro (constituíntes do sistema complemento e imunoglobulinas) conhecidas como opsoninas. Quando os fagócitos entram em contato com partículas opsonizadas, a resposta é altamente específica e localizada. Pseudópodos são direcionados ao microorganismo, ocorrendo a formação do fagossomo

após encaixe opsonina-receptor (ROSS & WEENING, 1979; HAENEY, 1985; EL-HAG et al, 1986 e ROTROSEN & GALLIN, 1987).

Posteriormente, grânulos das células fagocitárias fundem-se com a membrana plasmática invaginada. Com isso, o conteúdo dos grânulos é liberado e forma-se o fagolisossomo. Os neutrófilos contêm dois tipos de grânulos que são importantes na morte bacteriana. Um deles, os grânulos azurófilos, contêm mieloperoxidase, assim como uma bateria de enzimas hidrolíticas; o outro tipo de grânulos, contêm lactoferrina, uma proteína ligada à cobalamina, lisozima e outras substâncias. Ambos grânulos fundem-se com o vacúolo fagocítico, descarregando seu conteúdo no espaço ao redor do microorganismo contido no vacúolo (HAENEY, 1985 e ROTROSEN & GALLIN, 1987)

A degranulação resulta em um aumento na atividade respiratória da célula, processo conhecido como "explosão respiratória". Este é caracterizado por uma maior atividade da via glicolítica e da via hexose monofosfato acompanhada por um aumento no consumo de O_2 e produção de H_2O_2 . A via hexose monofosfato degrada glicose no citoplasma liberando como produtos finais 6 moléculas de CO_2 e 24 de H_2 . Além disso, são gerados ribose e NADPH. Essa complexa série de eventos resulta na ativação de uma oxidase ligada à membrana plasmática denominada NADPH oxidase, a qual utiliza NADPH como doador preferencial de elétrons (KLEBANOFF & PINCUS, 1971; BABIOR et al, 1973; CHESON et al, 1976; BABIOR, 1978; FRANK & MASSARO, 1980; KLEBANOFF, 1980; SHURIN et al, 1983 e EL-HAG et al, 1986). O NADPH oxida-se pela ação da NADPH oxidase, como pode ser visto na seguinte figura :

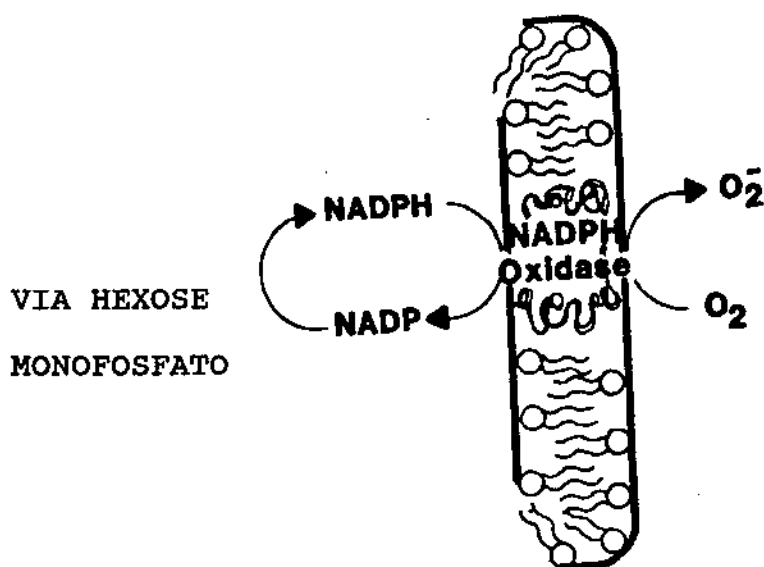
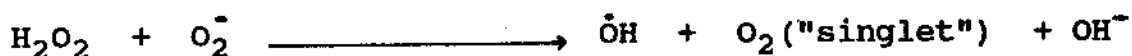
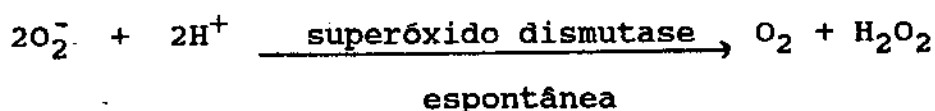


Figura 16 - Localização e ativação do sistema NADPH oxidase associado à membrana plasmática nas células fagocitárias.

Desta maneira, moléculas como o O_2 podem ter mais de 1 elétron na sua última camada orbital, como é o caso do ânion superóxido(O_2^-). A partir deste, forma-se peróxido de hidrogênio(H_2O_2), radical hidroxila($\cdot OH$) e oxigênio "singlet"(O_2). Estas reações encontram-se esquematizadas abaixo:



O ânion superóxido pode atravessar as membranas celulares (através de penetração na camada lipídica ou via canais iônicos) e desta forma, ter acesso aos sítios onde seus produtos altamente reativos exercem seus efeitos tóxicos. O peróxido de hidrogênio também pode difundir-se através das membranas celulares, ganhando acesso a organelas intracelulares.

A atividade microbicida do H_2O_2 é bastante aumentada quando ocorre sua conversão em ácido hipocloroso ($HOCl$) na presença de cloretos e da enzima mieloperoxidase.



A enzima mieloperoxidase pode também catalisar a produção de oxidantes microbicidas do Br^- e I^- , mas o Cl^- parece ser o substrato fisiológico devido à sua concentração nos neutrófilos. O sistema mieloperoxidase-peróxido de hidrogênio-halogênio pode prejudicar a bactéria através da incorporação de um halogênio no interior da mesma. O ácido hipocloroso também reage com cloretos, formando clorinas e potentes oxidantes como o N-cloro; O sistema mieloperoxidase descarboxila aminoácidos, convertendo-os em aldeídos, dióxido de carbono e amônia.

Além das suas atividades microbicidas, o sistema mieloperoxidase pode modular a resposta inflamatória por inativação oxidativa de mediadores solúveis e quimioatraentes, incluindo peptídeos formil, $C5a$, leukotrienes e prostaglandinas (KLEBANOFF & ROSEN, 1979).

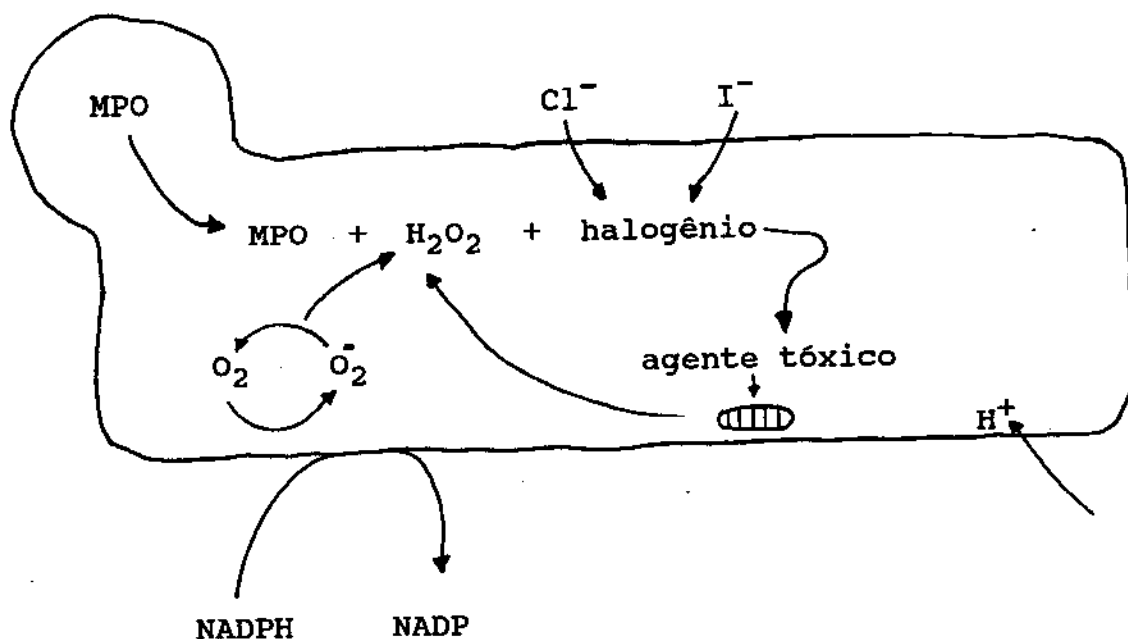


Figura 17 - Sistema microbicida mieloperoxidase (MPO) - peróxido de hidrogênio - halogênio em neutrófilos normais (KLEBANOFF & ROSEN, 1979).

O ânion superóxido, o radical hidroxila, o peróxido de hidrogênio, o oxigênio "singlet" e o ácido hipocloroso são altamente tóxicos para o microorganismo e portanto, responsáveis pelo processo lítico (KLEBANOFF & PINCUS, 1971; BABIOR et al, 1973; CHESON et al, 1976; BABIOR, 1978; FRANK & MASSARO, 1980; KLEBANOFF, 1980; PICK & KEISARI, 1980; SHURIN et al, 1983; MALAMUD et al, 1985; EL-HAG et al, 1986; ROTROSEN & GALLIN, 1987, CALICH & VAZ, 1989 e SHANBHAG et al, 1992)

Nossos resultados apontam para um comprometimento na capacidade lítica de neutrófilos de trabalhadores com exposição ocupacional ao mercúrio, sugerindo uma interferência deste metal na produção de radicais livres. Nesse sentido, estudos têm mostrado que o íon mercúrio pode reagir com uma variedade de biomoléculas, incluindo grupos sulfidrila, histidina, triptofano e tirosina, metionina, adenosina, uridina, timidina (MARSHALL et al, 1984) e mais recentemente com nucleotídeos piridínicos reduzidos (NADPH). O mercúrio parece interagir com a porção nicotinamida da molécula de NADPH, num complexo 1:1 (MARSHALL et al, 1984 e MALAMUD et al, 1985). Esta reação pode ser visualizada na fórmula estrutural a seguir:

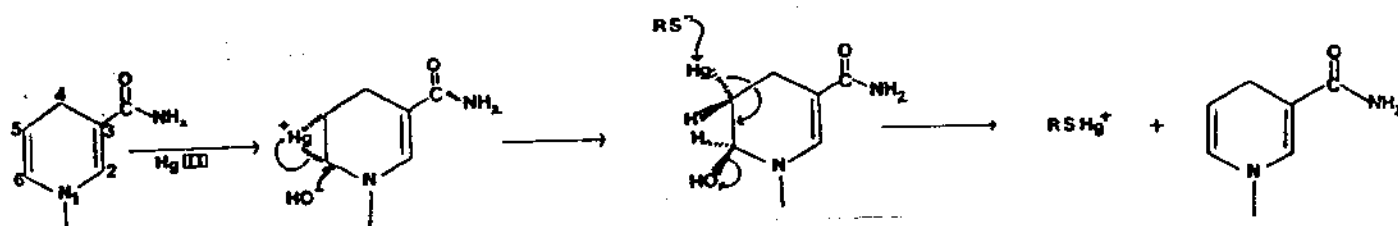
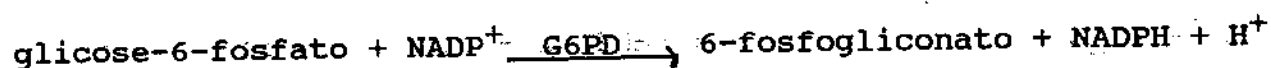
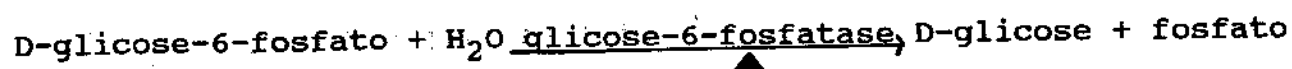


Figura 18 - Mecanismo proposto para a formação do complexo Hg(II).NADPH

Desta forma, esse complexo pode limitar severamente a utilização de nucleotídeos piridínicos reduzidos por enzimas NADPH-dependentes, atuando como um inibidor de reações catalisadas por estas enzimas, como é o caso da NADPH oxidase (MARSHALL et al, 1984 e MALAMUD et al, 1985).

Foi observado que o mercúrio, mesmo em baixas concentrações, é capaz de inibir profundamente a produção de radicais livres do oxigênio, o que permite uma redução na capacidade lítica de neutrófilos frente aos antígenos Candida albicans e Candida pseudotropicalis em indivíduos expostos ocupacionalmente ao mercúrio. Tal fato sugere que exposição ocupacional e ambiental a esse metal pode comprometer a função protetora normal dos leucócitos polimorfonucleares (MALAMUD et al, 1985).

Alguns trabalhos sugerem que o mercúrio também atua inibindo as enzimas glicose-6-fosfatase (HAYES, 1983) e glicose-6-fosfatodesidrogenase (G6PD)



Hg

Tais enzimas apresentam uma função fisiológica muito importante pois estão relacionadas com a regeneração de glicose livre para o sangue e geração de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ (via glicolítica), respectivamente (AZEVEDO, 1989). Portanto, a

inibição da glicose-6-fosfato desidrogenase pelo mercúrio pode ocasionar depleção séria nas concentrações de NADPH^+ e consequentemente, redução na formação de produtos ativos de oxigênio, proporcionando uma redução na atividade lítica de neutrófilos.

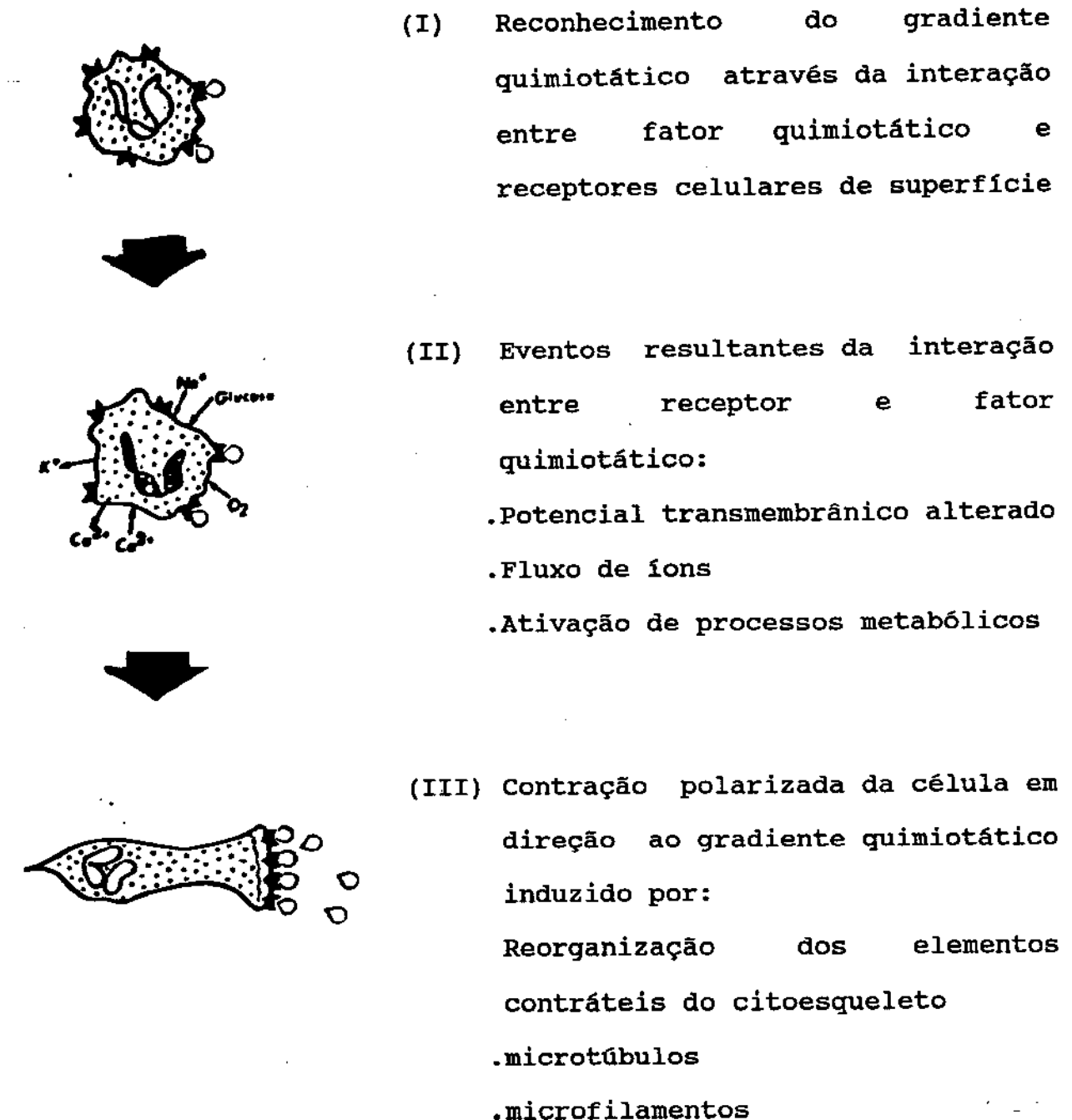
O uso neste trabalho dos dois antígenos, Candida albicans e Candida pseudotropicalis, justifica-se pelo fato da lise do primeiro ser dependente e a do segundo independente da ação da enzima mieloperoxidase (LEHRER et al, 1969a; LEHRER et al, 1969b e BALLART et al, 1987).

Os resultados obtidos na 1ª avaliação demonstram uma redução na atividade lítica de neutrófilos tanto frente à Candida albicans quanto à Candida pseudotropicalis, sugerindo portanto, uma interferência do mercúrio em uma etapa do processo lítico que seja comum às 2 espécies de Candida (Ex. níveis de NADPH). No entanto, os resultados observados na 2ª avaliação (6 meses após a 1ª investigação) apontam para alterações nos níveis da enzima mieloperoxidase, uma vez que, com o passar do tempo, essa atividade encontra-se ainda mais comprometida em relação ao antígeno C.albicans. Este resultado é confirmado pela correlação linear existente entre tempo de exposição e redução nesta atividade do antígeno C.albicans. Já a capacidade lítica frente à C.pseudotropicalis mantém-se tão reduzida quanto na 1ª avaliação. Portanto, esses resultados sugerem que o íon mercúrio possa atuar nos níveis da enzima mieloperoxidase através de um efeito cumulativo.

2- Atividade quimiotática de neutrófilos:

A quimiotaxia é iniciada pela ligação de "químioatraentes" a receptores específicos da membrana plasmática. A ocupação destes receptores induz a rápidas alterações no potencial transmembrânico da célula, mudança nos níveis de nucleotídeos cíclicos e fluxo de íons, sendo muito importante o influxo de cálcio extracelular assim como um aumento na sua liberação dos estoques intra-celulares, aumento na utilização de oxigênio e glicose, alterações na fluidez e composição fosfolipídica da membrana. A reorganização dos elementos do citoesqueleto como estrutura microtubular e filamentos de actina assim como os receptores de membrana parecem ser de fundamental importância na orientação da direção da migração (ALLAN & WILKINSON, 1978; SNYDERMAN & GOETZL, 1981; HAENEY, 1985; ROTROSEN & GALLIN, 1987; BECKER, 1990 e FRANK, 1990). Na Figura 19 apresentamos um esquema dos processos envolvidos no mecanismo de migração leucocitária.

Nossos resultados demonstram uma redução significativa na atividade quimiotática de neutrófilos nos trabalhadores expostos ao mercúrio. Esta deficiência está provavelmente relacionada com um defeito celular ao invés de uma inibição através de componente plasmático, uma vez que as células foram lavadas previamente. Nesse sentido, o mercúrio pode interferir a nível de grupamentos sulfidríla intracelulares (ELFERINK & KOSTER, 1991) e de superfície extracelular da membrana plasmáti-



Fator quimiotático: ○

Receptor para fator quimiotático: ■

Figura 19 - Eventos metabólicos na quimiotaxia de leucócitos
(SNYDERMAN & GOETZL, 1981)

ca (GOETZL & KUM YOKE HOE, 1979; PFEIFER & IRONS, 1985 e ELFERINK & KOSTER, 1991), nos quais parecem desempenhar importante papel em vários processos celulares, entre os quais, a atividade quimiotática de neutrófilos.

O mercúrio apresenta grande afinidade pelo enxofre, sendo capaz de inativar enzimas sulfidriladas mesmo em baixas concentrações (PASSOW et al, 1961; AZEVEDO, 1989 e SAIJOH et al, 1991). A união do mercúrio com o enxofre se estabelece muito facilmente, por meio de ligação covalente. No caso do enxofre das sulfidrilas, o mercúrio bivalente substitui o átomo de hidrogênio, formando mercaptídeos do tipo: $X-Hg-S-R$, $Hg-(SR)_2$ e $RS-Hg-SR'$, onde X é um grupamento eletronegativo e R e R' são proteínas (AZEVEDO, 1989).

Desta forma, o mercúrio pode interagir com grupamentos sulfidrila reativos que se encontram ligados às proteínas do citoesqueleto, os quais são pré-requisitos para a associação entre actina e tubulina e consequentemente, necessários na locomoção celular (PFEIFER & IRONS, 1985).

3- Transformação blástica de linfócitos em resposta à fitohemaglutinina:

A ativação de células T e B ocorre quando estas se ligam aos seus antígenos específicos na presença de células acessórias. Os linfócitos que estão inicialmente em repouso proliferam e amadurecem como células efetoras. Esta seleção clonal, através do reconhecimento do antígeno, resulta na expansão de clones específicos tanto diferenciando-se em células efetoras como dando origem às células de memória.

A proliferação induzida por antígeno normalmente ocorre fora da circulação e pode ser visualizada "in vitro", cultivando-se células linfóides com antígenos específicos. Usando o mesmo sistema experimental pode-se demonstrar que lectinas mitogênicas (lectinas são proteínas que ligam-se unindo resíduos de carboidratos específicos na superfície da célula), vão estimular células linfóides de maneira policlonal. Estas lectinas mitogênicas são derivadas de várias plantas e bactérias. Seu uso resulta na produção de citocinas, por exemplo, interleucinas, e de receptores para estas citocinas, os quais, em conjunto, impulsionam as células através do ciclo celular (proliferação) e, fundamentalmente, para a função efetora (maturação). A ativação dos linfócitos por mitógenos ou antígenos resulta em alterações intracelulares e subsequente desenvolvimento de um linfoblasto (ROITT et al, 1992).

Acredita-se que a estimulação mitogênica dos linfócitos "in vitro" mimetize a série de eventos que ocorrem "in vivo" seguindo-se a estimulação por antígenos específicos. Neste estudo, avaliamos os possíveis efeitos decorrentes da exposição ao mercúrio sobre a resposta imunológica de células T. Para tanto, a lectina utilizada foi a fitohemaglutinina, a qual é responsável predominantemente pela ativação de linfócitos T (TODD et al, 1989 e ROITT et al, 1992).

Os dados na literatura sobre os efeitos "in vitro" do mercúrio na atividade proliferativa de linfócitos são controversos. Alguns estudos têm mostrado que linfócitos tratados com mercúrio (HgCl_2) apresentam um aumento na síntese de DNA (PAULY et al, 1969; HUTCHINSON et al, 1976; OHSAWA & KIMURA, 1979; JAREMIN, 1983 e HULTMAN & JOHANSSON, 1991); enquanto outros têm atribuído ao mercúrio efeito imunossupressor (GAWORSKI & SHARMA, 1978 e LAWRENCE, 1981). Nenhum estudo clínico sobre exposição ao mercúrio foi encontrado na literatura.

Nossos resultados demonstram que linfócitos de trabalhadores expostos ao mercúrio apresentam redução na capacidade proliferativa somente quando em presença de soro autólogo, indicando portanto, a presença de fator inibidor (próprio íon Hg?) no soro destes indivíduos expostos. Este fator inibidor poderia agir através de competição com microelementos necessários ao metabolismo fisiológico dos linfócitos, mudanças estruturais em macromoléculas e em funções celulares, principalmente no funcionamento da membrana celular e sua permeabilidade, conforme sugerido por JAREMIN, 1983.

Alguns autores mencionam o envolvimento de grupamentos sulfidrila localizados na superfície celular no controle da proliferação de células T. No caso do fator inibidor presente no soro ser de fato o íon mercúrio, a grande afinidade apresentada por este metal com os grupamentos sulfidrila poderia explicar em grande parte a inibição da blastogênese nos trabalhadores expostos. O íon Hg interferindo à nível de microfilamentos (polimerização de actina), pode comprometer a integridade dos microtúbulos, os quais são necessários para que ocorra a mitogênese de linfócitos em resposta a lectinas, como é o caso da fitohemaglutinina (PFEIFER & IRONS, 1985).

4- Contagem de hemácias com irregularidades de superfície (pits):

As células fagocitárias do sistema reticuloendotelial do baço são responsáveis pela destruição de hemácias morfológicamente anormais, as quais têm sua passagem impedida através dos poros das células endoteliais, resultando em destruição (eritrocaterese) prematura. A função esplênica pode ser avaliada através da quantificação de hemácias com irregularidades de superfície ("pits"), uma vez que, indivíduos com baço hipofuncionante apresentam atividade fagocitária reduzida, permitindo a presença de hemácias morfológicamente anormais na corrente sanguínea.

Os resultados obtidos na contagem de hemácias com irregularidades de superfície nos permitem concluir que a função esplênica não é afetada em indivíduos expostos ocupacionalmente ao mercúrio, uma vez que todos os trabalhadores estudados apresentam contagem de "pits" abaixo de 2%.

VI - CONCLUSÕES

O presente estudo sobre alterações celulares em indivíduos com exposição ocupacional ao mercúrio permite concluir:

- 1 - Concentrações urinárias de mercúrio consideradas aceitáveis no campo profissional não previnem o trabalhador exposto de efeitos adversos à nível celular, como os mencionados à seguir.
- 2 - A capacidade fagocitária de neutrófilos apresenta-se normal frente às 2 espécies de *Candida*. No entanto, a atividade lítica encontra-se reduzida tanto frente à *Candida pseudotropicalis* quanto à *Candida albicans*. Além disso, em relação à *C. albicans* observamos uma correlação linear entre redução da atividade lítica e tempo de exposição. Isto indica que fatores comuns a lise das duas espécies de *Candida* são afetados desde o início da exposição ao mercúrio, sendo que no caso da enzima mieloperoxidase, este comprometimento se acentua com o aumento no tempo de exposição.
- 3 - A atividade quimiotática de neutrófilos apresenta-se reduzida em indivíduos expostos ao mercúrio.

4 - Não há alteração na capacidade proliferativa de linfócitos em resposta à PHA em presença de soro AB normal. No entanto, uma redução é encontrada nesta capacidade quando os linfócitos são incubados em presença de soro autólogo.

5 - A função esplênica, medida através da contagem de hemácias com irregularidades de superfície (pits), não é afetada em trabalhadores expostos ao mercúrio.

VII - RESUMO

Neste trabalho investigamos alguns efeitos do mercúrio sobre o sistema imunológico. Foram estudados 51 trabalhadores expostos ao metal, assim como 51 indivíduos não-expostos (grupo controle). Os níveis urinários de mercúrio, determinados pelo método de absorção atômica, foram utilizados como índices biológicos de exposição.

Foram estudadas a capacidade fagocitária e lítica de neutrófilos frente à Candida albicans e Candida pseudotropicalis, atividade quimiotática de neutrófilos e a capacidade proliferativa de linfócitos em resposta ao mitógeno fitohemaglutinina (PHA). O estudo da função esplênica foi efetuado através da contagem de hemácias com irregularidades de superfície (pits). Foi realizada uma 2ª avaliação destes parâmetros (intervalo de 6 meses) nos trabalhadores remanescentes, após uma melhoria efetuada nas condições de higiene da firma.

Inicialmente, noventa e dois por cento dos trabalhadores estudados apresentavam níveis urinários de mercúrio abaixo dos limites de tolerância biológica (até 50 ug/g de creatinina). Após o intervalo de 6 meses, observamos, nos mesmos trabalhadores, uma redução significativa nestes níveis ($p < 0,05$).

Os nossos resultados na 1ª avaliação demonstraram que não houve alteração na capacidade fagocitária de neutrófilos frente aos 2 antígenos. Por outro lado, a atividade lítica apresentou-se reduzida em relação às duas espécies de Candida. Na 2ª avaliação, a atividade lítica frente ao antígeno

C.pseudotropicalis não apresentou redução significativa em relação ao 1º estudo. Por outro lado, em relação ao antígeno C.albicans, esta atividade apresentou-se ainda mais reduzida nesta 2ª avaliação, sendo essa tendência reforçada pela correlação linear observada entre tempo de exposição e atividade lítica frente a este segundo antígeno. A atividade fagocitária manteve-se normal em relação aos dois antígenos.

Foi também observada uma redução significativa na atividade quimiotática de neutrófilos, a qual manteve-se reduzida na 2ª avaliação.

Não houve alteração significativa na capacidade proliferativa de linfócitos em resposta à PHA em presença de soro AB normal. No entanto, quando os linfócitos foram incubados em presença de soro autólogo, observamos uma redução na capacidade linfoproliferativa.

A contagem de hemácias com irregularidades de superfície apresentou-se normal nestes trabalhadores (abaixo de 2%).

Estes resultados indicam que níveis urinários de mercúrio considerados seguros no campo profissional não previnem o trabalhador exposto de efeitos tóxicos no sistema imunológico.

VIII - SUMMARY

In this work some effects of mercury on the immune response were investigated. Fifty one male workers of a mercury producing plant were studied, as well as fifty one non-exposed controls. To monitor exposure we used urinary mercury levels (HgU), determined by the atomic absorption method. Phagocytosis and killing of Candida albicans and Candida pseudotropicalis by neutrophils, chemotaxis of neutrophils, lymphocyte proliferation in the presence of the mitogen phytohemagglutinin (PHA) and the quantitation of red blood cell surface "pits" were measured. After improvement in the hygiene conditions in the factory, a new evaluation was performed, six months later, in the same workers.

In the first evaluation, the results of mercury urinary concentrations showed that 92% of the workers studied was below the threshold level value of 50ug/g of creatinine. After six months, these results were still lower ($p < 0.05$)

The results obtained in the first evaluation demonstrated that the phagocytic function of neutrophils in mercury-exposed workers did not differ from that of the controls. On the other hand, lysis of C. albicans and C.pseudotropicalis by neutrophils was significantly decreased. After 6 months, a greater impairment in the ability of neutrophils to kill Candida albicans was observed. The killing of Candida pseudotropicalis presented no changes, as compared to the previous evaluation. We also observed in the exposed group a significant impairment in the chemotaxis of neutrophils. This activity presented no changes, as compared to the previous evaluation. Blast lymphocyte

transformation had no significant alterations, as compared to controls, when lymphocytes were incubated with AB serum. However, incubation of lymphocytes with autologous serum resulted in suppression of the proliferation. The counting of pitted erythrocytes was not altered in these workers (below 2%).

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

IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- AIKOH, H. & OGATA, M. "Levels of metallic mercury and mercuric ion in the venous and arterial bloods of normal and acatalasemic mice following exposure to mercury vapor". Physiol. Chem. Phys. Med. N.M.R. 20:177-181, 1988
- 2- AKENZUA, G.I. & AMIENGHEME, O.R. "Inhibitor of in vitro neutrophil migration in sera of children with homozygous sickle cell gene during pain crisis". Brit. J. Haematol. 47:345-352, 1981
- 3- ALLAN, R.B. & WILKINSON, P.C. "A visual analysis of chemotactic and chemokinetic locomotion of human neutrophil leukocytes". Exp. Cell Res. 111:191-197, 1978.
- 4- ATTA, J.R.; FAINTUCH, J.J.; NASCIMENTO, L.O.T. & ROCHA, A.S. "Intoxicação aguda letal por vapor de mercúrio". Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo, 47:34-37, 1992
- 5- AZEVEDO, F.A. "Algumas bases bioquímicas da toxicodinâmica do mercúrio". Rev. Soc. Bras. Toxicol., 2:1-7, 1989
- 6- BABIOR, B.M.; KIPNES, R.S. & CURNUTTE, J.T. "Biological defense mechanisms: The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent". J. Clin. Invest. 52:741-744, 1973

- 7- BABIOR, B.M. "Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes". New Engl. J. Med. 298:659-668, 1978
- 8- BALLART, I.J.; ESTEVEZ, M.E.; DIEZ, R.A. & SEN, L. "Comparison of Candida killing activity measured by chemiluminescence and cytomorphological methods in human phagocytes". J. Immunol. Met. 97:263-268, 1987
- 9- BARREGARD, L.; HOGSTEDT, B.; SCHUTZ, A.; KARLSSON, A.; SALLSTEN, G. & THIRINGER, G. "Effects of occupational exposure to mercury vapor on lymphocyte micronuclei". Scan. J. Work. Environ. Health, 17:263-268, 1991
- 10- BASELT, R.C. "Biological monitoring methods for industrial chemicals". 2d. PSG, Massachussets, 198-202, 1988
- 11- BASELT, R.C. & CRAVEY, R.H. "Disposition of toxic drugs and chemicals in man". Third edition. Year book medical publishers, INC. Chicago, 1990
- 12- BECKER, E.L. "The short and happy life of neutrophil activation". J. Leuk. Biol. 47:378-389, 1990.

- 13- BELLON, B.; CAPRON, M.; DRUET, E.; VERROUST, P.; VIAL, M.C.;
SAPIN, C.; GIRARD, J.F.; FOIDART, J.M.; MAHIEU, P. &
DRUET, P. "Mercuric chloride induced autoimmune disease in
Brown-Norway rats: sequential search for anti-basement
membrane antibodies and circulating immune complexes".
Eur. J. Clin. Invest., 12:127-133, 1982
- 14- BENCKO, V.; WAGNER, B.; WAGNEROVA, M. & ONDREJCAK, V.
"Immunological profiles in workers occupationally exposed
to inorganic mercury". J. Hyg.Epidemiol. Microbiol.
Immunol. 34:9-15, 1990
- 15- BLAZKA, M.E. & SHAIKH, Z.A. "Cadmium and mercury
accumulation in rat hepatocytes: interactions with other
metal ions". Toxicol. Appl. Pharmacol., 113:118-125, 1992
- 16- BOWMAN, C.; MASON, D.; PUSEY, C. & LOCKWOOD, C.
"Autoregulation of autoantibody synthesis in mercuric
chloride nephritis in the Brown-Norway rat I. A role for T
supressor cells". Eur. J. Immunol., 14:464-470, 1984
- 17- BUCHET, J.P.; ROELS, H.; BERNARD, A. & LAUWERYS, M.D.
"Assessment of renal function of workers exposed to
inorganic lead, cadmium or mercury vapor". J. Occup. Med.
,22:741-750, 1980

- 18- CALICH, V.G.L. & VAZ, C.A.C. "Imunologia básica". 1ª edição. Ed. Artes Médicas, São Paulo-SP, 1989.
- 19- CHALOPIN, J.M. & LOCKWOOD, C.M. "Autoregulation of autoantibody synthesis in mercuric chloride nephritis in the Brown-Norway rat. II. Presence of antigen-augmentable plaque-forming cells in the spleen is associated with humoral factors behaving as auto-anti-idiotypic antibodies". Eur. J. Immunol., 14:470-475, 1984
- 20- CHESON, B.D.; CHRISTENSEN, R.L.; SPERLING, R.; KOHLER, B.E. & BABIOR, B.M. "The origin of the chemiluminescence of phagocytosing granulocytes". J. Clin. Invest. 58:789-796, 1976
- 21- CLARKSON, T.W.; GATZY, J. & DALTON, C. "Studies on the equilibration of mercury vapor with blood". Atomic Energy Commision Research and Development Report A.E.P. Report, n^o 582. University of Rochester, 1961
- 22- CONTRINO, J.; MARUCHA, P.; RIBAUDO, R.; FERENCÉ, R.; BIGAZZI, P.E. & KREUTZER, L. "Effects of mercury on human polymorphonuclear leukocyte function in vitro". Am. J. Pathol. 132:110-118, 1988

- 23- ELFERINK, J.G.R. & KOSTER, B.M. "Glutathione-induced enhancement of neutrophil locomotion". Immunobiol. 184:25-36, 1991.
- 24- EL-HAG, A.; LIPSKY, P.E.; BENNETT, M. & CLARK, R.A. "Immunomodulation by neutrophil myeloperoxidase and hydrogen peroxide:differential susceptibility of human lymphocyte functions". J. Immunol. 136:3420-3426, 1986
- 25- Environmental Health Criteria L-mercury world Health Organization. Geneva, 1976
- 26- FAINTUCH, J.J. & ROCHA, A.S. "Intoxicação por mercúrio no Brasil". Rev. Bras. Med., 47:505-509, 1990
- 27- FRANK, R.S. "Time-dependent alterations in the deformability of human neutrophils in response to chemotactic activation". BLOOD. 76:2606-2612, 1990.
- 28- GAWORSKI, C.L. & SHARMA, R.P. "The effects of heavy metals on (³H) Thymidine uptake in lymphocytes. Toxicol. Appl. Pharmacol. 46:305-313, 1978.

- 29- GOETZL, E.J. & KUM YOKE HOE. "Chemotatic factor receptors of human PMN leukocytes.I. effects on migration of labelling plasma membrana determinants with impermeant covalent reagents and inhibition of labelling by chemotactic factors". Immunology. 37:407, 1979.
- 30- GROTO, H.Z.W. "Aspectos da função esplênica nas doenças falciformes". Tese de mestrado, Campinas, UNICAMP, 1987
- 31- GROTO, H.Z.W. & COSTA, F.F. "Hyposplenism in AIDS". AIDS, 5:1538-1540, 1991.
- 32- HAENEY, M. "Introduction to Clinical Immunology". 1st edition. Update. London, 1985
- 33- HAYES, J.A. "Metal toxicity". A guide to general toxicology. Basel, New York, Karger, 1983.p.232-233.
- 34- HENDERSON, Y. & HAGGARD, H.W. "Noxious gases", New York, Reinhold, 1960
- 35- HENRY, G.A.; JARNOT, B.M.; STEINHOFF, M.M. & BIGAZZI, P.E. "Mercury-induced renal autoimmunity in the MAXX rat". Clin. Immunol. Immunopathol., 49:187-203, 1988

- 36- HIRSCH, 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
- 37- HOLROYDE, M.B.; OSKI, F.A. & GARDNER, F.H. "The
pocked erythrocytes red-cell surface alterations
in reticuloendothelial immaturity of the neonate". N.
Engl. J. Med., 281:516-520, 1969
- 38- HULTMAN, P. & JOHANSSON, U. "Strain differences in the
effect of mercury on murine cell-mediated immune
reactions". Fd. Chem. Toxic., 29:633-638, 1991
- 39- HUMES, H.D. & WEINBERG, J.M. "Toxic nephropathies". The
kidney 3rd. edition W.B. Saunders Company 1491-1532, 1986
- 40- HUNTER, D. "The diseases of occupations". 4^a ed. The
English University Press, London, 1970
- 41- HUTCHINSON, F.; MACLEOD, T.M. & RAFFLE, E.J. "Leukocyte
aggregation and lymphocyte transformation induced by
mercuric chloride". Clin. Exp. Immunol. 26:531-533,
1976.
- 42- JARDIM, W.F. "Contaminação por mercúrio: fatos e fantasias".
Ciência Hoje, 7:78-79, 1988

- 43- JAREMIN, B. "Blast lymphocyte transformation (LTT), rosette (ERFC) and leukocyte migration inhibition (MIF) tests in persons exposed to the action of lead during work". Bull. Inst. Marit. Trop. Med. Gdynia. 34:189-197, 1983.
- 44- KLEBANOFF, S.J. & PINCUS, S.H. "Hydrogen peroxide utilization in myeloperoxidase-deficient leukocytes: a possible microbicidal control mechanism". J. Clin. Inves. 50:2226-2229, 1971
- 45- KLEBANOFF, S.J. & ROSEN, H. "The role of myeloperoxidase in the microbicidal activity of polymorphonuclear leukocytes". Ciba Foundation Symposium. 65:263-281, 1979
- 46- KLEBANOFF, S.J. "Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes". Ann. Int. Med. 93:480-489, 1980
- 47- KOSUDA, L.L.; WAYNE, A.; NAHOUNOU, M.; GREINER, D.L. & BIGAZZI, P.E. "Reduction of the RT6.2⁺ subset of T lymphocytes in Brown-Norway rats with mercury-induced renal autoimmunity". Cell. Immunol., 135:154-167, 1991
- 48- LANGWORTH, S.; ELINDER, C.G.; GOTHE, C.J. & VESTERBERG, O. "Biological monitoring of environmental and occupational exposure to mercury". Int. Arch. Occup. Environ. Health, 63:161-167, 1991

- 49- LANGWORTH, S.; ALMKVIST, O.; SODERMAN, E. & WIKSTROM, B-O.
"Effects of occupational exposure to mercury vapour on the
central nervous system". Brit. J. Ind. Med., 49:545-555,
1992
- 50- LAWRENCE, D.A. "Heavy metals modulation of lymphocyte
activities". Toxicol. Appl. Pharmacol. 57:439-451, 1981
- 51- LEHRER, R.J. & CLINE, M.J. "Interaction of Candida albicans
with human leukocytes and serum". J. Bacteriol.
98:996-1002, 1969a
- 52- LEHRER, R.J. & CLINE, M.J. "Leukocyte myeloperoxidase
deficiency and disseminated Candidiasis: the role of
myeloperoxidase in resistance to Candida infection". J.
Clin. Invest. 48:1478-1488, 1969b .
- 53- LÉONARD, A.; JACQUET, P. & LAUWERYS, R.R. "Mutagenicity and
teratogenicity of mercury compounds". Mutation Res.,
114:1-18, 1983
- 54- LIVARDJANI, F.; LEDIG, M.; KOPP, P.; DAHLET, M.; LEROY, M. &
JAEGER, A. "Lung and blood superoxide dismutase activity
in mercury vapor exposed rats: effect of N-acetyl-cysteine
treatment". Toxicology, 66:289-295, 1991

- 55- LORSCHIEDER, F.L. & VIMY, M.J. "Mercury exposure from silver fillings". Lancet, 337:1103, 1991
- 56- MAGOS, L.; HALBACH, S. & CLARKSON, T.W. "Role of catalase in the oxidation of mercury vapor". Biochem. Pharmacol., 27:1373-1377, 1978
- 57- MALAMUD, D.; DIETRICH, S.A. & SHAPIRO, M. "Low levels of mercury inhibit the respiratory burst in human polymorphonuclear leukocytes". Biochem. Biophys. Res. Comm. 128:1145-1151, 1985
- 58- MANDEMA, E.; ARENDS, A. & VERNIER, G. "Mercury and the kidney". Lancet, 1:1266-1269, 1963
- 59- 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
- 60- MARSHALL, J.L.; BOOTH, J..E. & WILLIAMS, J.W. "Characterization of the covalent mercury (II)-NADPH complex* ". J. Biol. Chem. 259:3033-3036, 1984..

- 61- MIRTICHEVA, J.; PFEIFFER, C.; De BRUIJN, J.A.; JACQUESMART, F. & GLEICHMANN, E. "Immunological alterations inducible by mercury compounds. III. H-2A acts as an immune response and H-2E as an immune supression locus for HgCl_2 -induced antinucleolar autoantibodies". Eur. J. Immunol., 19:2257-2261, 1989
- 62- MOLIN, M.; SCHUTZ, A.; SKERFVING, S. & SALLSTEN. "Mobilized mercury in subjects with varying exposure to elemental mercury vapour". Int. Arch. Occup. Environ. Health., 63:187-192, 1991
- 63- NAGEL, J.E.; CHREST, F.J. & ADLER, W.H. "Human B cell function in normal individuals of various ages". Clin. Exp. Immunol., 44:646-653, 1981
- 64- NASCIMENTO, L.O.; FILHO, G.L. & ROCHA, A.S. "Intoxicação letal por mercúrio através da ingestão de merthiolate". Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo, 45:216-218, 1990
- 65- NEWCOMBE, D.S.; ROSE, N.R. & BLOOM, J.C. Clinical Immunotoxicology. Raven Press, New York, 1992
- 66- OHSAWA, M. & KIMURA, M. "Enhancement of B_2 -microglobulin formation induced by phytohemagglutinin and mercuric ion in cultured human leukocytes". Biochem. Biophys. Res. Comm., 91:569-574, 1979

- 67- PASSOW, H.; ROTHSTEIN, A. & CLARKSON, T.W. "The general pharmacology of the heavy metals". Pharmacol. Rev., 18:185-224, 1961
- 68- PAULY, J.L.; CARON, G.A. & SUSKIND, R.R. "Blast transformation of lymphocytes from guinea pigs, rats and rabbits induced by mercuric chloride in vitro". J. Cell Biol., 40:847-850, 1969
- 69- PFEIFER, R.W. & IRONS, R.D. "Mechanisms of sulfhydryl-dependent immunotoxicity". Immunotoxicology and Immunopharmacology. Raven Press, New York, 1985
- 70- PELLETIER, L.; PASQUIER, R.; HIRSCH, F.; SAPIN, C. & DRUET, P. "In vivo self-reactivity of mononuclear cells to T cells and macrophages exposed to HgCl_2 ". Eur. J. Immunol., 15:460-465, 1985
- 71- PELLETIER, L.; PASQUIER, R.; ROSSERT, J.; VIAL, M.C.; MANDET, C. & DRUET, P. "Autoreactive T cells in mercury-induced autoimmunity". J. Immunol., 140:750-754, 1988
- 72- PICK, E. & KEISARI, Y. "A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture". J. Immunol. Met. 38:161-170, 1980.

- 73- POPESCU, H.I.; NEGRU, L. & LANCRANJAN, I. "Chromossome aberrations induced by occupational exposure to mercury. Arch. Environ. Health, 34:461-463, 1979
- 74- PRESTON, F.E. & SHAHANY, R.T. "Surface ultramicroscopy of neonatal erythrocytes". Lancet, 1970:1177-1178, 1970
- 75- PROUVOST-DANON; ABADIE, A.; SAPIN, C. & DRUET, P. "Induction of IgE synthesis and potentation of anti-ovalbumin IgE antibody response by HgCl₂ in the rat". J. Immunol., 126:699, 1981
- 76- REPORT OF AN INTERNATIONAL COMITEE (Szockholn, nov. 1968) - "Maximum allowable concentrations of mercury compounds". Arch. Environ. Health., 19:891-905, 1969
- 77- RICHARDSON, R.A. "Automated method for determination of mercury in urine". Clin. Chem., 22:1604-1607, 1976
- 78- ROELS, H.; LAUWERYS, R.; BUCHET, J.P.; BERNARD, A.; BARTHELS, A.; OVERSTEYNS, M. & GAUSSIN, J. "Comparison of renal function and psychomotor performance in workers exposed to elementar mercury". Int. Arch. Occup. Environ. Health., 50:77-93, 1982a

- 79- ROELS, H.; GENNART, J.P.; LAUWERYS, R.; BUCHET, J.P.; MALCHAIRE, J. & BERNARD, A. "Surveillance of workers exposed to mercury vapor: validation of a previously proposed biological threshold limit value for mercury concentration in urine". Am. J. Ind. Med. 7:45-71, 1985
- 80- ROITT, I.; BROSTOFF, J. & MALE, D. "Imunologia", 2ª edição, Editora Manole, São Paulo-SP, 1992
- 81- ROOS, D. & WEENING, R.S. "Defects in the oxidative killing of microorganisms by phagocytic leukocytes". Ciba Foundation Symposium. 65:225-262, 1979
- 82- ROSSERT, ET AL. "Autoreactive T cells in mercury-induced autoimmunity. Demonstration by limiting dilution analysis". Eur. J. Immunol., 18:1761-1766, 1988
- 83- ROTROSEN, D. & GALLIN, J.I. "Disorders of phagocyte function". Ann. Rev. Immunol. 5:127-150, 1987.
- 84- SCHREINER, G.E. & MAHER, J.F. "Toxic nephropathy". Am. J. Med., 38:409-411, 1965
- 85- SHANBHAG, A.; YANG, J.; LILIEN, J. & BLACK, J. "Decreased neutrophil respiratory burst on exposure to cobalt-chrome alloy and polystyrene in vitro". J. Biom. Mat. Res. 26:185-195, 1992

- 86- 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
- 87- SHURIN, S.B.; COHEN, H.J.; WHITIN, J.C. & NEWBURGER, P.E. "Impaired granulocyte superoxide production and prolongation of the respiratory burst due to a low-affinity NADPH-dependent oxidase". BLOOD. 62:564-571, 1983
- 88- SNYDERMAN, R. & GOETZL, E. "Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis". Science. 213:830-837, 1981.
- 89- TODD; SANFORD & DAVIDSOHN. "Diagnósticos clínicos e conduta terapêutica por exames laboratoriais". 16^o edição, vol.1 e 2, Ed. Manole, São Paulo-SP, 1989
- 90- WADA, A. "Response to a low concentration of mercury vapor - relation to human porphyrin metabolism". Arch. Environ. Health, 19:485-488, 1969
- 91- 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

- 92- WHO, "Inorganic mercury". Environ. Health Criteria 118, World Health Organization, Geneva, 168p, 1991
- 93- ZAGO, M.A. "Síntese de globinas nas talassemias e aspectos da função esplênica na anemia falciforme e na heterotigose dupla para Beta-talassemia e hemoglobinopatia S". Tese de livre docência, Ribeirão Preto, USP, 1981
- 94- ZALUPS, R. & BARFUSS, D. "Accumulation of inorganic mercury along the renal proximal tubule of the rabbit". Toxicol. Pharmacol., 106:245-253, 1990
- 95- ZAMM, A.V. "Unrecognized mercury toxicity". Ann. Allergy, 66:354-355, 1991