

DANIEL BUSSOLARO

**EFEITOS *IN VITRO* DO CHUMBO INORGÂNICO [Pb(II)] NA  
RESPOSTA IMUNITÁRIA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE  
CAMUNDONGO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Biologia Celular e Molecular, do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador:  
Prof. Dr. Ciro A. de Oliveira Ribeiro.

Curitiba  
2006

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Paraná, ao setor de Ciências Biológicas e ao departamento de Biologia Celular e Fisiologia que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, meu orientador, pela amizade e ensinamentos no decorrer deste trabalho, e também por ter oportunizado a minha entrada em seu grupo de pesquisa.

Ao professor Luiz Cláudio Fernandes, por abrir as portas do seu laboratório permitindo a realização de boa parte dos experimentos.

Ao Chico, pela amizade, paciência e constante auxílio em todas as etapas de realização deste trabalho.

À professora Dorly de Freitas Buchi e todas as pessoas do seu laboratório pelas dicas e empréstimo de materiais.

Aos professores Marco Randi, Ruth Janice Shadeck e Célia Regina Franco pela colaboração em muitos momentos.

Aos meus colegas de Laboratório, Maritana, Fabíola, Anna, Grazielle, Alberto, João, Jociele, Patrícia França, Patrícia Diogo, Inês e Elaine, pelo apoio e amizade.

À todas as pessoas do laboratório de Metabolismo Celular, pela amizade e por terem me acolhido como um membro de seu laboratório, especialmente ao Sandro e a Loli, que me auxiliaram nos experimentos, e esta última por ser minha grande amiga fora da universidade também.

Aos meus colegas do curso de mestrado, Marcos, Ana Paula, Cláudio, Enelise, Clarice, Vanessa, Gleisson e Cecília por todos os momentos relacionados direta e indiretamente a este trabalho.

À Marlene, secretária do programa de mestrado em Biologia Celular e Molecular, pela cooperação sempre que necessário.

Aos meus pais, Sergio e Terezinha, pelo constante apoio nos momentos difíceis.

À D. Diva, que durante o tempo do mestrado me acolheu em sua casa como um membro de sua família. Além do Anderson e Nelson, que foram sempre importantes e grandes amigos para mim.

A todos os meus colegas de trabalho do Colégio Medianeira, que de uma forma ou de outra compartilharam alguns momentos relacionados a esta trajetória.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....                                   | 1  |
| 1.1. CARACTERÍSTICAS DO CHUMBO COMO UM METAL TÓXICO .....    | 2  |
| 1.2. INTERAÇÕES DO CHUMBO COM AS CÉLULAS .....               | 4  |
| 1.2.1. O chumbo e o estresse oxidativo .....                 | 6  |
| 1.3. CATALASE.....   | 9  |
| 1.4. MACRÓFAGOS .....  | 10 |
| 1.4.1. Fagocitose.....                                       | 12 |
| 1.5. ÓXIDO NÍTRICO .....                                     | 14 |
| 1.6. MODELOS <i>IN VITRO</i> .....                           | 16 |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....                                    | 18 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL .....                                    | 18 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                             | 18 |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....                           | 19 |
| 3.1. <i>DESIGN</i> EXPERIMENTAL COM MACRÓFAGOS .....         | 19 |
| 3.2. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....                | 19 |
| 3.3. DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DA RESPOSTA IMUNITÁRIA ..... | 20 |
| 3.3.1. Biossíntese do Óxido Nítrico (NO) .....               | 20 |
| 3.3.2. Atividade Fagocítica .....                            | 20 |
| 3.3.3. Retenção do vermelho neutro .....                     | 21 |
| 3.3.4. Adesão celular.....                                   | 21 |
| 3.4. ANÁLISE BIOQUÍMICA.....                                 | 22 |
| 3.4.1. Atividade da catalase .....                           | 22 |
| 3.5. ANÁLISES MORFOLÓGICAS.....                              | 22 |
| 3.5.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....      | 22 |
| 3.5.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....       | 23 |
| 3.6. Análises estatísticas .....                             | 24 |
| <b>4. RESULTADOS</b> .....                                   | 25 |
| 4.1. VIABILIDADE CELULAR.....                                | 25 |
| 4.2. BIOSÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO .....                       | 26 |
| 4.3. ÍNDICE FAGOCÍTICO .....                                 | 28 |

|   |    |
|---|----|
| 4.4. RETENÇÃO DE VERMELHO NEUTRO .....                  | 29 |
| 4.5. CAPACIDADE DE ADESÃO .....                         | 31 |
| 4.6. ATIVIDADE DA CATALASE .....                        | 32 |
| 4.7. ANÁLISES MORFOLÓGICAS.....                         | 34 |
| 4.7.1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)..... | 34 |
| 4.7.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....  | 37 |
| 5. <b>DISCUSSÃO</b> .....                               | 39 |
| 6. <b>CONCLUSÕES</b> .....                              | 50 |
| 7. <b>REFERÊNCIAS</b> .....                             | 51 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 1 - POSSÍVEIS MECANISMOS PELOS QUAIS O CHUMBO PODE PROVOCAR ESTRESSE OXIDATIVO.....                                   | 8  |
| FIGURA 2 - RECEPTORES E INTERAÇÕES DE SINAIS DURANTE A FAGOCITOSE.....   | 13 |
| FIGURA 3 - REAÇÃO CATALIZADA PELA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE.....  | 15 |
| FIGURA 4 – GRÁFICO DA VIABILIDADE CELULAR DOS MACRÓFAGOS APÓS 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO.....                           | 25 |
| FIGURA 5 – GRÁFICO DA VIABILIDADE CELULAR DOS MACRÓFAGOS APÓS 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO.....                           | 26 |
| FIGURA 6 – GRÁFICO DA BIOSÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO APÓS 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO.....                                  | 27 |
| FIGURA 7 – GRÁFICO DA BIOSÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO APÓS 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO.....                                  | 27 |
| FIGURA 8 – GRÁFICO DO ÍNDICE FAGOCÍTICO DOS MACRÓFAGOS APÓS 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO.....                             | 28 |
| FIGURA 9 – GRÁFICO DO ÍNDICE FAGOCÍTICO DOS MACRÓFAGOS APÓS 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO.....                             | 29 |
| FIGURA 10 – GRÁFICO DO ÍNDICE DE RETENÇÃO DO CORANTE VERMELHO NEUTRO EM MACRÓFAGOS APÓS 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO..... | 30 |
| FIGURA 11 – GRÁFICO DO ÍNDICE DE RETENÇÃO DO CORANTE VERMELHO NEUTRO EM MACRÓFAGOS APÓS 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO..... | 30 |
| FIGURA 12 – GRÁFICO DA CAPACIDADE DE ADESÃO DOS MACRÓFAGOS APÓS 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO.....                         | 31 |
| FIGURA 13– GRÁFICO DA CAPACIDADE DE ADESÃO DOS MACRÓFAGOS APÓS 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO.....                          | 32 |
| FIGURA 14 – GRÁFICO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ENZIMA CATALASE EM MACRÓFAGOS APÓS 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO.....       | 33 |
| FIGURA 15 – GRÁFICO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ENZIMA CATALASE EM MACRÓFAGOS APÓS 72 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO.....       | 33 |
| FIGURA 16 - MACRÓFAGOS FIXADOS COM DIFERENTES FÓRMULAS.....  | 35 |
| FIGURA 17 - MACRÓFAGOS FIXADOS COM DIFERENTES FÓRMULAS.....  | 36 |

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 18 - MACRÓFAGOS CULTIVADOS DURANTE 24 HORAS, OBSERVADOS ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. .... | 37 |
| FIGURA 19 - MACRÓFAGOS CULTIVADOS DURANTE 72 HORAS, OBSERVADOS ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. .... | 38 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ALA - aminolevulinato
- BH<sub>4</sub> - tetraidrobiopterina
- Ca<sup>++</sup> - íon cálcio
- c-NOS - óxido nítrico sintase constitutiva
- CO<sub>2</sub> – gás carbônico
- ConA - concanavalina A
- DMEM – *Dulbecco's modified eagle's médium*
- DNA – ácido desoxirribonucléico
- Fc – receptores Fc
- g – gramas
- g/L – gramas por litro
- g/ml – gramas por ml
- GPx – glutathiona Peroxidase
- GSH – glutathiona reduzida
- h – horas
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio
- HOCl - hipoclorito
- IFN- $\gamma$  - interferon gama
- IL – interleucina
- i-NOS – óxido nítrico sintase induzível
- kg - quilograma
- LPS – lipopolissacarídeo
- M – molar
- mg – miligrama
- NO – óxido nítrico
- O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - ânion superóxido
- OH<sup>•</sup> – radical hidroxila
- Pb – chumbo
- Pb(II) – chumbo inorgânico (forma iônica do metal – indicação que é bivalente)
- Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> – nitrato de chumbo

PBS – salina tamponada com fosfato  
PKC – proteína quinase C  
SOD – superóxido dismutase  
SBF – soro bovino fetal  
SH – grupo sulfidril  
ROS – espécies reativas do oxigênio  
rpm – rotações por minuto  
TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa  
TLRs – receptores *Toll like*  
 $\mu\text{g}/\text{dl}$  – microgramas por decilitro  
 $\mu\text{l}$  – microgramas por litro  
 $\mu\text{g}$  – micrograma  
 $\mu\text{l}$  – microlitro  
 $\mu\text{M}$  – micromolar

## RESUMO

Os metais pesados são compostos tóxicos provenientes em sua maioria dos processos industriais. Quando são lançados no ambiente, vários destes metais podem ser incorporados facilmente pela cadeia trófica sendo bioacumulados em tecidos de diferentes organismos. O chumbo é um dos metais pesados tóxicos mais comuns no ambiente, sem função biológica conhecida e potencialmente capaz de induzir efeitos tóxicos em diferentes níveis de organização biológica no homem e outros animais. Já é conhecido que o chumbo pode causar alterações na resposta imunitária diminuindo a resistência do hospedeiro contra agentes patogênicos. Desta maneira, o presente trabalho avaliou os efeitos do chumbo inorgânico [ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  ou  $\text{Pb}^{++}$ ] na resposta imunitária de macrófagos de camundongo, uma vez que estas células desempenham um importante papel na imunidade celular, quer seja na defesa do organismo contra agentes estranhos, como na regulação da função de outras células do sistema imune. Para avaliar os efeitos deste metal, macrófagos peritoneais de camundongo foram expostos ao chumbo inorgânico em três concentrações: 0,2, 2 e 20  $\mu\text{M}$ , durante os períodos de 24 e 72 horas, acompanhadas de um grupo controle. Ao final destes períodos, foi avaliado o índice de fagocitose, volume lisossomal, produção de óxido nítrico, capacidade de adesão celular e a atividade da catalase, uma das principais enzimas que fazem parte do sistema anti-oxidante das células. Todos estes parâmetros mostraram-se afetados em função do tempo de exposição e da concentração exposta. O índice fagocítico diminuiu nos grupos expostos ao chumbo na concentração de 2 e 20  $\mu\text{M}$  durante o período de 24h, mas após 72h de exposição, o índice fagocítico diminuiu em todas as concentrações testadas. O volume lisossomal e a produção de óxido nítrico também diminuíram numa relação dose-resposta. O chumbo diminuiu ainda a capacidade de adesão dos macrófagos expostos. Os resultados da atividade da enzima catalase também demonstraram que esta enzima sofreu alterações em consequência da exposição das células ao chumbo. Esta enzima aumentou sua atividade principalmente nos grupos de células que ficaram expostas ao chumbo durante 72 horas, mesmo na concentração mais baixa do metal, demonstrando que as células estavam sob estresse oxidativo resultante da exposição ao chumbo. Estudos têm demonstrado que o chumbo possui a capacidade de competir com o cálcio, comprometendo funções como a organização do citoesqueleto, a adesão célula-substrato cálcio-dependente e a sinalização celular. Portanto, algumas das modulações causadas pelo chumbo nos macrófagos podem ser devidas a estes problemas. O óxido nítrico é o principal mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas e constitui uma das mais importantes moléculas reguladoras do sistema imune. Desta forma, a diminuição da produção deste radical causada pelo chumbo, compromete gravemente a função dos macrófagos durante a digestão do material fagocitado. Os dados apresentados neste trabalho mostraram o efeito deste metal na imunidade celular, considerando que estes parâmetros são essenciais durante a defesa do organismo contra agentes infecciosos.

## ABSTRACT

Heavy metals are toxic chemicals released into the environment mainly due to industrial activities and many of them are bioaccumulated by biota. The lead, one of the most important toxic heavy metals, does not present any biological function. It is potentially able to cause toxic effects in different levels of biological organization, for example, in the immune system of different species. Thus, this study evaluated the cytotoxic effects of inorganic lead ( $Pb^{++}$ ) in the immune response of mice peritoneal macrophages, since these cells have important functions on cellular immunity. They protect the body against pathogenic microorganisms and control the function of other immune system cells. To evaluate the effects of inorganic lead, peritoneal macrophages were cultured and exposed to three concentrations of inorganic lead: 0.2, 2 e  $20\mu M$ , during 24 and 72 h, followed by a control group. After each exposure time, the phagocytic index, lysosomal volume, production of nitric oxide, cell attachment and catalase activity were evaluated. The phagocytic index decreased in the groups exposed to 2 and  $20\mu M$  of lead after 24 h and in all tested concentrations after 72 h. For lysosomal volume, there were a reduction in this parameter after 24 h for  $20\mu M$  and after 72 h for 2 and  $20\mu M$  of lead. The production of nitric oxide decreased for both 2 and  $20\mu M$  of lead, after 24 and 72 h. Also, it was observed that the lead can decrease the attachment of macrophages after 24 h ( $20\mu M$ ) and 72 h (2 and  $20\mu M$  of lead). The catalase activity increased after 24 h ( $20\mu M$ ) and 72 h (all concentrations of lead) due to oxidative stress caused by lead exposure. Studies have shown that lead is able to compete with intracellular calcium, compromising important functions such as cytoskeleton organization, calcium-dependent cells attachment and cellular signaling. Thus, some of the modulatory effects caused by lead on macrophages may be due to these molecular interactions. The nitric oxide is the main cytotoxic mediator of activated immune cells and is one of the most important regulatory molecule of the immune system. Therefore, the decrease of this radical species caused by lead compromises the macrophage function during digestion of foreigner particles. These results have shown that lead affects some important cellular parameters in macrophages, which may impair the defense of body against infectious agents.

## 1. INTRODUÇÃO

O crescente processo de industrialização tem contribuído de forma contínua para o comprometimento dos ambientes em que vivemos e isto tem atingido não apenas os ecossistemas de forma mais direta, mas também as populações humanas. Diferentes contaminantes são freqüentemente lançados nos diversos ambientes incluindo os corpos d'água, solo e ar. Alguns poluentes como determinados tipos de metais pesados são particularmente críticos neste processo, porque devido a características químicas próprias, entram facilmente na cadeia trófica, podendo ser bioacumulados em diferentes organismos. A exposição a produtos químicos tóxicos no ambiente é uma constante ameaça em potencial para a saúde e qualidade de vida do homem, principalmente em ambientes urbanos devido às altas emissões atmosféricas destes produtos.

Muitas das principais doenças ocupacionais em países industrializados são causadas pela exposição a metais tóxicos. Um destes metais é o chumbo (Pb), que é muito utilizado pela indústria na fabricação de canos, tubos, esmaltes, tintas, cerâmicas, baterias dentre outros produtos industriais. A exposição crônica a baixos níveis de chumbo inorgânico constitui um dos mais sérios problemas de intoxicação ocupacional e riscos à saúde humana (WINNEKE, 1996). Os principais problemas relacionados com a liberação de metais tóxicos pela indústria são provenientes da emissão de poeira e fumaça contendo estes componentes (ABOUL-ELA, 2002). Segundo PATRIARCA et al. (2000), a contaminação por metais pesados pode ocorrer através da inalação, ingestão através dos alimentos e absorção cutânea. A ingestão é uma forma de contato muito mais séria, sendo que na maioria das vezes é a rota de entrada predominante nos organismos vivos quando estes compostos são lançados no ambiente (ABOUL-ELA, 2002). Após a absorção pelo organismo, o chumbo atinge a corrente sanguínea, onde posteriormente alcançará os demais órgãos e sistemas do corpo, tais como ossos, sistema nervoso e células do sistema imunitário. Variações na composição dos tecidos podem facilitar a absorção, distribuição e acúmulo de determinados metais pesados, como é o caso da facilidade do chumbo acumular-se nos ossos por longos períodos de tempo.

Os problemas relacionados com a saúde podem estar prematuramente associados à exposição ainda no útero e nos primeiros anos de vida, mesmo se

ocorrendo em níveis baixos de exposição. Fetos, recém nascidos e crianças, por estarem passando por rápidas mudanças no desenvolvimento de seus órgãos são mais vulneráveis aos efeitos tóxicos dos contaminantes, em especial dos metais pesados (PATRIARCA et al., 2000). Em um trabalho comparativo entre os níveis de cádmio e chumbo no ar, estes autores relataram médias anuais de cádmio, quando medida em vários países no final dos anos 70, de 1 a 150 ng/m<sup>3</sup> em áreas urbanas e de 1 e 5 ng/m<sup>3</sup> em áreas rurais. No entanto, o nível de chumbo no ar encontrava-se com valores mais altos mesmo em áreas rurais (0,1 a 0,3 µg/m<sup>3</sup>) e urbanas (0,5 e 3 µg/m<sup>3</sup>), isto faz do chumbo o metal pesado tóxico mais abundante na atmosfera. Uma vez na atmosfera, estes metais podem se depositar em alimentos ou água, ou mesmo serem inalados e desta forma expostos à população humana. De acordo com o Programa Internacional de Segurança contra Produtos Químicos (IPCS), a presença do chumbo na poeira é a maior fonte de exposição deste contaminante, sendo responsável por 75% do total do chumbo inalado por crianças até dois anos de idade nos Estados Unidos (PATRIARCA et al., 2000).

### 1.1. CARACTERÍSTICAS DO CHUMBO COMO UM METAL TÓXICO

O chumbo juntamente com o carbono, o silício, o germânio e o estanho formam o grupo 14 da tabela periódica. Este metal é encontrado no seu estado natural em depósitos minerais, de onde são extraídos de 3 a 10% de Pb. É um metal pesado de cor cinza azulada, com número atômico igual a 82. Seu ponto de fusão é a 327,4 °C, enquanto o de ebulição se encontra a 1749 °C. (MOREIRA e MOREIRA, 2004).

Este metal pesado não apresenta função vital conhecida para os organismos vivos, é um dos contaminantes mais comuns no ambiente, sendo considerado um elemento que causa efeitos deletérios ao homem e em outros organismos vivos. Seus danos são conhecidos desde os tempos antigos uma vez que afeta o funcionamento de diversos órgãos e sistemas do corpo humano (XIE et al., 1998).

A maior parte do chumbo utilizado pela indústria vem da exploração de minérios ou da reciclagem de fragmentos de metal ou baterias. As atividades humanas têm espalhado o chumbo por toda a crosta terrestre, sendo o metal não

ferroso mais amplamente utilizado até o início da década de 90 (SARYAN e ZENZ, 1994).

O chumbo ainda encontra-se presente em alguns tipos de gasolina, tintas, produtos cerâmicos, calefação e soldas, mas tem sido drasticamente reduzido em função da crescente preocupação com a saúde humana e de outros organismos vivos. No entanto, a quantidade de emissão deste metal no ambiente faz com que o chumbo possa ser identificado em várias espécies de animais, além de uma enorme variedade de ambientes tais como atmosfera, águas de superfície, lençóis d'água, solo, sedimentos e aterros sanitários (SARYAN e ZENZ, 1994).

O chumbo possui uma lista razoável de tecidos alvos, dentre os quais destacamos o fígado, os rins, pulmões, sistema imunitário e sistema nervoso central (GOYER, 1993). Quando absorvido pelos vertebrados é distribuído em três compartimentos: sangue, ossos e outros tecidos, com uma meia vida biológica de 36 dias, 27 anos e 47 dias, respectivamente (TSALEV e ZAPRIANOV, 1983). Segundo VICTERY et al. (1984), a absorção pelas células não se deve a nenhum carreador específico, mas pela atividade endocítica. No entanto, pequenas quantidades podem também ser co-transportadas com ânions orgânicos de baixo peso molecular. (VANDER e JOHNSON, 1981).

Em animais, o chumbo é responsável por uma série de disfunções fisiológicas, bioquímicas e comportamentais. Interfere principalmente com a biossíntese do grupo heme e com o funcionamento do sistema nervoso central, especialmente durante os estágios iniciais do desenvolvimento (crianças de 2 – 3 anos) (AYKIN-BURNS et al., 2003). A exposição crônica a baixos níveis de chumbo durante tais períodos compromete significativamente a capacidade cognitiva, sendo que a maioria dos impactos neurocomportamentais em crianças é irreversível (FISHER e VESSEY, 1998). Segundo BELLINGER (1995) e GARAVAN et al. (2000), o chumbo pode comprometer os sistemas em desenvolvimento, uma vez que níveis de chumbo no sangue menores que 10 – 15  $\mu\text{g/ml}$  já foram associados com a redução da capacidade cognitiva e comportamental.

O chumbo é conhecido por sua ação tóxica no sistema imunitário, exercendo efeitos deletérios em humanos e em outras espécies. Segundo DIETERT et al. (2004), diferente de outros compostos que exercem efeitos adversos no

sistema imunitário, a exposição a moderados ou baixos níveis de chumbo produzem transformações aparentemente sutis nas células imunes. Porém, mesmo parecendo sutis, as alterações resultantes da exposição ao chumbo nas populações de células deste sistema, podem afetá-lo funcionalmente. De acordo com estes autores, no sistema imunitário o chumbo pode provocar alterações aumentando a incidência de asma, autoimunidade, doenças infecciosas e agravamento do câncer. Estudos têm demonstrado que macrófagos e linfócitos T são alvos da presença chumbo, mesmo em níveis moderados de exposição. Mudanças associadas com a produção de anticorpos também têm sido reportadas, da mesma forma que a baixa resistência a doenças infecciosas e a progressão de várias doenças têm sido igualmente influenciadas pela exposição ao chumbo (DIETERT et. al. 2004; BISHAY e SENGUPTA 2006).

## 1.2. INTERAÇÕES DO CHUMBO COM AS CÉLULAS

Um mecanismo geral que explica a toxicidade dos metais pesados envolve a geração de radicais livres, seja por diminuir os níveis intracelulares de antioxidantes como a glutathione ou pela produção de espécies reativas de oxigênio (KLEIN et al, 1991). Metais pesados, incluindo o chumbo, afetam muitas enzimas, especialmente aquelas que possuem grupos sulfidril (SH) e no interior das células podem ocupar o lugar de elementos essenciais, como magnésio, cálcio, ferro, cobre e zinco (NOLAN e SHAIKH, 1992).

Metais pesados são potentes imunomoduladores que podem afetar o funcionamento dos macrófagos e a diferenciação de linfócitos. Dentre esses efeitos deletérios está a diminuição da mielopoiese, o bloqueio da diferenciação dos monócitos em macrófagos, o antagonismo na expressão de antígenos, o bloqueio da liberação de citocinas e a inibição das atividades microbicidas e tumorílicas desempenhadas pelos macrófagos (BISHAY e SENGUPTA, 2003).

A adesão dos macrófagos mostra-se diminuída com o tempo após exposição ao chumbo, pois este metal provoca alteração da forma normal destas células (BISHAY e SENGUPTA, 2003). O chumbo também pode bloquear a produção do óxido nítrico *in vitro*, comprometendo a função de defesa do organismo desempenhada por estas células contra microrganismos invasores (TIAN e

LAWRENCE, 1995). Além disso, este metal é capaz de induzir danos oxidativos aumentando a produção de peróxido de hidrogênio em diferentes células (ARIZA et al., 1998; YANG, 1999), podendo causar aberrações cromossomais em animais e humanos (SILBERGERD, 2003; CESTARI et al., 2004).

O chumbo atuando sozinho pode não ser necessário e suficiente para induzir câncer, mas em níveis celulares e moleculares, este metal pode permitir ou aumentar eventos carcinogênicos envolvendo danos no material genético. Estes incluem a inibição da síntese e reparo do DNA, danos oxidativos e interações com proteínas que se ligam ao DNA e proteínas supressoras tumorais (SILBERGELD, 2003). Alguns estudos têm sugerido que o chumbo possa deslocar o zinco em proteínas que se ligam ao DNA (SILBERGELD, et al., 2000). Desta forma, alterações nos padrões de expressão gênica podem resultar de interações entre o DNA e fatores de transcrição nuclear no qual o zinco é substituído pelo chumbo (SILBERGELD, 2003). Estas ligações incluem sítios específicos onde o zinco, se ligado a algumas proteínas, promove interações com o DNA nas histonas, além das proteínas reguladoras da transcrição como a Sp1 e a TFIIA (HANAS et al., 1999; SILBERGELD, et al., 2000; BAL e KASPRZAK, 2002).

Outra importante característica da toxicidade do chumbo é a anemia, provocada pela inibição das enzimas  $\gamma$  - aminolevulinato sintetase (ALA-S) e  $\gamma$  - aminolevulinato desidratase (ALA-D), ambas necessárias para a biossíntese do grupo heme das hemoglobinas e outras importantes hemoproteínas (JOHNSON, 1998). A ALA-D é a principal enzima inibida pelo chumbo, via ligação direta deste metal com o grupo sulfidrila, que é essencial para a atividade catalítica da mesma (BERNARD e LAUWEYS, 1987). Além disso, os efeitos inibitórios do chumbo nestas enzimas também foram detectados em seres humanos (KLASSEN, 1996).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que o chumbo possui a capacidade de competir com o cálcio. No interior da célula, o chumbo pode ativar a proteína quinase C (COOPER et al., 1984, MARKOVAC e GOLDSTEIN, 1988), inibindo ou aumentando o efeito de vários canais iônicos dependentes de voltagem ou ativados por receptores (VIJVERBERG et al., 1994). Apesar dos mecanismos de toxicidade do chumbo não serem totalmente conhecidos, alguns trabalhos propuseram que o efeito tóxico baseia-se muito no desequilíbrio da homeostase do cálcio (POUNDS,

1984). A exposição de algumas células ao chumbo resulta não somente na interferência de eventos mediados pelo cálcio, mas também na modulação indevida das atividades da proteína quinase C (PKC) (ABOUL-ELA, 2002). O chumbo inorgânico tem a propriedade de ligar-se a proteínas ligantes do cálcio, atuando como um agonista, antagonista ou agonista parcial (KERN e AUDESIRK, 2000), respectivamente ativando a calmodulina (KERN et al., 2000), inibindo funções de canais de cálcio voltagem dependentes (SUN e SUSZKIW, 1995), e ativando isoformas da PKC dependentes de cálcio (LONG et al., 1994). A afinidade do chumbo com proteínas ligantes ao cálcio sugere que o chumbo possa desregular os níveis intracelulares de cálcio ou modular o influxo de cálcio do meio extracelular ou de compartimentos intracelulares (OLIVI et al., 2002). JADHAV et al. (2000), demonstraram que até mesmo níveis baixos de chumbo podem levar a uma ativação da PKC, aumentando desta forma os níveis intracelulares de cálcio. Segundo os mesmos autores, em muitos tipos celulares, o acúmulo do cálcio citosólico altera várias funções celulares podendo até mesmo induzir a morte celular programada.

As mudanças ultraestruturais ocorridas em uma situação experimental de nefropatia em decorrência da exposição ao chumbo, incluem dilatação do retículo endoplasmático, formação de *blebs* no envoltório nuclear, aumento no número de autofagossomos, mudanças na estrutura da mitocôndria e formações de corpos citoplasmáticos. Sabe-se que a estrutura e função das mitocôndrias são muito sensíveis à exposição ao chumbo. Os principais efeitos observados nestas organelas são a redução e encurtamento das cristas, alterações na fosforilação oxidativa e na atividade de várias enzimas mitocondriais (NOLAN e SHAIK, 1992).

### 1.2.1. O chumbo e o estresse oxidativo

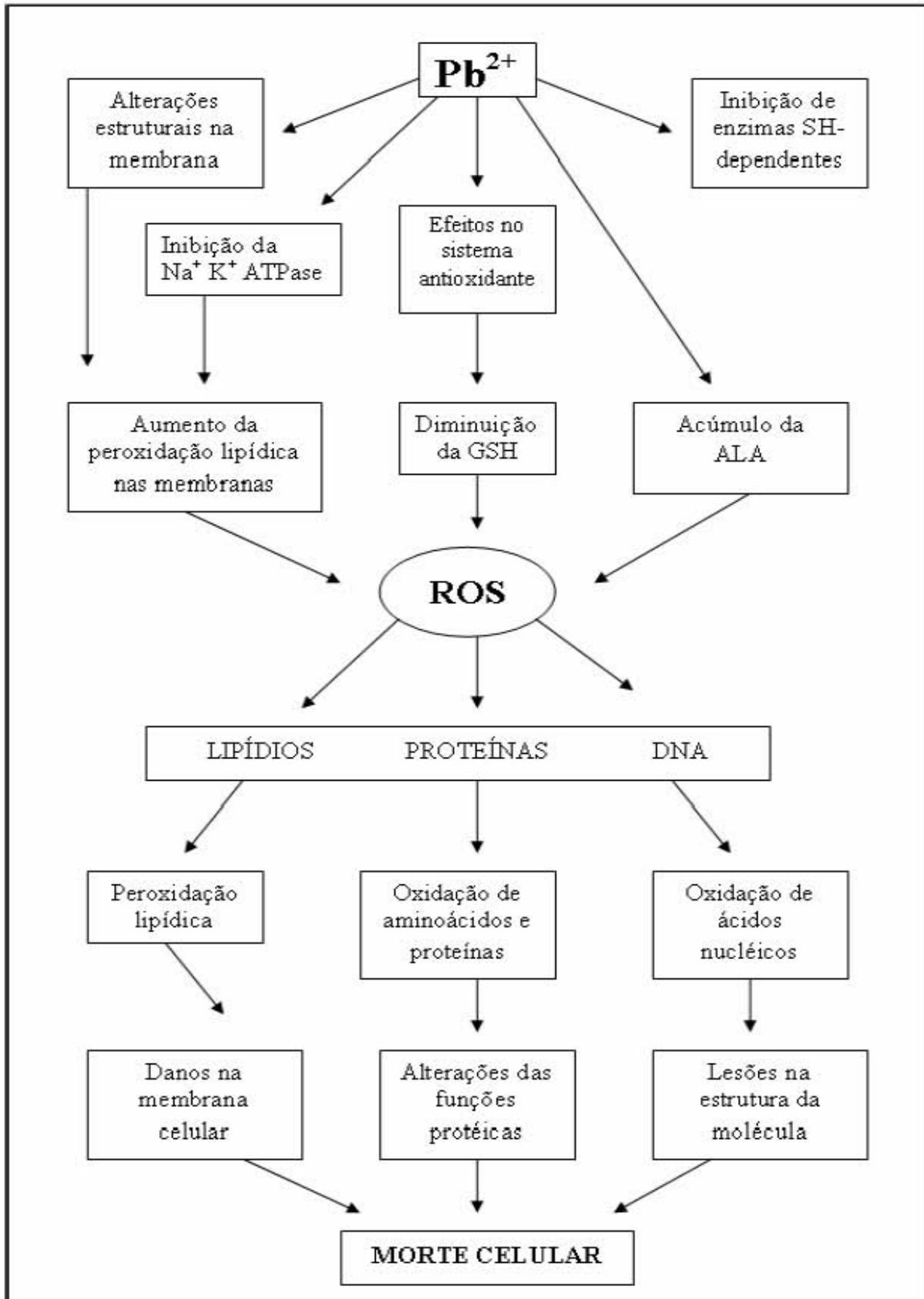
Embora a carcinogênese devido à exposição a metais pesados tenha sido muito investigada, os mecanismos de ação, especialmente em níveis moleculares, ainda não são totalmente conhecidos. Evidências indicam que as espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), geradas pela presença de alguns tipos de metais pesados na célula possam participar no processo inicial da doença (LEONARD et

al., 2004).

Através de reações mediadas por ROS, o chumbo pode causar danos no DNA, peroxidação lipídica, modificação de proteínas, ativação de fatores nucleares de transcrição e distúrbios no sistema antioxidante da célula (GURER e ERCAL, 2000) (FIGURA 1). Alguns trabalhos têm demonstrado também que através de danos oxidativos, o chumbo pode induzir danos cerebrais por desregular o balanço oxidante/antioxidante das células nervosas (WEST et al., 1994; NEAL et al., 1997).

O chumbo é um agente tóxico para a estrutura e função das membranas celulares (DONALDSON e KNOWLES, 1993). Os efeitos causados em membranas de eritrócitos são em particular, mais estudados devido ao fato destas células apresentarem uma grande afinidade pelo chumbo, concentrando grande parte do metal presente na corrente sanguínea, e por serem mais vulneráveis ao estresse oxidativo quando comparadas a outras células (RICE-EVANS, 1990). Ainda não está totalmente elucidado se o estresse oxidativo é a causa ou a consequência destes efeitos tóxicos provenientes do chumbo, mas a exposição ao chumbo pode alterar a integridade das membranas por afetar a estrutura dos seus constituintes moleculares. Tais dados sugerem que a alteração na composição lipídica das membranas podem resultar em problemas de integridade e permeabilidade, aumentando a susceptibilidade de ocorrer altas taxas de peroxidação lipídica (GURER e ERCAL, 2000).

O estresse oxidativo pode ser induzido como resultado de um decréscimo do sistema antioxidante da célula ou pelo aumento da produção de espécies reativas do oxigênio. O sistema antioxidante é composto por vários antioxidantes endógenos e outros provenientes da dieta, que interagindo, inativam as ROS provenientes do metabolismo celular. Uma das principais ROS é o ânion superóxido, produzido por organismos aeróbicos e extremamente tóxico para as células. Muito reativo, o  $O_2^-$  é convertido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela enzima superóxido dismutase (SOD). Tanto as enzimas catalase, quanto a glutathiona peroxidase (GPx), podem converter o  $H_2O_2$  em oxigênio molecular e água. Desta forma, o estresse oxidativo pode ser induzido até mesmo pela relativa deficiência na atuação da SOD, catalase, e/ou GPX, que constituem as principais enzimas do sistema antioxidante da célula (FARMAND et al., 2005).



**Figura 1:** Possíveis mecanismos pelos quais o chumbo pode provocar estresse oxidativo. Modificado de: GURER e HERCAL (2000).

### 1.3. CATALASE

As espécies reativas de oxigênio podem funcionar como moléculas sinalizadoras regulando importantes atividades celulares, porém, em concentrações excessivas, as ROS podem causar graves danos à célula, levando-as inclusive à morte celular (LUM e ROEBUCK, 2001). Para evitar um aumento exagerado de ROS, as células possuem um sistema antioxidante, onde algumas enzimas atuam e são cruciais para a proteção das células contra altas taxas de ROS. A catalase constitui uma das principais enzimas que fazem parte deste sistema.

A catalase está presente em animais, plantas, bactérias e fungos (ZAMOCKY e KOLLER, 1999). É uma enzima tetramérica que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ), protegendo as células do  $\text{H}_2\text{O}_2$  e desempenhando um importante papel no sistema de defesa antioxidante em adaptação ao stress oxidativo. A expressão gênica desta enzima é regulada pela taxa de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no citosol (MATES et al., 1999).

A catalase tem como cofator o ferro, que está ligado não covalentemente em cada uma de suas 4 subunidades sendo, portanto, uma hemoproteína. O átomo de ferro é um participante ativo do sítio catalítico desta enzima, que possui massa molecular de 240 kDa (MATES et al., 1999). Em células de mamíferos, a catalase localiza-se predominantemente em peroxissomos. Além do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a catalase também tem a função de detoxificar diferentes substratos, como fenóis e álcoois, via reações acopladas ao peróxido de hidrogênio. Para sua atividade, a catalase liga-se ao NADPH, que protege esta enzima contra a inativação e aumenta sua eficiência (NORDBERG e ARNER, 2001).

Atualmente, não existem dúvidas de que a contribuição da catalase na proteção do organismo contra o estresse oxidativo é essencial. O peróxido de hidrogênio, produto de várias oxidases e superóxido – dismutases, não é somente tóxico por si só, pois numa reação tipo Fenton, pode se decompor e formar outros radicais hidroxil. Este radical é provavelmente um dos maiores intermediários do oxigênio que pode causar efeitos deletérios reagindo com o DNA, proteínas e lipídios em suas proximidades (ZAMOCKY e KOLLER, 1999).

#### 1.4. MACRÓFAGOS

Células fagocíticas como neutrófilos e macrófagos constituem a primeira linha de defesa do organismo contra agentes infecciosos (BABIOR, 2000). Os macrófagos são células que surgem da maturação de monócitos que migram do sangue para os tecidos e se diferenciam em macrófagos residentes, possuindo a capacidade de reconhecer e endocitar agentes estranhos ao organismo. Nos vertebrados, os macrófagos residem em todos os tecidos do corpo e são especialmente abundantes em áreas que apresentam um potencial maior de sofrer algum tipo de invasão de organismos patogênicos como os pulmões e o intestino. Também estão presentes em grande número no tecido conjuntivo, fígado e baço. (ALBERTS et al, 2004).

Estas células de defesa, quando em contato com microorganismos e antígenos, são capazes de aumentar a secreção de uma ampla classe de moléculas como eicosanóides, citocinas, proteínas complemento e enzimas, especialmente lisozimas. Os macrófagos também liberam IL-1 (Interleucina 1) e TNF- $\alpha$  (Fator de necrose tumoral alfa), que são potentes reguladores de leucócitos e outras células. Estas citocinas são capazes de induzir a adesão de moléculas em células endoteliais e selectinas. Além disso, através do IFN- $\gamma$  (interferon gama), que é uma molécula sinalizadora secretada por linfócitos T, os macrófagos aumentam os níveis de liberação de vários produtos quando entram em contato com a superfície do LPS (lipopolissacarídeo) bacteriano. Esses produtos promovem uma reação inflamatória, recrutando linfócitos e outras células para o local da infecção. Outra classe de moléculas expressa pelos macrófagos são moléculas MHC I e II (*Major histocompatibility complex class*), envolvidas no processo de apresentação de antígenos para os linfócitos T (ROITT et al., 2001).

Os macrófagos apresentam uma grande diversidade de receptores de superfície celular que permitem a estas células reconhecer e endocitar os patógenos. Entre estes receptores encontram-se os receptores de reconhecimento de padrões, tais como os TLRs (*Toll like receptor*), que reconhecem imunoestimulantes associados à patógenos. Além destes, possuem receptores de superfície celular para a porção Fc dos anticorpos produzidos pelo sistema

imunitário adaptativo e para o componente C3b do complemento. A ligação do ligante com qualquer um desses receptores induz a polimerização de actina na região de contato com o patógeno, fazendo com que a membrana citoplasmática do fagócito envolva o patógeno e fagocite o mesmo em um grande fagossomo delimitado por membranas (ALBERTS et al., 2004).

Uma vez que o patógeno tenha sido fagocitado, os macrófagos lançam mão de uma incrível diversidade de mecanismos para eliminar o invasor. O fagossomo é acidificado pela fusão com vesículas proveniente da região trans-golgi contendo lisozima e hidrolases ácidas capazes de degradar as proteínas e a parede celular de bactérias, por exemplo. Além disso, é montado em suas membranas o complexo NAPH oxidase, que catalisa a produção de uma série de compostos altamente tóxicos derivados do oxigênio, tais como o superóxido ( $O_2^-$ ), o hipoclorito (HOCl), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), os radicais hidroxil e reativos intermediários de nitrogênio. A produção desses compostos tóxicos é acompanhada pelo aumento temporário do consumo de oxigênio pelas células, chamado de *burst* respiratório (ALBERTS et al., 2004). Um dos reativos intermediários de nitrogênio produzido por macrófagos ativados é o óxido nítrico (NO), que pode também ser produzido por outros tipos celulares e é importante em outros sistemas do organismo.

Os macrófagos participam ativamente no mecanismo de morte celular programada (apoptose) mecanismo essencial no desenvolvimento e homeostase tecidual de todos os organismos multicelulares. Desse modo, um grande número de células entra continuamente em apoptose em todos os tecidos, e são rapidamente internalizadas e degradadas pelas células fagocíticas como os macrófagos (SAVILL, 1997). Para endocitar uma célula apoptótica, receptores dos macrófagos devem encontrar sinais nestas células que não estão presentes em células saudáveis, como a migração do fosfolípido fosfatidilserina para a monocamada externa da membrana plasmática das células em fase avançada de apoptose (ADEREM E UNDERHILL, 1999).

### 1.4.1. Fagocitose

Os macrófagos realizam parte da imunidade celular não específica através do mecanismo da fagocitose. Esta pode ser dividida em alguns estágios, como migração, reconhecimento, ingestão e destruição do agente infeccioso através da produção de ânions superóxidos (WITKO-SARSAT et al., 2000). Estas células expressam uma ampla classe de receptores que participam do reconhecimento e internalização das partículas a serem fagocitadas (FIGURA 2). Alguns destes receptores são capazes de transmitir sinais intracelulares que levam à fagocitose, enquanto outros parecem participar da ligação ou do aumento da eficiência da internalização das partículas (UNDERHILL e OZINSKY, 2002).

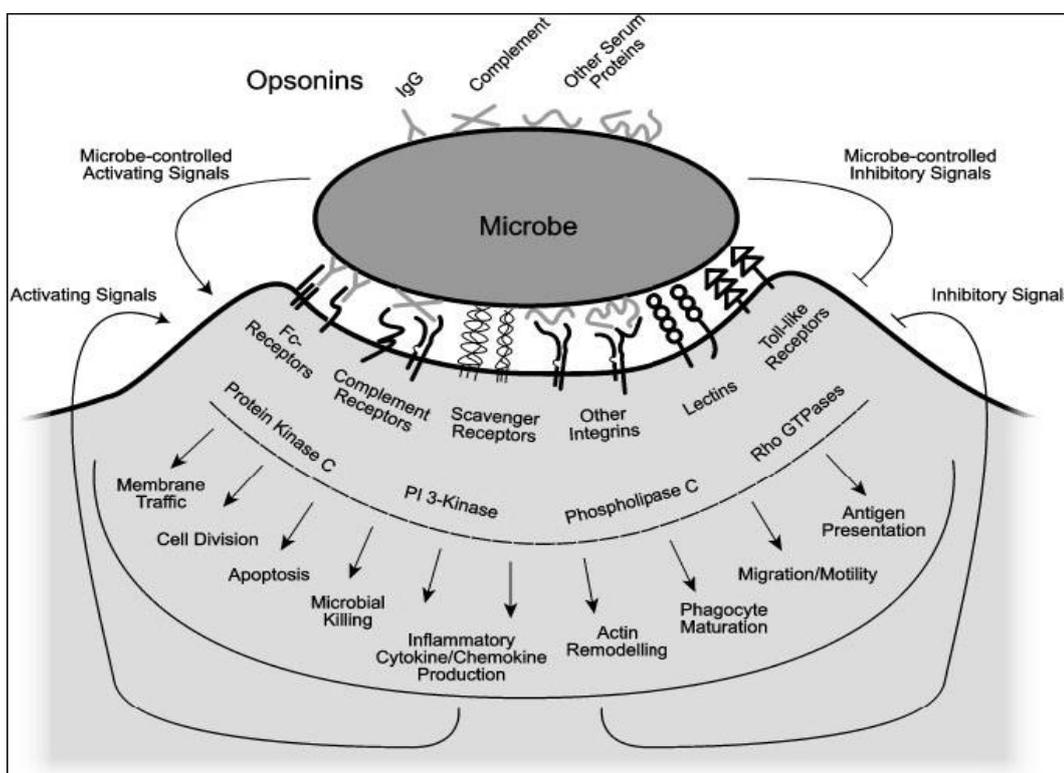
A fagocitose inicia-se com a resposta imune inata no reconhecimento de agentes estranhos. Os macrófagos expressam receptores fagocíticos, como o receptor de manose, que reconhece estruturas conservadas na estrutura de patógenos. Microorganismos invasores são também reconhecidos por receptores complemento após relativa opsonização não específica com elementos do complemento e por receptores Fc após opsonização específica com anticorpos. Todos estes receptores induzem rearranjos nos filamentos de actina que levam a internalização das partículas (ADEREM e UNDERHILL, 1999).

A fagocitose de patógenos realizada pelos macrófagos é um processo crítico, que envolve a entrada e degradação de agentes infecciosos e células senescentes e remodelamento de tecidos na resposta imune e inflamação. A fagocitose é um processo extremamente complexo, não havendo um único modelo para regular as diversas estruturas envolvidas com a internalização das partículas a serem fagocitadas. Esta complexidade é em parte devida à diversidade de receptores capazes de estimular a fagocitose, e em parte devida à capacidade que vários microorganismos possuem de influenciar seu destino quando são internalizados (ADEREM e UNDERHILL, 1999).

Apesar da complexidade associada aos diferentes mecanismos de fagocitose, várias características podem ser notadas: a internalização de partículas é iniciada pela interação de receptores específicos localizados na superfície do fagócito com ligantes na superfície da partícula a ser fagocitada. Isto leva a

polimerização da actina no local da ingestão. Após a internalização, a actina recobre o fagossomo e este se torna maduro através de uma série de eventos que interagem com componentes da via endocítica, culminando na formação de um fagolisossomo (ADEREM e UNDERHILL, 1999).

Os mecanismos de reconhecimento que levam à fagocitose ocorrem a nível celular ou humoral. Receptores celulares que reconhecem esses padrões incluem o receptor de manose (MR) e DEC 205, que reconhece manoses e integrinas (por exemplo, CD11b e CD18) e receptores *Scavengers* que reconhecem componentes na superfície de bactérias, incluindo o LPS (SASTRY e EZEKOWITZ, 1993; STAHL e EZEKOWITZ, 1998). Componentes humorais que opsonizam agentes infecciosos antes que estes sejam reconhecidos pelos receptores fagocíticos incluem uma proteína que se liga à manose e é reconhecida pelos receptores C1q e proteína surfactante A, que se liga a carboidratos e é reconhecida por um receptor transmembrana chamado SPR 210 (EPSTEIN et al., 1996; TENNER et al., 1995).



**Figura 2:** Receptores e interações de sinais durante a fagocitose. Múltiplos receptores reconhecem as partículas simultaneamente, ligando-se diretamente ou através das opsoninas na superfície das mesmas. Os receptores disparam outros sinais intracelulares. Adaptado de: UNDERHILL e OZINSKI (2002).

## 1.5. ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado. É produzido a partir da L-arginina, por uma reação mediada pela enzima óxido nítrico sintase constitutiva (c-NOS) e induzível (i-NOS) (FIGURA 3). Este radical constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares. Está envolvido no relaxamento vascular e tem um papel de grande importância na proteção do vaso sanguíneo. É um mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas capaz de destruir patógenos e células tumorais (DUSSE et al, 2003).

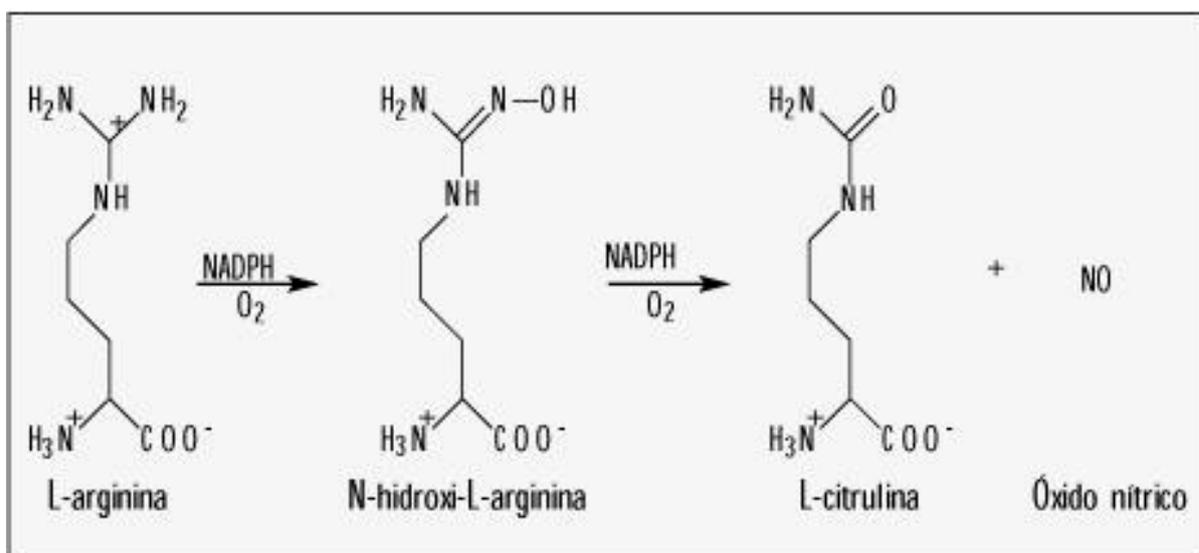
A enzima c-NOS é dependente de íons cálcio e de calmodulina. O óxido nítrico produzido por esta enzima está envolvido em processos de sinalização celular, em processos homeostáticos e é sintetizado por curtos períodos. A isoforma i-NOS é independente de cálcio e produz óxido nítrico por longos períodos. Está presente em macrófagos e outras células ativadas por citocinas onde o óxido nítrico produzido terá ação microbicida e tumoricida.

No sistema nervoso central, o óxido nítrico atua como um neuromodulador para o controle da atividade normal, influenciando inclusive, a formação de memória e intensidade da resposta a um estímulo doloroso (CHRISTOPHERSON e BREDT, 1997). Os efeitos do óxido nítrico de origem vascular estão ligados à inibição plaquetária e à contração do músculo liso. No sistema renal, parece regular a microcirculação (COSTA et al., 2003) e nas células endoteliais tem um papel essencial no processo de relaxamento do vaso sanguíneo. Este processo ocorre pela interação do óxido nítrico com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase no interior da célula muscular (DUSSE et al., 2003).

Em tumores, o óxido nítrico apresenta uma complexidade de efeitos, ora contribuindo para a regressão do tumor ora para a progressão. Se por um lado foi observada correlação inversa entre o potencial metastático do tumor e a produção de óxido nítrico, por outro, a maior produção deste radical foi detectada em tumores de maior potencial de malignidade. Contudo, esta diversidade de efeitos do óxido nítrico em tumores parece estar relacionada às concentrações de óxido nítrico gerados, à sensibilidade individual das células e à duração do fenômeno (COSTA et al., 2003). Segundo DUSSE et al., (2003), a toxicidade do óxido nítrico se faz

presente particularmente em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante.

O óxido nítrico é o principal mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas e constitui a mais importante molécula reguladora do sistema imune. O óxido nítrico resultante da ativação da i-NOS possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microorganismos, parasitas e células tumorais. A citotoxicidade do óxido nítrico resulta da sua ação direta ou da sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório (DUSSE et al., 2003). A base bioquímica para a ação direta do óxido nítrico consiste na sua reação com metais, especialmente o ferro, presentes nas enzimas alvo (JAMES, 1995). Desta forma, são inativadas enzimas cruciais para o ciclo de Krebs, para a cadeia de transporte de elétrons, para a síntese de DNA e para o mecanismo de proliferação celular. Em processos infecciosos, células ativadas como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais secretam simultaneamente óxido nítrico e intermediários reativos do oxigênio, e a ação citotóxica indireta do óxido nítrico consiste, principalmente, na sua reação com esses intermediários do oxigênio (DUSSE et al., 2003). A ação do óxido nítrico contra microorganismos ocorre intracelularmente, no caso de sua ação tumoricida deve ocorrer extracelularmente, graças a facilidade com que este radical se difunde pelas membranas biológicas (MACMICKING et al., 1997).



**Figura 3:** Reação catalizada pela enzima óxido nítrico sintase. Adaptado de: DUSSE et al., (2003).

## 1.6. MODELOS *IN VITRO*

Trabalhos de toxicologia celular utilizam diferentes abordagens e metodologias para identificar os riscos e entender os mecanismos básicos que influenciam a expressão de respostas celulares frente ao estresse químico. Uma abordagem particularmente interessante tem sido identificar e desenvolver sistemas em modelo *in vitro*, o qual mantém as características básicas das mais complexas condições *in vivo*, contudo, podem ser manipuladas experimentalmente. Modelos para fins de pesquisas *in vitro* possuem várias características próprias que fornecem importantes vantagens em muitas áreas da toxicologia, permitindo controlar melhor as condições experimentais, o que nem sempre é possível nos estudos *in vivo*.

Condições físicas e químicas do ambiente celular, tais como temperatura, pH, PO<sub>2</sub> e concentrações de íons fisiológicos podem ser rigorosamente controladas. Fatores biológicos que influenciam respostas celulares, tais como hormônios e mediadores, podem ser estudados individualmente e em combinação, o que não seria possível *in vivo*. Além disso, a concentração de agentes químicos tóxicos pode ser prontamente determinada e controlada para uma definição mais específica das relações dose-resposta. Outra vantagem, é que nos sistemas *in vitro* eliminam-se interações sistêmicas que podem confundir a situação experimental (BAKSI e FRAZIER, 1990).

Apesar dos efeitos causados pelo chumbo serem bastante conhecidos, pouco se sabe sobre os mecanismos que geram a toxicidade deste metal, principalmente a nível celular. Alguns estudos *in vivo* e *in vitro* têm surgido na tentativa de elucidar estes mecanismos, facilitando a compreensão das alterações desencadeadas pelo chumbo na célula.

Estudos recentes realizados pelo Laboratório de Toxicologia Celular com o chumbo inorgânico e macrófagos peritoneais em exposição *in vitro*, mostraram que estas células são sensíveis à presença deste metal. No entanto, algumas questões não foram respondidas. A primeira delas foi relacionada à concentração testada no primeiro trabalho (GARGIONI, 2003) ter sido considerada muito alta (40 µM), o que colocou em dúvida se o resultado de inibição fagocítica observada estava representando uma condição realista. Outra questão surgida foi verificar se alguns

dos mecanismos essenciais no processo de ativação do macrófago, não testados no primeiro trabalho, estavam de fato sendo afetados pela presença do chumbo em pequenas concentrações.

Neste trabalho, continuaremos a investigar a ação do chumbo inorgânico nesta população celular específica do sistema imune, os macrófagos. A escolha deste tipo celular deveu-se a necessidade de responder as questões apresentadas e a facilidade com o protocolo já bem estabelecido no trabalho anterior, além do fato de os macrófagos serem uma das principais células do sistema imunitário inato.

Outro fator importante desta escolha é que trabalhos mais recentes demonstraram que o chumbo causa sérias modulações no sistema imunitário de mamíferos, principalmente em macrófagos, alterando e comprometendo sua função de defesa do organismo contra agentes estranhos (DIETERT, et al., 2004). Para conhecer melhor os efeitos causados pelo chumbo inorgânico nestas células, foram investigadas a modulação da resposta imunitária e a atividade de uma das enzimas do sistema antioxidante em macrófagos peritoneais de camundongo expostos *in vitro* a este contaminante.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar através de ensaios *in vitro*, os efeitos do chumbo inorgânico [Pb(II)] na resposta imunitária de macrófagos peritoneais de camundongos expostos a concentrações de 0.2, 2 e 20 $\mu$ M de Pb(II) durante o período de 24 e 72 horas.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar diferentes tipos de fixadores para análise ultraestrutural de macrófagos através da microscopia eletrônica de transmissão;
- Quantificar a biossíntese do óxido nítrico liberado pelos macrófagos após exposição a diferentes concentrações e tempos de exposição ao chumbo inorgânico;
- Avaliar os efeitos de diferentes concentrações e tempo de exposição ao chumbo inorgânico na atividade fagocítica dos macrófagos;
- Investigar se o chumbo inorgânico interfere na retenção do corante vermelho neutro pelos macrófagos após diferentes concentrações e tempos de exposição;
- Verificar se a adesão dos macrófagos é afetada pela exposição ao chumbo após diferentes concentrações e tempo de exposição;
- Verificar se o chumbo inorgânico interfere com a atividade da enzima catalase.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. DESIGN EXPERIMENTAL COM MACRÓFAGOS

Neste estudo, foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos *Swiss Mus musculus* (Linné, 1758) machos, com idade entre dois e três meses. Os camundongos machos possuem menos tecido adiposo, com massa variando entre 30 e 33g, o que facilita também a obtenção das células. Todos os animais utilizados neste trabalho foram obtidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Para obtenção das células, os animais foram previamente sacrificados por deslocamento cervical. O lavado peritoneal foi coletado após inoculação de tampão fosfato salina (PBS), pH 7.2, estéril. Em seguida, as células foram aspiradas, plaqueadas e mantidas em estufa durante 30 minutos a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, o sobrenadante com células não aderidas foi substituído por meio de cultivo (DMEM) com 10% de soro bovino fetal, 10 unid./mL de antibiótico Gentamicina, 2,2g/L de bicarbonato de sódio e 2,5g/L de hepes. Os macrófagos foram mantidos em cultura por 24h a 37°C e com uma atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24h, as células foram expostas ao nitrato de chumbo (chumbo inorgânico) [Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] em três concentrações: 0,2 (grupo Pb1), 2 (grupo Pb2) e 20µM (grupo Pb3), ficando expostas ao metal pelos períodos de 24 e 72 horas, acompanhadas de um grupo controle não exposto ao metal. Em todos os experimentos foram obtidos resultados de um *pool* de células provenientes de 12 a 18 animais.

#### 3.2. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Para determinar a viabilidade das células, 600 macrófagos foram contados em lamínulas, em três repetições de 200 macrófagos cada. A média das três contagens foi transformada em porcentagem de macrófagos viáveis e representada graficamente.

### 3.3. DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DA RESPOSTA IMUNITÁRIA

Para todos os parâmetros analisados a seguir, foi utilizado o mesmo procedimento experimental descrito no parágrafo anterior, sendo que  $2 \times 10^5$  células foram adicionadas em cada poço de placas de cultivo de 96 poços. Os resultados são provenientes de 16 réplicas por experimento, sendo que cada experimento foi realizado no mínimo em triplicata.

#### 3.3.1. Biossíntese do Óxido Nítrico (NO)

O óxido nítrico formado é rapidamente convertido a nitrato e nitrito. Por este método, quantifica-se o óxido nítrico mensurando o nitrito e nitrato presentes no sobrenadante das culturas utilizando o reagente de Gries (Naftiletlenodiamino 0,1% em ácido fosfórico 5% e sulfonamina p-aminobenzeno 1% em ácido fosfórico 5%), ambos misturados numa proporção de 1:1 no momento do uso. Após 24 e 72 horas de cultivo, a placa foi centrifugada a 1500 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi retirado da placa de cultivo e misturado ao Reagente de Griess durante dez minutos. Em seguida, as amostras foram lidas em leitor de microplacas *Microplate reader Bio-rad-Benchmark*, a 550 nm. O NO foi calculado utilizando a curva padrão de nitrato de sódio (10-200 $\mu$ M) (STHUER e MARLETTA, 1985).

#### 3.3.2. Atividade Fagocítica

Para esta técnica, adicionou-se às culturas celulares, 10 $\mu$ L de zymosan ( $2,3 \times 10^8$  partículas/mL) corados com vermelho neutro e incubou-se por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 100 $\mu$ L de fixador para interromper o processo de fagocitose. Trinta minutos depois, a placa foi lavada com PBS e, posteriormente, centrifugada por 5 minutos a 1.500 rpm, com o objetivo de remover o zymosan e o vermelho neutro não fagocitados pelos macrófagos. O vermelho neutro no interior dos macrófagos foi solubilizado utilizando-se 100 $\mu$ L de solução de extração. Após 30 minutos procedeu-se a leitura das placas a 550 nm utilizando espectrofotômetro *Microplate reader Bio-rad-Benchmark*. Os dados foram expressos em absorbância

550 nm /  $2 \times 10^5$  células (BONATTO et al, 2004).

### 3.3.3. Retenção do vermelho neutro

Para esta análise, após os tempos de cultivo estabelecidos anteriormente, 20 $\mu$ L de vermelho neutro a 2% foi adicionado em cada poço da placa. Após 30 minutos, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 1.500 rpm. O sobrenadante foi descartado e os poços lavados com PBS, para eliminar o vermelho neutro que não foi internalizado pelas células. Adicionou-se 100 $\mu$ L de solução de extração para solubilizar o vermelho neutro que se encontrava no interior das células. Esta solubilização é possível porque o vermelho neutro é um corante catiônico que se difunde através da membrana celular e, uma vez presente nos lisossomos e outras regiões ácidas da célula, fica aprisionado devido à mudança de cargas causada pelo pH ácido do sistema lisossomal. Após 30 minutos, a placa foi lida a 550 nm utilizando espectrofotômetro Microplate reader Bio-rad-Benchmark. Os dados foram expressos em absorbância 550 nm /  $2 \times 10^5$  células (BONATTO et al, 2004).

### 3.3.4. Adesão celular

Para analisar a adesão celular, o meio de cultivo foi retirado, os poços contendo as células foram lavados uma vez com PBS e as células foram fixadas com metanol 50% durante 10 minutos. Em seguida o sobrenadante foi retirado e 100 $\mu$ L do corante Giemsa 0,1% foi adicionado durante 10 minutos. A placa foi lavada três vezes com água ultrapura para retirar o excesso de corante e as células não aderidas. O corante foi solubilizado com 200 $\mu$ L de metanol. A leitura foi realizada a 550 nm utilizando espectrofotômetro Microplate reader Bio-rad-Benchmark. Os dados foram expressos em absorbância 550 nm /  $2 \times 10^5$  células.

### 3.4. ANÁLISE BIOQUÍMICA

#### 3.4.1. Atividade da catalase

Após as células terem sido cultivadas em placas de petri estéreis, foram raspadas, removidas e centrifugadas. Os *pellets* celulares foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise. A atividade da catalase foi quantificada de acordo com AEBI (1984). As amostras foram descongeladas em gelo, submetidas ao ultra-som (6 ciclos de 4s cada) e centrifugadas a 9.000 xg por 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . As leituras de cinética enzimática procederam-se em intervalos de 2 segundos a 240 nm imediatamente após serem adicionados e misturados por inversão 980  $\mu\text{l}$  de meio de reação (peróxido de hidrogênio a 40 mM, Tris a 50 mM, EDTA a 0.25 mM, pH 8.0,  $25^{\circ}\text{C}$ ) e 20  $\mu\text{l}$  do sobrenadante da amostra a uma cubeta de quartzo. O decréscimo gradual na absorbância, devido à degradação do peróxido de hidrogênio, foi monitorado e registrado num intervalo total de 1 min e 30s. A partir dos valores de absorbância escolheu-se, através de regressão linear, o primeiro intervalo de 1 min com  $r^2$  igual ou superior a 0.99. Para a determinação da concentração protéica nas frações celulares foi utilizado o método de BRADFORD (1976), com curva padrão empregando albumina bovina (BSA). Foram realizados três experimentos independentes e com no mínimo dez réplicas por experimento.

### 3.5. ANÁLISES MORFOLÓGICAS

#### 3.5.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a análise morfológica dos macrófagos através da microscopia eletrônica de transmissão, determinaram-se oito fórmulas com diferentes concentrações e combinações de fixadores a fim de se verificar o melhor método de fixação para este tipo celular. Após terem sido cultivados em placas de petri estéreis por 24 horas, os macrófagos foram fixados de acordo com as fórmulas especificadas abaixo (TABELA 1). Após a fixação, as células foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 2% em tampão de cacodilato de

sódio 0,1M por 1h. Em seguida, foram desidratadas em série crescente de etanol P.A. e óxido de propileno, e incluídas em resina Poli Embed 812 (*Electron microscopy sciences*). Após polimerização em estufa a 60°C por 72h, os blocos foram trimados, realizados os cortes semi-finos e corados com azul de toluidina borificado 1%. Em seguida, foi selecionada a região de cortes ultrafinos que foram obtidos com auxílio do ultramicrotomo (Sorvall-Blum/MT2-B-Ultra-Microtome). Os cortes foram contrastados com acetato de uranila 5% durante 20 minutos e solução de Reynolds por 10 minutos, e posteriormente analisados no microscópio eletrônico de transmissão (JEOL – 1200 ExII) do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

|           | <b>Gluta-<br/>raldeído</b> | <b>Parafor-<br/>maldeído</b> | <b>Caco-<br/>dilato</b> | <b>CaCl<sub>2</sub></b> | <b>Ferricianeto<br/>de Potássio</b> | <b>Uranila<br/>em bloco</b> | <b>Tempo de<br/>fixação</b> | <b>Tempe-<br/>ratura</b> |
|-----------|----------------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| <b>F1</b> | 3,5%                       | -----                        | 0,14M                   | 0,5mM                   | -----                               | -----                       | 2h                          | Ambiente                 |
| <b>F2</b> | 2 %                        | 2%                           | 0,1M                    | 0,5mM                   | -----                               | -----                       | 2h                          | Ambiente                 |
| <b>F3</b> | 3,5%                       | -----                        | 0,14M                   | 0,5mM                   | -----                               | 1%                          | 2h                          | Ambiente                 |
| <b>F4</b> | 2 %                        | 2%                           | 0,1M                    | 0,5mM                   | -----                               | 1%                          | 2h                          | Ambiente                 |
| <b>F5</b> | 3,5%                       | -----                        | 0,14M                   | 0,5mM                   | 0,8%                                | 1%                          | 2h                          | Ambiente                 |
| <b>F6</b> | 3,5%                       | -----                        | 0,14M                   | 0,5mM                   | 0,8%                                | -----                       | 2h                          | Ambiente                 |
| <b>F7</b> | 2,5%                       | -----                        | 0,1M                    | 0,05mM                  | -----                               | -----                       | 30 min.                     | 4 °C                     |
| <b>F8</b> | 2,5%                       | -----                        | 0,1M                    | -----                   | -----                               | -----                       | 1h                          | Ambiente                 |

**Tabela 1:** Fórmulas dos diferentes fixadores utilizados para as análises ultraestruturais através da microscopia eletrônica de transmissão.

### 3.5.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os macrófagos foram cultivados em placas de 24 poços com lamínulas, durante 24 e 72 horas. Após estes períodos, foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M durante 2 horas. Logo após, as células foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M. Em seguida, foram desidratadas em etanol P.A. Após passar pelo ponto crítico (CO<sub>2</sub>) (CPD – Balzers) e por metalização (SCD-030-Balzers-Union SL 9496) com ouro, as células foram observadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura do Laboratório de Ultraestrutura Celular do Instituto de Biofísica da UFRJ.

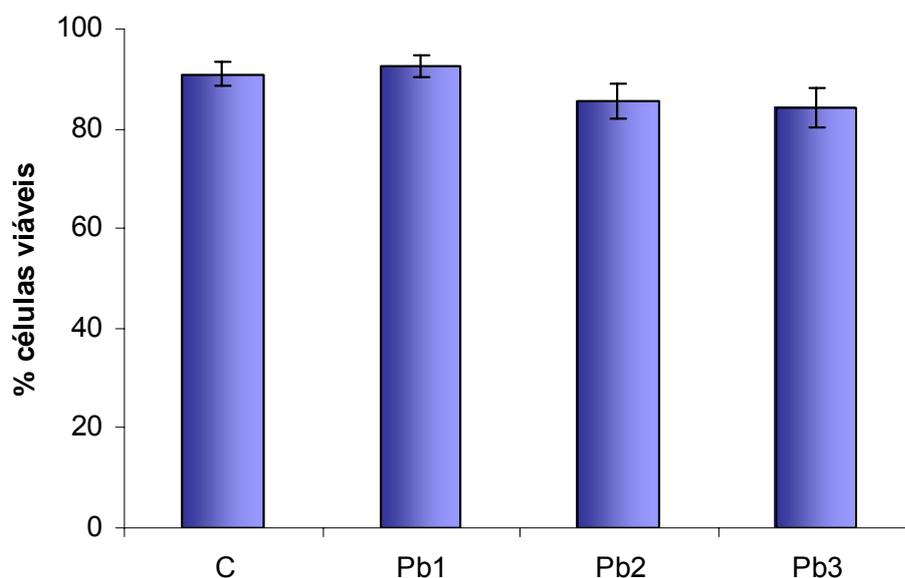
### 3.6. Análises estatísticas

Os testes estatísticos realizados foram ANOVA seguido pelos pós-testes Dunnett's e Tukey.

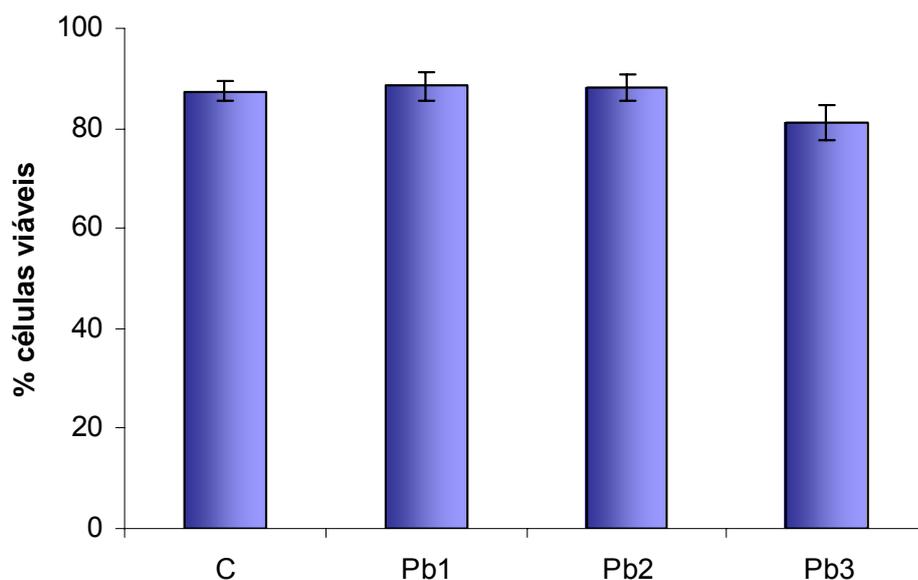
## 4. RESULTADOS

### 4.1. VIABILIDADE CELULAR

Os macrófagos que ficaram expostos ao chumbo pelo período de 24 horas apresentaram viabilidade acima de 90% para os grupos controle e Pb1 e acima de 80% para os grupos Pb2 e Pb3, não havendo diferenças significativas entre nenhum grupo (FIGURA 4). A viabilidade manteve-se alta também nas células que ficaram expostas ao chumbo durante 72 horas. Embora o grupo Pb3 apresentou um pequeno decréscimo na viabilidade das células, não houve diferenças significativas e a viabilidade manteve-se acima de 80% em todos os grupos (FIGURA 5).



**Figura 4:** Viabilidade celular dos macrófagos após 24 horas de exposição ao chumbo. (C) controle, Pb1 (0,2µM Pb<sup>2+</sup>), Pb2 (2µM Pb<sup>2+</sup>) e Pb3 (20µM Pb<sup>2+</sup>). p<0,001.

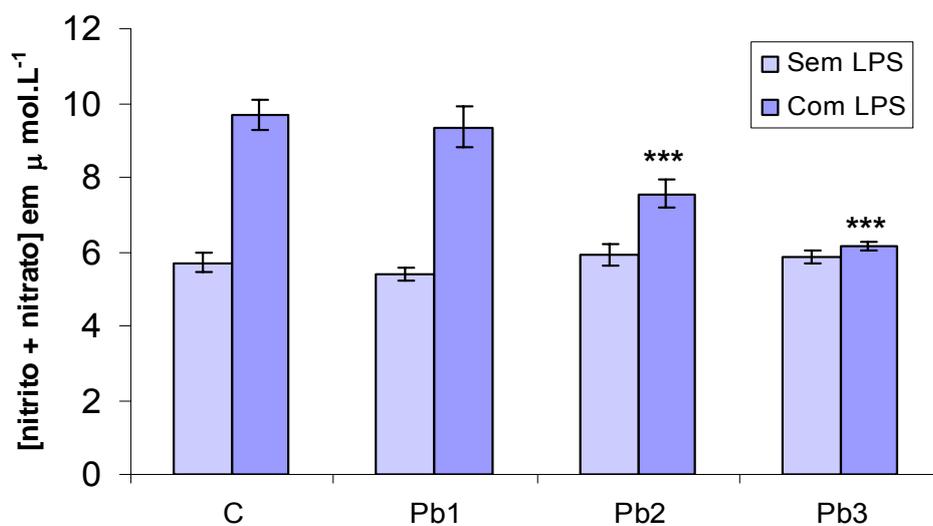


**Figura 5:** Viabilidade celular dos macrófagos após 72 horas de exposição ao chumbo. (C) controle, Pb1 (0,2µM Pb<sup>2+</sup>), Pb2 (2µM Pb<sup>2+</sup>) e Pb3 (20µM Pb<sup>2+</sup>).  $p < 0,001$ .

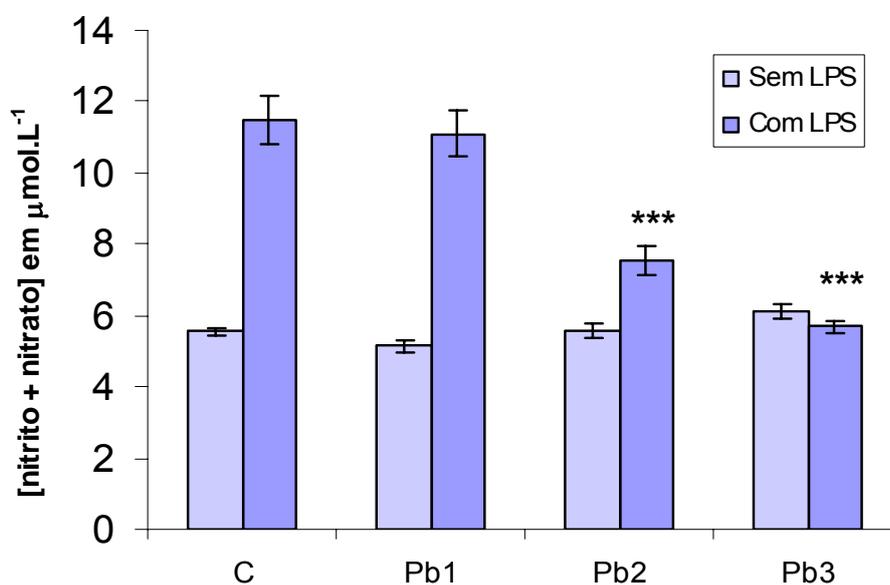
#### 4.2. BIOSÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO

A via para indução da biossíntese do óxido nítrico foi através do LPS e diminuiu significativamente em relação ao controle tanto no grupo de macrófagos expostos ao chumbo durante o período de 24 horas (FIGURA 6), quanto no grupo exposto ao metal pelo período de 72 horas (FIGURA 7). As células que ficaram em contato com chumbo pelo período de 24 horas tiveram sua produção de óxido nítrico diminuídas nos grupos que ficaram expostos às concentrações de 2µM (Pb2) e 20µM (Pb3). Estes grupos apresentaram diferença significativa entre si ( $p < 0,01$ ) e entre o grupo controle ( $p < 0,001$ ). Neste caso, a síntese do óxido nítrico diminuiu 22% em relação ao controle (concentração de 2µM) e 40% em relação ao controle nas células expostas à concentração de 20µM.

Os macrófagos que foram expostos ao chumbo pelo período de 72 horas também tiveram a síntese do óxido nítrico significativamente suprimida em relação ao controle nas concentrações de 2 e 20µM ( $p < 0,001$ ). Entretanto, provavelmente devido ao fator tempo, a síntese do óxido nítrico reduziu para a metade nestes grupos. Os grupos Pb2 e Pb3, embora com a produção do NO diminuída, não apresentaram diferença significativa entre si.



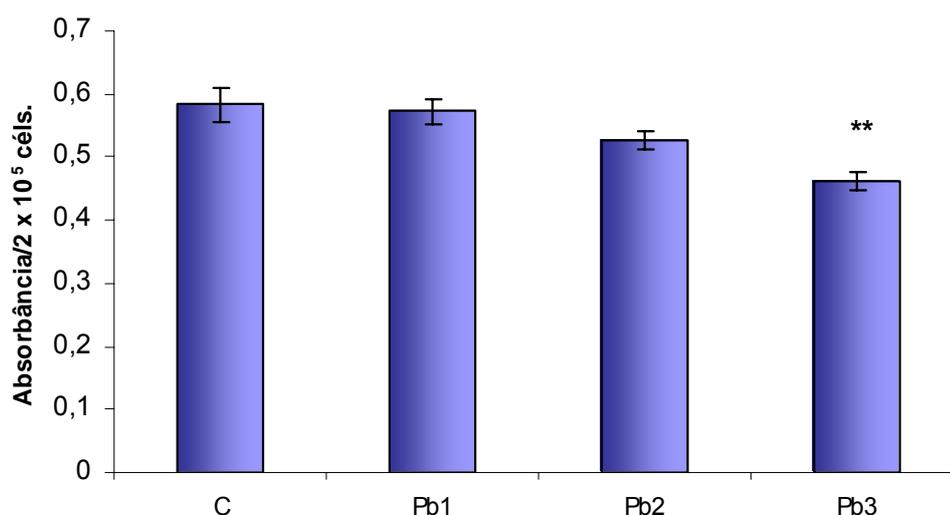
**Figura 6:** Biossíntese do óxido nítrico após 24 horas de exposição ao chumbo. (C) controle, Pb1 (0,2μM Pb<sup>++</sup>), Pb2 (2μM Pb<sup>++</sup>) e Pb3 (20μM Pb<sup>++</sup>). p<0,001.



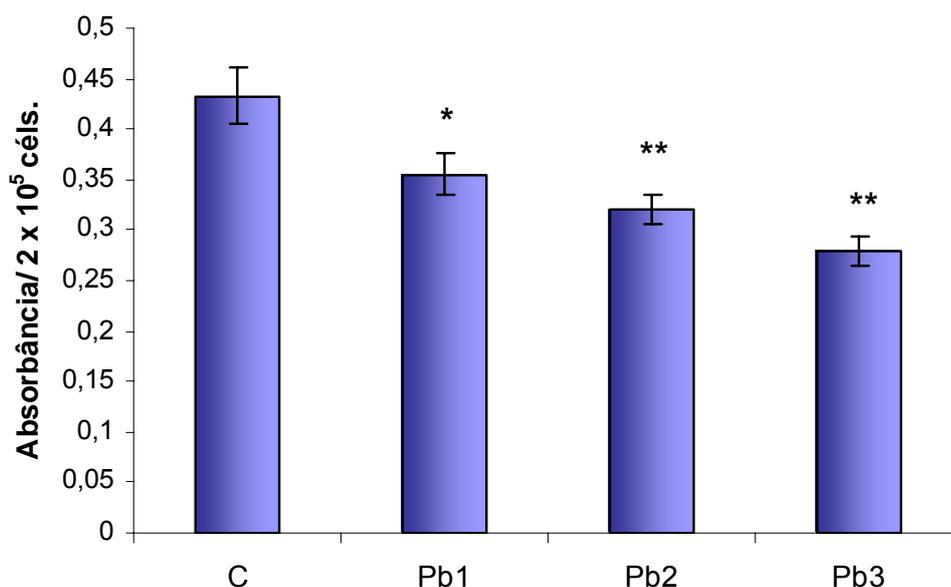
**Figura 7:** Biossíntese do óxido nítrico após 72 horas de exposição ao chumbo. (C) controle, Pb1 (0,2μM Pb<sup>++</sup>), Pb2 (2μM Pb<sup>++</sup>) e Pb3 (20μM Pb<sup>++</sup>). p<0,001.

### 4.3. ÍNDICE FAGOCÍTICO

O índice fagocítico dos macrófagos diminuiu tanto nos grupos de células que ficaram expostas ao chumbo durante 24 horas (FIGURA 8), quanto no grupo que ficou exposto durante 72 horas (FIGURA 9). No primeiro, a atividade fagocítica diminuiu em relação ao grupo controle nos grupos tratados com 2 e 20 $\mu$ M de chumbo, no entanto, somente na maior concentração do metal ocorreu redução significativa do índice fagocítico. As células que ficaram em contato com o chumbo durante 72 horas tiveram seus índices fagocíticos diminuídos em todos os grupos em relação ao controle. O grupo Pb2 diminuiu o índice fagocítico em 25%, relacionado ao controle. O grupo Pb3 reduziu o índice fagocítico em 35% em relação ao controle ( $p > 0,01$ ). Nenhum dos grupos apresentou diferença significativa entre si.



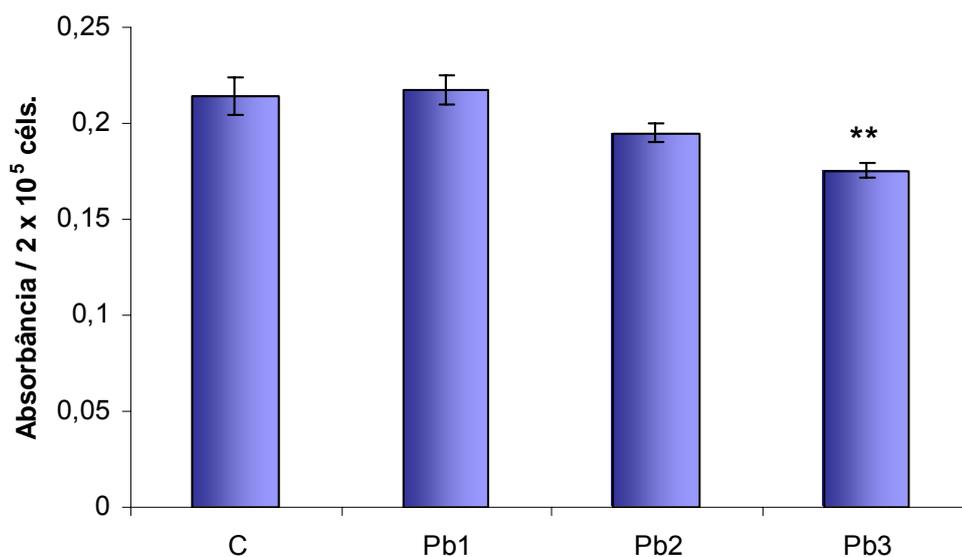
**Figura 8:** Índice fagocítico dos macrófagos após 24 horas de exposição ao chumbo. (C) controle, Pb1 (0,2 $\mu$ M Pb<sup>2+</sup>), Pb2 (2 $\mu$ M Pb<sup>2+</sup>) e Pb3 (20 $\mu$ M Pb<sup>2+</sup>).  $p < 0,01$ .



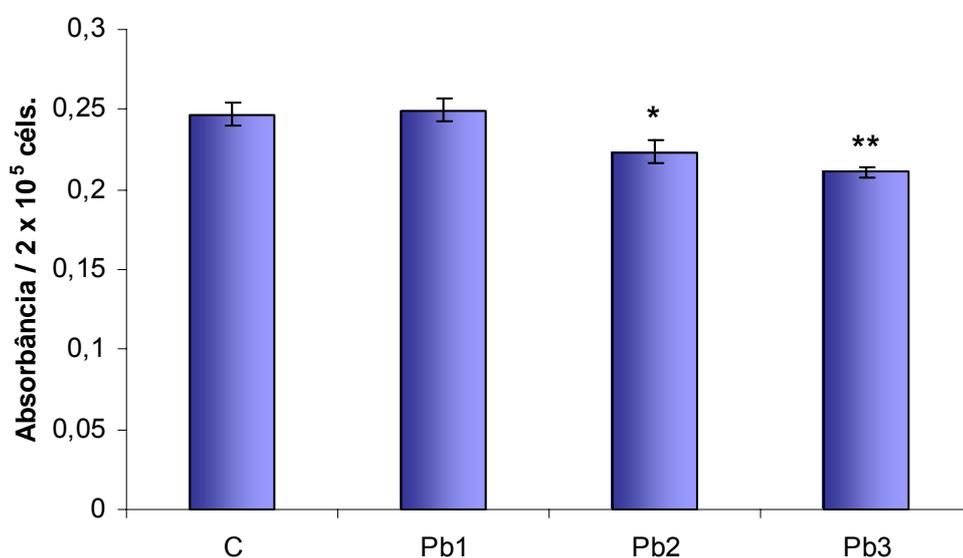
**Figura 9:** Índice fagocítico dos macrófagos após 72 horas de exposição ao chumbo. (C) controle, Pb1 (0,2µM Pb<sup>2+</sup>), Pb2 (2µM Pb<sup>2+</sup>) e Pb3 (20µM Pb<sup>2+</sup>). p<0,05 e p<0,01.

#### 4.4. RETENÇÃO DE VERMELHO NEUTRO

Apesar deste parâmetro apresentar pouca variação em nosso trabalho, a análise estatística da retenção do corante vermelho neutro por tempo de exposição ao chumbo, mostrou que os macrófagos expostos ao metal apresentaram menor quantidade do corante vermelho neutro retido, indicando que provavelmente estavam com o sistema endossoma/lisossoma comprometido. Nas células expostas ao chumbo pelo período de 24 horas, esta redução ocorreu apenas no grupo Pb3 em relação ao grupo controle (p< 0,01) (FIGURA 10). Já nas células que ficaram expostas ao chumbo pelo período de 72 horas, a diminuição deste parâmetro foi significativa em relação ao controle nos grupos Pb2 e Pb3 (p< 0,05) e (p< 0,01) respectivamente (FIGURA 11). Nenhum dos grupos apresentou diferença significativa entre si.



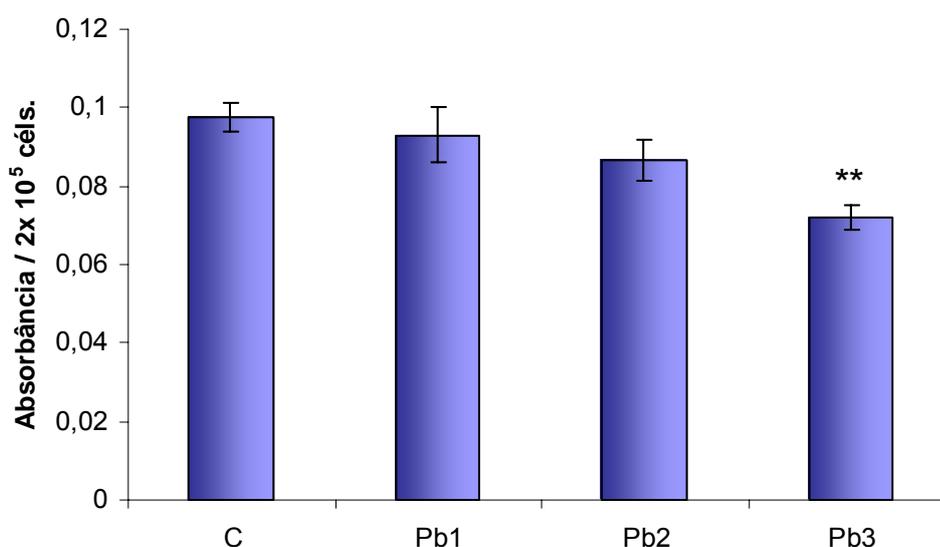
**Figura 10:** Índice de retenção do corante vermelho neutro em macrófagos após 24 horas de exposição ao chumbo. (C) controle, Pb1 ( $0,2\mu\text{M Pb}^{2+}$ ), Pb2 ( $2\mu\text{M Pb}^{2+}$ ) e Pb3 ( $20\mu\text{M Pb}^{2+}$ )  $p < 0,01$ .



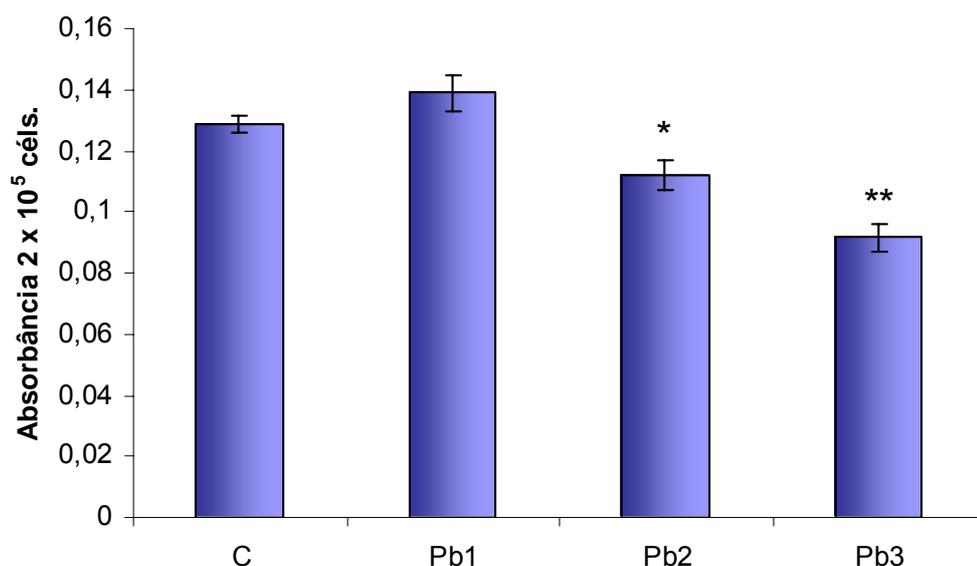
**Figura 11:** Índice de retenção do corante vermelho neutro em macrófagos após 72 horas de exposição ao chumbo. (C) controle, Pb1 ( $0,2\mu\text{M Pb}^{2+}$ ), Pb2 ( $2\mu\text{M Pb}^{2+}$ ) e Pb3 ( $20\mu\text{M Pb}^{2+}$ )  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ .

#### 4.5. CAPACIDADE DE ADESÃO

Os resultados da capacidade de adesão dos macrófagos após exposição ao chumbo, mostraram um efeito relacionado ao tempo que estas células permaneceram em contato com o metal. O grupo de células que esteve em contato com o chumbo pelo período de 24 horas demonstrou alterações significativas em sua adesão somente na maior concentração do metal ( $p > 0,01$ ) (FIGURA 12). No entanto, nas células que ficaram expostas ao chumbo pelo tempo de 72 horas, a capacidade de adesão mostrou-se alterada no grupo Pb2 e Pb3. As células do grupo Pb2 tiveram uma redução de aproximadamente 13% na adesão comparadas ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). No grupo Pb3 esta redução foi significativamente maior, chegando a 30% em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ) (FIGURA 13).



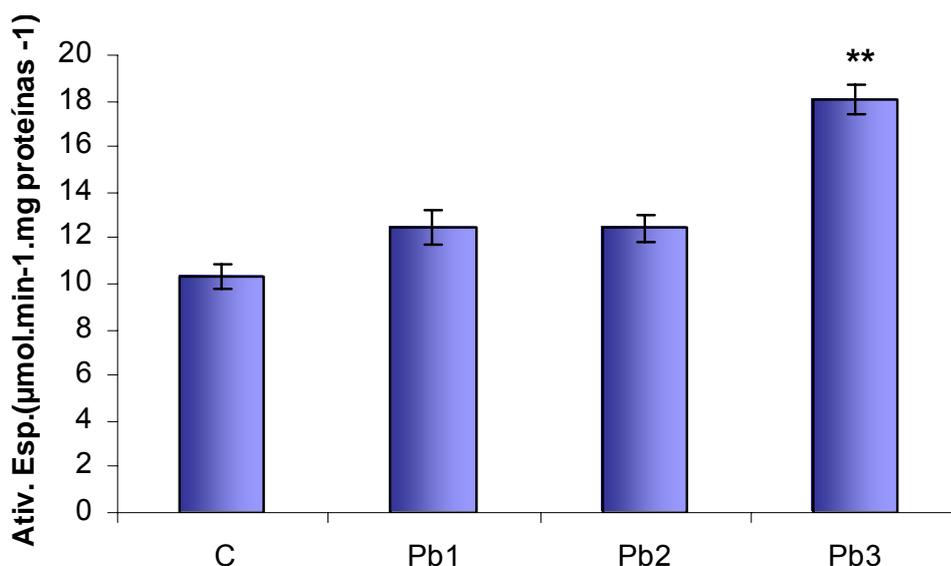
**Figura 12:** Capacidade de adesão dos macrófagos após 24 horas de exposição ao chumbo. (C) controle, Pb1 ( $0,2\mu\text{M Pb}^{2+}$ ), Pb2 ( $2\mu\text{M Pb}^{2+}$ ) e Pb3 ( $20\mu\text{M Pb}^{2+}$ )  $p < 0,01$ .



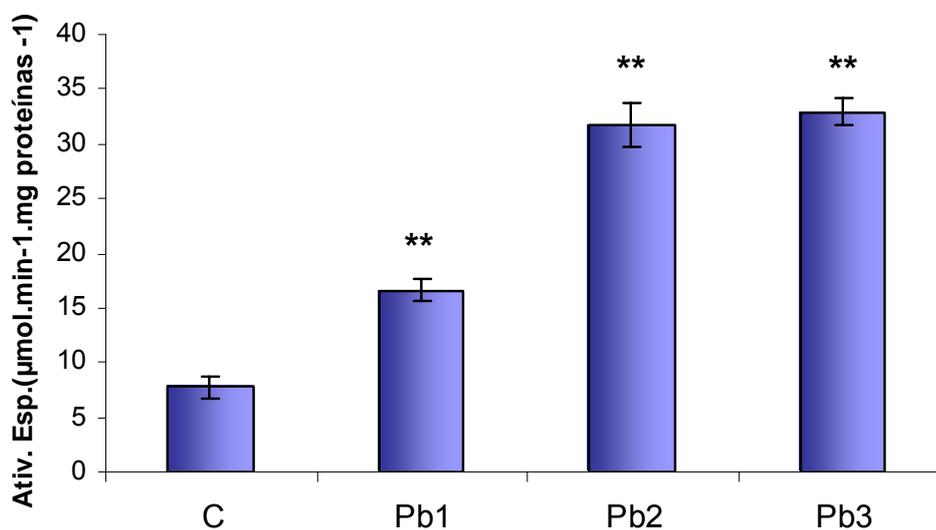
**Figura 13:** Capacidade de adesão dos macrófagos após 72 horas de exposição ao chumbo. (C) controle, Pb1 (0,2 $\mu$ M Pb<sup>++</sup>), Pb2 (2 $\mu$ M Pb<sup>++</sup>) e Pb3 (20 $\mu$ M Pb<sup>++</sup>) p<0,05 e p<0,01.

#### 4.6. ATIVIDADE DA CATALASE

A atividade da enzima catalase foi induzida principalmente nas células que ficaram expostas ao chumbo por mais tempo. Os macrófagos que ficaram em contato com o chumbo durante 24 horas apresentaram uma tendência de ativação em relação ao controle na atividade desta enzima nos grupos Pb1 e Pb2, embora este aumento não tenha sido significativo. No entanto, a atividade da catalase aumentou significativamente em relação ao controle (p< 0,01) no grupo Pb3. Este aumento foi significativamente maior também em relação aos grupos Pb1 e Pb2 (FIGURA 14). Nas células que ficaram expostas ao chumbo pelo período de 72 horas, observou-se que o aumento na atividade desta enzima foi bastante acentuado. Até mesmo a menor concentração de chumbo utilizada (0.2 $\mu$ M), induziu aumento na atividade da catalase. Os grupos Pb2 e Pb3 aumentaram a atividade da enzima em aproximadamente três vezes em relação ao controle (p< 0,01). Todos os grupos apresentaram diferenças significativas entre si (FIGURA 15).



**Figura 14:** Atividade específica da enzima catalase em macrófagos após 24 horas de exposição ao chumbo. (C) controle, Pb1 ( $0,2\mu\text{M Pb}^{++}$ ), Pb2 ( $2\mu\text{M Pb}^{++}$ ) e Pb3 ( $20\mu\text{M Pb}^{++}$ )  $p < 0,01$ .



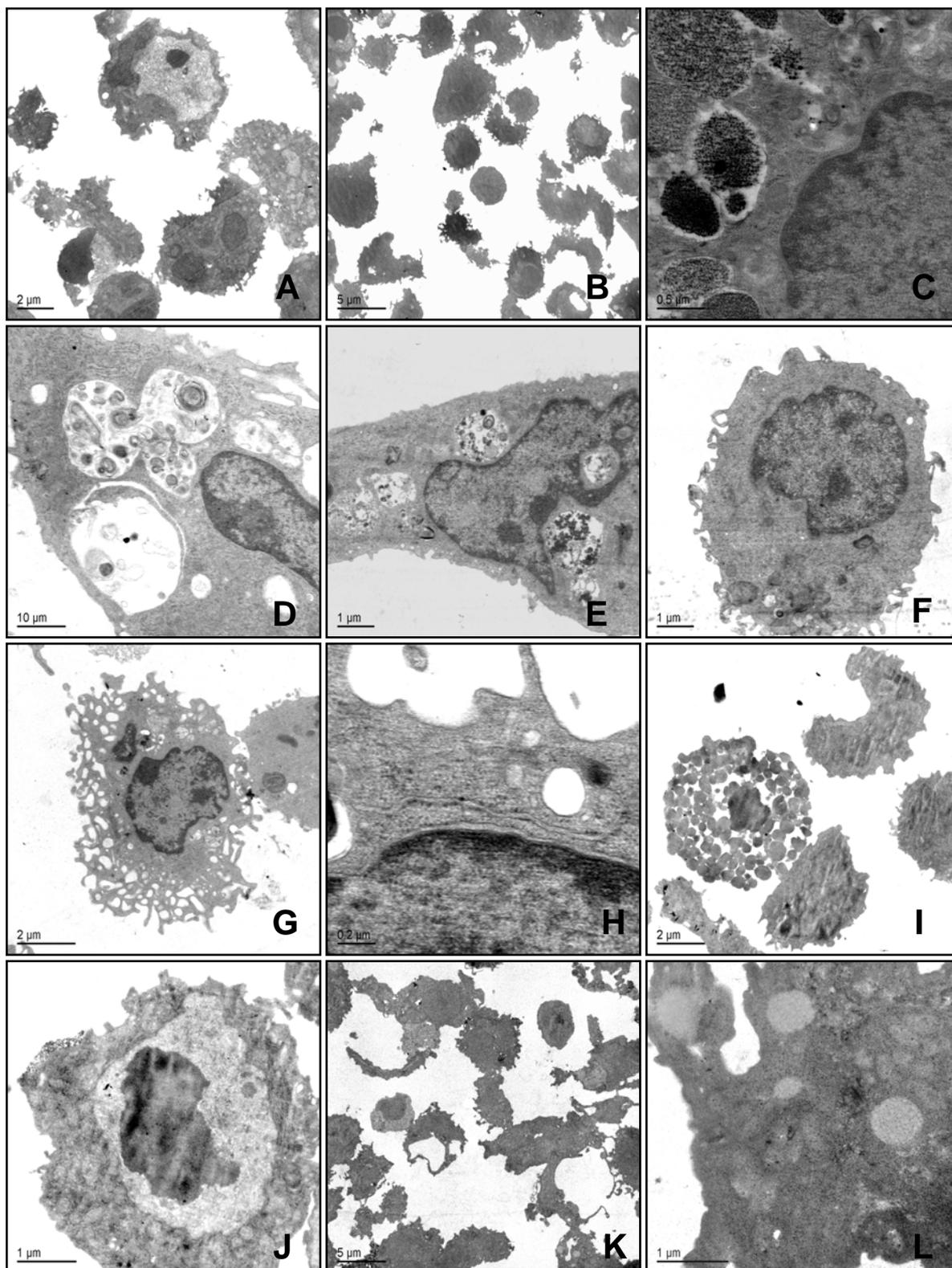
**Figura 15:** Atividade específica da enzima catalase em macrófagos após 72 horas de exposição ao chumbo. (C) controle, Pb1 ( $0,2\mu\text{M Pb}^{++}$ ), Pb2 ( $2\mu\text{M Pb}^{++}$ ) e Pb3 ( $20\mu\text{M Pb}^{++}$ )  $p < 0,01$ .

## 4.7. ANÁLISES MORFOLÓGICAS

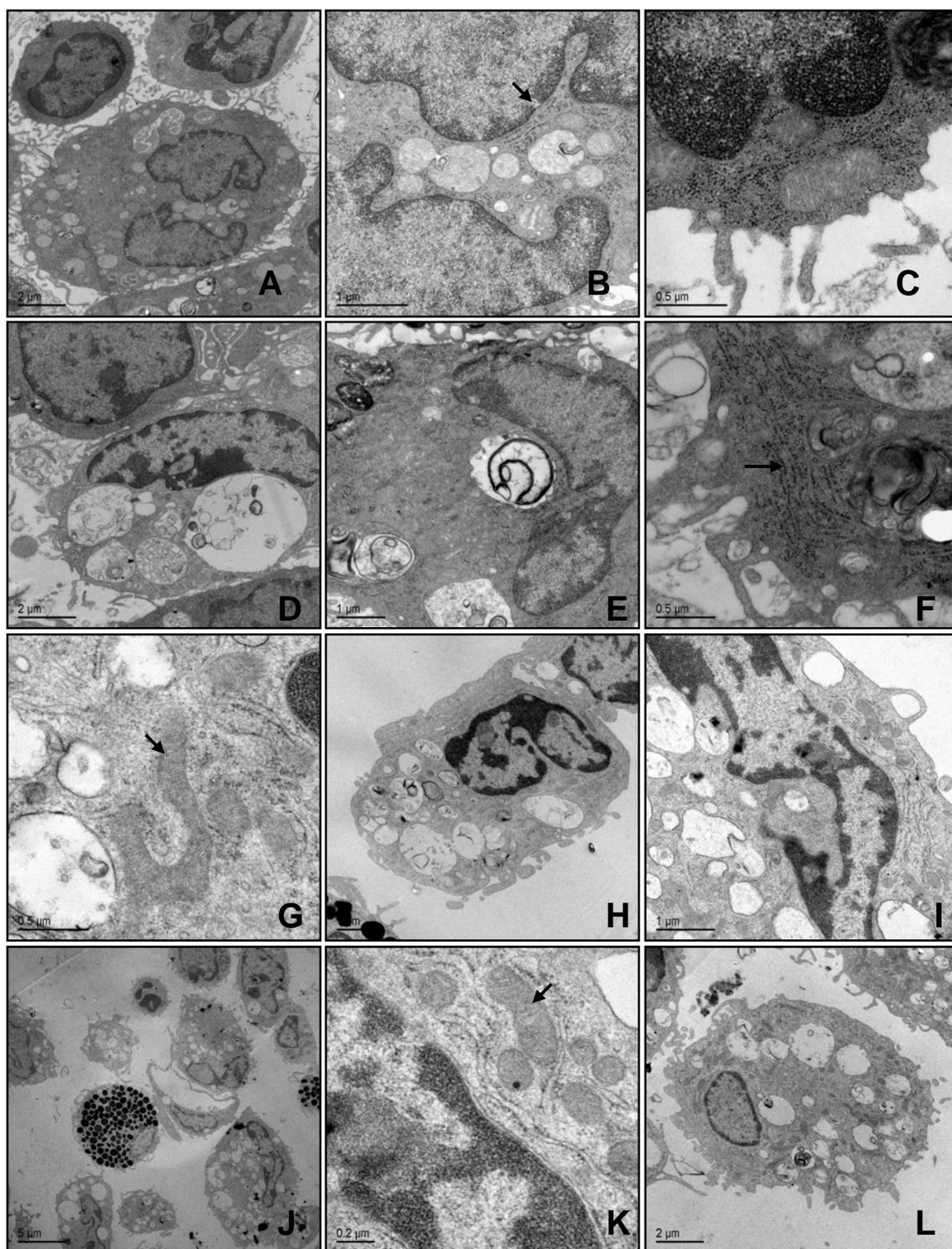
### 4.7.1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Os resultados dos testes de fixadores para a microscopia eletrônica de transmissão, demonstraram que de uma maneira geral, os macrófagos fixados com as fórmulas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 não apresentaram fixação satisfatória. Como se pode verificar nas imagens, as membranas não ficaram muito bem preservadas, inclusive as membranas nucleares (FIGURA 16 C, D e E). Outro problema verificado foi o aspecto homogêneo do citoplasma, sem distinção clara de organelas (FIGURA 16 F, G, J e L). As mitocôndrias e o retículo endoplasmático também não ficaram bem preservados, condição essencial a um bom fixador (FIGURA 16 C, D, H e L).

Os macrófagos fixados através das fórmulas 7 e 8 apresentaram uma fixação mais satisfatória. Na maioria das células, as membranas estão mais bem preservadas. Em algumas imagens é possível observar os complexos poro-nucleares, no envoltório nuclear (FIGURA 17 B, D, e K). Os macrófagos fixados com a fórmula 7 apresentam os ribossomos bem preservados em relação aos fixados com a fórmula 8 (FIGURA 17 C e F). As mitocôndrias, organelas que indicam a boa fixação da célula de uma maneira geral, encontram-se bem preservadas nos macrófagos fixados com a fórmula 8 (FIGURA 17 G e K).



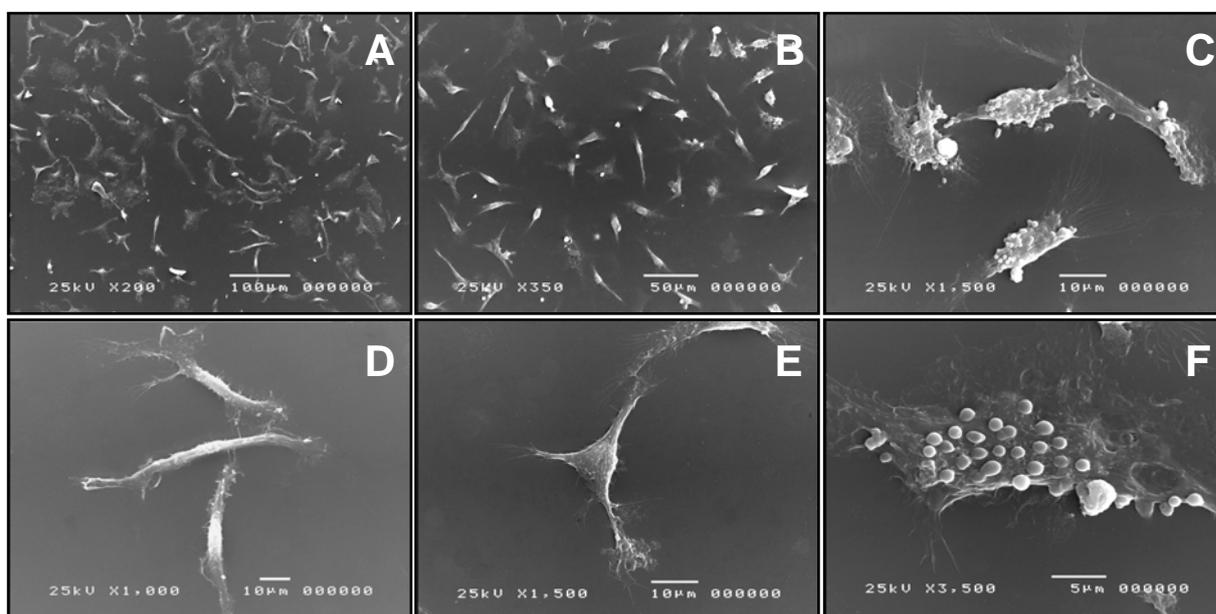
**Figura 16:** Macrófagos fixados com diferentes fórmulas de fixadores. Fórmula 1 (A, B), fórmula 2 (C, D), fórmula 3 (E, F), fórmula 4 (G, H), fórmula 5 (I, J) e fórmula 6 (K, L).



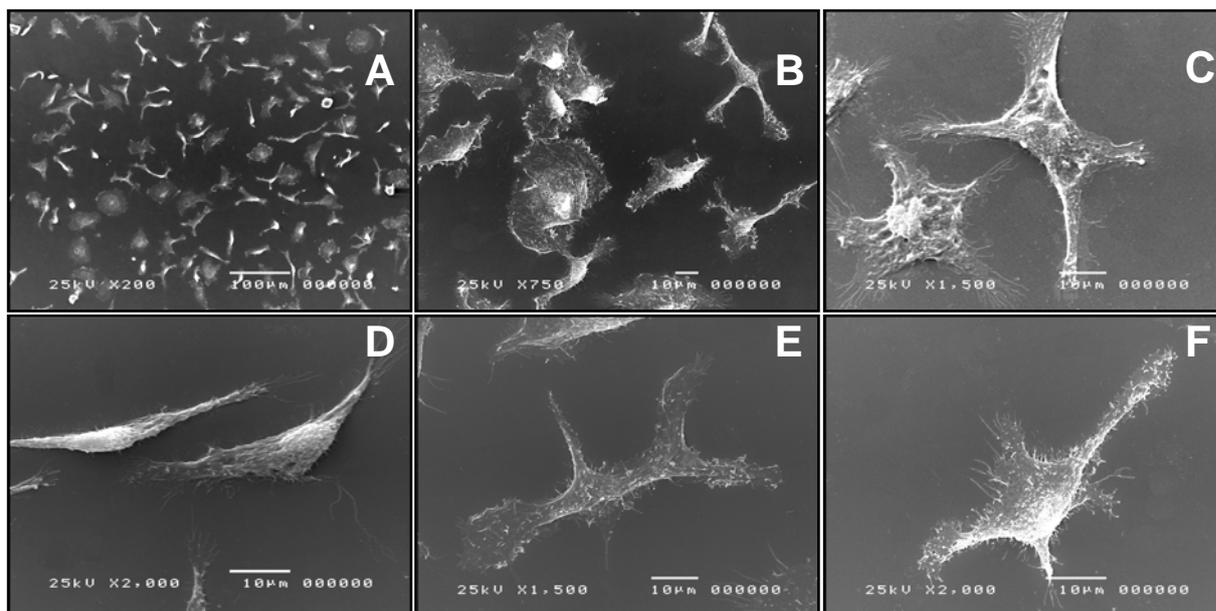
**Figura 17:** Macrófagos fixados com diferentes fórmulas de fixadores. Fórmula 7 (A, B, C, D, E e F), fórmula 8 (G, H, I, J, K e L). *Seta figura B* = complexos poro-nucleares no envoltório nuclear. *Setas figura G e K* = mitocôndrias. *Seta figura F* = Ribossomos associados ao retículo endoplasmático rugoso.

#### 4.7.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Através das análises morfológicas por microscopia eletrônica de varredura, pode-se observar que os macrófagos mostraram um espriamento maior ao longo do tempo. No grupo de macrófagos que ficaram em cultivo durante 24 horas, podem-se observar células bastante espreiadas (FIGURA 18 A e B). Estas células apresentaram-se alongadas com filopódios em suas extremidades (FIGURA 18 D e E). É possível observar também células com *blebs* em sua superfície, provavelmente conseqüentes da morte celular por apoptose (FIGURA 18 C e F). Os macrófagos que foram cultivados por 72 horas demonstraram um espriamento maior (FIGURA 19 A e B), com maior quantidade de filopódios e estes saindo de quase toda a superfície da célula (FIGURA 19 E e F). A Figura 19 C também demonstra células em morte celular por apoptose. Observaram-se ainda neste grupo, várias projeções do tipo lamelipódios (FIGURA 19 A, B, D e F).



**Figura 18:** Macrófagos cultivados durante 24 horas, observados através da microscopia eletrônica de varredura.



**Figura 19:** Macrófagos cultivados durante 72 horas, observados através da microscopia eletrônica de varredura.

## 5. DISCUSSÃO

Vários estudos têm sido realizados para verificar os níveis sanguíneos de chumbo em trabalhadores ocupacionalmente expostos e em pessoas que vivem em áreas de risco a este metal tóxico. Duas das concentrações de chumbo inorgânico utilizadas neste trabalho (0.2 e 2 $\mu$ M), são concentrações realistas, ou seja, que podem ser encontradas no organismo de pessoas expostas de alguma maneira ao chumbo. Neste trabalho, demonstrou-se a capacidade do chumbo inorgânico inibir algumas funções imunitárias básicas no desempenho das funções dos macrófagos. Os resultados descritos neste experimento são provenientes de um estudo *in vitro*, portanto, sem a interação com outras células do sistema imunitário e outros sistemas. No entanto, parece possível fazer uma relação entre as respostas encontradas em nosso trabalho e a importância destes dados no que diz respeito à saúde humana. Além disso, segundo AHAMED et al. (2005), alterações no metabolismo celular causadas pelo chumbo, são similares em trabalhos realizados *in vitro* e *in vivo*.

A concentração de chumbo presente na corrente sanguínea de indivíduos ocupacionalmente expostos em muitos países é de 40 – 50  $\mu$ g/dl ( $\approx$ 2,4  $\mu$ M), sendo que esta concentração é quatro ou cinco vezes maior do que o recomendado para crianças (SILBERGELD, 2003). LUSTBERG et al., (2002) associaram níveis sanguíneos de chumbo menores do que 20 $\mu$ g/dl (0,96  $\mu$ M) com aumentos nos riscos de mortalidade prematura, devido a doenças como câncer e patologias cardíacas. Segundo o Centro para Controle e Prevenção de Doenças dos EUA, os níveis seguros máximos de chumbo no sangue de crianças podem ser de até 10  $\mu$ g/dl (0,48  $\mu$ M) (RICE, 1996). No entanto é interessante perceber que alguns autores como SCHWARTZ (1994) e LANPHER et al., (2000), afirmam que não existem níveis seguros de chumbo no sangue de crianças. Esta afirmação vai de encontro com os trabalhos de AHAMED e colaboradores, que encontraram alterações bioquímicas em enzimas como a catalase, ALAD e glutathiona em crianças com níveis de chumbo no sangue menores que 10  $\mu$ g/dl (7,47  $\pm$  3,06  $\mu$ g/dl) (AHAMED, et al., 2005). Desta forma, percebe-se que o sangue poderá atuar como um bom veículo para colocar em contato o chumbo que estiver presente na corrente

sanguínea com as células do sistema imunitário, atingindo estas células que estão presentes também em diferentes órgãos linfóides do corpo (BISHAY e SENGUPTA, 2006).

A partir destes dados, fica evidente a relação entre os níveis sanguíneos de chumbo e sua provável capacidade de modular algumas funções dos macrófagos e de outras células. Os macrófagos são células complexas envolvidas em uma série de funções imunorregulatórias e os efeitos do chumbo nestas células não têm sido ainda bem esclarecidos (SHABANI e RABANI, 2000). Portanto, o estudo utilizando os macrófagos pode fornecer importantes informações e parâmetros quanto aos danos deste metal no sistema de defesa do organismo.

Segundo KROCOVA et al. (2000), concentrações de até 120 $\mu$ M de chumbo inorgânico são consideradas muito baixas, o que não é aceitável, uma vez que outros autores têm testado concentrações menores (0.01 até 40  $\mu$ M) que a citada acima (OLIVI et al., 2004; TIAN e LAWRENCE, 1995; JADHAV et al., 2000). No presente trabalho, foram utilizadas concentrações bem inferiores (0.2, 2 e 20 $\mu$ M), sendo que as duas primeiras são concentrações próximas às encontradas no organismo de indivíduos expostos ao chumbo inorgânico. No entanto, mesmo sendo concentrações baixas, os três parâmetros da resposta imunitária em macrófagos testados neste estudo foram alterados pelo chumbo: a biossíntese do óxido nítrico, o índice fagocítico e o volume lisossomal. Efeitos na atividade da catalase e capacidade de adesão também foram observados.

O óxido nítrico é responsável pela destruição ou supressão de muitos organismos patogênicos intracelulares e neste estudo, os macrófagos expostos às concentrações de 2 e 20 $\mu$ M de chumbo tiveram a biossíntese do óxido nítrico drasticamente reduzidas em relação às células do grupo controle.

A redução significativa na biossíntese do óxido nítrico demonstrada neste experimento, corrobora com os dados obtidos por TIAN e LAWRENCE (1995). Segundo estes autores, a produção do óxido nítrico foi bloqueada em macrófagos do baço estimulados com concanavalina A (ConA) quando foram expostos a 10 $\mu$ M de chumbo inorgânico. Quando estimulados com citocinas (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) o chumbo inibiu a produção do NO em 40% em macrófagos expostos a 0,625  $\mu$ M de PbII, 93% em macrófagos expostos a 10 $\mu$ M e bloqueou totalmente a produção em macrófagos

expostos a 40 $\mu$ M. Estes autores ressaltam que estas diminuições na produção do NO não são devidas à citotoxicidade do chumbo, uma vez que a viabilidade de todas as culturas foi similar, ficando em torno de 75%, também descrito por GARGIONI et al., (2006).

A inibição da produção do óxido nítrico pelo chumbo pode ser explicada pela supressão da tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) pelo metal (PURDY et al., 1981). Desta maneira, o Pb pode interferir na síntese da BH<sub>4</sub> em macrófagos e conseqüentemente diminuir a produção do óxido nítrico, já que a BH<sub>4</sub> é um dos co-fatores utilizados na reação de síntese do NO (MONCADA e HIGGS, 1993). A glutatona também participa da síntese do NO (STUEHR et al., 1990) e sabe-se que o Pb pode ligar-se a glutatona e outros grupos tióis, diminuindo a atividade da enzima óxido nítrico sintase induzível (i-NOS) (TIAN e LAWRENCE, 1995). Esta enzima é responsável pela produção do óxido nítrico em macrófagos ativados, requer sinais imunes para sua ativação e sua atividade é regulada basicamente em níveis transcricionais. (TIAN e LAWRENCE, 1995). A i-NOS deve ligar-se à calmodulina para tornar-se funcionalmente ativa (NATHAN, 1992) e como o Pb tem alta afinidade pela calmodulina (GOLDSTEIN, 1993) pode modificar desta forma a associação entre a calmodulina e a i-NOS (TIAN e LAWRENCE, 1995) e/ou atuar diretamente na atividade da enzima.

Os metais pesados podem interagir com moléculas da superfície celular ou com moléculas intracelulares. Se os íons metálicos atravessarem a membrana e acumularem-se no interior de macrófagos até certos níveis, eles podem afetar potencialmente os sinais de transdução da expressão da i-NOS e/ou a expressão de outras proteínas que estão envolvidas indiretamente na produção do NO. Embora haja muitas possibilidades do chumbo interferir na síntese da i-NOS, o principal alvo parece ser mesmo a síntese da BH<sub>4</sub> em macrófagos. A falta desta molécula pode diminuir a atividade da i-NOS e a produção do NO (TIAN e LAWRENCE, 1996).

De outra forma, segundo MACKMICKING et al., (1997), inibidores de tirosina quinases, proteíno fosfatases e serino proteases bloqueiam a indução da i-NOS, esta última ao nível do NF- $\kappa$ B (MACKMICKING, et al, 1997). O NF- $\kappa$ B é um dos últimos sinalizadores de uma via para ativar a transcrição de genes que promovem respostas imunes e inflamatórias em macrófagos ativados por lipopolissacarídeo

(ALBERTS et al, 2004). Sendo assim, é possível que o chumbo e outros metais pesados possam também diminuir ou bloquear a produção do NO por estas vias, caso sejam inibidores ou moduladores destas moléculas.

Estes dados demonstram que o Pb pode inibir a produção de NO em macrófagos, sendo que esta inibição pode ser responsável, pelo menos em parte, pelo comprometimento na capacidade de defesa do organismo de vertebrados, inclusive humanos expostos ao chumbo (TIAN e LAWRENCE, 1995). De acordo com BISHAY e SENGUPTA (2006), qualquer modulação nas funções do sistema imunitário pode causar inibição da capacidade do hospedeiro proteger-se contra agentes infecciosos e patogênicos.

A interferência com a produção do NO pode ser um dos principais mecanismos celulares conseqüentes da intoxicação pelo chumbo (TIAN e LAWRENCE, 1995). Sendo o NO um dos principais mecanismos microbicidas dos macrófagos (MACKMICKING, et al, 1997), o bloqueio na produção deste radical causado pelo chumbo, comprometerá as principais funções dos macrófagos durante a resposta imunitária e também durante a manutenção da homeostase do organismo.

Uma das descobertas mais importantes a respeito da toxicidade dos metais pesados é o seu efeito na função de fagocitose desempenhada pelas células fagocíticas (BROUSSEAU et al., 2000). A fagocitose é uma característica bem conservada tanto em espécies de invertebrados quanto em vertebrados e a sensibilidade desta função biológica a xenobióticos ambientais em várias espécies animais, faz que com esta função apresente uma abordagem muito interessante em estudos toxicológicos (FLIPO et al., 1992; FOURNIER et al., 1992 e VOCCIA et al., 1994).

No presente trabalho, verificou-se que o índice fagocítico diminuiu progressivamente em função do aumento na concentração do chumbo inorgânico, principalmente nos macrófagos que ficaram expostos ao metal durante 72 horas. Estes resultados são semelhantes ao trabalho de BROUSSEAU et al. (2000), onde fagócitos de bivalves tiveram seus índices fagocíticos suprimidos progressivamente quando expostos a concentrações cada vez mais altas de cloreto de zinco, cádmio e mercúrio. GARGIONI (2003) também descreveu uma significativa redução na

capacidade fagocítica dos macrófagos peritoneais de camundongos expostos a concentrações de 20 e 40 $\mu$ M de chumbo inorgânico expostos pelo mesmo tempo de 72 horas. No entanto, os mecanismos envolvidos na inibição da capacidade fagocítica pelos metais citados acima ainda não se encontram totalmente esclarecidos. Considerando que o movimento celular é essencial durante a fagocitose é possível que ocorra um comprometimento na estrutura do citoesqueleto (nos filamentos de actina) e contatos focais, comprometendo desta forma o movimento celular (GARGIONI, 2003). Outro fator importante é que a ação de diferentes mecanismos que levam a uma alteração na organização e distribuição dos filamentos de actina, interfere indiretamente com a projeção de filopódios e lamelipódios, prejudicando o movimento da célula sobre o substrato (SMALL et al., 1998). Reforçando esta idéia, como o chumbo pode agir inibindo a ativação da miosina pelo seu efeito sobre os sinais de transdução, o movimento de retração do corpo celular pode ficar também comprometido (SHABANI e RABANI, 2000) da mesma forma que pode ainda inibir o estímulo quimiotático (NIGGLI, 2003). Sendo assim, de acordo com os dados apresentados neste estudo, é provável que os baixos índices fagocíticos encontrados nos macrófagos expostos ao chumbo possam estar envolvidos com a desorganização do citoesqueleto no momento da endocitose e também durante os outros movimentos celulares que ocorrem em todo o processo de fagocitose.

Pensando em outros aspectos envolvidos com o efeito inibitório do Pb em macrófagos, sabe-se que membros da família da quinase C (PKC), são recrutados para a fagocitose, além de participar de outras vias de transdução de sinais. Inibidores em geral da atividade da PKC, inibem a internalização de partículas IgG-opsonizadas e complemento-opsonizadas, assim como partículas não opsonizadas de zymosan (ZHELEZNYAK e BROWN, 1992; ALLEN e ADEREM, 1995). Sabendo que o chumbo pode inibir as atividades da PKC (JADHAV et al. 2000), é possível supor que este metal diminua a atividade fagocítica também quando interfere com as atividades da PKC. A PKC está envolvida nos primeiros estágios da internalização das partículas e a sua inibição bloqueia a formação dos filamentos de actina abaixo do local da ligação das partículas (ALLEN e ADEREM, 1995). A isoforma precisa da PKC recrutada no momento da internalização não é totalmente conhecida mas entre

as 12 isoformas descritas da PKC, pelo menos cinco são expressas em macrófagos e são recrutadas para as membranas durante a fagocitose (UNDERHILL e OZINSKY, 2002).

Na tentativa de explicar a inibição ou diminuição da fagocitose pelos metais pesados, BROUSSEAU et al. (2000) levantaram a hipótese de que a citotoxicidade e por conseqüência a baixa viabilidade celular poderiam ser as responsáveis. Entretanto, estes autores observaram que em células expostas a baixas concentrações de metais pesados, mesmo não havendo citotoxicidade, ocorreu diminuição dos índices fagocíticos, indicando que alterações funcionais da fagocitose é que estariam envolvidas.

Embora tenha sido utilizado neste experimento um metal inorgânico que resultou em significativa diminuição da fagocitose, segundo DYRYNDA et al., (1998) esta resposta imunitária é mais vulnerável à modulação causada pela exposição à contaminantes orgânicos lipofílicos, que afetam com mais facilidade as membranas celulares, do que pela ação de metais inorgânicos.

Lisossomos são organelas celulares facilmente conservadas e presentes em quase todas as células de organismos eucarióticos. Sua função no metabolismo celular é fazer a digestão de materiais ingeridos por endocitose (MOORE et al., 2006). Os lisossomos estão envolvidos ainda com a degradação de organelas danificadas ou que estejam em excesso no interior da célula (ex. mitocôndrias e retículo endoplasmático), degradando também proteínas de vida longa, integrando o metabolismo de autofagia celular (KLIONSKY e EMR, 2000).

Os danos em lisossomos resultantes da exposição à contaminantes constituem uma ferramenta importante nos estudos de toxicidade (LOWE et al., 1992, LOWE e PIPE, 1994). Em estudos *in vitro*, a capacidade dos lisossomos reterem por algum tempo o corante catiônico vermelho neutro, faz com que este seja utilizado como um indicador de dano nestas organelas (LOWE et al., 1995). O aumento da entrada do corante vermelho neutro na célula, concentrando-se nos lisossomos, indica um “inchaço” destas organelas. Isto significa que as células estão aptas a fagocitar partículas e processá-las (BONATTO et al., 2004). Quando as células retêm menores quantidades de vermelho neutro, isto indica que o volume lisossomal está diminuído ou a integridade destas organelas está comprometida.

Observações no sistema lisossomal da célula podem servir como importantes biomarcadores prognósticos, já que danos em lisossomos frequentemente precedem patologias celulares e teciduais (GALLOWAY et al., 2004; MOORE, 2002; MOORE et al., 2004). Além disso, a estabilidade das membranas lisossomais é um indicador genérico do bom estado de células eucarióticas, como já foi demonstrado por estudos em protozoários, celenterados, anelídeos, crustáceos, moluscos, peixes e mamíferos (GALLOWAY et al., 2004; DAYEH et al., 2004; HANKARD et al., 2004; SVENDSEN et al., 2004; MARTINEZ-VICENTE et al., 2005; SERVAIS et al., 2005).

Os dados apresentados neste trabalho mostraram que os grupos de células que ficaram expostos ao chumbo na concentração de 2 e 20 $\mu$ M apresentaram o volume ou a integridade lisossomal significativamente diminuídos. Desta forma, a célula teria poucas condições de digerir as partículas fagocitadas, pois o destino final da via fagocítica é a fusão do fagossomo contendo o material fagocitado com as vesículas que possuem enzimas capazes de destruí-lo. Segundo LOWE et al. (1995), muitos dos danos observados em lisossomos são conseqüências de sua notável capacidade de concentrar uma ampla classe de contaminantes em seu interior, incluindo xenobiontes lipofílicos e metais. Isto resulta num aumento da permeabilidade de suas membranas e perda das hidrolases ácidas para o citosol. Alguns trabalhos mostram também que metais pesados podem interferir nestas organelas não só ocasionando a diminuição do volume ou comprometendo a integridade dos lisossomos, mas prejudicando o funcionamento das enzimas localizadas em seu interior, já que os íons metálicos podem acumular-se nestas organelas (LIVINGSTONE, 1992).

A capacidade de adesão dos macrófagos mostrou-se diminuída no presente trabalho em função tanto do tempo de exposição como da concentração de chumbo testada. Estes resultados são semelhantes aos descritos por BISHAYI e SENGUPTA (2006), onde foi observada uma diminuição gradativa em função do tempo em macrófagos do baço (30, 45 e 60 minutos), após injeções diárias do metal na dose de 10mg Pb(II)/kg em rato (15 dias). A diminuição da capacidade de adesão dos macrófagos pode acarretar sérias conseqüências na função imunitária destas células. Quando uma resposta inflamatória desenvolve-se, uma variedade de

citocinas e outros mediadores imunes são liberados e agem sobre os vasos sanguíneos no local da inflamação, incluindo aumento da expressão de moléculas de adesão das células endoteliais. Isto exige reconhecimento e forte adesão dos macrófagos para que estes não sejam levados pela corrente sanguínea (BISHAYI e SENGUPTA, 2006). Segundo os mesmos autores, ensaios de adesão celular podem refletir a capacidade de aderência das células *in vivo*.

Baseando-se nos resultados apresentados neste trabalho, há fortes indícios de que o chumbo possa estar interferindo com a organização do citoesqueleto e consequentemente interferindo com a adesão dos macrófagos. Segundo BERTON e LOWELL (1999), a reorganização da actina do citoesqueleto é parte integral da resposta celular a uma variedade de sinais do ambiente. A remodelagem adequada da actina é crítica para os processos de divisão, crescimento, adesão e locomoção celular. Portanto, o chumbo prejudica a resposta imunitária não somente por diminuir a adesão dos macrófagos, mas também por interferir na migração destas células. Macrófagos contêm em sua superfície e também secretam enzimas proteolíticas que são importantes em sua capacidade de migração. Numerosas substâncias geradas durante a inflamação possuem a capacidade de aumentar a velocidade dos macrófagos e orientá-los na movimentação em direção ao agente patogênico e/ou no local da inflamação. Foi observado que o chumbo pode ocasionar alterações também na superfície de leucócitos, interferindo com a forma e orientação dos macrófagos, levando a um comportamento migratório mais lento destas células (BISHAYI e SENGUPTA, 2003).

Vários estudos reportam alterações nas atividades de enzimas antioxidantes como a SOD, catalase e GPx, e mudanças nas concentrações de algumas moléculas antioxidantes, como a glutathiona (GSH) em animais (MCGOWAN e DONALDSON, 1986; HSU, 1981) e em pessoas ocupacionalmente expostas ao chumbo (MONTEIRO et al., 1985 e SOLLIWAY et al., 1996). Embora estes trabalhos reúnam evidências de um possível envolvimento do estresse oxidativo na fisiologia da intoxicação por chumbo, não está claro se estas alterações constituem a principal causa dos danos oxidativos ou uma consequência dos mesmos (GURER-ORHAN e ERCAL, 2000).

A catalase desempenha um importante papel na decomposição do  $H_2O_2$

quando este radical encontra-se em altas concentrações intracelularmente, enquanto a GPx está associada à decomposição do  $H_2O_2$  quando este radical encontra-se em baixas concentrações (MICHIELS, et al., 1994). Segundo ARIZA et al., (1998), SILBERGELD (2003) e AHAMED et al., (2005), o chumbo aumenta a produção de peróxido de hidrogênio nas células. Desta forma, ao quantificarmos a atividade da catalase em macrófagos expostos ao chumbo pensou-se em verificar a relação do funcionamento desta enzima com a geração de ROS pelo chumbo, uma vez que segundo IZGUT-UYSAL et al. (2004) os macrófagos não são resistentes à presença do  $H_2O_2$ . Assim, o significativo aumento na atividade da catalase nos macrófagos de camundongos expostos ao chumbo mostra que este metal é capaz de interferir com o equilíbrio óxido-redutor da célula. As células que ficaram expostas ao chumbo durante o período de 24 horas, tiveram a atividade da catalase aumentada somente no grupo exposto à maior concentração do metal ( $20\mu M$ ). Entretanto, as células que ficaram expostas ao chumbo durante o período de 72 horas, aumentaram a atividade da catalase em todas as concentrações do metal em relação ao grupo controle. O aumento mais significativo no grupo de 72 horas mostra claramente que há uma relação positiva com o tempo de exposição. Estes resultados são semelhantes aos descritos por FARMAND et al. (2005), que demonstraram aumento na atividade da catalase em células renais e endoteliais de ratos expostos ao chumbo.

O aumento na atividade da catalase em animais expostos ao chumbo é resultado da expressão gênica desta enzima induzida pelo aumento da produção do  $H_2O_2$  (FARMAND et al., 2005). Este aumento pode ser explicado como um mecanismo de defesa das células contra o excesso de  $H_2O_2$  gerado durante o estresse oxidativo induzido pelo chumbo. Estes dados são mais uma evidência de que o chumbo está associado ao desequilíbrio óxido redutor dos macrófagos. Segundo AHAMED et al., (2005), crianças com níveis sanguíneos de chumbo acima de  $10\mu g/dl$  apresentaram um significativo aumento na atividade da catalase em eritrócitos em relação ao grupo que possuía níveis menores que  $10\mu g/dl$ . Estes dados demonstram que *in vivo*, e em baixas concentrações, o chumbo mostra evidências claras de provocar estresse oxidativo em células de vertebrados.

A fagocitose estimula o *burst* respiratório nas células, um fenômeno do qual

fazem parte vários eventos químicos, incluindo a produção de ROS (DE CASTRO et al., 2000; BABIOR, 2000). As espécies reativas de oxigênio funcionam como moléculas sinalizadoras na regulação de atividades celulares fundamentais, como o crescimento e adaptação celular. Entretanto, em altas concentrações as ROS podem ser tóxicas, causando danos e morte às células (LUM e ROEBUCK, 2001). O excesso de ROS geradas pelos fagócitos pode causar danos a importantes macromoléculas biológicas. As membranas são particularmente vulneráveis a peroxidação, resultando em alterações na fluidez, na quimiotaxia, e na fagocitose. (PENG et al., 2000; BABIOR, 2000; VICTOR et al.; 2003; KNIGHT, 2000).

Células imunitárias são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo devido à presença de ácidos graxos polinsaturados em suas membranas plasmáticas e até mesmo à produção de ROS, que fazem parte de seu metabolismo normal (KNIGHT, 2000). As funções das células imunitárias, estão em especial, ligadas à geração de espécies reativas de oxigênio, porém, o balanço oxidante-antioxidante é essencial para estas células (IZGUT-UYSAL, et al., 2004).

Dentre os parâmetros analisados, a catalase demonstrou ser o mais sensível à exposição ao chumbo, pois sua atividade aumentou até mesmo nas células que foram expostas à menor concentração de chumbo inorgânico (0.2  $\mu\text{M}$ ). A partir de nossos resultados e de dados encontrados na literatura, o chumbo parece não alterar as funções desta enzima. Assim como foi demonstrado por outros autores, parece provável que este aumento represente uma resposta compensatória ao estresse oxidativo que está ocorrendo na célula.

A partir dos dados apresentado neste trabalho, é indiscutível a modulação da resposta imunitária nos macrófagos peritoneais pelo chumbo inorgânico. Importantes funções dos macrófagos durante a resposta imunitária foram alteradas *in vitro*, podendo significar um comprometimento das funções destas células também *in vivo*. Através do aumento na atividade da catalase, demonstrou-se também que o chumbo provoca estresse oxidativo nos macrófagos *in vitro*, corroborando com os dados obtidos por outros autores em experimentos *in vivo*. A diminuição dos índices fagocíticos, da produção do óxido nítrico, e da capacidade de adesão em macrófagos encontrados neste trabalho, também foram descritas por BISHAYI e SENGUPTA (2006). Estes autores também demonstraram uma diminuição/inibição

bastante significativa destes parâmetros. Embora os macrófagos tenham respondido da mesma forma que no presente trabalho com experimentos *in vitro*, é interessante observar que no trabalho mencionado acima os experimentos foram realizados com ratos expostos *in vivo* ao chumbo inorgânico (10mg Pb/kg). Por mais que as respostas de experimentos *in vivo* e *in vitro* não sejam exatamente as mesmas, é possível e recomendável que os dados sejam comparados e os efeitos tóxicos sejam considerados.

O crescente número de trabalhos que relatam os efeitos do chumbo relacionados ao estresse oxidativo, a associação entre os níveis de chumbo no sangue e alterações na atividade de enzimas importantes que protegem as células contra o estresse oxidativo, reforçam a idéia de que estes alvos bioquímicos possam ser cada vez mais utilizados como biomarcadores de efeito à exposição a este metal (AHAMED et al., 2005).

Embora os mecanismos pelos quais os metais pesados induzam inibição de algumas habilidades funcionais das células ainda não sejam muito bem compreendidos, pode-se dizer que a exposição a estes metais acaba pelo menos reduzindo a duração e a amplitude de diversas atividades das células que estão expostas de alguma forma a estes contaminantes (BISHAYI e SENGUPTA, 2003).

O presente trabalho mostra que apesar de submetidos a baixas concentrações de chumbo inorgânico, os macrófagos respondem de forma indiscutível no que diz respeito à toxicidade gerada pela presença do metal neste tipo celular. As questões referentes ao trabalho de GARGIONI (2003) ficaram melhor esclarecidas com os dados gerados neste trabalho. Ficou evidente o papel inibitório do chumbo inorgânico na atividade fagocítica dos macrófagos mesmo em pequenas doses, corroborando e enfatizando este efeito tóxico para o sistema imunitário. Os dados referentes às alterações relacionadas com a função dos macrófagos apresentados neste trabalho, mostram que outras vias podem explicar o efeito modulador do chumbo no sistema imunitário inato. Isto ficou evidente pela inibição da produção do NO, pela atuação no citoesqueleto refletindo nos efeitos de adesão ou ainda pela indução do estresse oxidativo. Estes dados possibilitam que outros caminhos possam ser explorados, uma vez que as concentrações de chumbo inorgânico utilizadas neste trabalho mantêm a maioria das células viáveis.

## 6. CONCLUSÕES

- O chumbo inorgânico é capaz de modular a resposta imunitária de macrófagos, inibindo mecanismos importantes na defesa do organismo contra agentes patogênicos.
- Os parâmetros afetados pelo chumbo encontram-se diretamente relacionados com o aumento da concentração e o tempo de exposição a este metal.
- A exposição de macrófagos ao chumbo aumenta a atividade da catalase. Este aumento é um estímulo compensatório para diminuir o excesso de peróxido de hidrogênio gerado pelo estresse oxidativo induzido pelo chumbo.
- Os resultados deste trabalho sugerem que o chumbo, mesmo em baixas concentrações, pode causar uma série de complicações nas atividades metabólicas dos macrófagos *in vitro*, podendo comprometer as funções imunitárias desempenhadas por estas células *in vivo*.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABOUL-ELA, E. I. The protective effect of calcium against genotoxicity of lead acetate administration on bone marrow and spermatocyte cells of mice in vivo **Mutation Research**. v.516 p.1–9, 2002.
- ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of Phagocytosis in Macrophages. **Annu. Rev. Immunol.** v.17, p.593-623, 1999.
- AEBI, H.. Catalase in vitro. **Academic Press**, v.105, p.121-126, 1984.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**. 4<sup>a</sup> ed., Artes Médicas. Porto Alegre, 2004.
- ALLEN, L. H.; ADEREM, A. A role for MARCKS, the alpha isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. **J. Exp. Med.** v.182, p. 829-840, 1995.
- AHAMED, M.; VERMA S.; KUMAR A.; SIDDIQUI, M. K. J. Environmental exposure to lead and its correlation with biochemical indices in children. **Science of the Total Environment**. v.346 p.48– 55, 2005.
- ARIZA, M.; BIJUR, G.N.; WILLIAMS, M. V. Lead and mercury mutagenesis: role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, superoxide dismutase, and xanthine oxidase. **Environ. Mol. Mutagen.** v.31, p. 352–361, 1998.
- AYKIN-BURNS, N.; LAEGELER, A.; KELLONG, G.; ERCAL. Oxidative effects of lead in young and adult fisher 344 rats. **Arch. Environ. Contam. Toxicology**, v. 44, p. 417 – 420, 2003.
- BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **Am J Med**, v.109(1) p.33-44, 2000.
- BAL, W.; KASPRZAK, K. S. Induction of oxidative DNA damage by carcinogenic metals. **Toxicol. Lett.** V.127 p. 55- 62, 2002.
- BAKSI, S. M. e FRAZIER, J. M. Isolated fish hepatocytes – model systems for toxicology research: review. **Aquatic Toxicology**, v.16, p.229-256, 1990.
- BELLINGER, D.C. Interpreting the literature on lead and child development: the neglected role of the “Experimental System”. **Neurotoxicol. Teratol.** v.17, p.201–212, 1995.
- BERNARD, A.; LAUWEYS, R. Metal-induced alterations of d-aminolevulinic acid dehydratase. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 514:41–47; 1987.
- BERTON, G., LOWELL, C. A. Integrin signaling in neutrophils and macrophages. **Cell Sig.** v.11, p. 621-635, 1999.
- BISHAYI, B.; SENGUPTA, M. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* due to alteration of cellular activity in arsenic and lead intoxicated mature Swiss albino mice. **Toxicology**. v.184, p. 31-39, 2003.

BISHAYI, B.; SENGUPTA, M. Synergism in immunotoxicological effects due to repeated combined administration of arsenic and lead in mice. **International Immunopharmacology**. v.6, (3), p. 454-464, 2006.

BONATTO, S. J. R.; FOLADOR, A.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R. K. PIZATTO, N.; OLIVEIRA, H. H. P.; VECCHI, R.; CURI, R.; CALDER P. C.; FERNANDES, L. C. Lifelong exposure to dietary fish oil alters macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cellular Immunology**. v. 231 p.56–62, 2004.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BROUSSEAU P.; PELLERIN, J.; MORIN, Y.; CYR, D.; BLAKLEY, B.; BOERMANS, H.; FOURNIER, M. Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following in vitro exposure to heavy metals. **Toxicology**, v. 142, p.145–156, 2000.

CESTARI, M. M.; LEMOS, P. M. M.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; ALVES COSTA, J. M.; PELLETIER, E.; FERRARO, M. V. M.; MANTOVANI, M. S.; FENOCCHIO, A. S. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**. v.27, p270-274, 2004.

CHRISTOPHERSON, K. S.; BREDET, D. Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. **Journal Clinical Investigation**. v.100, n.10, p. 2424 – 2429, 1997.

COSTA, M. T.; FABENI, R. C.; APTEKMANN, K. P.; MACHADO, R. R. Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. **Ciência Rural**. v.33, n.5, p. 967 – 974, 2003.

COOPER, G.P.; SUSZKIN, J.B.; MANALIS, R.S. Heavy metals: Effects on synaptic transmission. **Neurotoxicology**. v.5, p.246–277, 1984

DAYEH, V. R.; CHOW, S. L.; SCHIRMER, K.; LYNN, D. H.; BOLS, N. C. Evaluating the toxicity of Triton X- 100 to protozoan, fish, and mammalian cells using fluorescent dyes as indicators of cell viability. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.57, p.357–382, 2004.

DE CASTRO, C. M. M. B.; DE CASTRO, R. M.; DE MEDEIROS, A. F.; SANTOS, A. Q.; FERREIRA E SILVA, DE LIMA FILHO, J. S. Effect of stress on the production of O<sub>2</sub>- in alveolar macrophages. **J Neuroimmunol**. v.108, p.68-72, 2001.

DIETERT, R.; LEE, J.; HUSSAIN, I; PIEPENBRINK, M. Developmental immunotoxicology of lead. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.198, p. 86-94, 2004.

DONALDSON, W. E.; KNOWLES, S. O. Is lead toxicosis a reflection of altered fatty acid composition of membranes? **Comp. Biochem. Physiol.** v. 104, p.377–379, 1993.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre o óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 39, n. 04, p. 343-350, 2003.

DYRYNDA, E. A.; PIPE, R. K.; BURT, G. R.; RATCLIFFE, N. A. Modulations in the immune defences of mussels (*Mytilus edulis*) from contaminated sites in the UK. **Aquatic Toxicology**. v.42 p.169–185, 1998.

EPSTEIN, J.; EICHBAUM, Q.; SHERIFF, S. EZEKOWITZ, R.A. The collectins in innate immunity. **Curr. Opin. Immunol.** v.8, p.29–35, 1996

FARMAND, F.; EHDAIE, A.; ROBERTS, C. K.; SINDHU, R. K. Lead-induced dysregulation of superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, and guanylate cyclase. **Environmental Research**, v.98 p. 33–39, 2005.

FISHER A. M.; VESSEY J. A. Preventing lead poisoning and its consequences. **Ped. Nursing**, v. 24, p. 348-350, 1998.

FLIPO, D.; BERNIER, J.; GIRARD, D.; KRZYSTYNIAK, K.; FOURNIER, M. Simultaneous effects of selected pesticides on humoral immune response in mice. *Int. J. Immunopharmacol*, v.4, p.747–752, 1992.

FOURNIER, M., FRIBORG, J., GIRARD, D., MANSOUR, S., KRZYSTYNIAK, K., Limited immunotoxic potential of technical formulation of the herbicide atrazine, Aatrex in mice. **Toxicol. Lett.** v.60, p.263–274, 1992.

GALLOWAY, T. S.; BROWN, R. J.; BROWNE, M. A.; DISSANAYAKE, A.; LOWE, D.; JONES, M. B. A multibiomarker approach to environmental assessment. **Environmental Science and Technology**. v.38, p. 1723–1731, 2004.

GARAVAN, H., MORGAN, R.E., LEVITSHY, D.A., HERMAN-VAQUEZ, L., STRUPP, B.J., 2000. Enduring effects of early lead exposure: evidence for a specific deficit in associative ability. **Neurotoxicol. Teratol.** v. 22, p.151– 164, 2000.

GARGIONI, R; FILIPAK, F. N.; BUCHI, D. F.; RANDI, M. A. F.; FRANCO, C. R. C.; PALUDO, K. S.; PELLETIER, È.; FERRARO, M. V. M.; CESTARI, M. M. BUSSOLARO, D.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Cell death and DNA damage in peritoneal macrophage os mice (*Mus musculus*) exposed to inorganic lead. **Cell Biology International. In Press**, 2006.

GARGIONI, R. Estudo Citotóxico *in vitro* dos efeitos do chumbo inorgânico [Pb(II)] em macrófagos peritoneiais de camundongo. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). **Programa de Pós Graduação em Biologia Celular/UFPR**, 2003.

GOLDSTAIN, G. W. Evidence that lead acts as a calcium substitute in second messenger metabolism. **Neurotoxicol.** v.14, p. 97-102, 1993.

GOYER, R.A. Lead toxicity: current concerns. **Environ. Health Perspect.** v.100, p.177–187, 1993.

GURER-ORHAN, H.; ERCAL, N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? **Free Radical Biology e Medicine**, vol. 29, p. 927–945, 2000.

HANAS, J. S. Lead inhibition of DNA-binding mechanism of Cys(2)His(2) zinc finger proteins. **Mol. Pharmacol.** v.56 p.982–988, 1999.

HANKARD, P. K.; SVENDSEN, C.; WRIGHT, J.; WIENBERG, C.; FISHWICK, S. K.; SPURGEON, D. J. Biological assessment of contaminated land using earthworm biomarkers in support of chemical analysis. **Science of the Total Environment**. v.330, p.9–20, 2004.

HSU, J. M. Lead toxicity related to glutathione metabolism. **J. Nutr.** v.111, p.26-33, 1981.

IZGUT-UYSAL, V. N.; TAN, R.; MEHMET, B.; DERIN, N. Effect of stress-induced lipid peroxidation on functions of rat peritoneal macrophages. **Cell Biology International**. v.28, p.517-521, 2004.

JADHAV A. L.; RAMESH G. T.; GUNASEKAR P. G. Contribution of protein kinase C and glutamate in Pb<sup>2+</sup> induced cytotoxicity. **Toxicology Letters**, v. 115, p.89–98, 2000.

JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasit infections. **Microbiol. Rev.** v.59, n.4, p. 533-547, 1995.

JOHNSON, F. M. The genetic effects of environmental lead. **Mutation Research**, v.410, p. 123-140, 1998.

KERN, M.; AUDESIRK, G. Stimulatory and inhibitory effects of inorganic lead on calcineurin. **Toxicology**, v. 150 p. 171–178, 2000.

KERN, M., WISNIEWSKI, M., CABELL, L., AUDESIRK, G., Inorganic lead and calcium interact positively in activation of calmodulin. **NeuroToxicology**, v. 21, p. 353–364, 2000.

KLAASSEN CD. Heavy metals and heavy metal antagonists. In: 707 Gilman AG, editor. The pharmacological basis of therapeutics. 708 New York7 Mc. Graw Hill;. p. 1650– 1653, 1996

KLEIN, C. B.; FRENKEL, K.; COSTA, M. The role of oxidative processes in metal carcinogenesis. **Chem. Res. Toxicol.** v. 4 p.592–604, 1991.

KLIONSKY, D. J.; EMR, S. D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. **Science**, v. 290, p.1717–1721, 2000.

KNIGHT, J. A. Review: free radicals, antioxidants and the immune system. **Ann Clin Lab Sci.** v.30(2), p. 145-158, 2000.

KROCOVA, Z.; MACELA, A.; KROCA, M.; HERNYCHOVA, L. The immunomodulatory effects of lead and cadmium on the cells of immune system in vitro. **Toxicology in vitro.** v.14, p. 33-40, 2000.

LANPHEAR, B. P.; DIETRICH, K. N.; AUINGER P. Sub clinical lead toxicity in US children and adolescents. **Pediatr. Res.** v.152, p. 132- 138, 2000.

LEONARD, S.; HARRIS, G. K.; SHI, X. Metal induced oxidative stress and signal trasnduction. **Free radical biol. e Medicine.** v.37, (12), p.1921-1942, 2004.

LIVINGSTONE, D. R., PIPE, R.K. Mussels and environmental contaminants: molecular and cellular aspects. In: Gosling, E. (Ed.), The Mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Aquaculture. Elsevier, Amsterdam, pp. 425–464, 1992.

- LONG, G. J., ROSEN, J. F., SCHANNE, F.A.X. Lead activation of protein kinase C from rat brain: determination of free calcium, lead, and zinc by <sup>19</sup>F-NMR. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 834–837, 1994.
- LOWE, D. M.; MOORE, N. M.; EVANS, B. M. Contaminant impact on interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from dab *Limanda limanda*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** v.91, p.135-140, 1992.
- LOWE, D. M.; PIPE, R. K. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. **Aquat. Toxicol.** v.30, p. 357-365, 1994.
- LOWE, D. M. SOVERCHIAB, C.; MOORE, N. M. Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene **Aquatic Toxicology**. v. 33, p.105-112, 1995.
- LUM, H.; ROEBUCK, K. A. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. **Am J Physiol Cell Physiol.** v. 41, p. 280 – 271, 2001.
- LUSTBERG, M. SILBERGELD E. Blood lead levels and mortality, **Arch. Intern. Med.** v.162, p. 2443-2449, 2002.
- MACMICKING, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.** v.15, p. 353-350, 1997.
- MARKOVAC, J., GOLDSTEIN, G.W. Picomolar concentrations of lead stimulate brain protein kinase C. **Nature.** v.334, p.71–73,1988.
- MATES, J. M.; PEREZ-GOMEZ, C. NUNEZ DE CASTRO, I. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin. Biochem.** v.32, p.595–603, 1999.
- MCGOWAN, C.; DONALDSON, W. E. Changes in organ nonprotein sulfhydryl and glutathione concentrations during acute and chronic administration of inorganic lead to chicks. **Biol. Trace Elem. Res.** v.10, p. 37–46, 1986.
- MICHIELS, C.; RAES, M.; TOUSSAINT, O.; REMACLE, J. Importance of Seglutathione peroxidase, Catalase and Cu/Zn SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radic Biol Med.** v.17, p. 235– 48, 1994.
- MARTINEZ-VICENTE, M.; SOVAK, G.; CUERVO, A. M. Protein degradation and ageing. **Experimental Gerontology**, v.40, p.622–633, 2005.
- MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine nitric oxide pathway. **N. Engl J. Med.** v.329, p.2002-2012, 1993.
- MONTEIRO, H. P.; ABDALLA, D. S. P.; ARCURI, A. S.; BECHARA, E. J. H. Oxygen toxicity related to exposure to lead. **Clin. Chem.** v.31, p.1673-1676; 1985.
- MOORE, M. N. Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology. **Aquatic Toxicology**. v.59, p.1–15, 2002.
- MOORE, M. N.; DEPLEDGE, M. H.; READMAN, J. W.; LEONARD, D. R. P. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. **Mutation Research.** v.552, p.247–268, 2004.

MOORE, M. N.; ALLEN, J. I.; MCVEIGH, A. Environmental prognostics: An integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. **Marine Environmental Research**. v. 61 p. 278–304, 2006.

MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. A importância da análise de especiação do chumbo em plasma para a avaliação dos riscos à saúde. **Quim. Nova**. v.27, p.251-260, 2004.

NATHAN, C. F. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **Faesh J**. v.6, p. 3051-3064, 1992.

NEAL, R.; YANG, P.; FIECHTL, J.; GURER, H.; ERCAL, N. Pro-oxidant effects of aminolevulinic acid on Chinese hamster ovary cells. **Toxicol. Lett**. v.91, p. 169–178, 1997.

NIGGLI, V. Signalling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. **IJBC**. v.35, p. 1619-1638, 2003.

NOLAN, C. V.; SHAIKH, Z. A. Lead nephrotoxicity and associated disorders: biochemical mechanisms: review. **Toxicology**, v.73, p. 127-146, 1992.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. J. reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**. v.31, p. 1287 – 1312, 2001.

OLIVI L.; CASCIO S.; WANG S.; BRESSLER J. Mobilization of intracellular calcium in kidney epithelial cells is inhibited by lead. **Toxicology**, v.176, p. 1–9, 2002.

PATRIARCA, M.; MENDITTO, A; ROSSI, B.; LYON T.D.B.; FELL, G. S. Environmental exposure to metals of newborns, infants and young children. **Microchemical Journal**, v.67, p.351-361, 2000.

PENG, J.; JONES, G. L.; WATSON, K. Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. **Free Radic Biol Med**. v.28(11), p. 1598-1606, 2000.

POUNDS, J.G. Effect of lead intoxication on calcium homeostasis and calcium-mediated cell function: a review. **Neurotoxicology** v. 5, p. 295–331, 1984.

PURDY, S. E.; BLAIR, J. A.; LEEMING, R. L.; HILBURN, M. E. Effect of lead on tetrahydro-biotin synthesis and salvage: A cause of neurological dysfunction . **Int. J. Environ. Studies**. v.17, p141-145, 1981.

RICE-EVANS, C. Iron-mediated oxidative stress and erythrocytes. **Blood cell biochemistry**. vol. 1, p.429–453, 1990.

RICE, D.C. Behavioral effects of lead: Commonalties between experimental and epidemiologic data. **Environ. Health Perspect**. v.104, p.337–351, 1996.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunology**. Sixth Edition. Toronto, 2001

SARYAN, L. A.; ZENZ, C.; **Occupational Medicine**, 3rd ed., Mosby – Year Book: St. Louis, 1994.

SASTRY, K.; EZEKOWITZ, R. A. 1993. Collectins: pattern recognition molecules involved in first line host defense. **Curr. Opin. Immunol**. v.5 p.59–66, 1993.

SAVILL, J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. **Br. Med. Bull.** v.53, p.491–508, 1997.

SCHWARTZ J. Low level lead exposure and children's IQ: a meta analysis and search for a threshold. **Environ Res.** v.65 p.42– 5, 1994.

SERVAIS, H.; VAN DER SMISSEN, P.; THIRION, G.; VAN DER ESSEN, G.; VAN BAMBEKE, F.; TULKENS, P. M. Gentamicin-induced apoptosis in LLC-PK1 cells: involvement of lysosomes and mitochondria. **Toxicology and Applied Pharmacology.** v.206, p.321–333, 2005.

SHABANI, A.; RABANI, A. Lead nitrate induced apoptosis in alveolar macrophages from rat lung. **Toxicol.** v.149, p. 109-114, 2000.

SILBERGELD, E. K. Facilitative mechanisms of lead as a carcinogen: review. **Mutation Research.** v. 533, p.121–133, 2003.

SILBERGELD, E. K.; WAALKES, M.; RICE, J. M. Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action. **Am. J. Ind. Med.** v. 38, p.316–323, 2000.

SMALL, J. V.; ROTTNER, K.; KAVERINA, I.; ANDERSON, K. I. Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. **Biochim. Biophys. Acta,** v. 1404, p. 271-281, 1998.

SOLLIWAY, B. M.; SCHAFFER, A.; PRATT, H.; YANNAI, S. Effects of exposure to lead on selected biochemical and hematological variables. **Pharmacol. Toxicol.** v.78, p. 18–22, 1996.

STAHL, P.D.; EZEKOWITZ R. A. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. **Curr. Opin. Immunol.** v. 10, p.50–55, 1998.

STUHER, D. J.; KNOWN, N. S.; NATHAN, C. F. FAD and GSH participate in macrophage synthesis of nitric oxide. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.168, p. 558-565, 1990.

STUHER, D. J.; MARLETTA, M. A. Mammalian nitrate biosynthesis: Mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 82, p. 7738-7742, 1985.

SUN, L. R.; SUSZKIW, J. B. Extracellular inhibition and intracellular enhancement of Ca<sup>2+</sup> currents by Pb<sup>2+</sup> in bovine adrenal chromaffin cells. **J. Neurophysiol.** v. 74, p. 574 - 581, 1995.

SVENDSEN, C.; SPURGEON, D. J.; HANKARD, P. K.; WEEKS, J. M. A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker. **Ecotoxicology and Environmental Safety.** v.57, p.20–29, 2004.

TENNER, A. J.; ROBINSON, S.L.; EZEKOWITZ, R.A. Mannose binding protein (MBP) enhances mononuclear phagocyte function via a receptor that contains the 126,000 M(r) component of the C1q receptor. **Immunity.** v.3, p.485–493, 1995.

TIAN, L.; LAWRENCE, D. A. Metal induced modulation on nitric oxide production in vitro by murine macrophages: lead, nickel, and cobalt utilize different mechanisms. **Toxicology and applied pharmacology.** v.141, p. 540-547, 1996.

TIAN, L., LAWRENCE, D.A. Lead inhibits nitric oxide production in vitro by murine splenic macrophages. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v.132, p.156 – 163, 1995.

TSALEV, D. L.; ZAPRIANOV, Z. K. Atomic Absorption Spectrometry in Occupational and Environmental Health. **Practice.** vol. 1, CRC Press, Boca Raton, 1983.

UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annu. Rev. Immunol.** v.20, p.825–852, 2002.

VICTERY, W.; MILLER C. R.; FOWLER, B. A. Lead accumulation by rat renal brush border membrane vesicles. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v.231, p. 589, 1984.

VANDER, A.J.; JOHNSON, B. Accumulation of lead by renal slices in the presence of organic anions. **Proc. Sot. Exp. Biol. Med.** v. 166 p. 583, 1981.

VICTOR, V. M.; ROCHA, M.; DE LA FUENTE, M. Regulation of macrophage function by the antioxidant N-acetylcysteine in mouse-oxidative stress by endotoxin. **Int Immunopharmacol.** v3(1), p.97-106, 2003.

VIJVERBERG, H.P.; OORTGIESEN, M.; LEINDERS, T.; VAN KLEEF, R.G. Metal interactions with voltage and receptor-activated ion channels. **Environ. Health Perspect.** v.102, p.153– 158, 1994.

VOCCIA, I.; KRZYSTYNIAK, K.; DUNIER, M.; FLIPO, D.; FOURNIER, M., In vitro mercury-related cytotoxicity and functional impairment of the immune cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquat. Toxicol.** v.29, p.27–48, 1994.

XIE, Y.; CHIBA, M.; SHINOHARA, A.; WATANABE, H.; INABA, Y. **Ind. Health.** v. 36, p.234, 1998.

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

ZAMOCKY, M.; KOLLER, F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. **Progress in Biophysics & Molecular Biology.** v.72 , p. 19-66, 1999.

ZHELEZNYAK, A.; BROWN E. J. Immunoglobulin - mediated phagocytosis by human monocytes requires protein kinase C activation. Evidence for protein kinase C translocation to phagosomes. **J. Biol. Chem.** v. 267, p.12042–48, 1992.

WEST, W. L.; KNIGHT, E. M.; EDWARDS, C. H.; MANNING, M.; SPURLOCK, B.; JAMES, H.; JOHNSON, A .A.; OYEMADE, U.J.; JACKSON COLE, O.; WESNEY, L. S. Maternal low level lead and pregnancy outcomes. **J. Nutr.** v.124, p.981–986, 1994.

WINNEKE, G. Behavioural toxicology. In: Duffers JH, Howard GJ, 704 editors. Fundamental toxicology for chemists. United Kingdom 7 705 The Royal Society Of Chemists; p.175– 176, 1996.

WITKO-SARSAT V.; RIEU P.; DESCAMPS-LATSCHA B.; LESAVRE P.; HALBWACHS-MECARELLI L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Lab Invest.** v.80(5) p.617 e 53, 2000.