

ROGÉRIO GARGIONI

**ESTUDO CITOTÓXICO *IN VITRO* DOS EFEITOS DO CHUMBO
INORGÂNICO [Pb(II)] EM 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, Universidade Federal do
Paraná.

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

Co-orientadora:
Prof.^a Dr.^a Dorly de Freitas Buchi

CURITIBA

2003

ROGÉRIO GARGIONI

**ESTUDO CITOTÓXICO *IN VITRO* DOS EFEITOS DO CHUMBO
INORGÂNICO [Pb(II)] EM 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, Universidade Federal do
Paraná.

Orientador:

Prof. Dr. Ciro A. de Oliveira Ribeiro

Co-orientadora:

Prof.^a Dr.^a Dorly de Freitas Buchi

CURITIBA

2003

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia

Setor de Ciências Biológicas

Universidade Federal do Paraná

Instituto de Biologia Molecular do Paraná

PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado "*ESTUDO CITOTÓXICO IN VITRO DOS EFEITOS DO CHUMBO INORGÂNICO Pb^{+2} EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS*" de autoria do pós-graduando ROGÉRIO GARGIONI, orientado do Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, em afastamento do País, e com a Banca constituída pelos Professores: Dr^a. Dorly de Freitas Buchi (Co-orientadora e Presidente da Banca Examinadora do Departamento de Biologia Celular da UFPR), Dr^a. Célia Regina Cavichiolo Franco (UFPR) e Dr^a. Lia S. Nakao (PUC-PR). Segundo a avaliação da Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado, o candidato foi: APROVADO. Para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas. Em Curitiba, 21 de novembro de 2003.



Dr^a. Dorly de Freitas Buchi



Dr^a. Célia Regina Cavichiolo Franco



Dr^a. Lia S. Nakao

Dedicatória

À **Salete** pela compreensão e apoio recebido, na trajetória desse trabalho.

Agradecimento

À **Deus** por ter me proporcionado a possibilidade de ter um contato mais estreito com a ciência.

Ao Professor Dr. **Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro**, orientador deste trabalho, por seus ensinamentos e seriedade intelectual.

À Professora Dra. **Dorly de Freitas Buchi**, minha co-orientadora, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação.

À **Universidade Federal do Paraná**, ao Setor de Ciências Biológicas e ao Departamento de Biologia Celular que possibilitaram o desenvolvimento e a conclusão dos trabalhos.

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular nas pessoas dos professores, **Carolina, Marco, Daura, Célia, Luiz Cláudio, Ruth, Cláudio, Cloris, Sílvio, Márcia, Rosalvo, Luiz Fernando, Oldemir Carlos** e nas pessoas dos professores da UFSC, **Mário, Carlos Fernando, Marcus Vinícius, Zenilda e Margherita**.

Ao **Francisco**, pela amizade e constante colaboração na execução dos trabalhos técnicos desenvolvidos neste projeto.

À **Carolina, Luciana, Renata, Lyris, Maritana, Inês, Fabíola, Melissa, Fabiola Valdez, João, Juliana, Sushi, Camila, Sibelle, Patrícia, Rafael, Márcia Helena, Paulo e Gabriel**, pelo apoio.

Aos técnicos **Regina, Matilde, Cleverson, Nino, Eliane** por sua valiosa contribuição.

Ao Diretor do Laboratório Lactec/Curitiba/PR. Sr. **Henrique José de Tenes Neto** e ao técnico **Sérgio** por sua disponibilidade e auxílio com a microscopia eletrônica de varredura.

Aos funcionários **Marlene, Alexandra, Gerisalda, Ana, Cândido José, Luiz, Júlio e Iselen**, pela cooperação.

Aos meus pais **Antônio e Arcila** por seus ensinamentos e exemplo de vida.

Aos irmãos, **Tarcísio, Sérgio, Mari, Rosalene, Lucilene e Ivonete** pelo carinho e incentivo.

A **todos os colegas do Curso de Pós-Graduação**, que de uma forma ou de outra compartilharam seus conhecimentos no desenvolvimento das atividades ao longo do curso.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE SIGLAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 CARACTERÍSTICAS DO CHUMBO.....	04
1.1.1 História da intoxicação.....	04
1.1.2 Papel da cadeia alimentar nos processos de contaminação pelo chumbo...	05
1.1.3 Ação fisiológica do chumbo.....	08
1.1.4 Cinética do chumbo na célula.....	09
1.1.5 Toxicologia <i>in vitro</i>	09
1.2. MACRÓFAGOS.....	11
1.2.1 Participação dos Macrófagos na resposta imune e inflamatória.....	12
1.2. Endocitose.....	13
1.2.3 Citoesqueleto.....	15
1.2.4 Citoesqueleto e metais pesados.....	18
1.3 MATRIZ EXTRACELULAR (MEC).....	19
1.3.1 Fibronectina.....	19
1.3.2 Integrinas.....	21
1.4. MORTE CELULAR PROGRAMADA.....	33
1.4.1 Chumbo e apoptose.....	35
2. OBJETIVOS.....	38
2.1 Objetivo geral	38
2.2 Objetivos específicos.....	38
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 REAGENTES	39
3.1.1 Lista dos imunomarcadores utilizados nas marcações.....	39
3.1.2 Lista de reagentes utilizados.....	40
3.2 <i>DESIGN</i> EXPERIMENTAL COM MACRÓFAGOS (MΦs).....	43

3.3 VIABILIDADE CELULAR.....	43
3.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	44
3.4.1 Microscopia de luz (ML).....	44
3.4.1.1 Alterações morfológicas de macrófagos.....	44
3.4.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	44
3.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	45
3.5 FLUORESCÊNCIA E IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	45
3.5.1 Imunomarcção para microfilamentos de actina, integrina α_5 , Bax e FAK...	45
3.5.5 Teste Cometa.....	46
3.6 ATIVIDADE FAGOCÍTICA.....	47
3.7 ENSAIOS DE ADESÃO.....	47
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
3.8.1 Viabilidade celular.....	49
3.8.2 Alterações morfológicas dos macrófagos.....	49
4. RESULTADOS	50
4.1 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR.....	50
4.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	51
4.2.1 Microscopia de luz (ML).....	51
4.2.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	52
4.2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	54
4.3 EFEITO DO Pb(II) NA REORGANIZAÇÃO DOS MICROFILAMENTOS DE ACTINA.....	55
4.4. EFEITO DO CHUMBO INORGÂNICO NA ADESÃO DOS MACRÓFAGOS...	56
4.4.1 Imunomarcção de FAK.....	56
4.4.2 Imunomarcção para receptor de membrana (Integrina α_5).....	57
4.4.3 Adesão de macrófagos sobre fibronectina.....	58
4.5 EFEITO DO Pb(II) NA INDUÇÃO DE APOPTOSE.....	59
4.5.1 Indução de proteína pró-apoptótica Bax.....	59
4.5.2 Fragmentação de DNA.....	59
4.6. ATIVIDADE FAGOCÍTICA.....	61
5. FIGURAS.....	62

6. DISCUSSÃO.....	73
7.CONCLUSÕES.....	95
7.1 Sugestões para Novos Trabalhos.....	96
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – GRÁFICO DE VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS CULTIVADOS EM LAMÍNULAS.....	50
FIGURA 2 – GRÁFICO DE VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS CULTIVADOS EM GARRAFAS.....	51
FIGURA 3 – GRÁFICO DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS OBSERVADAS NO MO.....	52
FIGURA 4 – GRÁFICO REPRESENTANDO O PERFIL ADESIVO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS SOBRE FIBRONECTINA (FN) E SOBRE BSA (CONTROLE NEGATIVO) EM ABSORBÂNCIA DE 540 nm.....	58
FIGURA 5 – GRÁFICO DE FREQUÊNCIA COMPARATIVA (%) DE DIFERENTES TIPOS DE COMETAS ENTRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE GRUPOS TESTADOS.....	60
FIGURA 6 – GRÁFICO DO ÍNDICE DE ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO NA PRESENÇA DE LEVEDURAS <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	61
FIGURA 7 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS OBSERVADAS NO MO.....	62
FIGURA 8 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DO GRUPO CONTROLE OBSERVADAS NO MET.....	62
FIGURA 9 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DO GRUPO EXPOSTO A 20 μ M Pb(II) OBSERVADAS NO MET.....	63
FIGURA 10 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DO GRUPO EXPOSTO A 40 μ M Pb(II) OBSERVADAS NO MET....	64
FIGURA 11 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DO GRUPO CONTROLE OBSERVADAS NO MET.....	65
FIGURA 12 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DO GRUPO EXPOSTO AO Pb(II) OBSERVADAS NO MET.....	66
FIGURA 13 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DO GRUPO CONTROLE OBSERVADAS NO MEV.....	67
FIGURA 14 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DO GRUPO EXPOSTO A 40 μ m Pb(II) OBSERVADAS NO MEV.....	67

FIGURA 15 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DO GRUPO EXPOSTO A 20µm Pb(II) OBSERVADAS NO MEV.....	68
FIGURA 16 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DO GRUPO EXPOSTO A 40µm Pb(II) OBSERVADAS NO MEV.....	68
FIGURA 17 – MACRÓFAGOS PERITONEAIS OBSERVADOS NO MICROSCÓPIO CONFOCAL COM MARCAÇÃO PARA MICROFILAMENTOS DE ACTINA.....	69
FIGURA 18 - MACRÓFAGOS PERITONEAIS OBSERVADOS NO MICROSCÓPIO CONFOCAL COM IMUNOMARCAÇÃO PARA FAK.....	70
FIGURA 19 - MACRÓFAGOS PERITONEAIS OBSERVADOS NO MICROSCÓPIO CONFOCAL COM IMUNOMARCAÇÃO PARA INTEGRINA α_5	70
FIGURA 20 - MACRÓFAGOS PERITONEAIS OBSERVADOS NO MICROSCÓPIO CONFOCAL COM IMUNOMARCAÇÃO PARA Bax.....	71
FIGURA 21 - NUCLEÓIDES DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS – TESTE COMETA.....	72
FIGURA 22 - MACRÓFAGOS PERITONEAIS NA PRESENÇA DE LEVEDURAS <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	72

LISTA DE SIGLAS

α_5 – subunidade do receptor integrínico α_5
Bax – proteína apoptótica que participa no desencadeamento de morte celular programada ou apoptose
BSA – soro albumina bovino
cm – centímetro
MCVL – microscopia confocal de varredura a laser
DAPI – 4', 6 – diamidino-2-finilindole, dihidrocloride
DMEM – meio de cultivo celular da Dulbecco modificado
DMSO – dimetil sulfóxido
DP – desvio padrão
EDTA – ácido etilenodiamino tetraacético
ELISA – “enzyme-linked immunosorbenc assay”
EMS – resina plástica Epon da “electron microscopy science”
FACS – fluorescente activated cell sorter
FAK – focal adhesion kinase
FITIC – isiotiocianato de fluoresceína
FN – fibronectina
g – gramas
g/ml – grama por ml
GAGs - glicosaminoglicanos
h – horas
IgG – imunoglobulina
Kg – quilograma
LN – laminina
M – molar
MET – microscopia eletrônica de transmissão
MEV – microscopia eletrônica de varredura
ML - microscopia de luz
MEC – matriz extracelular
Mg – miligrama
min – minutos

ml – mililitro

mM – milimolar

mm – minutos

Mφs - macrófagos

Pb (NO₃)₂ - nitrato de chumbo

Pb(II) – chumbo inorgânico (forma iônica do metal/indicação que é bivalente)

PBS – salina tamponada com fosfato

PGs – proteoglicanos

rpm – rotações por minuto

SBF – soro bovino fetal

Tris – hidrometil amino metano

Triton X-100 - (t-octylphenoxypolyethoxyethanol)

μL – microgramas por litro

μg – micrograma

μl – microlitro

μm – micrômetro

μM - micromolar

RESUMO

No presente trabalho foram avaliados os efeitos do chumbo inorgânico [Pb (II)] em macrófagos (Mφs) peritoneais de camundongo *Mus musculus*, através de ensaios *in vitro* de cultivo primário. Estes Mφs foram expostos a duas concentrações do xenobionte (20 e 40 μM) por períodos de 4, 24 e 72h, após manutenção em cultura de 24 horas. Para avaliarmos os efeitos do Pb (II) nos Mφs, foram utilizadas várias técnicas, como a exclusão do azul de Tripán para determinação da viabilidade celular, o ensaio de fagocitose, o teste cometa, o ensaio de adesão, etc. Outro aspecto avaliado foi a morfologia celular, tanto ao nível estrutural como ultraestrutural, através de microscopia óptica (MO), eletrônica de transmissão (MET) e eletrônica de varredura (MEV). Foram também utilizadas técnicas de fluorescência para visualização de microfilamentos de actina, FAK, integrina α_5 e Bax. Utilizando critérios morfológicos pôde ser observado que os Mφs tratados apresentaram alterações estruturais e de comportamento, quando comparados com os Mφs do grupo controle. Essas alterações - sob Mφs tratados incluem citoplasma claro e vacuolizado, presença de várias projeções citoplasmáticas e de grânulos citoplasmáticos densos, núcleo com muita eucromatina e nucléolos evidentes. Através de MET ficaram evidentes a presença de muitos vacúolos, alto grau de condensação da cromatina e a presença de muitos *blebs*. Com relação às análises de MEV, foi possível observar que o Pb (II) altera a distribuição e o número de filopódios e que estes apresentam aborescentes com inúmeras projeções ramificadas e colapsadas e lamelopódios, assim como a ocorrência de *blebs*. Os resultados mostraram que, nos grupos tratados, microfilamentos e a FAK se distribuem de forma irregular. Mφs tratados apresentam-se mais espalhados e com *clusters* de integrina α_5 , sugerindo uma dinâmica de adesão e/ou migração celular. Utilizando ensaio de adesão celular foi verificado que o espalhamento celular e a distribuição da integrina não se devem a um estímulo adesivo, ao menos sobre cobertura de fibronectina, visto que os Mφs do grupo controle apresentaram resultados similares aos dos grupos expostos ao xenobionte. A expressão para proteína Bax confirma os resultados de MET, onde figuras apoptóticas foram identificadas nos Mφs expostos ao Pb (II). Finalmente, foi observado através do teste Cometa que o Pb (II) pode causar danos no DNA. Os resultados sugerem que o Pb (II), mesmo em baixas concentrações e curtos períodos de exposição, pode causar uma série de alterações morfológicas e estruturais. Ele pode estar interferindo em mecanismos funcionais dos Mφs, gerando alterações nas interações entre certos ligantes e receptores de membrana e pode também estar interferindo com os mecanismos energéticos dessas células, através de ligação covalente a biomoléculas. O Pb (II) também pode causar distúrbios na homeostase do cálcio, levando a morte celular programada ou apoptose. Então, as alterações observadas nos Mφs expostos ao xenobionte supracitado, podem interferir não apenas na manutenção estrutural e funcional das células, como também comprometer o sistema imunológico dos mamíferos.

ABSTRACT

We have evaluated in this work the inorganic lead [Pb (II)] effects on mice *Mus musculus* peritoneal macrophages (Mφs), through in vitro primary culture approach. These Mφs were exposed to two xenobiotic concentrations (20 e 40μM) during 4, 24 and 72h, following a 24h culture period. In order to evaluate the Pb (II) effects on these cells, many procedures were used, such as the Tripán blue exclusion viability technique, phagocytosis and adhesion essays, Comet test and so on. Another aspect assessed was related to Mφs morphology, at the structure and ultrastructure levels, through optic microscopy (OM) as well as transmission (TEM) and scanning electronic microscopy (SEM). Fluorescence and immunofluorescence techniques were also used with the intention of visualizing the actin microfilaments, FAK, integrin α_5 and Bax. The results of these evaluations were based on morphological criteria, which enabled the observation that the exposed Mφs presented structural alterations in shape and behaviour, if compared with the control group. A clear and vacuolated cytoplasm, many projections and dense cytoplasmatic granules, the presence of euchromatin rich big nucleus and evident nucleolus are examples of the Mφs alterations after the exposition to Pb (II) on OM. Regarding the alterations at the ultrastructural level under TEM, the presence of many vacuoles, a high chromatin condensation and the occurrence of many blebs on cell's surface. Considering the SEM analyses, it's possible to observe that Pb (II) alters the distribution and the number of filopodium and lamellipodium as well as blebs. The cytoskeleton's marking showed an irregular distribution of the actin and FAK protein. Sharply spreading Mφs presented clusters of integrin α_5 receptors into common cell's projections, suggesting at a first look, adhesion dynamics and/or cellular migration. The Mφs spreading did not represent an adhesive stimulus, at least on fibronectin coat, since the Mφs from the control group presented similar results in comparison to the treated groups. The Bax protein gene expression confirms the TEM results, where apoptotic structures were identified on Mφs exposed to Pb (II). Finally, it was observed through Comet test that this xenobiotic might cause DNA damage. All these results suggest that Pb (II), even at low concentrations and short-term exposition, causes a large number of morphologic alterations. Pb (II) might be interfering in Mφs functional mechanisms, originating alterations in the interactions between certain molecules and their membrane receptors and interfering with the energy mechanisms of these cells through covalent linkage to biomolecules, and also it might be disturbing the calcium homeostasis, leading this way, to the programmed cellular death, also called apoptosis. Then, the alterations presented by Mφs exposed to the aforesaid xenobiotic do may not interfere only with structural and functional maintenance, but may also compromise the whole immune system of these mammals.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a atividade humana crescente vem ameaçando o conjunto de ecossistemas terrestres que formam a biosfera do planeta. Toda essa destruição não está relacionada a apenas um problema ecológico gravíssimo, mas também a um problema econômico e social, uma vez que a destruição desses ecossistemas e dos seres vivos que deles fazem parte, representam também o desaparecimento da biodiversidade. Os organismos aquáticos, em geral, são os primeiros a sofrerem os efeitos da poluição, pois os ecossistemas onde vivem constituem o receptáculo final dos vários produtos lançados nos ambientes pela atividade humana. Os efeitos dos contaminantes nos organismos vivos são adversos e com frequência produzem nestes, danos em diferentes níveis de organização biológica (bioquímicos, morfológicos e fisiológicos), sendo estes muitas vezes irreversíveis.

Entre os contaminantes mais intensamente estudados em ambientes dulcícolas, estuarinos e marinhos estão os metais pesados, um grupo de elementos com massa atômica variando de 63 a 200 daltons (VIARENGO, 1989). Devido à sua toxicidade para os sistemas biológicos e sua persistência no ambiente, os metais pesados são considerados potencialmente perigosos (KENNISH, 1999). Tais elementos podem ser subdivididos em duas categorias essenciais: como o cobalto, cobre, ferro e zinco, os quais são necessários ao metabolismo em baixas concentrações, mas podem ser tóxicos em altas concentrações e os não essenciais: como, por exemplo, o arsênio, cádmio, chumbo, mercúrio, cromo, selênio e estanho, que não são necessários para as funções metabólicas e, portanto são tóxicos mesmo em baixas concentrações. A ordem decrescente de toxicidade para os metais pesados segundo ABEL (1989) é: o mercúrio, o cádmio, o chumbo, o cobre, o zinco, o níquel, o alumínio e o cobalto. Em níveis tóxicos, os metais pesados podem atuar como inibidores de enzimas nos organismos vivos, porém, a toxicidade de um dado metal pode variar significativamente de uma espécie para outra (ABEL, 1989). O acúmulo de metais pesados em organismos vivos depende de muitos fatores, tais como a biodisponibilidade do metal, a forma, a frequência e o tempo de exposição, a forma química do metal, a dieta, e a habilidade do organismo para regular sua

concentração imobilizando, estocando ou excretando o metal (PASTOR et al., 1994).

Os metais pesados entram nos ambientes aquáticos e, por conseguinte, na cadeia alimentar podendo desta forma atingir a população humana por diferentes vias: a) fluxo fluvial, b) deposição atmosférica, c) intemperismo, d) vulcões, e) atividade antropogênica, isto é, através da indústria, metalurgia e mineração. Uma grande parte dos metais pesados nas águas dos rios vem do intemperismo das rochas e lixiviação do solo e, disso, depende em parte da ocorrência de metais e depósitos de minérios na área de drenagem. Através de fontes antropogênicas há um aumento do volume de metais pesados quando o curso dos rios passa por centros urbano-industrializados. A atmosfera, no entanto, é a que representa a principal via de exposição para certos metais, principalmente o chumbo, o qual é adicionado à gasolina, e liberado na atmosfera pelos automóveis na forma volátil de $PbBr$ (brometo de chumbo) ou $PbCl$ (cloreto de chumbo) após a combustão da mesma (HELMERS, 1990). Constituem outros exemplos, o mercúrio liberado pela atividade vulcânica e o alumínio procedente da poeira e gases da desagregação do xisto (KENNISH, 1999).

Traços de metais pesados ocorrem em diferentes formas químicas durante o seu trajeto nos corpos d'água: (1) em solução como íons inorgânicos ou em complexos inorgânicos e orgânicos ou (2) adsorvidos em partículas orgânicas sólidas (DUINKER, 1980), tais características favorecem ou não sua biodisponibilidade. Embora os metais pesados existam dissolvidos, em fase coloidal e em fase particulada na água, a concentração de formas dissolvidas é baixa, pois como átomos reativos, se adsorvem a matéria particulada em suspensão, ao atingirem os corpos d'água (NIENCHESKI, 1994). Finalmente, a maior parte dos metais pesados é removida para os sedimentos, os quais funcionam como um depósito para esses elementos (SINEX, 1988).

Os organismos vivos também influenciam o ciclo dos metais pesados. O fitoplâncton, por exemplo, utiliza metais pesados para ativar os sistemas enzimáticos, como a glicólise, ciclo dos ácidos tricarboxílicos, fotossíntese e metabolismo celular (BRULAND, 1983). O Zooplâncton e a fauna bentônica filtram

o sedimento, facilitando a remoção dos metais pesados deste compartimento (BRYAN, 1976).

O acúmulo de metais pesados na biota ocorre por diferentes vias, incluindo a ingestão de alimentos, de material particulado em suspensão ou do sedimento (HEATH, 1987 e HAWKER, 1990). Numerosos fatores influenciam a absorção de metais-traço pelos organismos aquáticos e por outros organismos de níveis tróficos superiores, mais notavelmente por fatores físico-químicos extrínsecos, os quais controlam a biodisponibilidade do metal (RAINBOW, 1993). Segundo o mesmo autor, quanto aos efeitos tóxicos de metais pesados nos organismos vivos, a literatura é extensa, permitindo dizer que a princípio, todos os metais pesados são potencialmente tóxicos.

A capacidade de alguns organismos em estocar, remover, metabolizar os metais varia consideravelmente (CAPUZZO et al., 1985). As metalotineínas (proteínas de baixa massa molecular e ricas em radicais sulfidril), por exemplo, ocorrem tanto em procariontes como eucariontes e são conhecidas por estarem envolvidas na regulação celular, seqüestro e detoxicação de metais (ENGEL e BROWER, 1993; ROESIADI, 1994; SCHLENK, et al., 1993). Apesar do seu potencial em regular a concentração intracelular dos metais (ROESIADI, 1992), as metalotineínas não se ligam a todos os tipos de metais. Quando esta capacidade é excedida, os efeitos tóxicos da contaminação podem se manifestar. GEORGE e OLSSON (1994) têm demonstrado que a indução da síntese de metalotineínas em peixes por cádmio, zinco e mercúrio fornece um valioso processo de monitoramento para avaliar a viabilidade biológica (biodisponibilidade) e o impacto desses metais nos ambientes aquáticos.

Os lisossomos da mesma maneira seqüestram metais traços e constituem também um mecanismo regulador da homeostase no animal (CAPUZZO et al., 1985; VIARENGO et al., 1987). Lisossomos ricos em metais foram observados e descritos em anelídeos, crustáceos, moluscos e algas (VIARENGO, 1989 e PAVICIC et al., 1993).

A determinação do acúmulo de metais pesados, em certos organismos, tem sido eficaz na indicação de contaminação da água e dos sedimentos. Espécies empregadas para monitorar níveis de contaminantes são conhecidas

genericamente como bioindicadores ou organismos sentinelas (PHILLIPS e RAINBOW, 1993, 1989; PHILLIPS, 1994). Há vários paradigmas para uma espécie atuar como um bioindicador eficiente de contaminação de metais-traço em ambientes aquáticos. Os bioindicadores devem ser resistentes aos contaminantes e acumuladores dos mesmos, refletindo, portanto, a biodisponibilidade do contaminante no ambiente natural. No entanto, os mecanismos relacionados aos efeitos dos metais pesados nas células animais, não se encontram completamente elucidados tanto a nível estrutural como bioquímico. Segundo SLATER (1978), os efeitos dos metais pesados mais importantes para as células são: a perda ou aumento de metabólitos ou coenzimas; inibição ou estimulação de enzimas ou outras proteínas e alterações na estrutura da membrana plasmática.

Entretanto, é conhecido que quando os metais pesados atravessam a membrana celular, estes reagem com componentes citosólicos e geralmente formam complexos metalorgânicos por diferentes vias ou modificam alguns metabólitos intermediários (VIARENGO, 1985). A atividade das enzimas que catalisam essencialmente reações irreversíveis na célula parece ser a mais seriamente afetada. Em especial, o chumbo é conhecido como inibidor da fosforilação oxidativa, mesmo em baixas concentrações; de fato, as mitocôndrias são conhecidas por serem organelas alvo deste poluente (BULL, 1980).

1.1. CARACTERÍSTICAS DO CHUMBO

1.1.1. História da Intoxicação

Já no Império Romano era comum a intoxicação por chumbo devido os encanamentos de água serem deste metal e o uso do mesmo na confecção de vasos e recipientes onde se guardavam vinhos e alimentos. Sendo assim, a primeira intoxicação foi registrada em 370 a.C. A contaminação por este metal foi comum também entre os trabalhadores no século XIX e início do século XX (como pintores e encanadores). Em 1883, foi promulgada na Inglaterra a primeira legislação com relação à proteção de trabalhadores expostos ao chumbo, isto

depois de acidente ocasionando a morte de vários empregados que manipulavam este metal em meados de 1882.

Atualmente, apesar das leis serem mais severas prevenindo a intoxicação aguda pelo chumbo em países desenvolvidos, estes mesmos países se utilizam dos países em desenvolvimento, onde as leis são menos severas, para desenvolverem suas atividades industriais poluidoras. A exposição crônica, no entanto, tem sido questionada principalmente depois de verificada a intoxicação pelo chumbo, especialmente em crianças, onde os efeitos são mais graves. Em 1943, um estudo nos EUA, com crianças expostas ao chumbo, comprovou alterações neuropsicológicas na exposição crônica em doses leves e após exposição aguda a doses altas. A partir de então, muitas pesquisas foram realizadas nos últimos 30 anos, onde se buscou avaliar as concentrações limítrofes de chumbo no sangue e os seus efeitos. Mais recentemente foi descoberto que crianças no vale do Ribeira (PR) se encontram contaminadas e intoxicadas pelo chumbo inorgânico, onde a fonte de contaminação é a poeira proveniente de montanhas de rejeitos abandonados pela exploração do metal no passado (PAOLIELLO et al., 2002).

1.1.2. Papel da cadeia alimentar nos processos de contaminação pelo chumbo

Resíduos sólidos, líquidos e gasosos provenientes de processos industriais passaram a ser grandes problemas ambientais, interferindo no equilíbrio dos ecossistemas naturais e causando enormes prejuízos à saúde de organismos vivos de uma maneira geral. As populações vizinhas às fábricas ou centros industriais encontram-se constantemente expostas aos poluentes lançados nas imediações e hoje sofrem como consequência graves problemas de saúde. Na Rússia foi diagnosticado em populações humanas próximas às áreas impactadas “sintomas de doença ecológica”, sendo um dos primeiros registros de contaminação ambiental considerado como “casos epidemiológicos” (JENSEN et al, 1997). Mais recentemente nos Estados Unidos, os resíduos de grandes complexos petroquímicos foram relacionados com o aumento de incidência de câncer no cérebro, ossos e bexiga de crianças e adolescentes

(BAARS, 2002). Dentre as muitas substâncias tóxicas presentes nos resíduos industriais, o chumbo é um dos metais que mais afeta a saúde humana uma vez que este metal encontra-se presente em grande quantidade na atmosfera de grandes centros urbanos (SEZGINN et al., 2003).

O chumbo é um elemento não essencial ao metabolismo dos seres vivos e, nos últimos sessenta anos (MERIAN, 1991), grande quantidade de chumbo tem sido extraída, concentrada, utilizada pelo homem e re-emitida para o ambiente. Com isso, a concentração atmosférica de chumbo tem sido superior às satisfatórias, o que caracteriza um ambiente poluído, com riscos para a saúde humana e outros organismos vivos. Na espécie humana, os fetos, recém-nascidos e crianças são os mais afetados, isto porque o chumbo é altamente neurotóxico aos processos relacionados com o desenvolvimento humano. Efeitos neurológicos são freqüentemente observados e a presença de chumbo no sangue é geralmente vista como indicação de exposição. Normalmente adultos não devem ultrapassar concentrações entre 35 e 40 mg Pb(II) em 100 mL de sangue e mulheres grávidas não devem apresentar concentrações acima de 20 mg/100 mL (EWERS e SCHLIPKÖTER, 1991). FELLEBERG (1980) afirma que 70 mg /100 mL de sangue seria o limite superior tolerável pelo corpo humano sem comprometer sua saúde.

A presença de chumbo em alimentos pode resultar de várias fontes, como: absorção por plantas presentes em solos com concentrações elevadas desse elemento ou tratadas com pesticidas à base de arsenato de chumbo ou mesmo irrigadas com água contaminada. Estudos em países como a Alemanha (WEIGERT et al., 1984) e a Inglaterra (MAFF, 1975 e 1983), mostraram que a concentração de chumbo no trigo e na batata variou entre 0,04 e 0,09 ppm e na carne entre 0,01 e 0,06 ppm. Embora exista uma grande variabilidade na concentração de chumbo em alimentos, o que depende de vários fatores, como a localização geográfica onde o alimento foi produzido, é possível fazer algumas generalizações:

- ✓ em vegetais, a concentração de chumbo é mais elevada nas raízes, mais baixa no tronco, folhas, flores e sementes. Uma exceção é encontrada em

vegetais folhosos que retêm poeira não facilmente removida com a lavagem;

- ✓ em frutos, a concentração mais elevada do chumbo foi encontrada nas cascas;
- ✓ alimentos de origem animal como carne de músculo, leite fresco e ovos têm uma concentração relativamente baixa de chumbo. Entretanto, vísceras, especialmente rim e o fígado apresentam concentrações substancialmente elevadas do metal;
- ✓ bebidas alcoólicas como vinhos podem conter concentrações substanciais de Pb, com médias oscilando entre 50 e 100 mg/L (ECKARD e BERTRAM, 1987). Whisky destilado ilegalmente também pode apresentar elevadas concentrações de chumbo em função do seu uso em soldas nos destiladores.

Segundo HAPKE (1991), a concentração de chumbo no tecido animal é resultante principalmente da ingestão de alimentos contaminados e cerca de 10% do excesso encontrado são provocados pela inalação de poeira rica no metal. Uma vez dentro do organismo, o chumbo se acumula nos tecidos de modo diferenciado. Não mais do que 0,1 mg/Kg é encontrado em músculo esquelético de animais de criação, mesmo se eles tiverem sido expostos a níveis consideravelmente elevados. Entretanto, em áreas poluídas, o fígado de organismos expostos pode apresentar concentrações de até 10 mg/Kg e concentrações similares também são encontradas nos rins. O leite e o sangue apresentam concentrações bem mais baixas, variando entre 0,002 e 0,006 mg/L (DEUTSCHE FORSCHUNFGEMEINSCHAFT, 1975). Segundo o mesmo autor, para evitar a concentração do metal através da água consumida, esta não deve conter mais do que 0,1 mg Pb/L. O chumbo preferencialmente se apresenta na forma de compostos orgânicos dentro do organismo e o maior acúmulo ocorre nos ossos (HAPKE, 1987).

A ingestão humana de chumbo através de alimentos deve ficar em torno de 0,3 a 1,0 mg/semana, com casos esporádicos essa ingestão pode chegar até 2,5 mg. Dentro desta perspectiva, a ingestão semanal de verduras ricas em folhas,

contendo até 7,5 mg de Pb/Kg, deverá ser entre 40 e 133 gramas. Uma ingestão semanal entre 3 e 4 mg é aceita como toxicologicamente inofensiva. Aproximadamente metade da ingestão humana de chumbo ocorre através de alimentos, dos quais mais da metade é de origem vegetal. No caso deste metal, a cadeia alimentar (solo – planta – animal – homem) caracteriza mais propriamente uma diluição do que um acúmulo. O fator de diluição normalmente é de aproximadamente 1000 vezes, mas em áreas industriais poluídas sendo de apenas 100 vezes (TSUCHIYA, 1986).

1.1.3. Ação fisiológica do chumbo

Segundo FELLEBERG (1980), o trato digestivo não é a principal forma de absorção do chumbo, uma vez que este só é absorvido parcialmente através do estômago e intestinos. A principal forma de absorção é através da inalação do tetraetilchumbo presente na atmosfera. Quando inalado, o chumbo atinge os pulmões, onde é absorvido de forma mais rápida e completa que no trato digestivo.

O chumbo atinge a circulação sanguínea, associa-se aos glóbulos vermelhos (eritrócitos) e distribui-se por todo o organismo, podendo desencadear uma série de perturbações sistêmicas. Até 90% do metal se deposita nos ossos e o restante se espalha pela musculatura, nervos e órgãos. Os compostos organometálicos de chumbo têm um comportamento bem diferente do chumbo inorgânico. Devido a seu caráter lipofílico, este se acumula no cérebro e no sistema nervoso periférico em proporções bem maiores, provocando danos ao sistema nervoso central, como estado de agitação, epilepsia e até paralisia. Os níveis no sangue a partir de 10 – 100 µg/dl em crianças, 10 – 100 µg/dl adultos foram associados a uma série de efeitos adversos. Esses efeitos incluem distúrbios no sistema nervoso, anemia e síntese de hemoglobina diminuída, doenças cardiovasculares, além de distúrbios no metabolismo ósseo, na função renal e na reprodução. O efeito de uma exposição relativamente baixa no desenvolvimento cognitivo e comportamental em crianças é extremamente

preocupante (PIRKLE et al., 1998, USPHS, 1997; BERNARD et al., 1995; GOYER, 1993; NRIAGU, 1988).

Em 1975, o Centro de Controle de Doenças (CDC) em Atlanta (EUA) recomendou que o maior nível permissível de chumbo no sangue fosse de 30 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (para o homem). Esses níveis foram reduzidos em 1985 para 25 $\mu\text{g}/\text{dl}$, e novamente em 1991, definindo um nível de chumbo no sangue de 10 $\mu\text{g}/\text{dl}$ como um nível para ação ou intervenção (USPHS, 1997). Ainda mais importante é a recomendação atual de que talvez não haja níveis aceitáveis de chumbo no sangue que não produzam efeitos tóxicos, especialmente no sistema nervoso central em desenvolvimento (USPHS, 1997; GOYER, 1993).

1.1.4. Cinética do chumbo na célula

Tanto os fatores bióticos como os abióticos podem influenciar na absorção, distribuição e, por conseguinte, no efeito tóxico do chumbo em condições naturais. Independente do organismo exposto, a absorção dar-se-á através das membranas biológicas. Embora a forma química do elemento ou substância no meio extracelular seja importante na absorção, ao atingir o citoplasma o mesmo encontrará um ambiente físico-químico completamente diferente àquele do exterior celular, o que poderá alterar o comportamento da molécula. Assim, os efeitos tóxicos celulares do chumbo são diferentes, dependendo da afinidade do tecido ou célula ao contaminante, que pode imobilizá-lo ou não (COSTA, 2001).

Os efeitos tóxicos do chumbo em animais variam de acordo com a espécie considerada, o tempo e o modo de exposição, a tolerância fisiológica, os teores de metal e com fatores ambientais locais. Sabe-se, no entanto, que a tolerância fisiológica é controlada por expressão gênica (PAIN, 1995).

Efeitos do chumbo inorgânico no sistema nervoso periférico também já foram relatados, mas com maior frequência em adultos. Atualmente os estudos nessa área envolvem os efeitos relacionados com anormalidades eletrofisiológicas que possam ocorrer na ausência de sinais clínicos (EWERS e SCHLIPKÖTER, 1991).

1.1.5. Toxicologia *in vitro*

A toxicidade é uma série de respostas que envolvem reações complexas e contínuas devido aos efeitos adversos de agentes tóxicos sobre os organismos vivos. A ecotoxicologia está mais associada aos efeitos dos poluentes sobre os ecossistemas naturais, baseando-se para isso em efeitos nos organismos que vivem nestes ecossistemas, e suas implicações para o equilíbrio destes ambientes.

A pesquisa toxicológica utiliza várias abordagens e metodologias para identificar riscos e compreender os processos básicos, que influenciam a expressão de respostas em sistemas biológicos à presença de agentes tóxicos. Uma abordagem importante tem sido identificar e desenvolver modelos *in vitro*, que retenham as características básicas das condições mais complexas *in vivo*, e que possam ser manipulados para fins de pesquisa. Modelos de pesquisa *in vitro* têm características próprias, que fornecem vantagens significativas em muitas áreas da pesquisa toxicológica. Primeiramente, sistemas *in vitro* permitem controlar melhor as condições experimentais, o que não é possível *in vivo*. Condições físicas e químicas do ambiente celular, tais como temperatura, pH, $pO_{2(g)}$, e concentração de íons fisiológicos, podem ser rigorosamente e mais amplamente controladas, incluindo condições não fisiológicas, para elucidar mecanismos fundamentais. Fatores biológicos, que influenciam as respostas celulares, como hormônios e mediadores, podem ser estudados individualmente ou em combinações, o que não seria possível *in vivo*. Além disso, a concentração de produtos tóxicos pode ser prontamente determinada e controlada para uma definição mais precisa das relações dose-resposta. Portanto, os sistemas *in vitro* eliminam os efeitos de interação sistêmica, que podem confundir a interpretação dos fenômenos. Por exemplo, alterações nas condições fisiológicas *in vivo* como fluxo de sangue no tecido de interesse pode complicar a análise das respostas biológicas. Estas interações podem ser eliminadas *in vitro* sem comprometer o estudo e com isso a interpretação dos dados é simplificada e além do mais, os sistemas *in vitro* freqüentemente exibem menos variáveis entre os experimentos, relacionados à habilidade de controlar as condições ambientais. Entretanto,

manter a variabilidade experimental reduzida é extremamente importante na investigação científica, e pode ser atribuída ao uso de controles internos no caso dos estudos *in vitro* (cada experimento atua como seu próprio controle), além de incorporar controles negativos ao *design* experimental calibrando o sistema para cada experimento. A habilidade em se obter amostras repetidas durante o curso de um experimento adiciona uma dimensão importante nos estudos *in vitro*.

Estudos, que levam em consideração o curso do tempo, podem prover informações valiosas com relação à seqüência de eventos celulares durante a resposta toxicológica ao agente tóxico. Outras vantagens do modelo *in vitro* são de natureza mais prática. Por exemplo, sistemas *in vitro* requerem significativamente menores quantidades de reagentes para conduzir uma relação completa dose-resposta. Isto é uma consideração particularmente importante quando os compostos utilizados são muito caros ou quando são altamente perigosos como no caso do uso de material radioativo. Sistemas *in vitro* são, em geral, mais baratos e fornecem respostas mais rápidas do que sistemas de modelos *in vivo*. Finalmente, desde que menores quantidades de reagentes-teste sejam usadas nesses estudos, geram-se menos resíduos tóxicos para se descartar ao final dos mesmos. Por todas essas razões, sistemas de modelos *in vitro* apresentam um papel importante na pesquisa toxicológica. (BAKSI e FROZIER, 1990).

1.2. MACRÓFAGOS

Os macrófagos foram primeiramente descritos por METCHNIKOFF (1905), no início do século XX e o termo macrófagos ativados foi usado pela primeira vez por MACKNESS (1960). Morfologicamente, estas células caracterizam-se por serem relativamente grandes, medindo entre 25 a 50µM de diâmetro, com núcleo irregular e centralizado, um ou mais nucléolos e cromatina pouco condensada. Sua superfície é bastante irregular, sendo proeminente de inúmeras projeções citoplasmáticas. Apresentam Complexo de Golgi abundante, grande número de lisossomos e mitocôndrias e um citoesqueleto bem desenvolvido, por toda a

extensão celular desde o núcleo da célula bem como se estendendo até a periferia da mesma (AUGER e ROSS, 1992).

Macrófagos são células que pertencem à primeira linha de defesa contra microrganismos invasores e têm um papel crucial na resposta imune, atuando através de diversos mecanismos: (a) diretamente, destruindo bactérias, parasitas, vírus, células tumorais; (b) indiretamente, pela liberação de mediadores (interleucina-1 (IL-1), fator- α de necrose tumoral (TNF- α), etc que podem ativar outras células); (c) processando antígenos e apresentando peptídeos aos linfócitos T ou no (d) reparo de tecidos danificados.

O sistema imune é caracterizado pela produção de grande número de células, todas ligadas ao mecanismo de proteção do organismo. A viabilidade das células do sistema imune pode ser regulada por fatores externos como o de crescimento e citocinas, bem como pelas interações com a matriz extracelular (XAUS et al., 2001). Sendo assim torna-se interessante o uso destas células avaliando melhor o seu comportamento quando expostas a contaminantes.

Muitos dos trabalhos realizados com fagócitos mononucleados em experimentos animais têm preferencialmente empregado os macrófagos peritoneais, uma vez que estes podem ser facilmente obtidos e cultivados. Além do mais, estas células aderem facilmente ao vidro ou plástico, facilitando seu uso em estudos *in vitro* (BECKER et al., 1983; NEWMAN, 1985)

Os macrófagos estimulados apresentam elevada capacidade de espraiamento, fagocitose e secreção de proteases neutras e outras enzimas e a fatores de crescimento, como fator estimulador de colônias de macrófagos. (GORDON, 1995). A ativação dos macrófagos envolve a interação de citocinas com receptores presentes na membrana, desencadeando uma série de eventos moleculares que incluem hidrólise de fosfatidilinositol, formação de diacilglicerol, alterações na concentração de cálcio citosólico, ativação de proteínas quinase C, fosforilação de proteínas e alterações na transcrição gênica (ADAMS e HAMILTON, 1992).

1.2.1. Participação dos Macrófagos na Resposta Imune e Inflamatória

Os macrófagos influenciam vários aspectos da resposta imune e inflamatória, atuando como células efetoras e desempenham um papel fundamental na união entre os sistemas imunes inato e adaptativos (UNANUE e ALLEN, 1987). Estas células não somente fagocitam microrganismos, células infectadas e células mortas, mas também liberam uma bateria de citocinas que são a chave para iniciar e manter a resposta imune e inflamatória (RIDLEY, 2001).

Para monitorar o organismo de maneira eficiente em busca de agentes agressores, os macrófagos, assim como as demais células do sistema imune, precisam circular como células não aderentes nos vasos sanguíneos e linfáticos e migrar como células aderentes através dos tecidos (SPRINGER, 1990).

Os macrófagos interagem com outras células e com a matriz extracelular em diversas situações durante sua ontogenia e diferenciação, assim como em resposta a estímulos fisiológicos apropriados (MERCURIO e SHAW, 1988; HARLAN, 1985). Sua habilidade em interagir com moléculas da matriz extracelular como colágeno, laminina e fibronectina, é um fator determinante para o desenvolvimento de suas funções. Essa interação permite às células aderir e espalhar-se sobre a matriz o que acontece via receptores específicos presentes na membrana celular, entre os quais destacam-se as integrinas (LAOUAR et al., 1999; HYNES, 1992). Além de serem receptores de adesão, as integrinas funcionam como transdutores de sinal via fosforilação de resíduos de tirosina (CHEN et al. 1996; LIN et al. 1994). Assim, a interação dos receptores integrínicos com seus ligantes na matriz extracelular desencadeia uma série de cascatas de sinalizações intracelulares, influenciando a expressão gênica (LIN et al., 1995) e regulando, desta forma, processos como o crescimento celular (SCHNELLER et al., 1997) e apoptose (MIAO et al., 1997).

A atuação dos macrófagos como células efetoras, envolve a participação destas na endocitose, processamento e apresentação de antígenos, secreção de moléculas efetoras e regulatórias (GORDON, 1999).

1.2.2. Endocitose

A endocitose é um processo fundamental para o desenvolvimento de diferentes funções dos macrófagos. Ela permite a captura de uma série de substâncias, macromoléculas e microrganismos, variando de acordo com a natureza do agente a ser ingerido (BERON et al., 1995).

Substâncias ou partículas pequenas, presentes em solução, são captadas através de um processo denominado pinocitose, que pode ser ou não seletivo. Na pinocitose não seletiva ou fluida, ocorre o transporte em massa de microgotas, promovendo a captação de solutos dissolvidos no fluido extracelular, tais como sacarose. Já na pinocitose seletiva ou absorptiva, o transporte de macromoléculas depende de seu reconhecimento e ligação a receptores presentes na membrana, como é o caso do complexo antígeno-anticorpo e hormônios protéicos (PHAIRE-WASHINGTON et al., 1980).

A ingestão de partículas sólidas e microrganismos é denominada fagocitose. Assim como a pinocitose seletiva, a fagocitose depende da interação entre receptores presentes na membrana dos macrófagos e seus respectivos ligantes na superfície dos elementos a serem fagocitados (BERON et al., 1995).

O processo de fagocitose está intimamente relacionado aos fenômenos de adesão e espraiamento. Durante esses processos ocorrem uma série de alterações estruturais nas células, envolvendo a ativação e recrutamento de receptores de membrana para interagirem com as moléculas da matriz extracelular, como fibronectina, vitronectina e laminina. A ativação dos receptores desencadeia uma cascata de sinalização intracelular mediadas por tirosinoquinase, promovendo a reorganização de elementos do citoesqueleto, como microtúbulos, microfilamentos de actina e a redistribuição de organelas (GREENBERG, 1995). Essas alterações levam a uma mudança na morfologia celular, possibilitando o aumento da área de contato da membrana plasmática da célula fagocitária com a superfície das partículas ou microrganismos a serem fagocitados. Além disso, o aumento da polimerização de filamentos de actina próximo à membrana plasmática acarreta a formação de projeções celulares

(pseudópodos), que se estendem ao redor das partículas-alvo e promovem sua internalização (ARAKI et al., 1996).

O processo de endocitose está relacionado com a função de célula apresentadora de antígenos (APC) desempenhada pelos macrófagos. Eles são capazes de interagir com uma variedade muito grande de moléculas extracelulares, tais como proteínas e polissacarídeos livres em solução ou presentes na estrutura de microrganismos. Subseqüentemente, essas moléculas são internalizadas, submetidas a mudanças metabólicas intracelulares e apresentadas em sua superfície em associação com moléculas MHC I e II, de maneira a serem reconhecidas pelos linfócitos T (DEBRIK et al., 1991; CAO et al., 1989).

1.2.3 Citoesqueleto

O citoesqueleto é uma complexa rede de filamentos e túbulos que permite estímulos mecânicos e químicos dentro e entre as células (CHOQUET, 1997 e WANG, 1994). Eles contribuem substancialmente para a estabilidade da célula mantendo as estruturas subcelulares, tais como as mitocôndrias, Golgi, núcleo, e microfibrilas. A ação do citoesqueleto como um estabilizador de força e como transdutor é mantido por proteínas associadas à membrana, especialmente a distrofina que liga actina intracelular e laminina extracelular (KLIETSCH, 1993). A integridade do citoesqueleto permite as células responder a sinais físicos e bioquímicos exercida pela matriz extracelular (CHOQUET, 1997).

A ligação das células ao substrato e seu espreado em uma superfície envolve uma reorganização dinâmica de três estruturas filamentosas principais: os microtúbulos, filamentos intermediários, e, particularmente a actina (microfilamentos) e proteínas associadas a estas (IRELAND et al., 1987).

As células eucariontes possuem um esqueleto interno denominado citoesqueleto, que capacita as células a ter uma forma definida, capacidade de movimento, habilidade de distribuir as organelas e transportá-las de uma parte à outra da célula. O citoesqueleto é composto de uma rede de filamentos constituídos de proteínas, sendo os filamentos de actina e microtúbulos os mais

importantes para processos que envolvam dinâmicas celulares sendo objetivo deste trabalho. Tais estruturas datam dos primeiros estágios da evolução, devido ao fato de serem encontradas na maior parte das células eucariontes e estão envolvidas na geração do movimento celular. Os microtúbulos são os primeiros geradores de força em cílios e flagelos – longas projeções da superfície celular, em forma de chicote que servem como instrumento de propulsão.

Os filamentos de actina e microtúbulos são também essenciais para movimentos internos que ocorrem no citoplasma de todas as células eucariontes. Por exemplo, os microtúbulos, na forma de fuso mitótico, são cruciais na maquinaria de separação do DNA em partes iguais para as duas células filhas, quando da divisão celular. Sem os microtúbulos, as células eucariontes não poderiam dividir-se. De fato, a maioria das organelas em uma célula parece estar associada direta ou indiretamente ao citoesqueleto, uma vez que o movimento se dá ao longo da estrutura do mesmo (ALBERTS et al., 1997). O citoesqueleto nas células eucariontes possui a capacidade de adotar uma variedade de formas e de executar movimentos coordenados e direcionados dependentes de uma rede complexa de filamentos e proteínas filamentosas. Estas são responsáveis pela organização espacial do citoplasma das células eucariontes. Esta rede é altamente dinâmica e se organiza continuamente sempre que a célula altera a forma, se divide ou mesmo responde ao seu ambiente. O citoesqueleto também é responsável por movimentos tais como o deslocamento das células sobre um substrato e contração muscular. Para que uma célula consiga desempenhar as suas funções ela depende dos diferentes tipos de proteínas que estão presentes no citoplasma que constituem o chamado citoesqueleto. Numa única célula eucarionte de vertebrado estima-se que existam 10.000 tipos diferentes de proteínas e que a maioria delas apresenta um alto grau de organização. O citoesqueleto cria e mantém um nível ainda mais elevado de organização, permitindo que, tal qual uma cidade, uma célula viva possua muitos serviços especializados concentrados em diferentes áreas, interconectadas por vias de comunicação (ALBERTS et al., 1997).

Para que ele consiga desempenhar as suas funções, o citoesqueleto depende de três diferentes tipos de filamentos protéicos – filamentos de actina,

microtúbulos e filamentos intermediários. A actina e a tubulina foram conservadas ao longo da evolução dos eucariontes; seus filamentos protéicos se ligam a uma grande variedade de proteínas acessórias que permitem que um mesmo filamento participe de diferentes funções em diferentes regiões da célula. A actina é a proteína mais abundante do citoesqueleto, constituindo, freqüentemente, 5% a 20% da massa protéica total nas fibras musculares esqueléticas. Ela é encontrada em todas as células eucariontes e participa na formação do córtex celular, o qual é importante para reforçar a membrana plasmática, sendo essencial para muitos de seus movimentos, principalmente aqueles envolvendo a superfície celular (ALBERTS et al., 1997).

Os filamentos de actina estão associados a um grande número de proteínas (troponina/tropomiosina) que lhes permitem desempenhar uma variedade de funções. Dependendo de sua associação com diferentes proteínas, eles podem formar estruturas rígidas e relativamente permanentes como microvilosidades do intestino, pequenos feixes contráteis que podem funcionar como “músculos”, protusões formadas na borda anterior de um fibroblasto, anel contrátil numa célula em divisão. Por outro lado, os microtúbulos são polímeros longos e rígidos que se estendem por todo o citoplasma, coordenam a localização intracelular das organelas e de outros componentes celulares. Esses polímeros são constituídos de proteínas chamadas α -tubulina e β -tubulina. Estas proteínas são encontradas entre 10 e 20% do total das proteínas solúveis do cérebro, refletindo uma densidade extraordinariamente alta de microtúbulos nos prolongamentos das células nervosas. Qualquer microtúbulo que, casualmente, encontrar uma estrutura que estabilize sua extremidade livre será seletivamente mantido, enquanto os demais serão despolimerizados. Este processo seletivo determinaria a posição dos conjuntos de microtúbulos numa célula. Muitos dos conjuntos de microtúbulos celulares são lábeis e dependem desta labilidade para suas funções (ALBERTS et al., 1997).

A capacidade de estabilizar microtúbulos numa configuração particular proporciona à célula um mecanismo importante pelo qual ela pode organizar seu citoplasma. Os microtúbulos citoplasmáticos das células animais tendem a irradiar-se em todas as direções a partir do centróssomo. Sua instabilidade

inerente ajuda a explicar como eles podem se organizar em orientações específicas na célula, por exemplo, em direção da borda das células que estão se deslocando. Uma vez que diferentes componentes da célula se deslocam ao longo dos microtúbulos em diferentes direções, pode-se postular que uma diferença inicial na sua polaridade é criada por uma distribuição diferente das MAPs, o que levará a diferenças entre os dendritos e axônios (ALBERTS et al., 1997).

As vesículas secretoras, por exemplo, se deslocam no sentido da extremidade “mais” dos microtúbulos e, desta forma serão transformadas ao longo do axônio até os terminais nervosos onde exercem sua função; inversamente se os ribossomos ou os mRNAs se deslocam no sentido da extremidade “menos”, eles poderiam sair do axônio. Existem as chamadas proteínas motoras que são dependentes de microtúbulos como as quinesinas e as dineínas citoplasmáticas. As dineínas estão envolvidas com o transporte de organelas e com a mitose e as quinesinas apresentam maior diversidade do que as dineínas. Estas estão envolvidas além do transporte de organelas, na mitose, na meiose e no transporte de vesículas sinápticas ao longo dos axônios. Já os filamentos intermediários são fibras protéicas e resistentes encontradas no citoplasma da maioria das células animais e apresentam um diâmetro aparente de 8 a 10nm. Na maioria das células animais, o núcleo é rodeado por uma extensa rede de filamentos intermediários que se estende para a periferia da célula onde interage com a membrana plasmática. Estes filamentos são particularmente importantes no citoplasma das células que estão sujeitas à tensão mecânica. Eles estão presentes em grande número, por exemplo, no epitélio ligando as células entre si por junções especializadas, nas células nervosas e em todos os tipos de células musculares. (ALBERTS et al., 1997)

1.2.4. Citoesqueleto e metais pesados

Segundo GILLES e PÉQUEUX (1983), os metais pesados modificam os transportes ativo e passivo ao nível de membranas celulares, resultando em

deficiência dos processos controladores da osmolaridade das células e fluidos corpóreo em crustáceos.

De fato, modificações no citoesqueleto conduzem a formação de bolhas - *blebs* - na superfície das células e é um fenômeno comum durante o desenvolvimento da toxicidade e freqüentemente precede a morte celular (BELLOMO et al., 1990). Recentes relatos têm demonstrado que a ruptura dos microfilamentos pode induzir a apoptose em linfócitos T. Além disso, linfócitos de rato submetidos a glicocorticóides são induzidos a apoptose e também a uma diminuição na F-actina. Uma vez que as proteínas do citoesqueleto estarão envolvidas em uma série de processos nucleares, a alteração dessas proteínas poderia resultar também em uma mudança conformacional do núcleo, podendo promover a fragmentação do DNA (KOLBER et al., 1990). Alguns metais pesados podem alterar a organização microtubular, e a ausência de orientação implica em uma reorganização do citoesqueleto (CIMA et al., 1998), o qual não está provavelmente destruído, mas alterado em sua extensão e arranjo (WEBER e OSBORN, 1985).

Estudos complementares ainda serão necessários para um melhor entendimento dos efeitos deletérios de poluentes na estrutura celular. Um tipo celular também bastante importante e que apresenta uma grande sensibilidade à presença de poluentes são os hepatócitos, os quais podem servir como um biomarcador sensível da toxicidade de metais pesados, bem como de outros poluentes (HINTON, 1993; BIAGIANTE-RISBOURG, 1997; BRAUBEK, 1998; HINTON e COUCH, 1998; LACKNER, 1998)

1.3. MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)

1.3.1. Fibronectina

É uma importante classe de glicoproteínas adesivas que desempenham um papel relevante em muitas interações entre células e outras moléculas da matriz extracelular. A fibronectina pode ser encontrada na forma plasmática solúvel, a uma concentração de 0,3 g/l e, também ocorre como fibronectina celular, produzida por uma grande variedade de tipos celulares (HUMPHRIES e

YAMADA, 1990; YAMADA, 1991).

A fibronectina é constituída de duas cadeias polipeptídicas semelhantes, que se ligam por pontes dissulfeto nas regiões próximas à região C-terminal. Cada cadeia polipeptídica tem cerca de 60 – 70 nm de comprimento e 2 – 3 nm de diâmetro, com peso molecular de cerca de 250 kDa (ERICKSON; CERRELL; MCDONAGH, 1981).

Apesar da fibronectina ser codificada por um único gene (KORNBLIHTT; VIBE-PEDERSEN; BARALLE, 1983; TAMKUM; SCHWARZBAUER; HYNES, 1984), existem cerca de 20 cadeias diferentes, com diferentes seqüências de aminoácidos, que são geradas por unidades diferentes de uma mesma molécula de RNAm (YAMADA, 1991).

As cadeias polipeptídicas da fibronectina caracterizam-se por conter pequenas seqüências repetitivas de aminoácidos, cuja similaridade permitiu classificá-las como do tipo I, II ou III (PETERSEN et al., 1983). Análises por fragmentação proteolítica e através de técnicas que utilizam DNA recombinante, mostraram que cada cadeia polipeptídica possui pelo menos cinco domínios estruturais e funcionais, separados por regiões flexíveis. Cada domínio é formado por um conjunto de seqüências do tipo I, II, ou III que, por serem sítios de alta afinidade de ligação para macromoléculas da matriz extracelular e para receptores de superfície celular, estão envolvidos em diferentes funções (YAMADA, 1991).

A maioria das células aderem a fibronectina por meio de receptores específicos, que reconhecem um domínio localizado na região central da cadeia, cuja estrutura mínima, mas crucial para o reconhecimento celular é o tripeptídeo Arg-Gly-Asp (RGD) (PIERSCHBACHER e RUOSLAHTI, 1984; YAMADA, 1991).

Outros domínios da molécula, no entanto, podem ser reconhecidos por diferentes tipos celulares. Células embrionárias da crista neural e alguns linfócitos são extremamente hábeis para aderirem a uma região conhecida como IIICS da fibronectina, enquanto que fibroblastos o fazem por outras regiões (MOULD et al., 1991).

A síntese temporal e espacialmente controlada de moléculas de fibronectina, que apresentam diferentes sítios de ligação, pode ser reconhecida

por diferentes tipos celulares e, desta forma, contribuir com diferentes comportamentos celulares durante o desenvolvimento ou a fisiologia de um órgão (GUAN; TREVITHICK; HYNES, 1990).

A expressão da fibronectina em diferentes sistemas *in vivo* e *in vitro* tem enfatizado seu papel em estimular a migração e diferenciação de inúmeros tipos celulares durante o desenvolvimento embrionário, nos processos de reparo tecidual onde sua associação com moléculas de fibrina funciona como um substrato para a migração celular e, como moléculas de adesão para células e outras moléculas (YAMADA, 1991).

Na cicatrização, a fibronectina e suas interações com integrinas exercem papel ímpar na adesão de plaquetas à matriz danificada de colágeno, além de facilitar a migração e adesão de fagócitos e viabilizar a matriz para a proliferação celular. Fibronectina ainda parece estar relacionada ao aumento da aderência e quimiotaxia, dependentes da manutenção da estrutura do citoesqueleto.

É importante na neovascularização, estimulando a migração de células endoteliais e servindo de guia para o movimento de células epiteliais através do tecido de granulação. Fibronectina também tem sua importância nos processos de embriogênese, regeneração de fibras nervosas e migração de células tumorais (MOHRI, 1996).

No período de desenvolvimento embrionário, células germinativas primordiais de anfíbios e aves atravessam um ambiente rico em fibronectina durante sua migração para a crista gonadal (HEASMAN et al., 1981; ALVAREZ-BUYLLA e MERCHANT-LARIOS, 1986). Notável quantidade de fibronectina também aparece associada a laminina basal durante a neurulação, tornando-se, ao que tudo indica, uma via de migração para células da crista neural (DUBAND e THIERY, 1982).

A importância da fibronectina durante o desenvolvimento embrionário torna-se, particularmente evidente, quando as interações celulares com este componente são bloqueadas utilizando-se, por exemplo, anticorpos específicos que mascaram os sítios de ligação. No timo este protocolo impede a diferenciação de células T (SAVINO; VILLA-VERDE; LANNES-VIEIRA, 1993).

1.3.2. Integrinas

✓ Aspectos Estruturais

As integrinas foram originariamente caracterizadas como moléculas de adesão responsáveis pela ancoragem da célula à matriz extracelular, porém, sabe-se hoje, que estas moléculas também estão envolvidas em dinâmica de processos fisiológicos e patológicos, como na transdução de sinais que alteram o “status” fenotípico e comportamental das células (HYNES, 1987).

As primeiras descrições destes receptores reconheciam a presença de antígenos de adesão célula - substrato (CSAT – *Cell Substrate Attachment antigen*), descrevendo sua estrutura como complexas glicoproteínas da membrana celular, envolvidas na adesão célula–matriz (HORWITZ et al., 1985; NEFF et al., 1982). O complexo antigênico CSAT foi mais tarde denominado integrina, devido ao seu papel na integração adesiva entre células e matriz extracelular (RICHARDSON e STEINER, 1995; HYNES, 1987).

Até o presente, quinze subunidades α e oito subunidades β foram descritas, e estas se combinam para formar mais de vinte e cinco receptores integrínicos. Cada um é composto por uma subunidade α não covalentemente associada a uma subunidade β (WHITTARD e AKIYAMA, 2001). As subunidades integrínicas α e β , constituem proteínas transmembranares do tipo I. Cada heterodímero contém um grande domínio extracelular. Os domínios α e β possuem aproximadamente 1000 e 750 resíduos de aminoácidos, respectivamente.

As integrinas em sua grande maioria são glicoproteínas. Recentemente, foi mostrado que a integrina $\alpha_5\beta_1$ em melanoma, é um proteoglicano facultativo (VEIGA et al., 1997). O tamanho das subunidades varia de aproximadamente 90 kDa para as unidades β menores (β_2 e β_3) e 200 kDa para as subunidades maiores (β_4 e α_1). As integrinas também apresentam um simples segmento transmembrânico e uma cauda citoplasmática relativamente curta, geralmente contendo de 20 a 70 resíduos de aminoácidos, exceto o domínio integrínico β_4 , com cerca de 1000 resíduos de aminoácidos (HOGERVORST et al., 1990;

SUZUKI e NAITOH, 1990; TAMURA et al., 1990). A cauda citoplasmática da subunidade β é necessária e suficiente para interligar as integrinas a actina do citoesqueleto (CHOQUET; FELSENFELD; SHEETZ, 1997; BURRIDGE e CHZANOWSKA-WODNICKA, 1996; CALDERWOOD; SHATTIL; GINSBERG, 2000).

Estudos realizados em receptores sintéticos ou mutantes de integrinas, indicam que a subunidade β é necessária e suficiente para manter a integrina nos pontos de adesão focal, enquanto que a subunidade α regula a especificidade das interações ligantes-dependentes (CLARK e BRUGGE, 1995).

Proteínas citoplasmáticas como vinculina, talina e α -actinina interagem com as integrinas e com as proteínas do citoesqueleto (SASTRY e HORWITZ, 1993; BURRIDGE e CHZANOWSKA-WODNICKA, 1996; DEDHAR e HANNIGAN, 1996; BOURDREAU e JONES, 1999; WOODS e COUCHMANN, 2000).

O nome integrina está vinculado ao papel desenvolvido por estas biomoléculas, por interligar o citoesqueleto interno de uma célula com a matriz extracelular (HYNES, 1987; HAAS e PLOW, 1994). As integrinas são expressas em todos os animais multicelulares, mas variam amplamente entre as espécies. Ambas as subunidades α e β incluem membros que são hábeis em associando-se com múltiplas β 's e α 's. As subunidades integrínica β_1 e α_v são particularmente versáteis, e se associam com diferentes subunidades formando diversos receptores (BROWN, 2000a e b; De ARCANGELIS e GEORGES-LABOUESSE, 2000; HYNES e ZHAO, 2000; DANEN e YAMADA, 2001).

A diversidade das integrinas foi expandida pelo "*splicing*" alternativo, modificações pós-traducionais, interações com outras moléculas de superfície celular e intracelular (GREEN; MOULD; HUMPHRIES, 1998; DE MELKER; SONNENBERG, 1999; PLOW et al., 2000).

O enfoque aqui apresentado é direcionado para um grande número de proteínas de matriz extracelular (proteínas da matriz óssea, colágenos, fibronectinas, fibrinogênio, laminínas, trombospondina, vitronectina e fator de Von Willebrand) refletindo a função primária das integrinas, a adesão sobre a matriz extracelular.

Integrinas não são apenas receptores para a adesão celular, mas também

interagem com receptores específicos como os fatores de crescimento, regulando a sobrevivência, diferenciação e proliferação celular (DANEM e YAMADA, 2001).

As células em cultura expressam diferentes tipos de integrinas e a quantidade varia entre as diferentes células. As células nos tecidos apresentam um restrito repertório de integrina apropriado a sua função. Desta forma, células epiteliais, que estão limitadas sobre uma membrana basal, expressam as integrinas $\alpha_6\beta_1$ e $\alpha_6\beta_4$, sendo estes receptores para a laminina, proteína presente na membrana basal.

A membrana basal, ou lâmina basal é um tipo especializado de matriz extracelular, de espessura variável (20/40 a 100/300 nm), disposta sobre todas as camadas celulares epiteliais, endoteliais, em certos tumores, envolvendo individualmente células musculares, adipócitos e, células de Schwann, separando-as da matriz conjuntiva. A membrana basal é composta pela laminina, colágeno Tipo IV, proteoglicano de heparam sulfato (perlecan, agrin ou bamacan) e, entactina (GIANCOTTI e RUOSLAHTI, 1990; BELKIN e STEPP, 2000).

A escolha de seu ligante para qualquer uma das integrinas é determinada pela relativa afinidade, disponibilidade dentro do micro ambiente e, o estado conformacional do ligante, o qual modela a exposição de suas seqüências para o reconhecimento pelas integrinas (sítios críticos).

✓ Integrinas e sinalizações

Estudos recentes têm mostrado melhor entendimento das vias de sinalização ativadas pelas integrinas em células aderentes, como os fibroblastos e epiteliais. Células aderentes estão bem ancoradas sobre uma apropriada matriz extracelular (MEC) adequada para sobreviver. Dependendo em parte das sinalizações vindas da matriz, estas podem proliferar, sair do ciclo celular ou ainda, diferenciar-se. Esta ancoragem é perdida em células neoplásicas.

Mecanismo básico para as sinalizações via Integrina (*Clustering de Integrinas*): As caudas citoplasmáticas das integrinas são geralmente curtas e sempre desprovidas de ação enzimática. Por isso, essas moléculas transduzem

sinais pela associação com proteínas adaptadoras que conectam a integrina com o citoesqueleto através de quinases citoplasmáticas e receptores para fatores de crescimento transmembrânicos. Existe uma íntima ligação entre a sinalização das integrinas e o arranjo do citoesqueleto (Ilustração 1). As integrinas ao interagirem com a matriz extracelular formam agregados - *clusters* - no plano da membrana plasmática e associam-se com o citoesqueleto, formando os filamentos de actina, através de proteínas citoplasmáticas (a integrina $\alpha_6\beta_4$ associa-se a filamentos de queratina através de um grande domínio citoplasmático β_4).

A organização dos filamentos de actina em torno e no interior das fibras de *stress* induz a mais recrutamento de integrinas aumentando cada vez mais a interação com a matriz extracelular. Esta ligação resulta da interligação das proteínas da matriz, integrinas e organização e arranjo das proteínas do citoesqueleto e proteínas quinásicas, formando as adesões focais (BURRIDGE e CHZANOWSKA- WODNICKA, 1996).

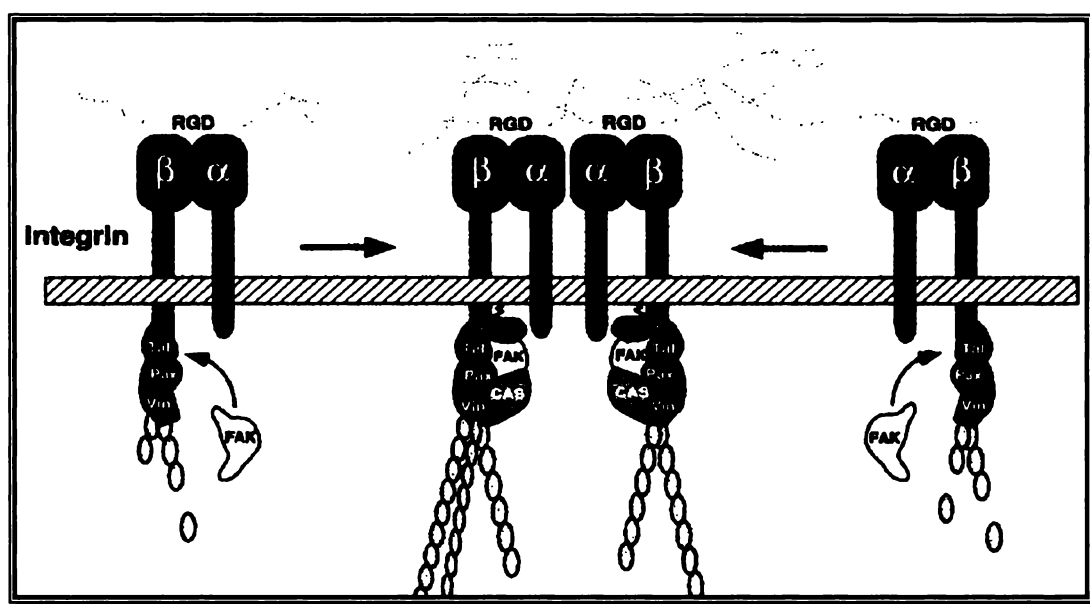


Ilustração 1 – *Clustering* de integrinas decorrentes da ligação com a matriz extracelular e associação com o citoesqueleto. Adaptado de GIANCOTTI e RUOSLAHTI (1990).

✓ Integrinas e transdução de sinais

Uma variedade de mecanismos de adesão reafirma a importância da organização celular na arquitetura tecidual. Interações celulares estáveis são

necessárias para a manutenção da integridade tecidual, e mudanças dinâmicas nesta adesão são importantes nos processos de morfogênese e diferenciação. Estes mecanismos de adesão são altamente regulados e, intimamente relacionados, aos processos de desenvolvimento, migração e morfo-diferenciação celular (GIANCOTTI e RUOSLAHTI, 1990; GUAN e CHEN, 1996).

O controle da adesão celular ocorre em diferentes níveis, e inclui modulação da afinidade e interações com o citoesqueleto de actina (GIANCOTTI e RUOSLAHTI, 1990). Os sinais gerados localmente através dos receptores de adesão celular são envolvidos em meticolosos mecanismos de regulação. Vias de sinalização são ainda influenciadas por receptores de fatores de crescimento e fatores solúveis do meio. Sinais gerados localmente, através da adesão celular, também interagem com as vias clássicas de transdução de sinais, que ajudam a controlar o comportamento celular (GIANCOTTI e RUOSLAHTI, 1990).

A associação entre a adesão física e o desencadeamento de sinalização, integra os diversos aspectos da morfogênese, proliferação celular e diferenciação, sendo esta coordenação essencial para a manutenção da vida (GIANCOTTI e RUOSLAHTI, 1990; GUAN e CHEN, 1996). As integrinas exercem papel fundamental na transdução de sinais que controlam a fisiologia celular. Sua capacidade de sinalização ocorre basicamente através de dois mecanismos chamados de sinalização *inside out* e *outside in*, que regulam as atividades proliferativas e de diferenciação das células adesivas (HYNES, 1987).

O mecanismo *inside out* é o fenômeno pelo qual a célula regula o estado de afinidade de suas integrinas. Este mecanismo parece estar relacionado com a propagação de mudanças conformacionais nos domínios citoplasmáticos em resposta a eventos sinalizadores intracelulares. Evidências correlacionam estas mudanças conformacionais a eventos de fosforilação e desfosforilação, que permitem a associação de proteínas que podem regular o estado de ativação destes receptores (JONES e WALKER, 1999; CLARK e BRUGGE, 1995).

O mecanismo *outside in* vincula sinais originários da matriz extracelular após a ligação de componentes da matriz com integrinas, e envolve a regulação de diversos processos celulares fundamentais, tais como a formação de adesão focal (JONES e WALKER, 1999; CLARK e BRUGGE, 1995). As integrinas,

entretanto, não funcionam como receptores isolados, mas estão associadas a complexos supramoleculares nos locais de adesão celular à matriz (JULIANO, 1996).

A interação das caudas citoplasmáticas das integrinas com as proteínas que medeiam a ligação com o citoesqueleto de actina (talina, α -actinina, paxilina, vinculina e tropomiosina) tem função integrante na estruturação da morfologia e mobilidade celular, além de contribuir sobremaneira na associação de proteínas sinalizadoras que regulam a transdução de sinais, levando a mudanças celulares induzidas por estes receptores (JULIANO, 1996; CLARK e BRUGGE, 1995).

Neste cenário, duas hipóteses tentam explicar os mecanismos básicos de sinalização proveniente da interação entre as integrinas e a matriz extracelular e seu controle sobre a expressão genética, tendo como consequência, mudanças no comportamento celular. A primeira sugere que a reorganização do citoesqueleto resulta em mudanças profundas na morfologia celular, e levam a influenciar seu comportamento, e eventualmente o seu padrão de expressão genética (DANEN et al., 1998). A segunda hipótese enfatiza a função das integrinas como moléculas sinalizadoras, que excitam cascatas de sinalização, gerando mudanças na expressão genética (DANEN et al., 1998).

Entre os sinais que modulam as integrinas destaca-se o aumento do pH intracelular, aumento do cálcio intracelular, síntese de lipídeo inositol e fosforilação de quinases associadas às adesões focais (VARNER e CHERESH, 1996). As vias sinalizadoras ativadas pelas integrinas foram identificadas através de análise dos eventos bioquímicos iniciados pela interação destes receptores com segundo mensageiros, modulando outras proteínas (JULIANO, 1996; CLARK e BRUGGE, 1995).

As tirosinas - quinases, incluindo a quinase de adesão focal (FAK), parecem assumir papel central na sinalização através das integrinas (DANEN et al., 1998; CLARK e BRUGGE, 1995). Sua fosforilação e atividade aparentam estar intimamente relacionadas e controladas por estes receptores (JULIANO, 1996). FAK possui domínio central de tirosina quinase, que representa seu domínio citoplasmático, direcionando-a para contatos focais e mediando sua interação com as integrinas (JULIANO, 1996). FAK ainda participa da fosforilação

de tenascina e paxilina, proteínas estruturais dos contatos focais (JULIANO, 1996). A autofosforilação de FAK cria sítios de ligação das proteínas adaptadoras Grb2/SOS, que ativam cadeias sinalizadoras envolvidas no controle da replicação celular, incluindo Src e Ras (BOUDREAU e JONES, 1999).

Assim, as integrinas promovem a ativação do complexo FAK-Scr, que propicia a formação e dissociação das adesões focais nas frentes de migração, envolvendo quatro fenômenos dependentes da subunidade integrínica β_1 , que incluem: (1) o recrutamento de integrinas através da interação do citoesqueleto com a porção intracitoplasmática destas; (2) o recrutamento intracelular de moléculas adaptadoras e sinalizadoras em direção às adesões focais em formação; (3) alta afinidade de ligação das integrinas induzidas pelo citoesqueleto (sinalização *inside out*), resultando em adesão estável ao substrato e (4) sinalização das moléculas de integrinas em direção ao interior da célula (sinalização *outside in*), finalmente induzindo uma série de dinâmicas celulares que incluem adesão ou migração, diferenciação ou indiferenciação, proliferação ou apoptose (FRIEDL; BRÖCKER, ZÄNKER, 1998).

Por fim, a associação das integrinas ao citoesqueleto de actina exerce força física sobre o núcleo celular, levando a mudanças no citoesqueleto que podem regular eventos nucleares independentemente de proteínas citoplasmáticas e de mensageiros intermediários (GIANCOTTI e RUOSLAHTI, 1990).

As cascatas de sinalização intermediadas pelas integrinas, também irão influenciar a progressão do ciclo celular através da ativação de Jun, Fos e ciclínas, via Ras (GIANCOTTI e RUOSLAHTI, 1990). A regulação positiva e negativa destas cascatas é mediada por fosfatases de tirosina (GIANCOTTI e RUOSLAHTI, 1990). Adicionalmente, a interação das integrinas com receptores de fatores de crescimento, tais como EGF, FGF, e PDGF nos sítios das adesões focais, resulta no aumento da fosforilação destes receptores, acúmulo de substratos que irão fomentar sua afinidade e avidéz por agentes mitogênicos e de sinalização, e aumento da eficiência de sinalização das FAK (BOUDREAU e JONES, 1999).

As integrinas também promovem a ativação da MAP quinase através de sua conexão com as proteínas da matriz extracelular, que incluem fibronectina,

colágeno e laminina 5. A ativação da MAP quinase parece ser independente da ativação de FAK ou Ras, portanto representando via alternativa de sinalização. A ativação da MAP quinase pelas integrinas está implicada no controle do ciclo celular, em situações de proliferação ou diferenciação, que são moduladas pelo micro ambiente da matriz extracelular (GIANCOTTI e RUOSLAHTI, 1990).

A sinalização das integrinas ainda é essencial no controle do ciclo celular e sua evolução através das fases G_0 - G_1 , uma vez que estas regulam a atividade das quinases dependentes de ciclina (Cdk) e parecem estar envolvidas na sinalização de transcrição da ciclina D_1 (JULIANO, 1996). Durante a divisão celular, células dependentes de adesão perdem momentaneamente sua ancoragem, o que facilita a replicação. Em contraste, adesão celular a tipos específicos de matriz extracelular favorece a parada do ciclo, agindo em sinergismo com citocinas e outros fatores solúveis do meio, que orquestram juntamente com as integrinas os fenômenos de morfogênese e diferenciação celular (GIANCOTTI e RUOSLAHTI, 1990). Por outro lado, a perda de adesão causa o fenômeno *anoikis* em células dependentes de adesão. Este fenômeno auxilia na manutenção da integridade tecidual, impedindo a formação de colônias em locais impróprios, por células que perderam o contato com seu meio.

Este fenômeno é parcialmente controlado pela interação integrinas – matriz extracelular, que ativa cascatas sinalizadores da morte celular programada (GIANCOTTI e RUOSLAHTI, 1990). As integrinas ainda são de fundamental importância na ativação de receptores de fatores de crescimento e canais iônicos, por meio de complexos formados a partir de sua associação com o citoesqueleto, porém tais mecanismos ainda estão por ser elucidados. Sabe-se, no entanto, que a conexão de integrinas específicas aos seus ligantes extracelulares induz aumento na concentração intracelular de cálcio (CLARK e BRUGGE, 1995).

Os mecanismos supracitados de forma sumária influenciam o mecanismo celular, gerando modificações de seu comportamento nas mais diversas situações. A composição da matriz extracelular é essencial para a determinação do comportamento fenotípico de cada célula. O elo de ligação entre este estímulo externo e interno que irá transformar-se de acordo com ele, é exercido primariamente pelas integrinas (GIANCOTTI e RUOSLAHTI, 1990).

A morfologia, adesão e migração celular também dependem da sinalização de integrinas. Células em contato com a matriz extracelular desenvolvem adesões focais nas extremidades terminais de seus filopódios. A partir daí, lamelopódios repletos de actina irão se formar, contribuindo para a adesão celular à matriz. Este evento cíclico ocorre durante a migração celular, gerando tração que viabiliza a movimentação das células. As integrinas e fatores solúveis regulam o espraiamento e a migração celular através da ativação de um grupo de proteínas ligadas ao nucleotídeo guanina, família Rho, sendo estas uma família de proteínas vinculadas ao GTP, a qual induzem a formação de lamelopódios, adesões focais e fibras de *stress* (GUMBINER, 1996).

Os conhecimentos atuais sobre as vias de sinalização relacionadas as integrinas ainda são truncados e dependentes de aprofundamento. Trabalhos neste sentido vêm sendo realizados por vários grupos de pesquisadores, a fim de ampliar conhecimentos que possam fornecer subsídios para o estabelecimento de terapias baseadas nestas cascatas sinalizadoras.

✓ Integrinas e adesões focais

Adesões focais constituem agregados bem desenvolvidos presentes na membrana celular, localizadas na interface de adesão entre duas células ou entre as células e a matriz extracelular (GIANCOTTI e RUOSLAHTI, 1990). Estas estruturas dinâmicas em forma de “fita” foram identificadas pela primeira vez através de experimentos *in vitro* empregando microscopia eletrônica (ABERCROMBIE et al., 1971).

A existência das adesões focais tem como pré-requisito a presença de matriz extracelular, e é iniciada através das integrinas, levando a recrutamento de estruturas citoplasmáticas e de proteínas ligadas à membrana celular, tais como paxilina, vinculina, talina, α -actinina e tropomiosina. Esta cadeia de eventos leva à maturação de organelas de adesão e à presença de actina polimerizada, que possivelmente confere à adesão focal, o formato de fita. Portanto, os contatos focais ou organelas de adesão maduras, servem para ancorar o sistema de microfilamentos, contribuindo desta forma, para a determinação do formato celular

durante a adesão, migração e eventos relacionados. Mudanças na forma e no comportamento celular são resultados da dinâmica dos filamentos de actina no que se refere a sua polimerização e despolimerização, e reorganização dos microfilamentos preexistentes (DOGIC; ECKES, AUMAILLEY, 1999).

A formação das adesões focais é regulada por ambos, ligantes da matriz extracelular e eventos intracelulares de sinalização (GUMBINER, 1996). Para a formação efetiva de adesões focais, o sítio de ligação das integrinas deve estar preenchido pelo seu ligante da matriz extracelular (GUMBINER, 1996).

Este evento desencadeia respostas sinérgicas que incluem a reorganização do citoesqueleto e de placas citoplasmáticas associadas a ele, e a ativação de vias de sinalização locais (GUMBINER, 1996). As integrinas têm papel central na regência das adesões focais, regulando a ancoragem e funcionando como elo fundamental entre a matriz extracelular e os componentes intracelulares (DOGIC; ECKES, AUMAILLEY, 1999; SASTRY e HORWITZ, 1993).

✓ Integrinas e ligantes da matriz extracelular

As proteínas da matriz extracelular têm sido relacionadas em eventos de proliferação celular, polaridade, migração e diferenciação durante a morfogênese, reparo e oncogênese. Adicionalmente, a influência da matriz extracelular pode induzir a modulações genéticas, servindo de veículo para a sinalização proveniente de citocinas e outros fatores solúveis do meio (KOUKOULIS et al., 1993).

As interações adesivas entre células e matriz extracelular são mediadas por receptores específicos da membrana celular, e as integrinas representam o receptor de maior importância destas interações (HYNES, 1987). A glicoproteína fibronectina e sua inter-relação com receptores de integrinas parecem ter papel importante em processos fisiológicos e patológicos. A integrina $\alpha_5\beta_1$ é o receptor específico da fibronectina envolvida nas respostas celulares de migração, recrutamento do citoesqueleto e da matriz extracelular (AKIYAMA et al., 1995).

Dois sítios de ligação foram encontrados na estrutura da laminina 1 e estes interagem com as integrinas $\alpha_6\beta_1/\alpha_7\beta_1$ e $\alpha_1\beta_1/\alpha_2\beta_1$. Outras isoformas de laminina

interagem com as integrinas $\alpha_3\beta_1$ e $\alpha_6\beta_1$. A importância funcional destas interações foi confirmada através dos fenótipos deletérios observados a partir de mutações nos genes que codificam lamininas e integrinas, em doenças humanas severas, como a epidermólise bolhosa junctional ou distrofia muscular progressiva (AUMAILLEY e SMYTH, 1998; BURGESSON e CHRISTIANO, 1997).

O contato celular com diferentes isoformas de lamininas leva a diferenças na estrutura e distribuição das adesões focais. A laminina 1 induz a formação de filopódios e adesões focais compactas e bem individualizadas, enquanto que a laminina 5 e outras isoformas de laminina levam ao desenvolvimento de lamelopódios que contém adesões focais pequenas e distribuídas em arranjos radiais paralelos. Análise destas estruturas através de imunofluorescência também revelou a presença da integrina α_6 em ambos os casos, porém a integrina $\alpha_3\beta_1$ não pôde ser identificada nas interações entre células e laminina tipo 1 (DOGIC; ECKES, AUMAILLEY, 1999). Estas evidências mostram que a presença de diferentes receptores de integrina participam de complexas vias de sinalização, interagindo com diversas isoformas de laminina (DOGIC; ECKES, AUMAILLEY, 1999).

O receptor $\alpha_2\beta_1$ é a principal integrina ligante de colágeno, estando presente em fibroblastos, plaquetas, células endoteliais e epiteliais. Suas interações com moléculas de colágeno são dependentes de cátions bivalentes, como o cálcio (DICKESON; WALSH; SANTORO, 1998).

A expressão de colágeno e colagenase também estão sob o controle das integrinas $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_1$ (LANGHOLZ et al., 1995). A organização espacial da matriz de colágeno e suas formas monoméricas ou polimerizadas influenciam a interação com os receptores de integrinas, atuando diretamente sobre a organização do citoesqueleto, orientação e morfologia celular. Em tipos celulares, que mantém contato com o colágeno monomérico, como fibroblastos, o citoesqueleto de actina é bem desenvolvido e as adesões focais estão presentes nas extremidades dos microfilamentos. Em contraste, sobre colágeno fibrilar, as adesões focais aparecem como estruturas esmaecidas e granulares. Estas evidências mostram o estado monomérico ou polimerizado do colágeno o qual influencia na qualidade da matriz extracelular, que por sua vez causa alterações

na morfologia e arquitetura celular (DOGIC; ECKES, AUMAILLEY, 1999).

Outras proteínas da matriz extracelular vêm ganhando maior atenção como ligantes de integrinas, dentre elas destacam-se a tenascina e epiligrina (HAAS e PLOW, 1994). A tenascina é uma glicoproteína composta de múltiplos domínios distintos, incluindo regiões homólogas à fibronectina do tipo III, que possuem a seqüência RGD e são condescendentes com o espalhamento e adesão celular mediados pela integrina α_v (HAAS e PLOW, 1994).

A epiligrina é um componente da membrana basal epitelial, sendo sintetizada primordialmente por queratinócitos na membrana basal. A adesão de queratinócitos, bem como a de linfócitos T à membrana basal do epitélio parece estar relacionada à ligação entre a integrina $\alpha_3\beta_1$ e epiligrina, que atua na preservação da arquitetura epitelial (HAAS e PLOW, 1994). A integrina $\alpha_9\beta_1$ também foi recentemente detectada em queratinócitos basais da pele, vias aéreas, mucosas e córnea, e, aparentemente também está envolvida na preservação da integridade epitelial e em processos patológicos ligados a ela (HAAS e PLOW, 1994).

1.4. MORTE CELULAR PROGRAMADA

A apoptose foi inicialmente definida por critérios morfológicos, dentre os quais encontra-se a condensação da cromatina no núcleo (KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980). Hoje é definida como morte celular programada. É caracterizada por uma série de mudanças morfológicas e bioquímicas. Vários genes relacionados a apoptose têm sido encontrados (DU et al., 1997; EVAN e LITTLEWOOD, 1998; PETER et al., 1997). Um grupo de genes regulatórios de apoptose é a família *bcl-2*. Desses genes, *bcl-2*, *bcl-x_L* são anti-apoptóticos, ao passo que *Bax*, *bcl-x_s*, *bad*, *bak* e *bik* são pró-apoptóticas. A dimerização do fator anti-apoptótico Bcl-2 com o fator pró-apoptótico Bax é um critério de interação. As células continuam a sobreviver se a proteína Bcl-2 predominar sobre Bax. Ao contrário, uma alta concentração de Bax, comparada com Bcl-2, aumenta a suscetibilidade da célula para apoptose (ADAMS e CORY, 1998; OLTVAI et al., 1993).

A p53, um fator de transcrição do DNA inicialmente identificado como um supressor de tumor, é também um importante fator regulatório de morte celular. Isto tem sido mostrado como um fator transcricional do gene *Bax*. A ação da p53 pode levar a um aumento nas taxas de Bax na dimerização da Bax/Bcl-2 e assim contribuir para o início da apoptose (HUGHES *et al.*, 1997; MIYASHITA e REED, 1995). Alguns outros genes anti-apoptóticos e pró-apoptóticos têm sido identificados em diferentes tipos celulares. Por exemplo, *c-Myc*, a proteína codificada pela oncogene *c-myc*, é um fator de transcrição. Entretanto, *c-Myc* induz a apoptose quando fatores de crescimento semelhante à insulina e fatores de crescimento procedentes de plaquetas não estão acessíveis (STAUNTON e GAFFNEY, 1998). Quando os efetores de morte celular, a família mais importante no processo de apoptose é o grupo de proteases, chamadas de caspases (GERMAN *et al.*, 1998). Caspases são ativadas durante a apoptose e a clivagem de certas proteínas estruturais por estas proteases causam algumas mudanças morfológicas que permitem identificar a célula em apoptose (PORTER e JÄNICKE, 1997; STROH e SCHULZE-OSTHOFF, 1998).

A morte celular programada pode ser identificada de várias formas, baseando-se apenas nos aspectos morfológicos ou pela marcação de algumas proteínas chaves no fenômeno. Aspectos morfológicos como a cromatina altamente condensada e localizada radialmente no núcleo de células apoptóticas, é facilmente detectada em microscopia eletrônica de transmissão. Outra característica inclui o aumento da densidade do citoplasma, a presença de *blebs* na membrana celular, alteração na forma do núcleo e da célula (KERR *et al.*, 1972).

A marcação de proteínas-chave no processo de apoptose constitui uma ferramenta interessante no processo de identificar células em processo de apoptose, tanto no tecido como em cultivo. A marcação das caspases e da proteína Bax, define o estado bioquímico da célula no processo. A ativação de caspases 8 e 9 determina o início do processo em cadeia de ativação das caspases; já a marcação da ativação da caspase 3, caspase efetora, já determina o final da cadeia, caracterizando um processo já irreversível da morte celular. A expressão da proteína Bax, proteína pró-apoptótica, sinaliza para um aumento a

suscetibilidade da célula para apoptose (ADAMS e CORY, 1998; OLTVAI et al., 1993).

Os testes de genotoxicidade como o Teste Cometa, possibilita também observar fenômenos apoptóticos adiantados, onde a quebra do DNA é facilmente identificada e quantificada neste método. Como a base do processo de morte celular programada é a quebra do DNA pela ativação das endonucleases, o que caracteriza a irreversibilidade do processo, a visualização dos fragmentos de DNA adiciona informações favorecendo um diagnostico mais preciso do evento. Alguns autores têm utilizado este teste para estudar os efeitos genotóxicos em linfócitos de um grupo ocupacional exposto ao chumbo (BETTI et al., 1994; SINGH et al., 1998; VODICKA et al., 1999), também confirmado pelos estudos realizados por FRACASSO et al. (2002).

1.4.1. Chumbo e apoptose

Recentemente tem sido sugerido que existe uma interação entre o sistema neurotransmissor glutamatérgico e o neurotoxicidade induzido pelo Pb(II). O chumbo inibe a função de receptores glutamatérgicos-N-metil-D-aspartato (NMDA) (GUILART, 1997), afeta a expressão de diferentes subunidades receptoras NMDA (NIHEI e GUILARTE, 2001) e diminui a ligação de glutamato dependente de estímulo (LASLEY e GILBERT, 2002). Uma vez que o glutamato e seus receptores são importantes nas mudanças sinápticas que, pensa-se ser, essenciais no aprendizado e memória (MALENKA e NICOLL, 1999), desordens cognitivas induzidas pelo Pb(II), como deficiência de aprendizado observado em crianças (FINKELSTEIN et al., 1998) deve resultar dos efeitos do Pb(II) no NMDA (GUILARTE, 1997) e liberação de glutamato (LASLEY e GILBERT, 2002). A morte neuronal induzida por espécies reativas de oxigênio (ROS) e *stress* oxidativo podem ser mediados através de apoptose (CHANDRA et al., 2000). Evidências acumulativas o ROS devem agir como moléculas assinaladoras para iniciação e execução da morte celular por apoptose em muitos, senão todos modelos atuais de morte celular programada (HENGARTNER, 2000). Além disso, não é incomum encontrar trabalhos relatando a exposição de metais com

apoptose. O envolvimento das ROS na apoptose induzida por metais tem sido relatado para arsênio (BENNETT, 1999), cádmio (PLUQUET e HAINAUT, 2001) e cromo (SIMONS, 1993). Existem poucos estudos que têm investigado e indicado uma associação entre a exposição ao Pb(II) e a apoptose neuronal. O chumbo pode romper a homeostase celular de cálcio (SIMONS, 1993) e levando a morte celular por apoptose (HE et al., 2000). A interação do glutamato com o Pb(II) resulta no *stress* oxidativo (NAARALA et al., 1995). Podendo agir como um gatilho para a apoptose mediada por mitocôndrias, que está associada com a liberação do citocromo c e ativação da caspase 9, que subsequente ativa a caspase 3 (GUILARTE, 1997), observado em retinas tratadas com Pb(II) (HE et al., 2000). Foi observado, portanto que a exposição do Pb(II) diminui a síntese de ATP, libera o citocromo c de mitocôndrias, e aumenta a atividade das caspases da retina. Retina isolada de rato exposta ao Pb(II) produz apoptose em menos de 1 hora (HE et al., 2000) enquanto que mais tempo foi necessário para que o Pb(II) sozinho ou associado ao glutamato pudesse causar apoptose em uma linhagem em neurônios mostrando diferentes mecanismos envolvidos. De acordo com os resultados, a p53 não está envolvida com a contaminação do chumbo sozinho, ou associado ao glutamato em neurônios de linhagem imortalizada GT1-7 (LOIKKANEN et al., 2003).

Uma vez que os efeitos causados pelo chumbo nos sistemas biológicos ainda encontram-se pouco elucidados, faz-se necessário investigar a que nível sub-letal este xenobionte é potencialmente capaz de provocar danos aos organismos vivos, inclusive ao homem. A partir destes fatos objetivamos investigar os efeitos causados do Pb(II) sobre um determinado tipo celular. O modelo para esta investigação foi o macrófago peritoneal através de sistema *in vitro*, fundamental para a compreensão dos mecanismos toxicológicos e possibilitando outros estudos mais sofisticados. Os estudos *in vitro* permitem controlar melhor os fatores exógenos, os quais podem ser analisados individualmente ou em combinação, da mesma forma que se pode utilizar múltiplas condições experimentais com populações de células obtidas de um mesmo animal ou um *pool* de animais. As células utilizadas no presente trabalho foram macrófagos peritoneais de camundongos *Swiss*, uma vez que estes são

bastante representativos do ponto de vista da homeostase orgânica e por já apresentarem um protocolo de cultivo bastante utilizado no departamento. Esperamos com esta investigação apontar alguns dos principais efeitos causados pelo chumbo inorgânico na fisiologia e morfologia celular, colaborando para o conhecimento do mecanismo de toxicidade do Pb(II) na célula. Esperamos ainda, que os resultados alcançados através da aplicação destas técnicas, venham a instigar novas e mais aprofundadas análises dos efeitos que este xenobionte pode e poderá causar nos organismos vivos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos do chumbo Inorgânico Pb(II) dissolvido no meio de cultura em macrófagos peritoneais de camundongos *Swiss (Mus musculus)*, através de ensaios utilizando cultivo primário *in vitro*.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a viabilidade de macrófagos após o tratamento com duas concentrações e diferentes tempos de exposição ao Pb(II) diluído no meio de cultivo, através da técnica de exclusão do azul de Tripán;
- ✓ Estudar o efeito de duas concentrações diferentes de Pb(II) em macrófagos, através de estudos morfológicos comparativos (microscopia de luz e microscopia eletrônica) após diferentes tempos de exposição;
- ✓ Avaliar os efeitos do Pb(II) na organização estrutural do citoesqueleto em macrófagos utilizando técnicas de imunofluorescência em microscopia confocal, após 72h de exposição;
- ✓ Avaliar o potencial genotóxico do Pb(II) em macrófagos após 72h de exposição;
- ✓ Avaliar o efeito do Pb(II) na expressão de proteína pró-apoptótica Bax em macrófagos após 72h de exposição, através de imunomarcacão e microscopia confocal;
- ✓ Verificar o efeito do Pb(II) na capacidade fagocítica dos macrófagos após 72h de exposição em duas diferentes concentrações diluídas no meio de cultura;
- ✓ Estudar o efeito do Pb(II) na capacidade de adesão dos macrófagos sobre a fobronectina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. REAGENTES

3.1.1. Lista dos imunomarcadores utilizados nas marcações

- ✓ Fibronectina - esta molécula foi purificada no Laboratório de Matriz Extracelular, do Departamento de Biologia Celular, a partir de plasma humano fresco (obtido do Hospital das Clínicas - UFPR), por cromatografia de afinidade em gelatina (*Shepharose*, Pharmacia, LK Biotechnology, Uppsala, Sweden) segundo metodologia descrita por AKIYAMA e YAMADA (1985) e utilizada na concentração de 10µg/mL.
- ✓ Faloidina – microfilamentos de actina F foram detectados com a toxina produzida pelo cogumelo *Amantia faloide*, conjugada com flúor-cromo FITIC (isiotiocianato de fluoresceína) adquirido comercialmente da MOLECULAR PROBE. A diluição utilizada foi 1:250, em PBS/BSA 1% por 20 minutos.
- ✓ DAPI – (4', 6 Diamino-2-fenilindole, dihidrocloride). Foi adquirido comercialmente da MOLECULAR PROBE (Eugene, OR, USA), diluído 1:10.000 em PBS/BSA 1%, por 5 minutos.
- ✓ Bax – Santa Cruz, USA – Anticorpo policlonal produzido em coelho (anticorpo secundário ALEXA FLUOR 594), adquiridos da MOLECULAR PROBE, (Eugene, OR, USA). Foi utilizado com diluição de 1:300 em PBS/BSA 1%/saponina 0,01% por 30 minutos.
- ✓ FAK – Santa Cruz – SC – 558G – Anticorpo policlonal produzido em cabra (anticorpo secundário ALEXA FLUOR 594), adquiridos da MOLECULAR PROBE, (Eugene, OR, USA). Foi utilizado com diluição de 1:300 em PBS/BSA 1%/saponina 0,01% por 30 minutos.
- ✓ Integrina α_5 – anticorpos monoclonais de coelho que reconhecem a porção (aminoterminal) da integrina α_5 , foram adquiridos comercialmente (CHEMICON INTERNATIONAL INC., Temecula, CA, USA) e utilizados na concentração de 0,2mg/ml. Como anticorpo secundário empregamos anti

IgG de coelho produzido em cabra (Conjugado com Alexa Fluor 488), adquiridos da MOLECULAR PROBE, (Eugene, OR, USA). Foi utilizado com diluição de 1:300 em PBS/BSA 1%/saponina 0,01% por 30 minutos.

3.1.2. Lista de reagentes utilizados

- ✓ Antibiótico Estreptomicina (Sigma – USA)
- ✓ Antibiótico Penicilina (Sigma – USA)
- ✓ Acetona (Merk – Alemanha)
- ✓ Ácido cacodílico (Serva – Feinbiochemia – Gmbh & Co)
- ✓ Ácido acético glacial (Synth – Brasil)
- ✓ Ácido pícrico P.A. (Cinética – Brasil).
- ✓ Acetato de uranila (TED PELLA, Inc.).
- ✓ Agarose (Standard Low-MR) da Biorad Laboratories, Inc. (Hercules, C, EUA).
- ✓ Álcool Etílico (MERK – Alemanha)
- ✓ Alexa Fluor 488 – (MOLECULAR PROBE)
- ✓ Azul de toluidina da Fisher Scientific Co. (Fair Laun, NY, EUA).
- ✓ Azul de Tripán (Gibco – USA)
- ✓ Bicarbonato de sódio (Reagen – Brasil)
- ✓ BSA (Soro bovino de albumina – Sigma – USA)
- ✓ Cacodilato de sódio (Reagen – Brasil).
- ✓ Chumbo inorgânico Pb (NO₃)₂ (Aldrich Chemical Company, Inc. – USA)
- ✓ Cloreto de cálcio (Reagen – Brasil)
- ✓ Cloreto de potássio P.A. (Reagen – Brasil)
- ✓ Cloreto de Sódio P.A. (Reagen – Brasil)
- ✓ Corante Brometo de etídeo (Sigma – USA)
- ✓ DAPI (Molecular PROBE, Eugene, OR, USA)
- ✓ Detergente Extran (Merk – Alemanha)

- ✓ DMSO (1,2-diamenoetano, 1,3-deaminopropano, demetilsulfóxido da Aldrich Chemical Company, Inc. (Milwauker, WI, EUA).
- ✓ EDTA (Ácido Etilenodiaminotetra acético – Synth – Brasil)
- ✓ Etanol P.A. (Merk – Alemanha)
- ✓ Éter etílico P.A. (Quimex – Brasil)
- ✓ Fluormont G - Electron Microscopy Science (EMS) P.O. Box 251, 321 Morris Road Ft. Washington, P.A. 19034
- ✓ Formol (Quimex – Brasil)
- ✓ Fosfato de sódio dibásico P. A. (Vetec – Brasil).
- ✓ Fosfato de sódio dibásico P. A. (Cinética – Brasil).
- ✓ Giemsa (Merk – Alemanha)
- ✓ Glicina (Merk, Darmstadt, Alemanha).
- ✓ Glutaraldeído (Sigma – USA)
- ✓ Hepes (N-[2-hidroxyethylpiperazine – N – [2-ethanesulphonic acid]]) (USB – USA)
- ✓ Hidróxido de sódio (Reagen – Brasil)
- ✓ Lamínulas de microscopia 13mm (Glass Técnica Brasil)
- ✓ Meio DMEM (Dulbecco modificado/Gibco – USA)
- ✓ Óxido de propileno (Merk – USA)
- ✓ Paraformaldeído (ampola da Ladd Research Industries, Burlington, VT, USA)
- ✓ PBS (MERK, Darmstadt, Alemanha)
- ✓ Permout (Fischer Chemicals – USA)
- ✓ Resina Epon - Electron Microscopy Science (EMS), Inc. USA
- ✓ Revelador D-76 e fixador da Eastman Kodak Co. (Rochester, NY, EUA).
- ✓ Reynold's (Citrato de chumbo/Sigma – USA)
- ✓ Saponina (Sigma Chemical Co / USA)
- ✓ Sarcosianato de sódio (Sigma – USA)

- ✓ Soro bovino fetal (SBF/Cibco-™ - USA).
- ✓ Solução fosfato salina (PBS) – Reagen - Brasil
- ✓ Tetróxido de ósmio - Electron Microscopy Science (EMS), Box 251. FT Washington P.A. 19034, 4% 19152, 2mL/amp.
- ✓ TRIS (hidrometil aminometano) Reagen – Brasil
- ✓ Triton X–100 (t-octylphenoxypolyethoxyethanol).
- ✓ Unidade filtrante descartável Millex GV (MILLEX)
- ✓ Xilol (Quimex – Brasil)

3.2. DESIGN EXPERIMENTAL COM MACRÓFAGOS (Mφs)

Foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos *Swiss Mus musculus* (Linné, 1758) machos, de dois meses de idade devido à facilidade para obtenção destes Mφs, que possuem menos tecido adiposo, com massa variando entre 30 e 33g. Estes animais foram obtidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Os animais foram sacrificados por inalação com éter etílico para exposição do peritônio. O lavado peritoneal foi coletado após inoculação de tampão fosfato salina (PBS), pH 7,2 estéril, e em seguida, as células foram aspiradas e plaqueadas em lamínulas de vidro e em garrafas de cultura, mantidas em estufa durante 30 minutos, a 37°C e 5% de CO₂. Após este tempo, o sobrenadante com células não aderidas, foi substituído por meio de cultivo (DMEM/Gibco) com 15% de soro bovino fetal (SBF/Gibco), 10 unid./mL de Penicilina, 10 µg/mL de Estreptomicina, 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 CO₂. Após essas 24h, as células foram tratadas com chumbo inorgânico [Aldrich Lead II nitrato, Pb(NO₃)₂] em duas concentrações, 20 e 40µM, ficando expostas ao metal pelos períodos de 4h, 24h e 72h, acompanhadas de um grupo controle não exposto. Os grupos experimentais e as repetições foram realizados em quadruplicatas para cada tratamento.

3.3. VIABILIDADE CELULAR

Para o teste de viabilidade celular, utilizou-se o método da exclusão de Azul Tripán, no qual a monocamada de células foi “removida” através da raspagem das garrafas com uma *cellscraper* e centrifugadas a 1500 rpm por 5 min. Já os macrófagos aderidos nas lamínulas, o Azul de Tripán foi utilizado diretamente sobre os mesmos. Após 5 minutos, foi realizada a contagem das células pela exclusão do azul de Tripán para ambos os testes. A percentagem (%) de células viáveis foi segundo (HUDSON e HAY, 1989).

3.4. ANÁLISE MORFOLÓGICA

3.4.1. Microscopia de Luz (ML)

As lamínulas com as células foram fixadas em Bouin por 5 minutos e lavadas 3X em álcool 70%. Posteriormente, os macrófagos foram corados com Giemsa (1:5 dH₂O, pH entre 6 e 7) por 10 minutos. As lamínulas foram então desidratadas em uma bateria crescente de etanol e xilol. Finalmente, elas foram montadas em Permount, analisadas e fotografadas em microscópio óptico (ZEISS/AXIOPHOT/HBO 50).

3.4.1.1. Alterações Morfológicas de Macrófagos

Foram realizadas contagens dos Mφs que apresentavam as seguintes alterações morfológicas: citoplasma claro e vacuolizado, apresentando várias projeções citoplasmáticas; grânulos citoplasmáticos densos, núcleos (grandes, lobulados, claros com muita eucromatina e nucléolo evidente). Contaram-se campos contendo vinte células tanto para o grupo controle como para os grupos tratados. Foram utilizados os testes estatísticos ANOVA seguido do teste Dunnett's (comparando-se com o controle).

3.4.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os Mφs foram fixados em solução de Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%; paraformaldeído 4%; cacodilato de sódio 0,1M; CaCl₂ 0,1M) por 2h, lavados em tampão cacodilato de sódio 0,1M e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão de cacodilato de sódio 0,1M por 1h. Em seguida foram então desidratados em série crescente de etanol P.A. (MERK®) e óxido de propileno (Sigma®), e incluídos em resina Epon (EMS®). Após polimerização em estufa a 60°C por 72h, os blocos foram trimados, realizados os cortes finos e corados com azul de toluidina borificado 1%. Foi selecionada a região de cortes ultrafinos que foram obtidos no ultramicrotomo (Sorvall-Blum/MT2-B-Ultra-Microtome). Os cortes

foram contrastados com acetado de uranila 5% durante 30 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.

3.4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os Mφs foram fixados em solução de Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%; paraformaldeído 4%; cacodilato de sódio 0,1M; CaCl_2 0,1M) por 2h, lavados em tampão cacodilato de sódio 0,1M e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M por 1h. Os Mφs sofreram então nova lavagem em tampão cacodilato de sódio 0,1M e foram desidratados em etanol P.A da (MERK®). Após passar pelo ponto crítico (CO_2) (CPD – Balzers) e por metalização (SCD-030-Balzers-Union SL 9496) com ouro, as células foram observadas no microscópio Eletrônico de Varredura PHILIPS - XL 30 (Laboratório LACTEC/UFPR).

3.5. FLUORESCÊNCIA E IMUNOFLUORESCÊNCIA

3.5.1. Imunomarcção para microfilamentos de actina, Integrina α_5 , Bax e FAK.

Os Mφs foram fixados em paraformaldeído 2% (paraformaldeído 20% em ampola da Ladd Research Industries, Burlington, VT, USA) diluído em PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. Os radicais aldeídos foram bloqueados com glicina 0,1M por 2 minutos. Posteriormente foram lavados duas vezes com PBS. A membrana plasmática foi permeabilizada com saponina 0,01% (Sigma Chemical Co) em PBS por 20 minutos, e os sítios inespecíficos foram bloqueados através de BSA 1% (Sigma®). Em seguida, os Mφs foram incubados com os respectivos anticorpos primários, diluídos em PBS acrescidos de BSA 1% mais saponina 0,01% por 1h a temperatura ambiente. Após submetemos a lavagens em PBS (3X), posteriormente em PBS acrescido de saponina 0,01% mais 3 X. E mais 2X com PBS. Após estas lavagens, bloqueamos novamente os sítios inespecíficos

com PBS acrescido de BSA 1% por 20 minutos. E incubamos com os respectivos anticorpos secundários ALEXA FLUOR 594 (para Bax e FAK) para integrina α_5 o fluorcromo foi ALEXA FLUOR 488. Para todos os secundários empregamos uma diluição de 1:300 em PBS/BSA1%/saponina 0,01%, incubamos por um período de 30 minutos no escuro. Após a incubação lavamos 3X com PBS, posteriormente em PBS acrescido de saponina 0,01% mais 3X, finalmente 2X com PBS. Ao término das reações de imunomarcção, o núcleo foi corado com DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindole, dihidrocloride), durante 5 minutos (1:10.000 em PBS). Em seguida, as lamínulas contendo os macrófagos foram lavadas cinco vezes com PBS, mergulhadas rapidamente em água bidestilada, montadas em lâminas (Glass Técnica Brasil) com Fluormont-G 2:1 em PBS (meio de montagem aquoso) (SEM-Electron Microscopy Science, Washington, PA, USA), as lamínulas foram vedadas com esmalte isento de formol, observadas no microscópio confocal (Nikon Eclipse E-800 acoplado a um Confocal Radiance 2100 device com 2 lasers).

3.5.5. Teste Cometa

O teste cometa foi realizado de acordo com o método desenvolvido por SINGH e colaboradores, (1988), com pequenas modificações. Lâminas de Møφs foram montadas com 10 mL da suspensão mais 120 mL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%), a 37°C. As lâminas permaneceram em uma solução de lise (1mL de Triton X-100, 10 ml de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque, pH 10,0 – solução estoque: NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10 mM, 8,0g NaOH sódio, 10g de sarcosianato de sódio para 1L) em geladeira por 1h. Após a lise, as lâminas permaneceram em tampão NaOH (0,3) + 1mM de EDTA pH>13 por 20 minutos para desnaturação do DNA e 20 minutos de corrida de eletroforese a 25V, 300 mA. Então as lâminas foram neutralizadas com Tris 0,4M por 15 minutos e fixadas em etanol por 10 minutos. A coloração foi realizada com o corante Brometo de Etídeo 0,02 g/mL. Em cada lâmina preparada, 100 nucleóides foram analisados em fotomicroscópio ZEISS, e classificados visualmente em 4 classes de acordo com o tamanho da cauda (0, 1, 2 ou 3), onde o tipo 0 equivale aos

nucleóides sem danos, e os demais representam nucleóides com danos no DNA. Para análise estatística foi aplicado o teste do Qui-quadrado.

3.6. ATIVIDADE FAGOCÍTICA

Para os ensaios de fagocitose, os Mφs foram submetidos ao chumbo inorgânico em duas concentrações, 20 e 40μM, durante 72h, acompanhados de um grupo controle. A atividade fagocítica foi avaliada a partir da interação com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* diluídas e homogeneizadas em 10 mL de PBS (pH 7,4), Incubou as leveduras com os Mφs em uma relação de (10:1) durante 1h. Após o período de incubação, as células foram novamente lavadas com PBS (pH 7,4) para remoção das leveduras não fagocitadas. Posteriormente foram fixadas e processadas para a microscopia de luz, e coradas com Giemsa (MERK®). Em cada experimento foram realizadas 5 réplicas para cada grupo de tratamento. Foram contados de 100 a 150 Mφs por lamínula, sendo o n° total de Mφs, o n° de Mφs com leveduras e o n° de leveduras internalizadas determinadas para cada amostra. O cálculo do índice endocítico foi realizado segundo BUCHI e DE SOUZA (1992; 1993), a partir da utilização das seguintes equações:

$$\% \text{ Ma} = \text{Ma} / \text{Mt}$$

$$\text{I.E.} = \text{Mi} / \text{Ma} \times \% \text{ Ma}$$

Onde:

I.E. = índice endocítico

Mi = n° de microrganismos internalizados

Ma = n° de Mφs com microrganismos

Mt = n° total de Mφs

3.7. ENSAIOS DE ADESÃO

As células foram mantidas em cultura conforme descrito anteriormente na presença e na ausência de Pb(II) em concentrações de 20 e 40μM por períodos de 72h em estufa a 37°C, 5% CO₂. Posteriormente placas de 24 “wells” de

Poliestireno (Nalge Nunc International Corporation-Naperville, IL, USA), foram sensibilizadas por 2h em estufa a 37°C, 5% CO₂, com fibronectina (10µM) diluída em PBS estéril. Após o período de 2 horas na estufa, as placas foram mantidas *overnight* a 4° C. Posteriormente, no momento dos ensaios, os poços foram aspirados e lavados com PBS estéril, e os sítios inespecíficos foram bloqueados incubando com BSA 1% (Albumina sérica bovina (BSA) frasco V da Sigma Chemical Co. (St. Louis,MO,USA) desnaturado pelo calor, diluído em PBS estéril durante 1h a 37°C 5% CO₂. Para controle de adesão inespecífica foi empregada a albumina 1% (BSA).

Após aos períodos de exposição ao Pb(II) nas diferentes concentrações, as células foram lavadas 2 vezes com meio (DMEM/Gibco), e posteriormente plaqueadas (2×10^5) nos poços contendo previamente (500µl) de meio (DMEM/Gibco). A viabilidade celular foi previamente avaliada pelo teste do Azul de Tripan, onde tanto as células controles quanto às expostas a 20 ou 40µM de Pb(II) apresentaram em torno de (98% viáveis). Após o período de adesão de 2 horas a 37°C 5% CO₂, as células não aderidas foram removidas cuidadosamente por lavagens sucessivas com PBS. As células aderidas foram fixadas com metanol PA (Merk®) por 10 minutos. Coradas com Cristal Violeta 0,8% (Sigma®) dissolvido em 20% de metanol (Merck®) durante 10 minutos. Foram então lavadas 10 vezes com PBS. Os resultados foram expressos após leituras de absorbâncias a 540 nm no leitor de Elisa (ELX 800, Universal Microplate Reader Bio-TEK Instruments, INC.). O corante foi diluído com (1000µl de citrato de sódio 0.1M, 50 % etanol), por 30 minutos. Os resultados das absorbâncias das células aderidas em cada poço foram expressos em relação aos grupos controles, adesão sobre o BSA. Cada variável foi processada em triplicata. As células foram fotografadas aleatoriamente (objetiva 10 x 10) em fotomicroscópio invertido (NIKON-Eclipse 8800).

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.8.1 Viabilidade celular

Para a viabilidade celular, 600 Mφs foram contados em lamínulas e garrafas, em três repetições de 200 Mφs cada. A média das três contagens foi transformada em percentagem de Mφs viáveis e representadas graficamente. Os testes estatísticos realizados foram ANOVA seguido do teste Dunnett's (comparado com o controle).

3.8.2 Alterações morfológicas dos macrófagos

Foram considerados Mφs alterados aqueles que apresentavam as seguintes características morfológicas: citoplasma claro e vacuolizado com várias projeções citoplasmáticas; grânulos citoplasmáticos densos, núcleos grandes, lobulados, claros com muita eucromatina e nucléolo evidente. Quinze campos com vinte células cada (cinco campos por lamínula, totalizando 300 Mφs) foram contados para o controle e para os grupos tratados. Foram utilizados os testes estatísticos ANOVA seguido do teste Dunnett's (comparado com o controle).

4. RESULTADOS

4.1. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

A análise estatística dos dados de viabilidade celular por tempo de exposição ao Pb(II), mostrou que os Mφs do grupo controle após 4h resultou em mais de 90% dos Mφs viáveis ($P < 0,01$). Nas células mantidas por 24 e 72h nas mesmas condições houve um decréscimo na viabilidade chegando a 82% ($P < 0,05$). Já os resultados para os Mφs expostos ao xenobionte tanto na concentração de 20μM como na de 40μM, mostraram um decréscimo na viabilidade ($P < 0,05$), sendo este valor significativamente diferente do controle, embora não tenha sido encontrada diferença significativa entre os dois grupos tratados. Quando comparados os dois métodos de cultivo aqui empregados (lamínulas e garrafas), observamos que embora não ocorra diferença significativa, as células que cresceram em garrafas (Figura 2) tiveram uma viabilidade ligeiramente maior quando comparadas com as que cresceram em lamínulas (Figura 1).

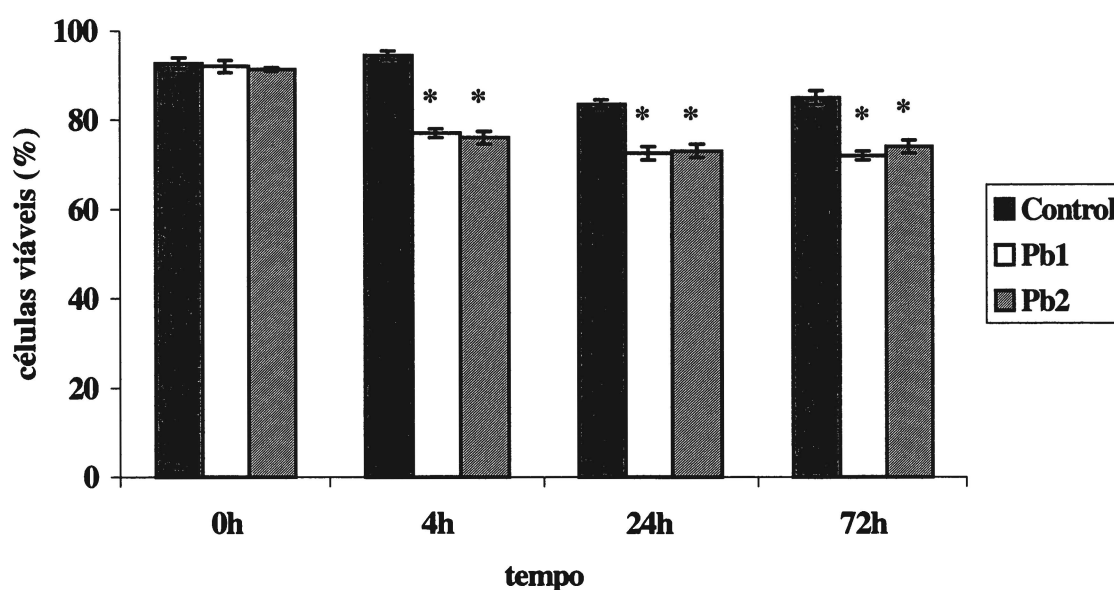


Figura 1 – Gráfico de viabilidade celular de macrófagos cultivados em lamínulas e submetidos à exposição de duas diferentes concentrações de chumbo inorgânico Pb1 (20 μM) e Pb2 (40μM), ($p < 0,05$).

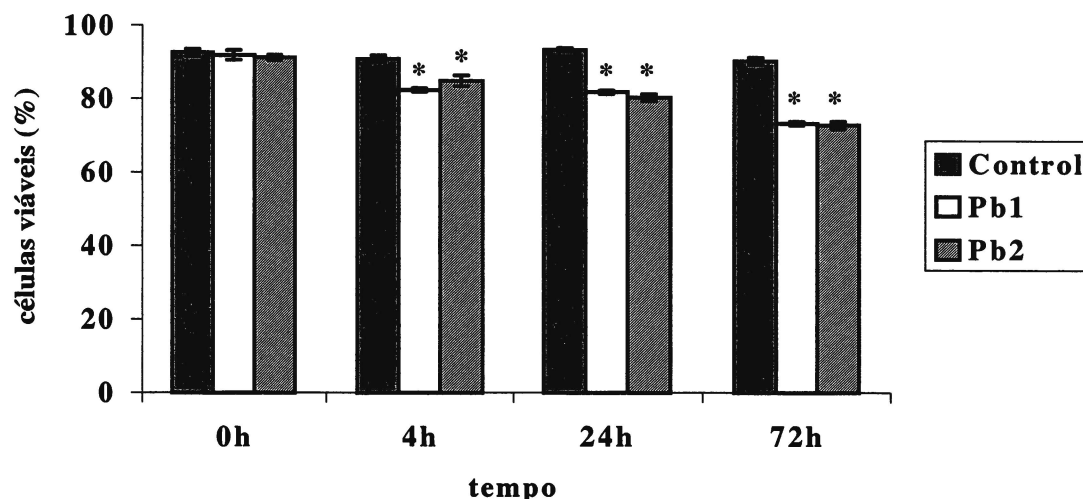


Figura 2 – Gráfico de viabilidade celular de macrófagos cultivados em garrafas e submetidos à exposição de duas diferentes concentrações de chumbo inorgânico Pb1 (20 μ M) e Pb2 (40 μ M), ($p < 0,05$).

4.2. ANÁLISE MORFOLÓGICA

4.2.1. Microscopia de Luz (ML)

Os Macrófagos peritoneais foram tratados com chumbo inorgânico em duas concentrações, 20 e 40 μ M, durante 4, 24 e 72h. Utilizando critérios morfológicos, foram diferenciados os M ϕ s com alterações estruturais dos controles. Os M ϕ s residentes apresentaram citoplasma escasso e ausência de grânulos citoplasmático densos, núcleo pequeno, escuro, oval ou reniforme (Figura 7A). Observações realizadas nos M ϕ s dos grupos controle mostraram que a maioria das células apresentaram-se com características de residentes, no período de 4, 24 e 72h. Já os M ϕ s identificados como células morfolologicamente alteradas, apresentaram citoplasma claro e vacuolizado com várias projeções citoplasmáticas, sendo que alguns deles apresentaram grânulos citoplasmáticos densos, núcleos grandes, lobulados, claros com muita eucromatina e nucléolo evidente (Figura 7B e C).

Observou-se que as alterações dos Mφs expostos a ambas concentrações de Pb(II) foram significativamente maiores se comparadas com o grupo controle. Acima de 75% dos macrófagos tratados apresentaram-se com alterações morfológicas para os 3 tempos de exposição ($p < 0,05$) (Figura 3).

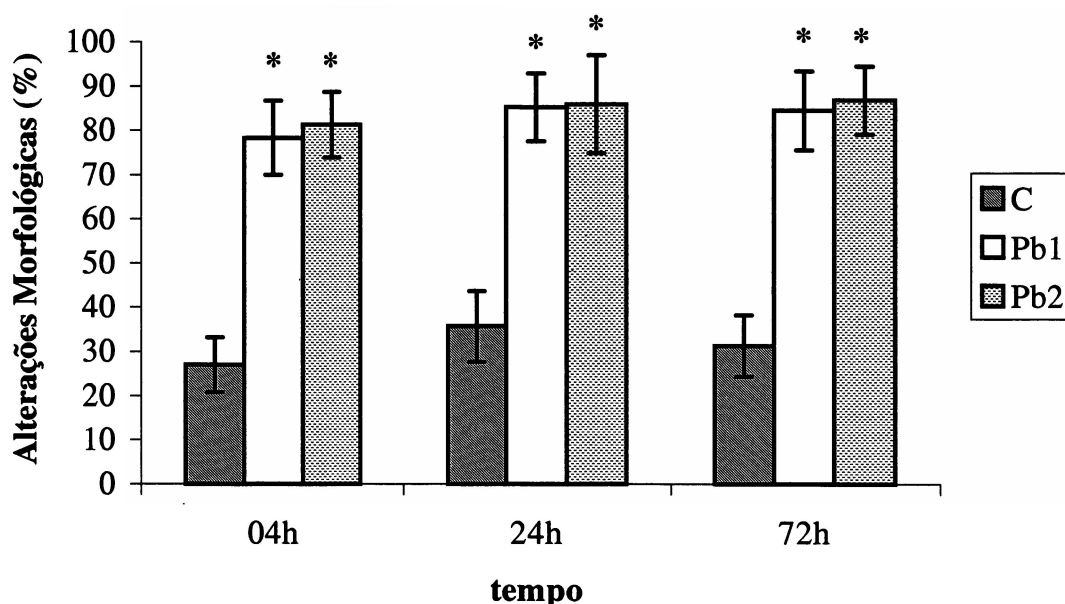


Figura 3 – Gráfico de alteração morfológica em macrófagos peritoneais de camundongos após a exposição *in vitro* ao chumbo, cultivo primário em garrafas. Observe que o metal altera significativamente a morfologia das células em relação ao controle ($p < 0,05$).

4.2.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

Os resultados apresentados pelos macrófagos expostos a 20 e 40 μM de Pb(II) são bem evidentes em relação aos aspectos morfológicos e estruturais quando comparados com os macrófagos do grupo controle. Macrófagos do grupo controle cultivados por 4h (Figura 8A) mostraram o núcleo, o retículo endoplasmático granular, o envoltório nuclear e as mitocôndrias com aspectos morfológicos preservados. O mesmo pode ser observado para os macrófagos que permaneceram cultivados por 24h nas mesmas condições (Figuras 8B). Detalhes

da integridade dos Mφs do grupo controle podem ser observada na figura 11. Integridade da membrana nuclear e condensação normal da cromatina (A, C), retículo endoplasmático e membrana plasmática (D) e citoplasma com aspecto normal (A, B e C). Os Mφs submetidos a 20μM de Pb(II), apresentaram alterações ultraestruturais, importantes o que permitiu evidenciar o efeito do chumbo nestas células observadas nos 2 tempos de exposição, isto é, 4 e 24h. Nos Mφs expostos por 4h (Figura 9A), estes apresentaram o núcleo com a cromatina altamente condensada e muitos vacúolos, portanto esses macrófagos apresentaram o aspecto morfológico do citoplasma muito comprometido. Os Mφs expostos por 24h (Figura 9B) apresentaram alterações morfológicas semelhantes às encontradas nos Mφs expostos por 4h. Além dessas alterações, podem ser observados Mφs apresentando *blebs* e vários filopódios (observados também em MEV). Os Mφs expostos ao Pb(II) (Figura 9D) apresentaram grandes vacúolos, estes ocupando a maior parte do citoplasma, também foram observadas organelas alteradas e a presença de *blebs*. O Mφ (Figura 9E) apresentou a cromatina muito condensada e *blebs* em praticamente toda a extensão da superfície celular. Os Mφs tratados com 40μM de Pb(II), apresentaram mudanças morfológicas semelhantes quando comparados com os Mφs tratados com 20μM. As alterações apresentadas por esses Mφs após 4h de exposição (Figura 10A) foram: a presença de um grande vacúolo com estruturas celulares internalizadas como mitocôndrias, a presença de vesículas de tamanhos variados e outras estruturas que não foram identificadas. Nos Mφs expostos por 4 horas (Figura 10B), pode ser observado a presença de núcleo apoptótico e em 24h (Figura 10C) há presença de muitos *blebs* na maior parte da superfície celular, e na região superior dessa mesma figura pode se observar um Mφ apresentando núcleo apoptótico. Alterações morfológicas como a presença de vacúolos também pode ser observadas (Figura 10D). Os Mφs expostos por um período de 72h (Figura 10E e F) se apresentam com as seguintes alterações morfológicas: pequenas e numerosas vesículas, muitos filopódios, o que pode ser observado também em MEV. Na Figura 10F observamos indícios da presença de núcleos apoptóticos. Na figura 12 estão representadas as principais alterações associadas à morte

celular programada. Como núcleo apoptótico (A), cromatina altamente condensada (B), vacúolos (C), *blebs* (D). Podemos também observar a presença de vacúolos com material eletrondenso no citoplasma (E e F).

4.2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Pode-se observar pelos resultados que as alterações encontradas nos grupos expostos ao Pb(II) são evidentes comparativamente em relação à superfície e morfologia das células controle nas duas concentrações testadas. M ϕ s do grupo controle mostraram claramente um espreado ao longo do tempo, onde geralmente projeções do citoplasma vão se formando e se estendendo sobre o substrato. (Figura 13A, B, C, D). Os M ϕ s cultivados por 4h (Figura 13A) se apresentaram arredondados com pequenas projeções do tipo filopódios, enquanto os M ϕ s cultivados por 24h (Figura 13B) se apresentaram mais alongados com alguns filopódios e nas extremidades dessas células há presença de pequenas projeções do tipo lamelopódios. Os M ϕ s cultivados por 72h (Figura 13C e D) se mostraram com aspecto morfológico semelhante aos M ϕ s cultivados por 24h, porém, em alguns casos, com um número maior de filopódios, sendo estes mais longos. Os M ϕ s submetidos à concentração de 40 μ M de Pb(II) após 4h de exposição (Figura 14A) apresentaram formato arredondado, com poucos lamelopódios, mas com um grande número de filopódios, estando estes distribuídos por toda a extensão das células. Os M ϕ s após 24h de exposição apresentaram lamelopódios principalmente nas extremidades de grandes projeções e na maior parte da extensão desses M ϕ s há a presença de muitos filopódios (Figura 14B, C e D). Na superfície dos M ϕ s da Figura 14B há a presença de *blebs* (observados também em MET). Os M ϕ s submetidos à concentração de 20 μ M de Pb(II) após 72h de exposição apresentaram filopódios, podendo estes serem curtos e em todas as direções (Figura 15A) ou serem menos numerosos mas, apresentando-se mais longos (Figura 15B). Na Figura 15C, pode-se observar M ϕ s bastante espreados, com vários lamelopódios e filopódios alongados presentes em quase toda a superfície celular. Na Figura 15D observamos que os M ϕ s se apresentaram com muitos filopódios em quase toda a

extensão da célula, porém esses filopódios se mostraram mais reduzidos no comprimento quando comparados com os Mφs da Figura 15C. Aqui também pode ser observado Mφ com a presença de *blebs*. Na presença de maior concentração de Pb(II) (40μM), as células expostas pelo período de 72h se apresentaram também bastante espreiadas e com lamelopódios mais evidentes nas extremidades celulares. Filopódios longos se concentraram mais nas extremidades (Figuras 16A, B e C). O Mφ que apresentou uma morfologia mais arredondada (Figura 16D) possui poucos lamelopódios, ao contrário dos Mφs que possuem uma morfologia mais alongada, o que apresenta abundantes lamelopódios em toda sua extensão. Visto que a nítida alteração estrutural ocorre nos Mφs expostos ao xenobionte onde estes apresentam com expansões membranares bem distendidas. Passamos neste momento com técnicas de imunomarcacão desvendar se estas expansões são para dinâmicas de adesão ou migração celular (frente à organização de lamelopódios e contatos focais), ou se estas expansões membranares induzidas sob exposição dose dependente ao Pb(II) são emissões de pseudópodos, os quais estariam sendo ativados para estímulo fagocítico sob ação deste xenobionte. Para tanto, iniciamos o rastreamento por imunomarcadores dos microfilamentos de actina.

4.3. EFEITO DO Pb(II) NA REORGANIZAÇÃO DOS MICROFILAMENTOS DE ACTINA

As células controle (Figura 17A), tratadas com 20μM (Figura 17F), e tratadas com 40μM (Figura 17K) são sobreposições dos planos focais subseqüentes. Podemos observar nos Mφs do grupo controle (Figuras de 17A a 17E) uma distribuição dos microfilamentos de actina por toda extensão celular distribuindo-se em todos os planos focais. Não há concentração deste componente do citoesqueleto em regiões específicas, sendo encontrados nas projeções celulares de membrana nas microespículas e filopódios. Observa-se uma integridade morfológica, onde o padrão de marcação para os microfilamentos se mostrou condizente com os encontrados na literatura.

Nos Mφs tratados com 20μM de Pb(II) observamos uma nítida mudança na morfologia das células (como anteriormente mostrado nas imagens de MEV), onde estas se apresentaram mais espalhadas com projeções do tipo lamelopódios nas extremidades das projeções citoplasmáticas. Exatamente nestes pontos é observada uma intensa deposição dos microfilamentos de actina e uma distribuição menos intensa pelo restante da célula, demonstrando uma distribuição irregular da proteína, a qual assume um papel de “fibras de *stress*” desvirtuando sua função de “explorar” o substrato, o que define o comportamento da célula (Figuras de 17F a 17J).

As alterações morfológicas descritas para os Mφs tratados com 40μM de Pb(II) através da MEV, são evidenciadas e confirmadas quando observamos os resultados de marcação dos filamentos de actina. As projeções celulares são mais longas e afiladas com intensa marcação para os microfilamentos de actina, estando estes também presentes por toda a extensão do corpo celular, confirmando a presença contínua de filopódios por toda a extensão da célula, o que foi observado nas imagens de MEV. Tal distribuição embora se assemelhe ao material controle, é diferente morfológicamente (como descrito para as imagens de MEV), caracterizando algum tipo de distúrbio na organização da actina nestas regiões da célula (Figuras de 17K a 17O). Estes resultados sugerem estímulo de adesão, migração ou mesmo fagocitose. Para desvendarmos tais dinâmicas marcamos FAK.

4.4. EFEITO DO CHUMBO INORGÂNICO NA ADESÃO DOS MACRÓFAGOS

4.4.1. Imunomarcção de FAK

A distribuição das quinases de adesão focal (FAK) na superfície dos macrófagos se assemelha àquela descrita para os microfilamentos de actina, ou seja, distribuindo-se por toda a superfície celular (Figuras 18D e 18G). Após o tratamento com Pb(II) em 20 e 40μM, é observado uma intensa e nítida marcação para FAK ao longo das projeções celulares, fato semelhante ao padrão observado para os microfilamentos de actina (Figuras 18E, H, F e I) e pouco distribuído ao

longo de toda a superfície celular. Este resultado está demonstrando a associação destas proteínas na dinâmica celular dos Mφs, em associação com proteínas acessórias modulando a dinâmica dos Mφs frente à reorganização dos pontos de adesão focal via microfilamentos de actina (Figura 17). Desta forma, esta marcação sugere estarem os Mφs tendo estímulo para adesão ou migração celular. Para comprovarmos estas dinâmicas, fizemos uma marcação para integrinas α_5 , a qual nos proporcionará e elucidará estas projeções decorrentes da exposição ao Pb(II), serem pontos de adesão focal e não pseudópodos.

4.4.2. Imunomarcação para receptor de membrana (Integrina α_5)

Através da imunomarcação para os receptores de Integrina α_5 , observamos que no material controle (Figura 19A) ocorreu a presença de intensa marcação na forma de *clusters* no plano focal. Como observado anteriormente, estas células mantêm-se espalhadas e com poucos prolongamentos citoplasmáticos. A intensa marcação em *clusters* apontou os pontos de adesão celular à matriz extracelular. Os macrófagos expostos à ação do chumbo nas concentrações de 20 ou 40 μ M apresentaram-se nitidamente mais espalhados com características projeções membranares onde se vê *clustering* de receptores para integrinas, sugerindo dinâmica de adesão e ou migração celular, excluindo a hipótese de estímulo de fagocitose. Estes dados devem ser analisados com auxílio das imagens das Figuras 17A, 17F e 17K, onde há deposição também nestas projeções dos microfilamentos de actina. Tais resultados demonstraram que quando às células estão expostas ao metal, os *clusters* de integrina estavam mais associados aos lamelopódios e não aos pseudópodos vistos que estes na presença deste xenobionte diminuem a dinâmica de fagocitose (Figura 6). Sendo assim, estas projeções pertencem a dinâmicas de migração, adesão e espalhamento, onde provavelmente as células expostas estejam com um comportamento migratório aleatório ou desenvolvendo uma estratégia de sobrevivência, se mantendo aderidas ao meio (Figura 19). Para assegurarmos ainda mais a diminuição do estímulo fagocitário empregaremos, mais tarde, ensaio de fagocitose com levedura. Neste momento faremos a avaliação da adesão sobre a fibronectina.

4.4.3. Adesão de macrófagos sobre fibronectina

Podemos observar que os Mφs não têm estímulo adesivo a fibronectina, os Mφs controles aderem similarmente aos Mφs que aderiam sobre o BSA (controle negativo de adesão). Observamos ainda neste gráfico, que a ação do Pb(II) em concentrações de 20 e 40μM não altera o processo de adesão nem para o substrato de BSA como para fibronectina (Figura 4). Não podemos concluir com estes resultados que o Pb(II) não maximize ou mesmo impeça a adesão dos Mφs sobre as demais proteínas. Apenas que a FN não houve ação direta deste xenobionte nesta dinâmica.

Frente aos resultados onde há nítido comprometimento da integridade ultraestrutural dos Mφs expostos ao xenobionte, tanto na concentração de 20 ou 40μM, é que foi possível observar figuras de sofrimento celular especificamente por apoptose. Nesta fase, faremos 2 experimentos para ainda mais reforçar a indução da apoptose observada ultraestruturalmente, para tanto empregaremos teste cometa e imunomarcção com Bax.

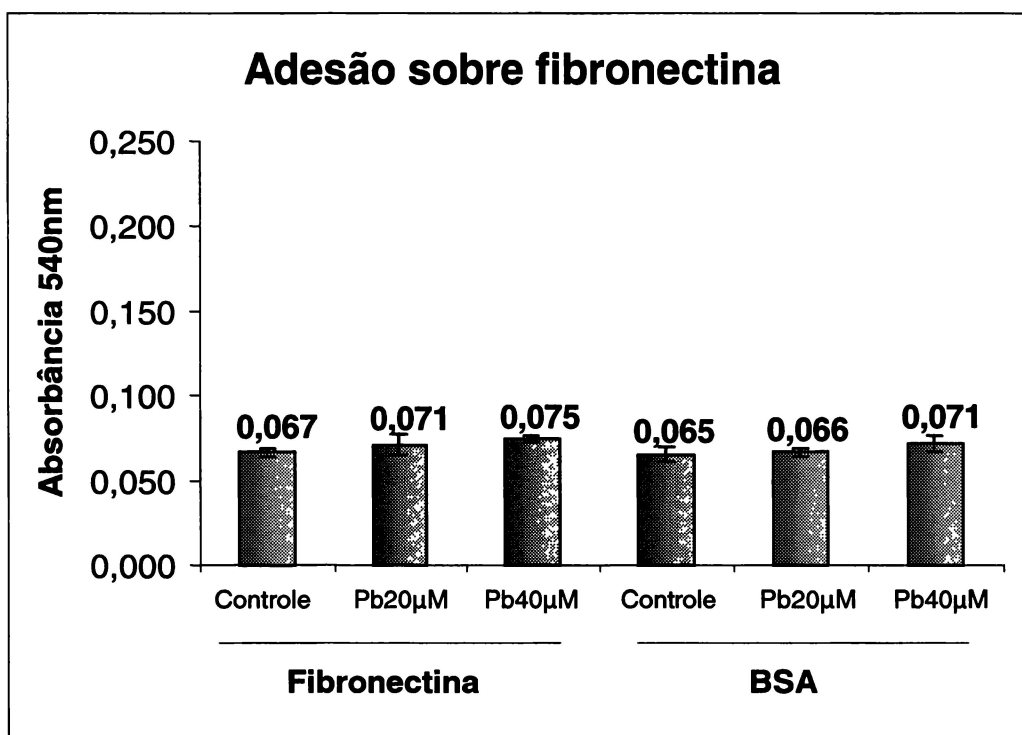


Figura 4 – Gráfico representando o perfil adesivo de macrófagos sobre fibronectina (FN) e sobre BSA (controle negativo) em absorbância de 540 nm. Foram plaqueadas 2×10^5 céls/poço de placas de 24 poços. Barra no centro das colunas indica o desvio padrão.

4.5. EFEITO DO Pb(II) NA INDUÇÃO DE APOPTOSE

4.5.1 Indução de proteína pró-apoptótica Bax

Os resultados de expressão da proteína Bax confirmaram as imagens obtidas com a MET, onde figuras apoptóticas foram identificadas nos grupos de células expostas a ambas as concentrações de Pb(II). As Figuras 20A, 20F constituem sobreposições dos planos focais subseqüentes, e demonstraram que a presença do chumbo no meio de cultivo é um forte indutor da expressão desta proteína. Os Mφs expostos à concentração de 20μM Pb(II), mostraram claramente que a proteína Bax é expressa em maior quantidade e em um maior número de células quando comparada com as células do grupo controle, as quais apresentaram uma sutil marcação para a proteína. Na mesma figura pode-se observar que a morfologia do núcleo, evidenciada pelo DAPI, mostra uma redução de tamanho do mesmo e em alguns casos caracterizando figuras nucleares apoptóticas típicas (Figuras 20A, 20F).

4.5.2. Fragmentação de DNA

No que se refere à fragmentação de DNA determinada pelo Teste Cometa, nos dois grupos de Mφs expostos ao Pb(II) (20 e 40μM) após um período de 4h, não foi observada diferença significativa entre o grupo controle e aqueles expostos ao metal. No tratamento de 24h, o grupo exposto a 20μM Pb(II) não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle, no entanto, o grupo exposto à concentração de 40μM de Pb(II) mostrou-se significativamente diferente em relação ao controle ($P < 0,01$). O mesmo acontece nos grupos expostos por 72h, para as duas concentrações testadas em relação ao grupo controle ($P < 0,05$ e $P < 0,001$ respectivamente) (Figura 5 e 21).

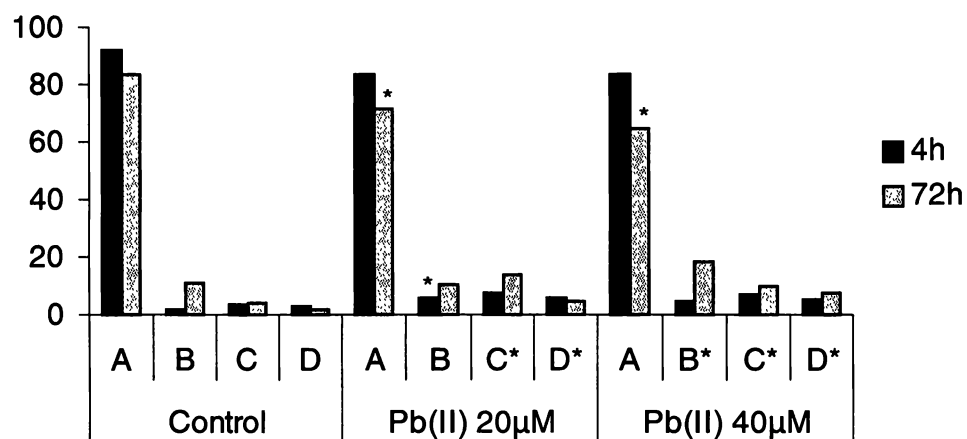


Figura 5. Frequência comparativa (%) de diferentes tipos de figuras de cometas entre macrófagos dos grupos testados. [Pb(II) 20 µM e Pb(II) 40 µM] e grupo controle após 4 e 72 h. (A) tipo 0, (B) tipo I, (C) tipo II e (D) tipo III. Bar = 8µm

4.6. ATIVIDADE FAGOCÍTICA

Os resultados de atividade fagocítica após 72h de exposição às duas concentrações de chumbo inorgânico, confirmaram os dados de alterações morfológicas descritas acima, da mesma forma que demonstraram que tais alterações morfológicas diminuem significativamente a atividade fagocítica destas células. A atividade fagocítica foi analisada a partir da interação dos macrófagos com as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. O índice de atividade fagocítica dos grupos tratados com Pb(II) não apresentou diferença significativa entre si ($P > 0,05$), no entanto, os grupos tratados apresentaram um índice fagocítico significativamente inferior quando comparados com o grupo controle ($P < 0,05$) (Figura 6 e Figura 22).

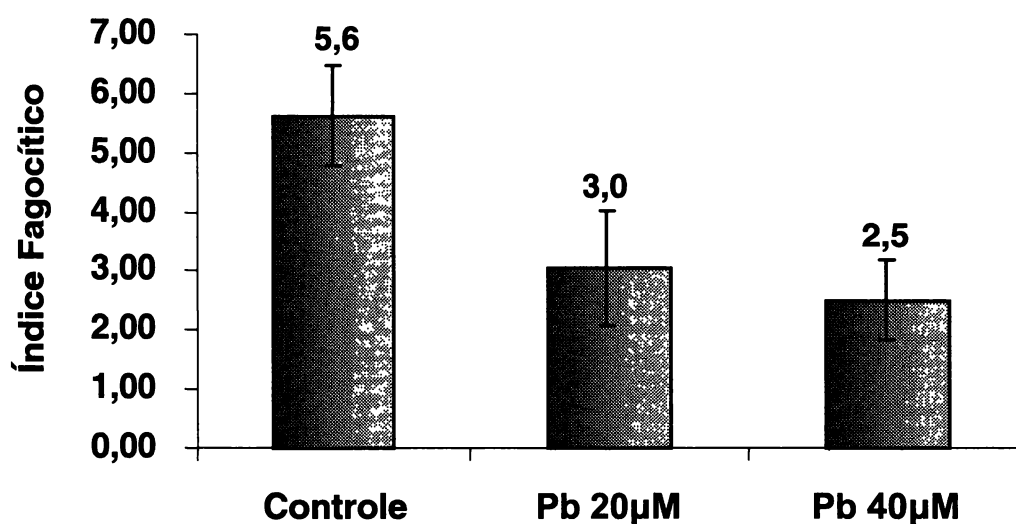


Figura 6 – Gráfico do índice de atividade fagocítica de macrófagos peritoneais de camundongo na presença de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, após 72 horas de exposição a 20 e 40µM Pb(II). As células foram cultivadas em lamínulas e aquelas tratadas pelo metal se mostraram significativamente afetadas se comparado ao grupo controle ($p < 0,05$).

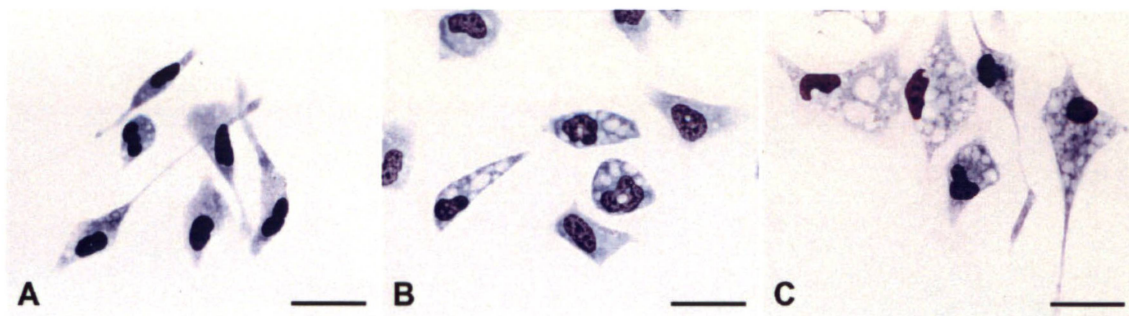


Figura 7 – Alterações morfológicas em Mφs cultivados por 72h observados no MO. (A) controle: células com característica de residentes, (B) células expostas ao Pb 20μM, (C) células expostas ao Pb 40μM. barra = 16μm.

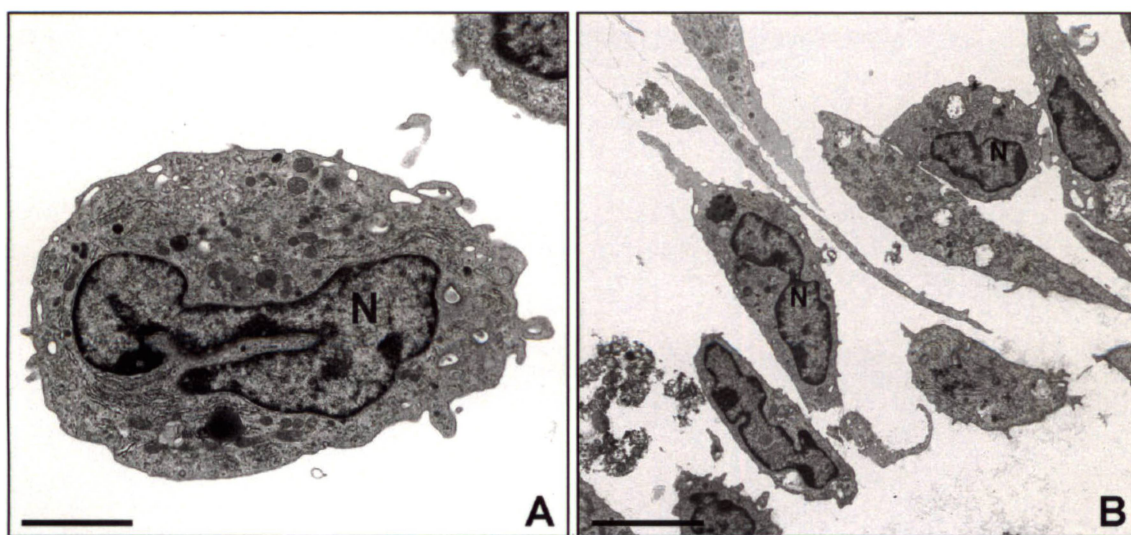


Figura 8 - Mφs do grupo controle observados no MET. (A) 4h de cultivo, (barra = 2μm), (B) 24h de cultivo (barra = 5μm). N=núcleo.

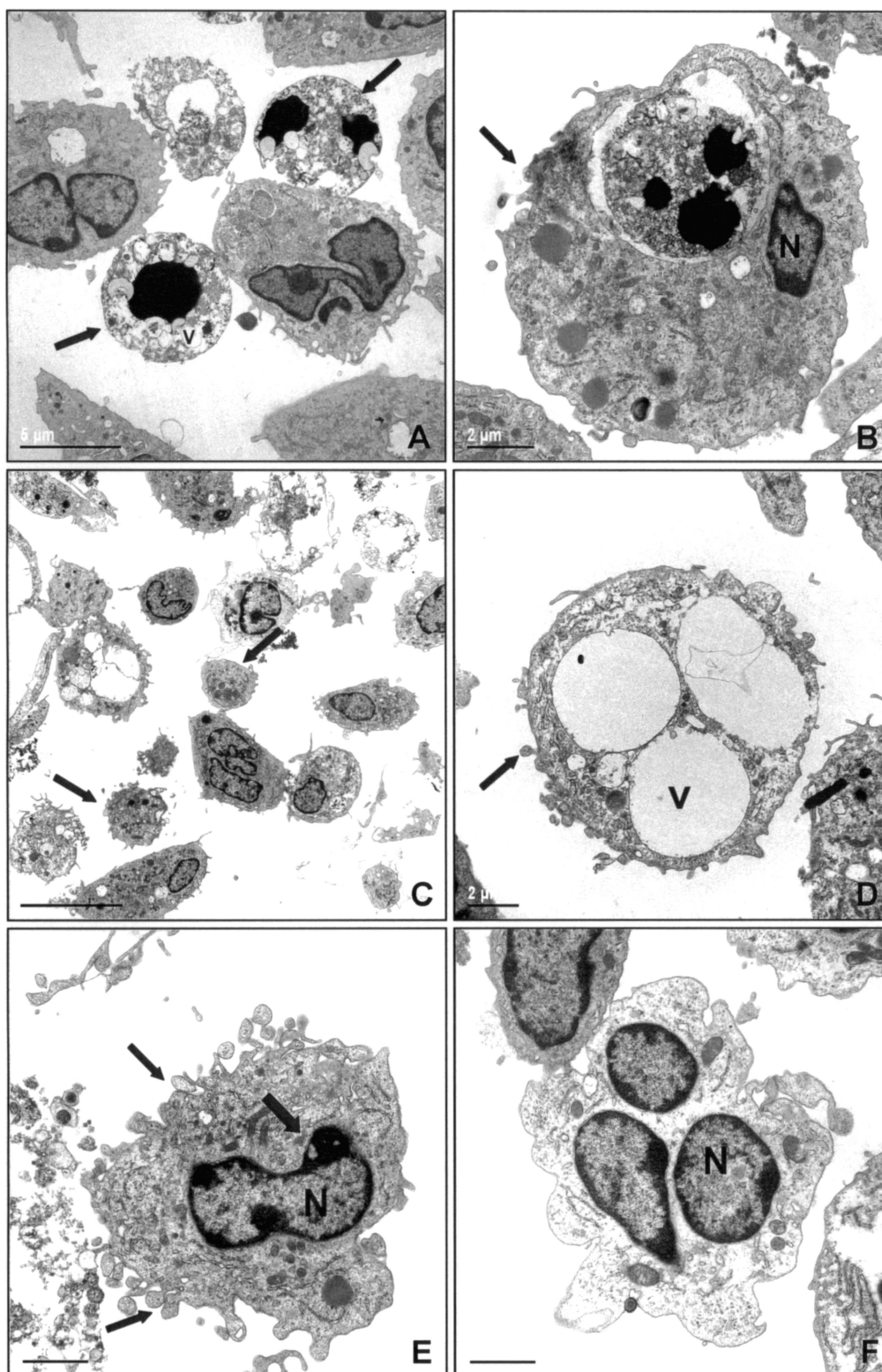


Figura 9 - Mφs do grupo exposto ao Pb 20μM observados no MET. (A) 4h de exposição (setas = morte celular) (barra = 5μm), (B) 24h de exposição (seta = bleb) (barra = 2μm), (C) 24h de exposição (seta inferior = blebs, seta superior = núcleo apoptótico) (barra = 5μm), (D) 24h de exposição (seta = bleb) (barra = 2μm) e (E) 24h de exposição (setas menores = blebs, seta maior = núcleo apoptótico) (barra = 2μm), (F) 24h de exposição (barra = 2μm). N=núcleo, V = vacúolo.

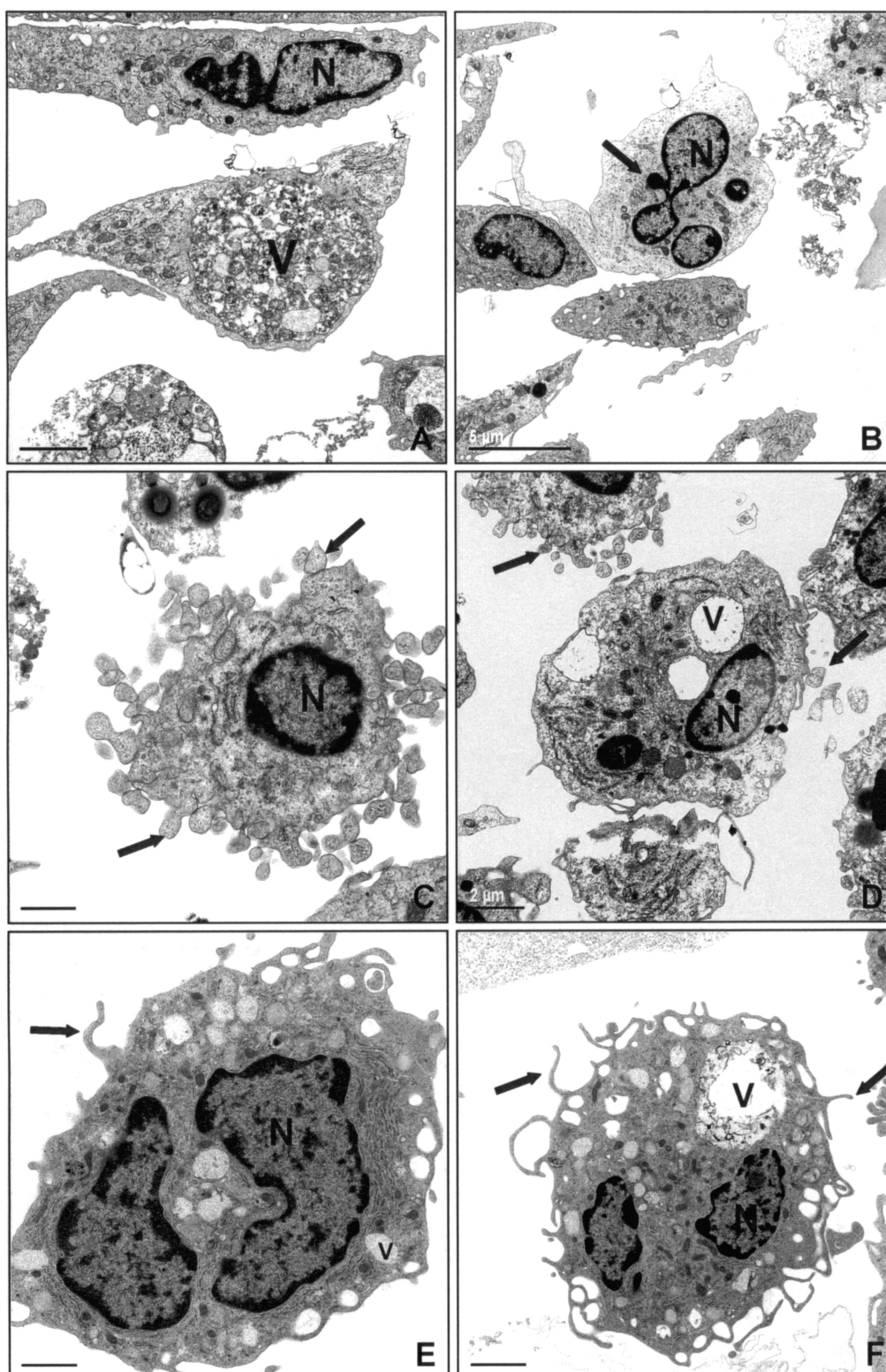


Figura 10 - Mφs expostos ao Pb 40μM observados no MET. (A) 4h de exposição (V = vacúolo com muitas vesículas internalizadas) (*barra* = 2μm), (B) 4h de exposição (seta = núcleo apoptótico) (*barra* = 5μm), (C) 24h de exposição (setas = *blebs*) (*barra* = 2μm), (D) 24h de exposição (setas = *blebs*) (*barra* = 2μm) e (E) 72h de exposição (seta = filopódio) (*barra* = 2μm), (F) 72h de exposição (setas = filopódios), (*barra* = 2μm). N=núcleo, V=vacúolo.

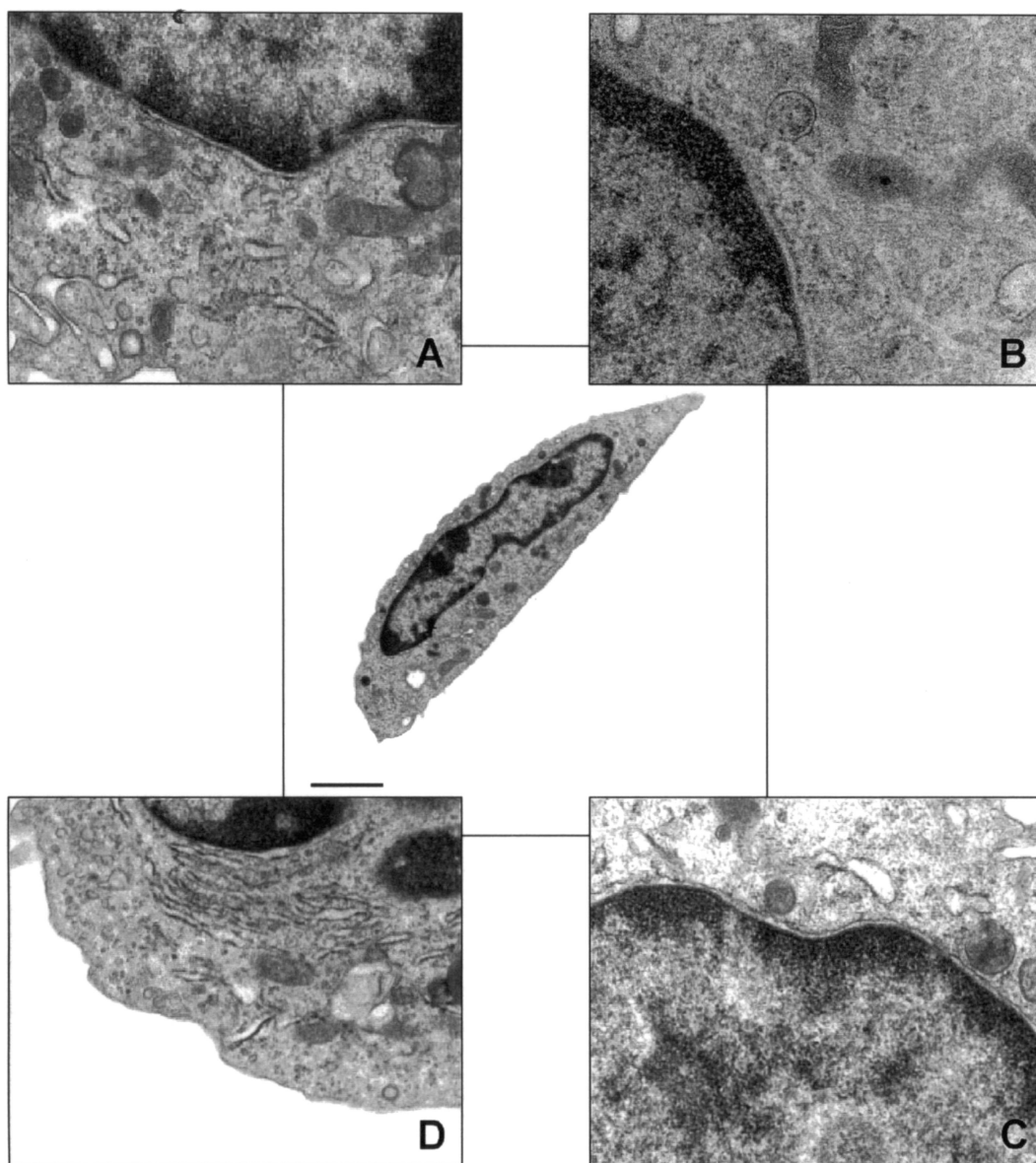


Figura 11 - Mφs do grupo controle observados no MET. Observar integridade da membrana nuclear e condensação normal da cromatina (A, C), RE e membrana plasmática (D) e citoplasma com aspecto normal (A, B, C). barra = 2μm.

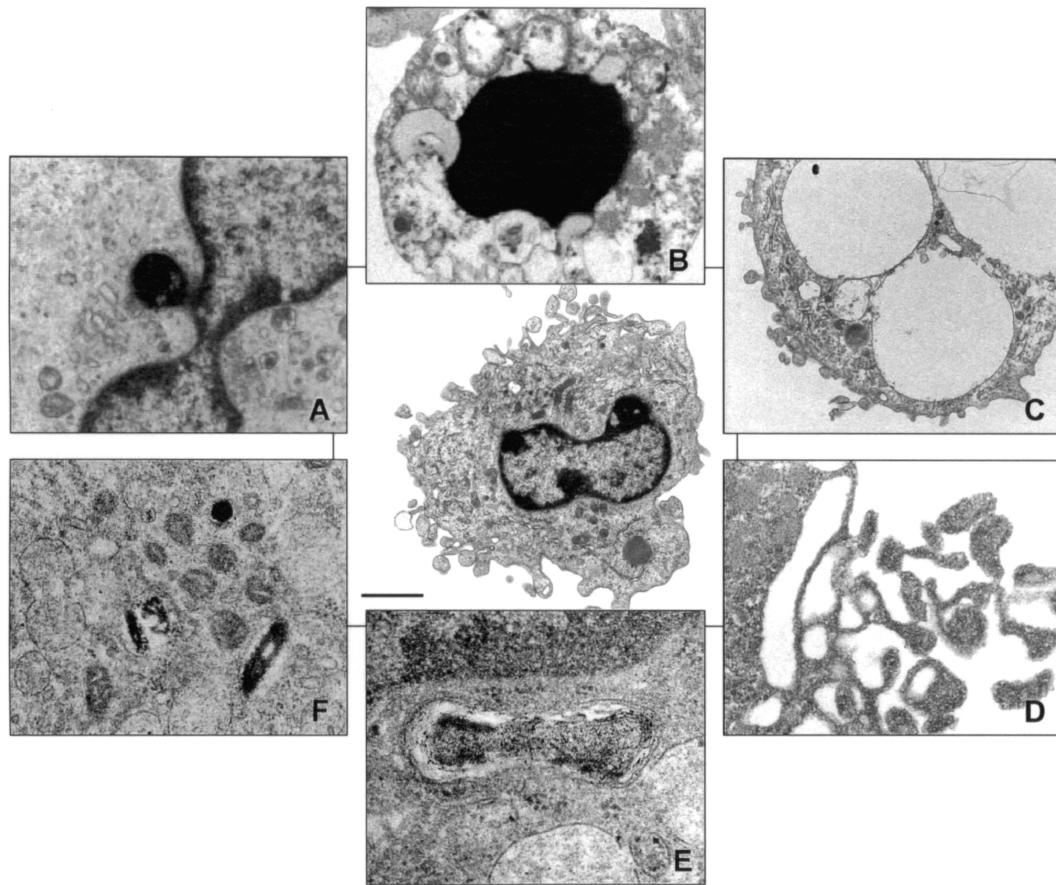


Figura 12 - Mφs do grupo exposto ao Pb observados no MET. Observar núcleo apoptótico (A), cromatina extremamente condensada (B), vacúolos (C) e *blebs* (D), alterações que podem evidenciar morte celular programada. Observar também a presença de vacúolos com material eletrondenso no citoplasma (F) em detalhe (E). barra = 2μm.

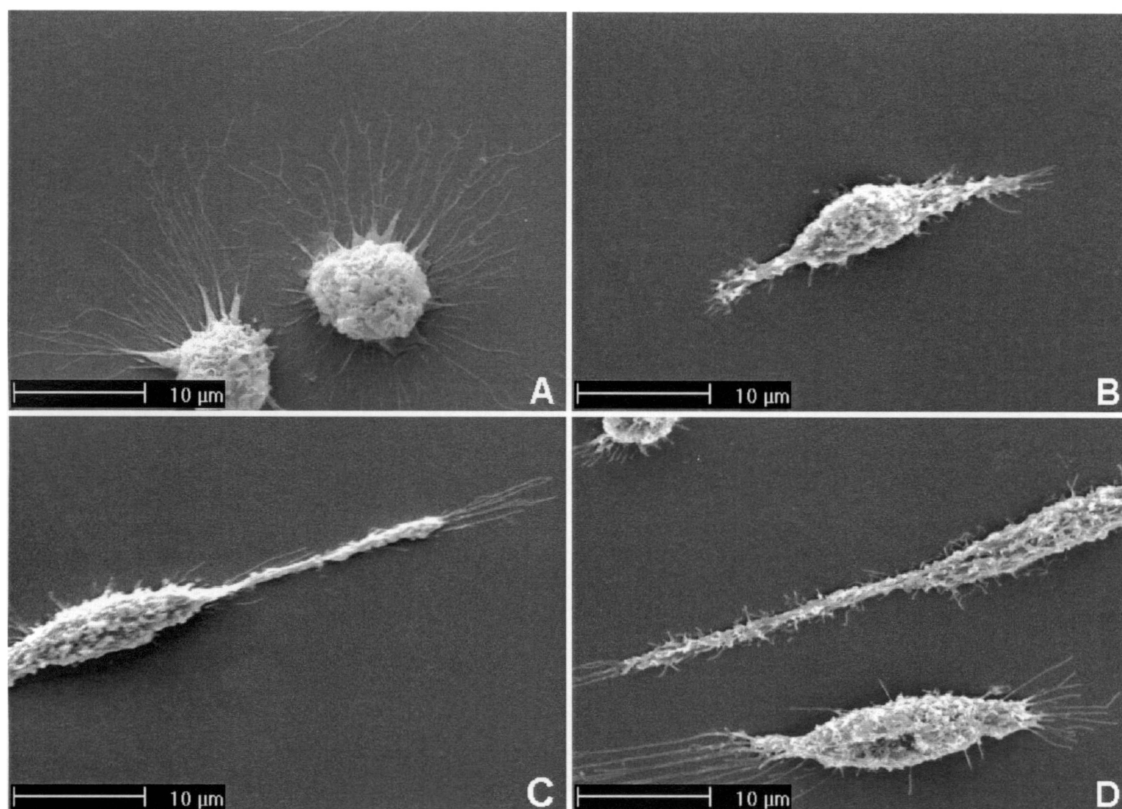


Figura 13 – Mφs do grupo controle observados no MEV. (A) 4h de cultivo, (B) 24h de cultivo, (C e D) 72h de cultivo.

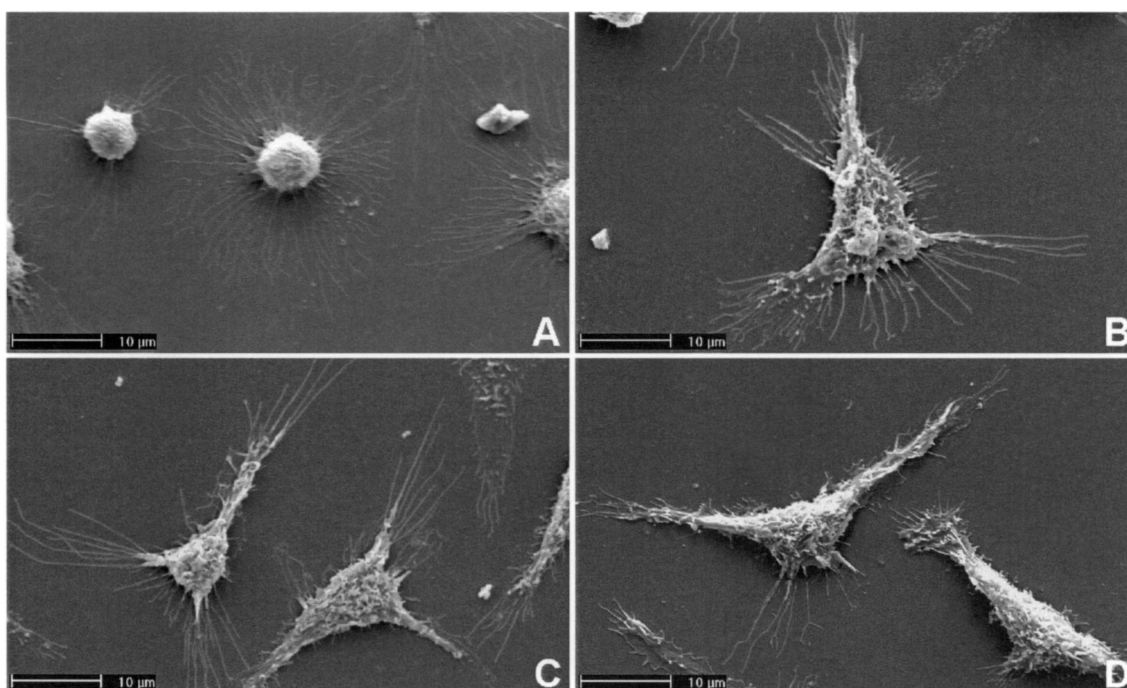


Figura 14 – Mφs do grupo exposto ao Pb 40μM observados no MEV. (A) 4h de exposição, (B, C e D) 24h de exposição.

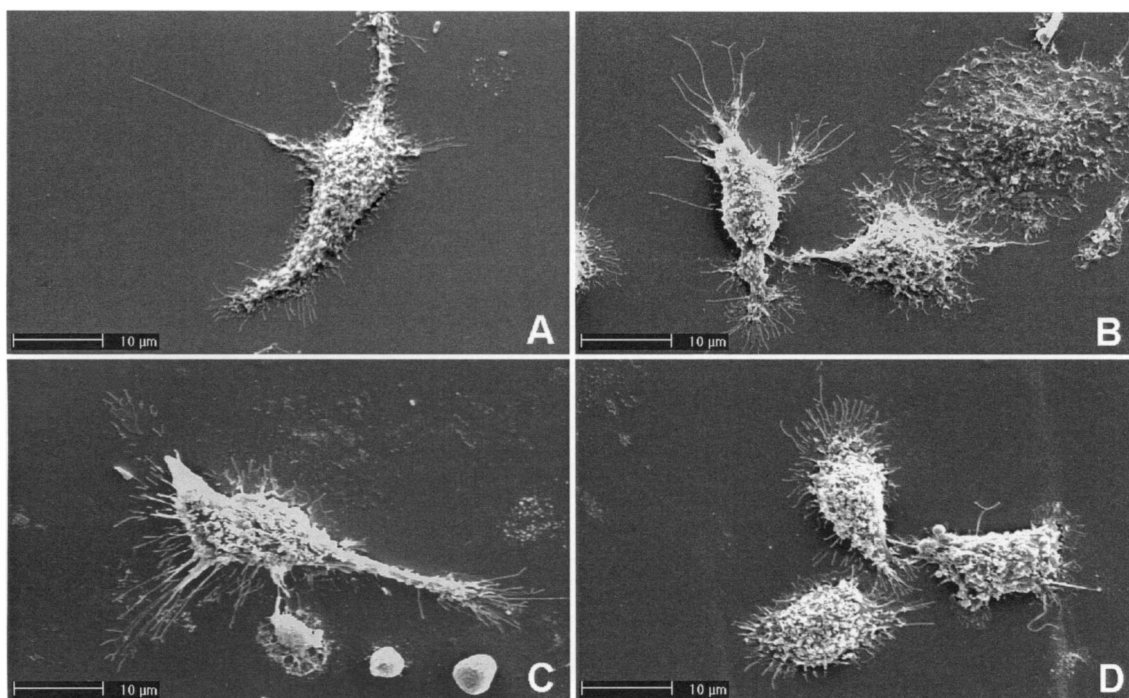


Figura 15 – Mφs do grupo exposto ao Pb 20μM observados no MEV. (A, B, C e D) 72h de exposição.

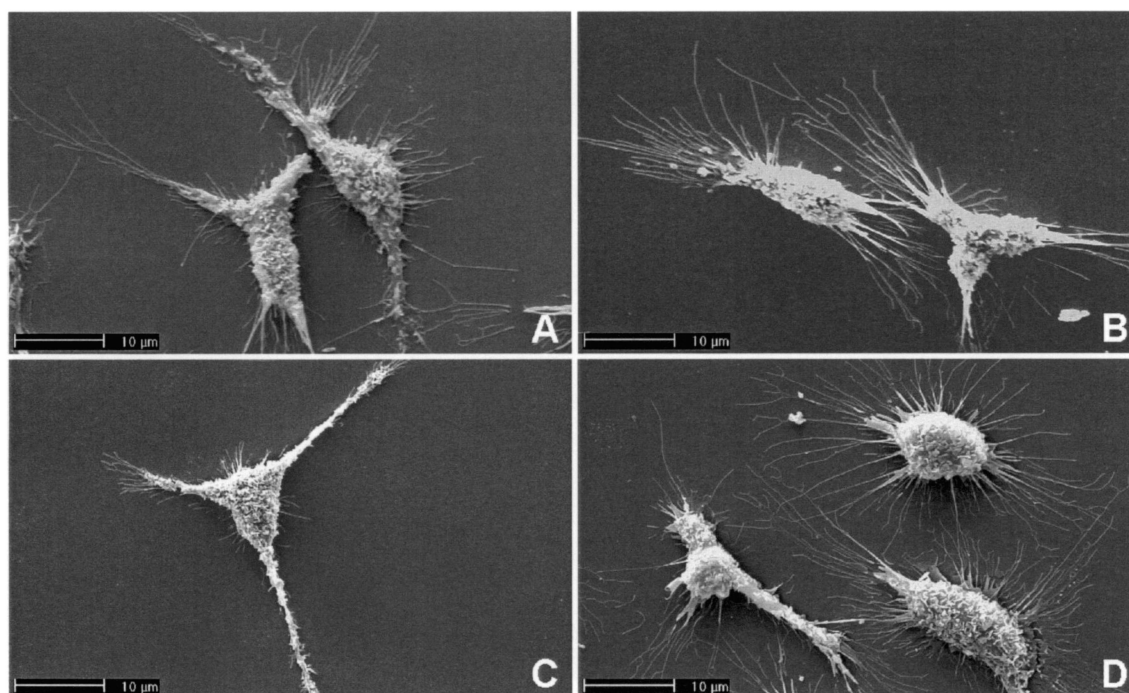


Figura 16 – Mφs do grupo exposto ao Pb 40μM observados no MEV. (A, B, C e D) 72h de exposição.

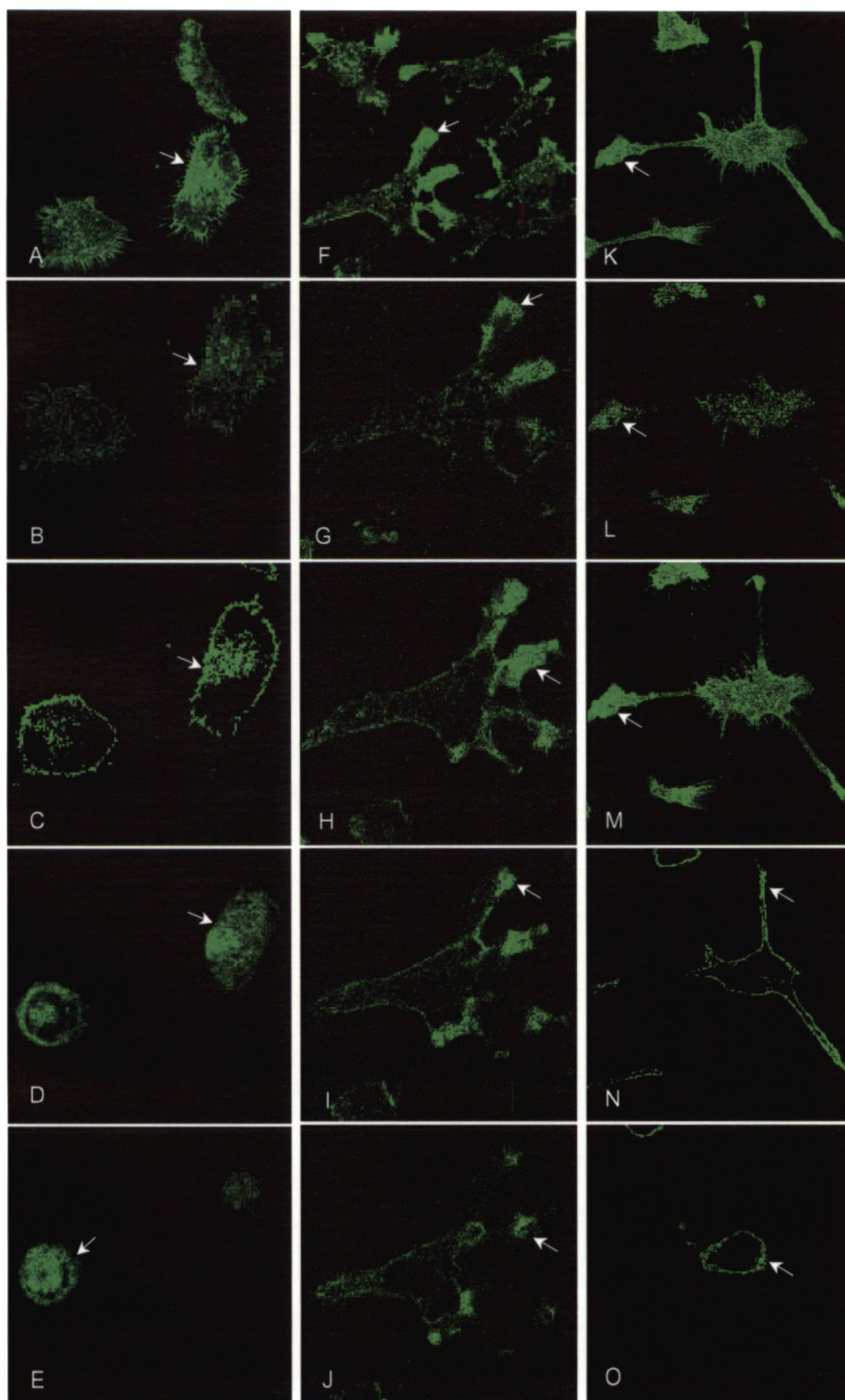


Figura 17 – Mφs cultivados por 72h observados no microscópio confocal com marcação para microfilamentos de actina. (A, F e K) são sobreposições dos planos focais sub-seqüentes, (A, B, C, D e E) Controle: observamos uma distribuição dos microfilamentos por toda extensão celular. (F, G, H, I, J) Pb 20μM observamos nitidas mudanças morfológicas, e (K, L, M, N, O) Pb 40μM: células apresentando projeções mais longas e afiladas. Aumento: 600X.

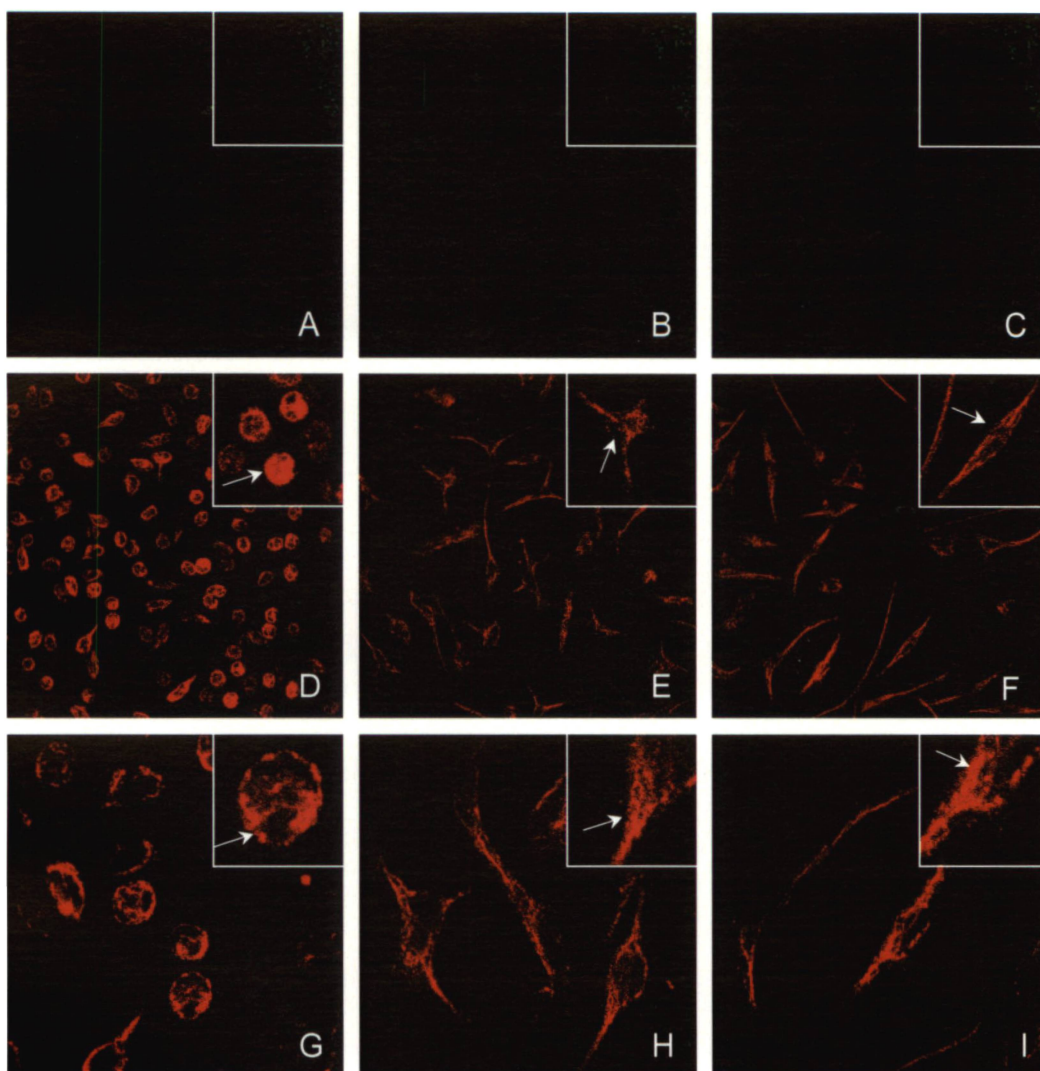


Figura 18 - Mφs cultivados por 72h observados no M. confocal com imunomarcção para FAK. (A, D e G) controle: apresentam adesão focal por toda extensão celular, (B, E e H) Pb 20μM e (C, F e I) Pb 40μM, observamos uma intensa marcação ao longo das projeções celulares. Aumento: 600X.

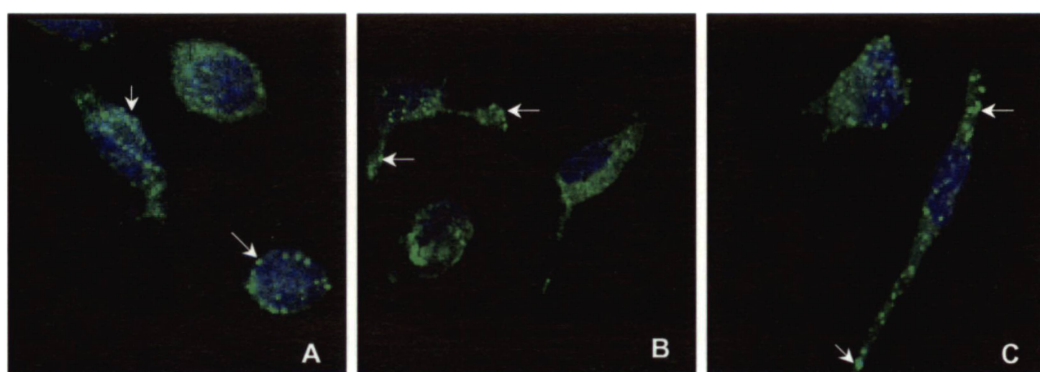


Figura 19 - Mφs cultivados por 72h observados no M. confocal com imunomarcção para integrina α_5 . (A) Controle: apresentam uma intensa marcação na forma de *clusters* por toda superfície em contato com o substrato, estabelecendo característicos pontos de adesão focal, (B) Pb 20μM e (C) Pb 40μM, apresentam nitidamente mais espalhados com características projeções membranares onde se vê *clustering* destes receptores. Aumento: 600 X.

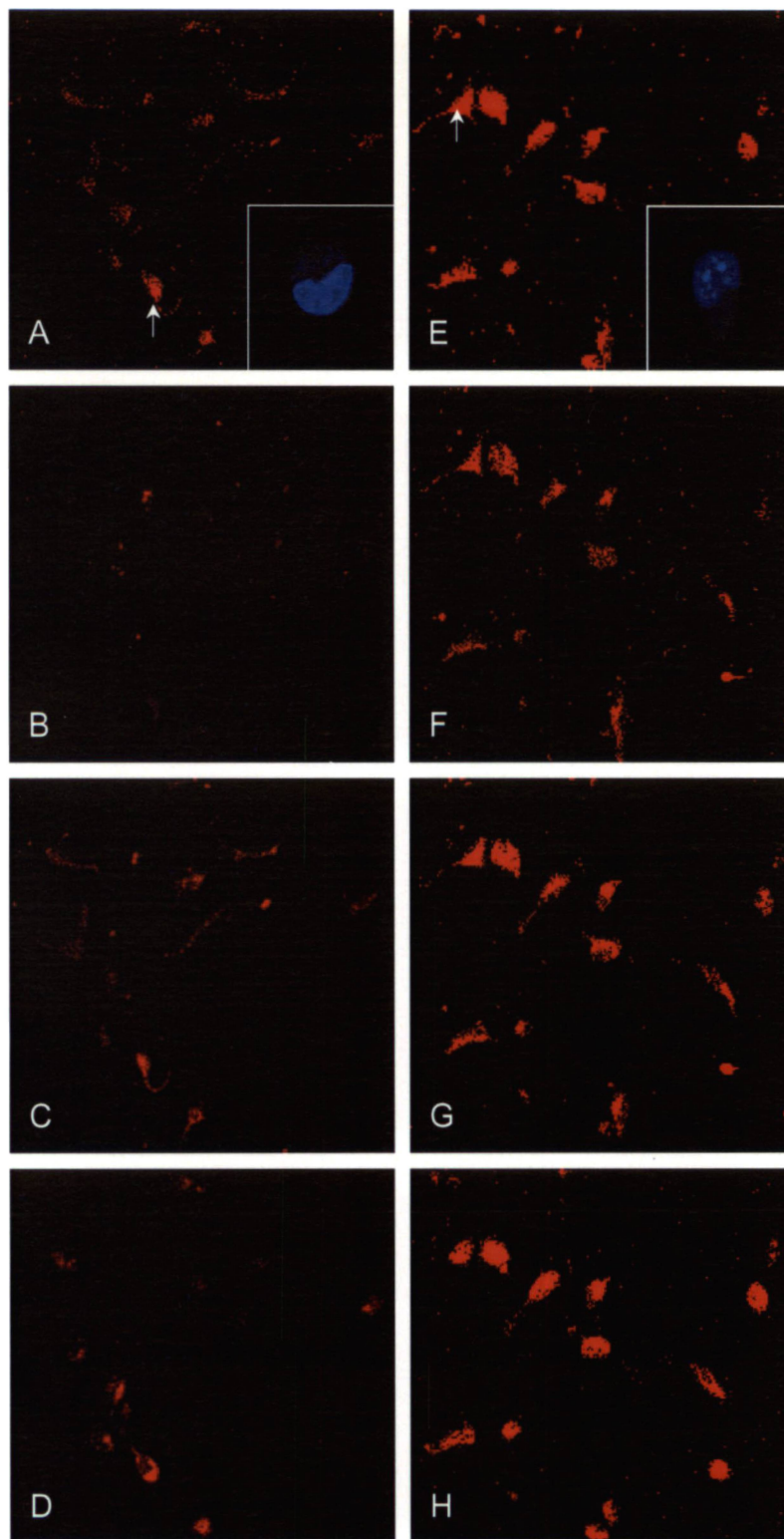


Figura 20 – Mφs cultivados por 72h observados no M. confocal com imunomarcção para Bax. (A, E) são sobreposições dos planos focais subsequentes. (A, B, C, D) Controle: apresentam uma sutil marcação para Bax quando comparados com o grupo Pb 20μM (E, F, G, H). Observe no *inset* da figura E marcação do núcleo com DAPI onde se vê o núcleo bem menor, sugerindo apoptose celular. Aumento: 600X.

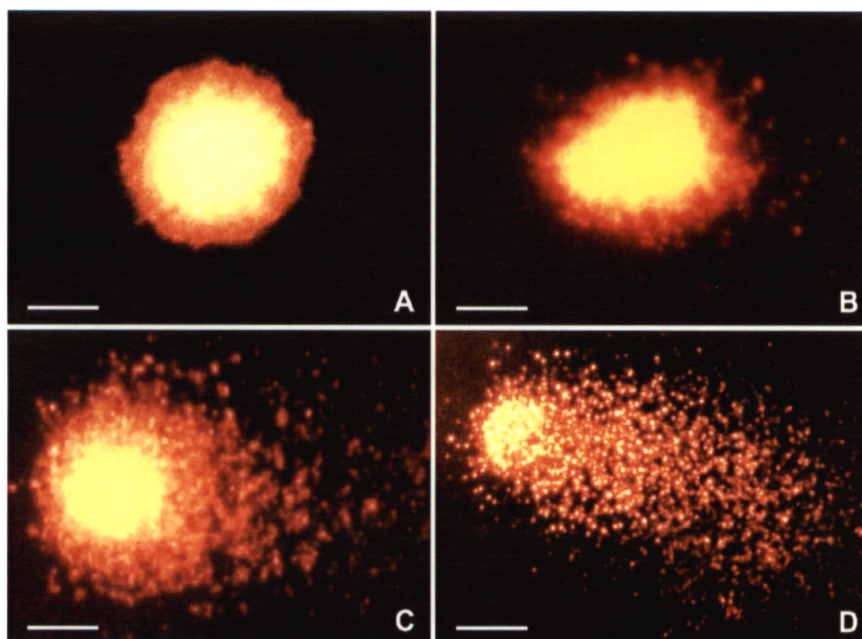


Figura 21 - Nucleóides de M ϕ s - teste Cometa. (A) tipo 0: sem dano aparente, (B) tipo I: com pequeno dano no DNA, (C) tipo II: com dano médio no DNA e (D) tipo III: com alto dano no DNA. barra = 8 μ m.

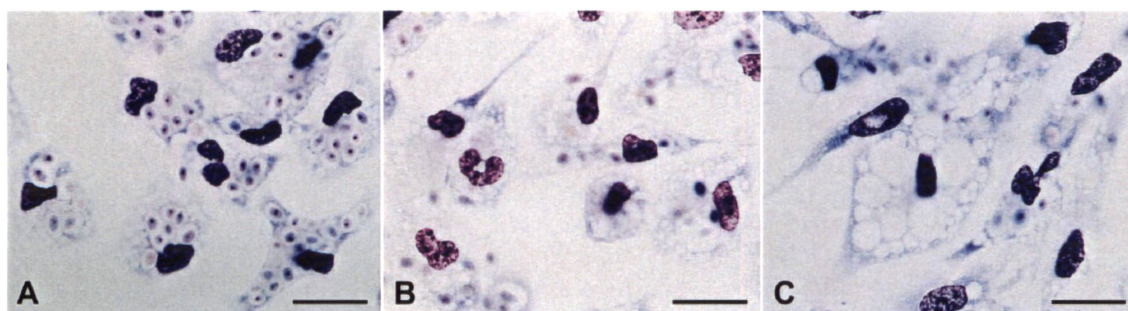


Figura 22 – M ϕ s cultivados por 72h, período após o qual entraram em contato com *Saccharomyces cerevisiae* – ensaio de fagocitose. (A) controle com muitas leveduras no citoplasma, (B) células expostas ao Pb 20 μ M e (C) células expostas ao Pb 40 μ M, ambas as últimas com menor número de leveduras endocitadas. barra = 16 μ m.

6. DISCUSSÃO

O chumbo [Pb(II)] é um dos metais pesados com maiores riscos para a saúde do homem, devido a sua ampla distribuição no ambiente. Em 1995, o EUA usou $1,4 \times 10^6$ toneladas de chumbo na produção de uma grande variedade de produtos incluindo baterias, munição, produtos de cristal, tintas de impressoras, pesticidas e produtos industriais. Esse metal pesado apresenta uma grande variedade de efeitos tóxicos atribuídos à sua exposição, que variam de gastrointestinal, muscular, comportamental até genético. Contudo, algumas pesquisas mostram que o Pb(II) é capaz de inibir a expressão de gene e causa mutações cromossômicas (JOHNSON, 1998).

O Pb(II) é um dos produtos que pode conduzir efeitos deletérios no tecido nervoso (STRUZYNSKA e RAFALOWSKA, 1994; ADONAYLO e OTEIZA, 1999), renal (FOWLER et al., 1994), imune (COHEN et al., 1994; RAZANI-BOROUJERDI et al., 1999), e tecido reprodutivo (QUINTANILLA-VEJA et al., 2000), sendo responsável por uma variedade de estados patológicos no homem (BATUMAN, 1993; GOYER, 1993). Esse metal pesado é classificado pela IARC (Agência Internacional de Pesquisa do Câncer), como possível carcinogênico para ao homem. O câncer tem sido detectado em trabalhadores expostos ao chumbo (STEENLAND e BOFFETTA, 2000) e um aumento nos riscos de gliomas foi relatado em trabalhadores com um nível de chumbo no sangue de $1,4 \mu\text{M}$ ou acima. (ANTTILA et al., 1996).

O Pb(II) encontrado no sangue da população em geral está na ordem de $0,5 - 1 \mu\text{M}$ e apresenta efeitos em órgãos, vias bioquímicas e sistemas enzimáticos, (MILOSEVIC e MAIER, 2000) sendo que esse metal também se liga a diferentes proteínas (AOKI et al., 1986).

Os mecanismos moleculares da toxicidade pelo Pb(II) não são totalmente conhecidos, mas fortes evidências indicam que ele pode atuar competindo com cátions endógenos em proteínas ligantes em sítios de ligação, como o cálcio e o zinco (ZAWIA et al., 1998; GOLDSTEIN, 1993; HANAS et al., 1999). Esta substituição pode promover novas mudanças conformacionais nessas proteínas e com isso alterar o metabolismo celular e induzir alterações na transcrição de

genes (HANAS et al., 1999; BOUTON et al., 2001). Os mecanismos bioquímicos e moleculares da genotoxicidade do Pb(II) são pouco conhecidos e os resultados desses estudos permanecem inconclusivos (ADONAYLO e OTEIZA, 1999; ZELIKOFF et al., 1988; HARTWING, 1994; HARTWING e SCHLEPEGRELL, 1990; FRACASSO et al., 2002).

Na investigação sobre os mecanismos envolvidos na toxicidade de xenobiontes no homem, freqüentemente se usam modelos de cultivo celular. Eles têm a vantagem de que, um amplo padrão de mudanças fisiológicas e estruturais pode ser analisadas sob condições definidas, isto é, tempo e concentração (MILOSEVIC e MAIER, 2000). Em algumas investigações, macrófagos (monócitos diferenciados) são utilizados para testes com xenobiontes, porque são células altamente versáteis com diversas e importantes funções (VAUX, 1981).

Os macrófagos são células complexas envolvidas em uma variedade de funções imunorregulatórias, fagocitose e degradativas e os efeitos do Pb(II) nestas células não têm sido ainda bem documentados (SHABANI e RABBANI, 2000). No entanto, segundo os mesmos autores, o estudo em macrófagos peritoneais pode fornecer importantes informações quanto aos danos deste metal no sistema de defesa do organismo. Nossos dados mostram que os efeitos do Pb(II) em macrófagos peritoneais de camundongos estão associados a diferentes mecanismos, no entanto dois destes parecem depender diretamente do Ca^{++} , a morte celular e a organização e funcionamento do citoesqueleto. Embora vários, dentre os resultados apresentados neste trabalho sejam consistentes com a literatura, alguns aspectos não foram ainda reportados, contribuindo assim com a compreensão dos efeitos do Pb(II) na estrutura e na função dos macrófagos.

No presente estudo foram aplicadas várias metodologias, como viabilidade celular, microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e varredura, imunomarcção de microfilamentos de actina, FAK (quinase de adesão focal), integrina α_5 , Bax, fagocitose, adesão (em fibronectina), e teste Cometa, com objetivo de avaliarmos os possíveis efeitos que o Pb(II) nas concentrações de 20 μM e 40 μM por um período de 4, 24 e 72h, poderia causar nesses macrófagos peritoneais de camundongos *Mus musculus*.

O índice de viabilidade celular constitui um importante elemento na avaliação da condição experimental *in vitro* dando mais confiabilidade aos dados. Os Mφs do grupo controle apresentaram um índice de viabilidade acima de 90%, após 28h de cultivo. Estes dados são comparáveis aos relatados por SHABANI e RABBANI (2000) para macrófagos alveolares de camundongos. Quanto aos efeitos, embora os mesmos autores não tenham observado efeito do Pb(II) (15 e 240μM) na viabilidade dos macrófagos alveolares após 3h de exposição, nossos dados mostraram que o chumbo afeta a viabilidade dos macrófagos peritoneais a partir de 4 h de exposição, tanto para 20 como 40 μM. Estes dados são confirmados por WOZNIAK e BLASIAK (2003) em linfócitos (10-100μM) e KROCOVA e colaboradores, (2000) em linfócitos e macrófagos (1, 10 e 100μM). Após 48h de cultivo, os Mφs do grupo controle em garrafas mostraram-se mais viáveis que em lamínulas, no entanto esta diferença não foi suficiente para comprometer os resultados obtidos com os Mφs cultivados sobre lamínulas.

Utilizando critérios morfológicos foram diferenciados Mφs com alterações estruturais de forma e comportamento de Mφs residentes (controle). Os Mφs tratados com Pb(II) apresentaram as seguintes alterações morfológicas: citoplasma claro e vacuolizado com várias projeções citoplasmáticas, sendo que alguns deles apresentaram grânulos citoplasmáticos densos; núcleos grandes, lobulados, claros com muita eucromatina e nucléolo evidente. Já os Mφs residentes, os quais são predominantes nos grupos controle, apresentaram citoplasma escasso e ausência de grânulos citoplasmático densos, núcleo pequeno, escuro, oval ou reniforme.

Estes resultados nos mostraram que acima de 75% dos Mφs tratados apresentaram-se com alterações morfológicas para os 3 tempos de exposição. Os resultados permitem sugerir que o Pb(II) nessas concentrações e tempos de exposições induz uma série de alterações morfológicas.

Recentemente MISRA e colaboradores (2002) mostraram que Mφs peritoneais tratados com cádmio apresentaram alterações morfológicas significativas, como o aumento do volume celular e alterações nas bordas do citoplasma, típicas de células com estrutura do citoesqueleto alterada.

Um trabalho realizado por BISHAYI e SENGUPTA (2003) com Mφs de camundongo *Swiss* exposto ao acetato de chumbo mostrou que essas células apresentaram alterações morfológicas que podem ser a causa da redução do estado funcional dessas células. Também houve um decréscimo na adesão com o tempo e o índice quimiostático foi decrescendo significativamente, o que pode sugerir que a intoxicação por metais pesados in vivo pode de alguma maneira alterar a forma, sinais da membrana e funcionalmente inativar as células (BISHAYI e SENGUPTA, 2003).

Os nossos resultados de alterações morfológicas causadas pelo Pb(II) parecem vir de encontro aos trabalhos realizados por MISRA e colaboradores (2002) e BISHAYI e SENGUPTA (2003), que o Pb(II) mesmo em baixas concentrações pode levar a uma série de alterações morfológicas significativas. Essas alterações morfológicas poderão levar a um comprometimento em nível estrutural e molecular desses Mφs. Elas podem fazer com que essas células apresentem uma série de disfunções, como por exemplo dificultar o reconhecimento de antígeno, o espreadamento e a realização do processo de fagocitose e com isso, inibir a capacidade funcional desses Mφs, e conseqüentemente, comprometer o funcionamento do sistema imunológico do indivíduo.

As alterações morfológicas refletem o efeito bioquímico e/ou molecular de contaminantes ou agentes tóxicos na estrutura e funcionamento da célula. As análises morfológicas realizadas com os Mφs no presente trabalho, mostraram que o Pb(II) provoca diferentes tipos de alterações visíveis em microscopia de luz e eletrônica. Os efeitos morfológicos estão relacionados principalmente com o efeito do Pb(II) na organização e estrutura do citoesqueleto e morte celular. Tais observações são evidentes tanto pelas alterações na forma da célula como pela presença de diversos vacúolos no citosol facilmente observáveis em microscopia de luz após 72h de exposição. Os vacúolos citoplasmáticos observados nos macrófagos afetados pelo Pb(II), apresentaram tamanhos variados e não contêm material no seu lúmen, no entanto não é possível definir se estes representam fagossomos ou se constituem um distúrbio no fenômeno da fagocitose.

Podemos observar através da microscopia eletrônica de transmissão, que os macrófagos expostos ao Pb(II) apresentaram uma série de alterações morfológicas e estruturais quando comparados com os Mφs do grupo controle. Os Mφs submetidos às duas concentrações de Pb(II), apresentaram alterações morfológicas importantes que permitiram evidenciar o efeito desse metal nestas células, nos três tempos de exposição. As alterações apresentadas por esses Mφs como a cromatina altamente condensada, a presença de muitos *blebs* e grandes vacúolos. Todas essas alterações foram detectadas nos Mφs que foram tratados nas duas concentrações de Pb(II) e nos três tempos de exposição. Portanto, o Pb(II) nessas concentrações, e nesses tempos de exposição, são capazes de induzir esses macrófagos a apresentarem grandes alterações não só morfológicas como também estruturais, comprometendo com isso a identificação, por exemplo das organelas. Trabalhos realizados por (KERR, et al., 1972) com cortes de tecidos contrastados com uranila ou acetato de chumbo e examinados através do MET, observaram que a cromatina se apresentava altamente condensada em células apoptóticas. Outras características dessas observações incluem o aumento da densidade do citoplasma e a presença de *blebs* na membrana celular.

A microscopia eletrônica tem dado evidência de uma alteração na ultraestrutura das células (JENSEN et al., 1965). Há também delgadas lesões na membrana nuclear, mas as anormalidades são mais evidentes no citoplasma. O complexo de Golgi é aumentado e as mitocôndrias apresentam alterações nas cristas (ALBAHARY, 1972).

Segundo LINDER e colaboradores (1999) observaram que macrófagos após a estimulação, grandes mudanças ocorrem na morfologia dessas células como por exemplo: a perda da simetria radial e mais alongados, numerosos filopódios são formados e os podosomos são recrutados.

Com todas essas alterações apresentadas pelos Mφs neste trabalho, podemos afirmar, que o Pb(II) nessas concentrações e tempos de exposição é capaz de provocar uma série de alterações morfológicas e moleculares como mencionado acima, levando essas células ao comprometimento não só das suas estruturas, como também dos processos fisiológicos. Como por exemplo,

podemos constatar que no teste de fagocitose realizado com esses Mφs, pode se observar que houve uma diminuição do índice endocítico, isto é, na capacidade fagocítica dessas células, comprometendo assim o sistema imunológico, já que estas células possuem um papel muito importante ligado ao sistema de defesa dos organismos.

Várias alterações morfológicas puderam ser observadas através de MEV nos Mφs, principalmente após 72h de exposição ao Pb(II) nas duas concentrações, o que indica a proximidade entre essas concentrações, que para alguns autores podem ser consideradas concentrações baixas do xenobionte Pb(II). Os Mφs do grupo controle mostraram claramente um espreadimento ao longo do tempo, passando de células arredondadas (4h) para células mais alongadas com dois ou três projeções regulares (72h) sobre o substrato. As projeções homogêneas dos Mφs observadas no controle não são observadas nos grupos tratados (20 e 40μM), onde elas apresentaram certa desorganização e são relativamente irregulares se comparadas ao controle (Figura 15B e 16A). Também fica claro o aumento no número de filopódios e a incidência de lamelopódios nos Mφs expostos ao xenobionte. A emissão dessas projeções marcadamente observadas nos Mφs tratados, poderia estar interferindo na emissão de pseudópodos ou na eficiência da emissão dos mesmos, fato corroborado pela redução da capacidade fagocítica das células. Esta redução pode estar relacionada com a interação do Pb(II) com receptores de membrana e o englobamento da levedura.

Após 72h (20 e 40μM) observou-se uma maior incidência de *blebs* na superfície celular, o que é uma das características de morte celular por apoptose. Em MET, *blebs* também foram observados após 24h de exposição e a presença de núcleos picnóticos e intensa compactação da cromatina após 4h de exposição, o que está de acordo com carácter citotóxico do xenobionte testado.

As alterações descritas acima mostram claramente que o Pb(II) nas duas concentrações testadas é autor de mudanças na estrutura do citoesqueleto dos macrófagos, interferindo na sua morfologia e comportamento sobre o substrato. O lançamento irregular de todos os tipos de projeções do citoplasma e membrana

nos diferentes tempos e concentrações, não deixa dúvidas do aspecto citotóxico deste contaminante sobre o tipo celular utilizado.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a organização e/ou distribuição dos filamentos de actina também estão sendo afetados pela presença do Pb(II) nos Mφs. Tais alterações podem ser explicadas por um conjunto de diferentes mecanismos, onde o Pb(II) atua alterando a função de proteínas chave (Figura 14). Segundo RAZMIFSHARI e colaboradores (2001), a timosina B4 é diretamente inibida pelo Pb(II) alterando a organização dos filamentos de actina. Da mesma forma, que baixas concentrações de Pb(II) podem ativar a quinase C (TIAU e LAWRENCE, 1996; ZHENG et al., 2003), interferindo em 2 mecanismos diferentes que podem alterar a organização dos filamentos de actina ou a expressão gênica (SMITH et al., 1998). Observamos no entanto, que a quinase C não constitui a única via de interferência do Pb(II) na expressão gênica. Segundo RAZMIFSHARI e colaboradores (2001) a presença deste metal altera diminuindo a função de zinc finger proteins, as quais têm também um papel direto no controle da expressão gênica. Neste caso, o Pb(II) impede a formação de uma ponte entre a molécula de histidina e cisteína, essencial na formação do domínio da Zinc Finger Protein com o DNA. Somando a isso, de acordo com TULLY e colaboradores (2000), o Pb(II) pode aumentar a expressão da β -catenina, molécula importante na expressão gênica e na formação dos contatos focais. De uma forma geral, parece ser consenso para alguns autores que o Pb(II) age indiretamente na expressão gênica através de sua ação na transdução de sinais (receptor, proteína G, IP3 e proteínas quinases) (FUJUWARA e KAJI, 1999; ZAWIA et al., 2000; GUITY et al., 2002; WOZNIAK e BLASIAK, 2003; ZHENG et al., 2003). No entanto, segundo SHABANI e RABBANI (2000), alterações nos processos de transdução dos sinais pode ser o princípio para alterar a organização dos filamentos de actina pelo Pb(II), também confirmado por ZHENG e colaboradores (2003).

Sabemos que a actina é uma das proteínas mais abundantes que ocorre nas células eucariontes (KORN, 1982) e (SAUMON e BERRY, 1994). A polimerização da actina, miosina e α actinina está envolvida no controle da forma da célula, contração e motilidade das células (MITCHISON e CRAMER, 1996;

JANSON et al., 1992). Portanto, os microfilamentos de actina são cruciais para a polaridade, locomoção e adesão das células, e existe uma comunicação entre os microtúbulos e a actina do citoesqueleto (WATERMAN-STORER e SALMON, 1999; SMALL et al., 1999a; SMALL et al 1999b; KELLER et al., 1984).

Os microfilamentos de actina estão presentes nos lamelopódios e filopódios que formam a periferia da célula e são necessários para o espraiamento e motilidade celular. Fibras de *stress* são contráteis e servem para desenvolver uma intensa fixação no substrato (SMALL et al, 1999a). O processo de polimerização e despolimerização da F-actina é um processo contínuo. A montagem desses filamentos de actina está regulada por membros da família Tho de pequenas GTPases. Rho (promove a formação da fibra de *stress* e a maturação da adesão focal) regula a formação das fibras de *stress*, ao passo que a formação dos lamelopódios e filopódios são regulados pela Rac (promove os lamelopódios e a formação do complexo focal) e Cdc42 (promove a formação dos filopódios e o complexo focal), respectivamente (BRAGA et al., 1999).

O espraiamento é mediado pela Rac em direção ao crescimento dos lamelopódios (VASILIEV e GELFAND, 1981). Estudos têm demonstrado que ativação das Cdc42 é necessária para a formação de filopódios (JONES et al., 1998; ALLEN et al., 1998). Além disso, a dinâmica do rearranjo da actina do citoesqueleto parece ser coordenada em espaço e tempo por vias de sinalização intracelular envolvendo ativação de proteínas G. Recentemente, membros da família Rho das GTPases têm sido incluídas nas alterações do citoesqueleto (TAPON e HALL, 1997). Portanto, o espraiamento e a organização da actina do citoesqueleto em Mφs é regulado por Cdc42, Rac e Rho (ALLEN et al, 1997).

Existem dois domínios principais onde os filamentos de actina estão concentrados na membrana plasmática: nos lugares da adesão no substrato, e nos lamelopódios e filopódios (VICTOR SMALL e KAVERINA, 2003).

Os complexos de adesão focal são exclusivamente ligados a filamentos de actina, e a diferença de tipos de complexos de adesão pode ser classificada de acordo com a polimerização dos filamentos de actina, aos quais eles estão associados.(KAVERINA et al, 2002).

Além da actina, outras proteínas do citoesqueleto estão certamente envolvidas na formação de sua estrutura, no espraiamento de Mφs e o estabelecimento de sítios de adesão focal (PAVALKO e LA ROCHE, 1993). As proteínas que estão envolvidas no espraiamento de Mφs mediados por integrinas incluem vinculina e talina (YÜRÜKER e NIGGLI, 1992; LI et al, 1996).

A reorganização da actina do citoesqueleto é uma parte integral da resposta celular a uma variedade de sinais do ambiente. A remodelagem adequada da actina do citoesqueleto é crítica para os processos como divisão, crescimento, adesão, e locomoção (BERTON e LOWELL, 1999).

A arquitetura do citoesqueleto é essencial para manutenção da forma da célula e da adesão celular (ANSELME, 2000; ANTTILA et al, 1997) e avaliação dos diferentes componentes é um bom indicador para o estado de ativação de macrófagos e pode assim ser usado como um sinal de indícios inflamatórios potenciais (LINDER et al., 1999).

Pelas diferenças apresentadas com relação à distribuição dos microfilamentos de actina na extensão dos Mφs e como conseqüências das mudanças no aspecto morfológico dessas células, percebeu-se que o chumbo, mesmo em baixas concentrações, induz uma variedade de respostas desses microfilamentos nas dinâmicas celulares, e conseqüentemente causa algum tipo de distúrbio na organização desses microfilamentos de actina nestas regiões da célula (Figuras 17K - 17O). Em resumo, verificamos que o Pb(II), por diferentes vias, pode interferir na organização da actina dos Mφs com efeitos no movimento celular e conseqüentemente na função destas células.

A proteína quinase de adesão focal (FAK) é a maior tirosina quinase citoplasmática reconhecida como um componente chave da transdução de sinais da integrina em células mesenquimais e epiteliais (PARSONS, 1996).

A FAK consiste de complexos protéicos da membrana celular que regula a ligação da célula a matriz extracelular e fixa o citoesqueleto à membrana plasmática (LUTTREL et al., 1999; APLIN et al., 1998).

O papel essencial da FAK é sinalizar a integrina levando com isso a reorganização do citoesqueleto, crescimento da célula, sobrevivência e motilidade (BERTON e LOWELL, 1999). Três classes de tirosina quinase têm sido incluídas

como os maiores transdutores de sinais pelas integrinas em monócitos e macrófagos de camundongos. Essas três classes pertencem à família quinase-FAK (p125 e PyK2), quinase-Src e p72 (BERTON e LOWELL, 1999) e podem atuar como um dispositivo de sinalização (YASUDA et al., 1999), que é um processo de várias vias que não somente envolve receptores de adesão, mas também requer a participação do citoesqueleto (ROHRBACH e TIMPL, 1993).

A distribuição das FAK na superfície dos Mφs se assemelha àquela descrita para os microfilamentos de actina, ou seja, distribuindo-se por toda a superfície celular. Após o tratamento com Pb(II) (20 e 40 μM) é observado uma intensa e nítida marcação para FAK ao longo das projeções celulares, e tênue marcação ao longo de toda a superfície celular, aquela sendo semelhante ao padrão observado para os microfilamentos de actina. Esse resultado demonstra a associação destas proteínas na dinâmica celular dos Mφs, em associação com os microfilamentos de actina, contudo falta muita informação para se conhecer a dinâmica de adesão focal (ZAMIR et al., 2001).

Embora estudos tenham demonstrado que ativação da tirosina quinase é essencial para sinalizar a integrina em células fagocíticas, o mecanismo pelo qual esta tirosina quinase torna-se enzimaticamente ativada em células aderentes não é conhecido (BERTON e LOWELL, 1999).

Integrinas são glicoproteínas transmembrana sintetizadas no retículo endoplasmático. Essas moléculas são grandes receptores primários que regulam adesão da célula às proteínas do MEC (matriz extracelular), bem como a adesão célula-célula. Há aproximadamente 17 diferentes subunidades α e 8 β . A sinalização das integrinas leva a um rearranjo do citoesqueleto, ao espraiamento e a adesão da célula (BERTON e LOWELL, 1999).

Através da imunomarcação para os receptores de Integrina α_5 , observamos que nas células controle ocorreu a presença de intensa marcação na forma de *clusters* por toda a superfície celular. Como observado anteriormente, estas células mantêm-se espraiadas e com poucos prolongamentos citoplasmáticos. A intensa marcação em *clusters* aponta os pontos de adesão celular à matriz extracelular. Os macrófagos expostos ao chumbo (nas concentrações de 20 ou 40 μM) apresentam-se nitidamente mais espraiadas com projeções membranares

características onde se vê *clustering* de receptores para integrinas, sugerindo dinâmica de adesão e/ou migração celular. Geralmente os domínios extracelulares α e β das integrinas ligam-se aos componentes da matriz extracelular. Elas são chamadas de integrinas por causa de seu papel de fazer a conexão entre o citoesqueleto e MEC, e as subunidades α e β não interagem covalentemente.

A ligação entre a integrina e a actina presente no citoesqueleto não é simples e existe sob diversas formas: junções semi-aderentes, adesão focal e junções miotendiosas. Muitas moléculas com potencial para ligar integrinas aos filamentos de actina foram caracterizadas. As proteínas de ligação à actina são talina, filamina, vinculina e α -actinina e estão co-localizadas com integrinas e/ou diretamente ligadas aos domínios destas. Talvez, em diferentes tipos celulares ou em locais subcelulares, a ligação integrina-actina seja feita, por diferentes proteínas de ligação ou diferentes arranjos de vários ligantes dentro de um complexo. Alternativamente, cada local de adesão à integrina pode conter uma mistura de diferentes conexões, fazendo com que cada integrina individualmente possa ser ligada a diferentes tipos de proteínas de ligação.

Integrinas podem atuar como mecanorreceptores, e a transferência das forças das integrinas para o citoesqueleto, representa um passo importante na sinalização intracelular que leva ao rearranjo global do citoesqueleto (WANG e BUTLER, 1993). A matriz extracelular controla a estrutura e a mecânica do citoesqueleto, particularmente pela ligação da fibronectina à integrina CHOQUET e colaboradores, (1997) e WANG (1994) sugerem que macrófagos expostos ao Pb(II) sofrem inibição da atividade quimiostática, podendo alterar a resposta inflamatória. A inibição da capacidade funcional dos macrófagos induzida por metais pesados não está claramente esclarecida.

Em células do sistema imune que proliferam e se diferenciam rapidamente em resposta a estímulo, por exemplo, bacteriano, o mecanismo imune e ativação celular são importantes. A inibição dessas funções pode resultar em um grau de toxicidade (BISHAYI e SENGUPTA, 2003).

Tais resultados demonstraram que quando às células são expostas ao metal, os *clusters* de integrina estão mais associados aos lamelopódios e não aos

pseudópodos, visto que estes na presença do xenobionte diminuem a dinâmica de fagocitose. Sendo assim, essas projeções pertencem a dinâmicas de migração, adesão e espraiamento, onde provavelmente as células expostas estejam com um comportamento migratório aleatório ou desenvolvendo uma estratégia de sobrevivência, mantendo-se aderidas ao substrato. Para tanto, faz-se necessário investigarmos frente ao ensaio de migração celular tanto por haptotaxia como quimiotaxia, o que certamente concluiria o possível estímulo migratório para os mesmos.

Também foi feita imunomarcagem para proteínas citoplasmática talina, que não foi detectada nos Mφs.

A fibronectina (FN) é uma glicoproteína dimérica de 440 kDa produzida por uma variedade de células e capaz de atuar em amplos processos biológicos como adesão, espraiamento, organização do citoesqueleto, migração, proliferação e diferenciação. Esta proteína tem se mostrado como mediadora de fagocitose de vários tipos de partículas artificiais e restos de tecidos pelos macrófagos (VAN DE WATER, 1985).

Pudemos observar que os Mφs não têm estímulo adesivo a fibronectina, os Mφs controles aderem similarmente aos Mφs que aderiam sobre o BSA (Albumina de soro bovino/controle negativo de adesão). Células na presença de arsênio e chumbo apresentam decréscimo gradual na adesão. (BISHAYI e SENGUPTA, 2003).

Das várias famílias de moléculas de adesão, as integrinas específicas de monócitos (Integrina $\beta 2$, CD11/CD18, estão entre os mais importantes (SANCHEZ-MADRID e CORBI, 1992), com Mac-1 (CD11b/CD18) sendo a forma predominante em macrófagos durante a inflamação (AREFIEVA e KRASNIKOVA, 2001).

O chumbo inibiu a produção de óxido nítrico *in vitro* de Mφs do baço (TIAN e LAWRENCE, 1995) e reduziu a adesão de macrófagos peritoneais (VILLANUEVA et al.; 1997).

SMALL e KAVERINA (2003) sugerem que os substratos de adesão são os principais locais de interação entre os microtúbulos e os microfilamentos de actina do citoesqueleto, e que esta interação tem um papel central na determinação da

polaridade das células que se movimentam e a adesão de uma célula no substrato é um requerimento necessário para o espreadimento (LEE e JACOBSON, 1997).

Locais de adesão, como reconhecidos pelo acúmulo de vinculina, originam pequenos pontos (complexo focal) atrás da borda da lamelopódio, abaixo da rede de actina. (LEE e JACOBSON, 1997). Vinculina, integrina $\beta 1$, α -actina e FAK têm sido localizadas nestes complexos focais por imunomarcação.

Sabe-se que as células podem espreadir na ausência de microtúbulos, logo não depende do tráfego de vesículas ligadas a microtúbulos. (LEE e JACOBSON, 1997).

Devemos ressaltar que a adesão sobre fibronectina, embora tivesse apresentado uma sutil elevação no valor da absorbância, isto não sugere um maior estímulo adesivo aos substratos após a exposição do chumbo, mas sim uma maior expansão celular com conseqüente maior absorção do corante e, por sua vez, maior valor da absorbância. Não podemos aqui concluir que o chumbo não induza uma ação sobre a dinâmica de adesão celular, para tanto seria necessário empregarmos ensaios de adesão com outras proteínas de matriz. Podemos ainda imaginar que esta mudança morfológica induzida pelo Pb(II) concentração-dependente esteja de alguma forma estimulando a migração celular, fato que pretendemos verificar nos próximos experimentos.

Os resultados de expressão da proteína Bax confirmam as imagens obtidas através das análises da MET, onde mostraram que o Pb(II) é capaz de estimular os dois tipos de morte celular, necrose e apoptose. A necrose é observada já nas primeiras horas de exposição, é característica de efeito agudo, onde algum distúrbio na membrana plasmática promove sua desestabilização estrutural e funcional, alterando a homeostase celular e levando a este tipo de morte celular. A morte celular por apoptose ocorre de forma mais complexa, onde um mecanismo bioquímico dirige o evento culminando com a ativação de endonucleases e a conseqüente quebra da molécula de DNA. Este tipo de morte celular possui aspectos morfológicos típicos como a formação de *blebs* (observados em MEV e MET), a deposição de DNA próximo ao envoltório nuclear, formação de núcleos picnóticos (MET), presença de grandes vacúolos (MET) e

aumento da exposição do gene para proteína Bax (imunomarcacão), o que permite facilmente sua visualização microscópica. Neste caso, tanto a célula como o núcleo perdem a forma característica e um conjunto de eventos bioquímicos em cascata são acionados, como ativação de caspases, alterações no citoesqueleto com a perda de função das integrinas, o que faz com que a célula perca sua capacidade de adesão, fosforilação dos filamentos intermediários (lamínas) e a quebra do DNA (observados através do teste Cometa) (ALBERTS et al., 2000).

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que a ativação da proteína pró-apoptótica Bax, constitui um efeito chave na indução da apoptose em Mφs expostos ao Pb(II), também relatado por SALEH e colaboradores (2003) em linfócitos expostos ao organofosforado Paraoxon. No entanto, observamos que outras vias também sujeitas ao efeito do Pb(II) podem estar associadas à expressão da Bax. Segundo os mesmos autores, a ativação da caspase 9 pode aumentar a expressão da Bax promovendo o efluxo de citocromo c das mitocôndrias para o citosol, aumentando com isso a ativação da própria caspase 9, retroalimentando o ciclo de ativação das caspases. Neste caso, uma provável explicação da ação do Pb(II) na expressão da Bax pode ser via mecanismo de sinalização secundária através do Ca^{++} . Segundo MA et al., (1998), o Pb(II) diminui a concentração intracelular de Ca^{++} , o que promove a ativação da caspase 9 (SALAS e BUCHIEL, 1998). O aumento da taxa de Bax no entanto, pode ser também consequência da inibição da Bcl_2 pela presença de baixas concentrações de Ca^{++} no citosol (VAIRO et al., 1996). Desta forma, parece que o aumento da expressão da Bax nos macrófagos peritoneais expostos ao Pb(II), ocorre indiretamente através do seu efeito na concentração de Ca^{++} intracelular. Segundo SALAS e BUCHIEL (1998), alterações na sinalização de Ca^{++} em respostas apoptóticas têm surgido como um mecanismo primário de efeito tóxico para a célula. Além disso, o efeito do Pb(II) em proteínas quinases e fosfatases Ca^{++} dependentes, pode ter um papel importante no controle transcricional de moléculas reguladoras da apoptose (LIU et al., 1991).

A evidência mais importante do efeito tóxico do Pb(II) na função dos Mφs é demonstrada pela baixa atividade fagocítica destas células após exposição ao

metal nas duas concentrações testadas. Os resultados mostram que após a incubação com *Saccharomyces cerevisiae* depois de 72h de exposição, a capacidade de fagocitar estas células cai para menos da metade na maior concentração testada. A fagocitose é um fenômeno associado à defesa do organismo, comum em células como macrófagos e linfócitos. Esta atividade depende inicialmente da identificação extracelular da estrutura a ser internalizada e posteriormente do movimento do citoesqueleto, necessário à internalização da mesma dentro de vesículas citoplasmáticas para posterior digestão. Nossos dados mostram que, apesar de formar vesículas na presença de *S. cerevisiae*, estas encontram-se vazias e em maior número nos grupos expostos ao chumbo que nas células do grupo controle. Na concentração de 40 μ M, a quantidade de vacúolos é muito maior, chegando a alterar completamente a forma original da célula. Sendo assim, sugerimos duas hipóteses na tentativa de entender o efeito do Pb(II) na fagocitose dos M ϕ s. (I) os M ϕ s perdem sua capacidade de reconhecer o fungo extracelularmente e portanto não o fagocita, caracterizando um efeito inibitório do Pb(II) na estrutura dos receptores de membrana ou diminuindo a expressão dos mesmos, e (II) os M ϕ s reconhecem parcialmente o fungo estimulando a fagocitose, no entanto não há interação suficiente com os receptores para que o fungo permaneça associado à membrana no momento da internalização, fazendo com que as vesículas formadas estejam vazias. Esta segunda hipótese pode estar associada também a um distúrbio na estrutura e organização do citoesqueleto, o que dificultaria a internalização do fungo. A presença de vesículas vazias é observada tanto na microscopia de luz como na análise ultraestrutural dos M ϕ s, mas não é observada no grupo controle, onde estas se apresentam contendo a célula do fungo fagocitado ou restos celulares em processo avançado de digestão. Tais resultados indicam que as condições de cultivo primário utilizadas não comprometem a capacidade dos M ϕ s exercerem sua função de defesa.

A interação actina-microtúbulo que regula a integridade e o reparo celular, encontram-se diretamente associada aos contatos focais, onde o complexo proteico de integrinas, FAK, talina e vinculina constituem o princípio de adesão celular (LEE e GOTLIEB, 2002). No presente trabalho, a imunomarcagem de

proteínas participantes do movimento do macrófagos como a integrina- α_5 , FAK e actina, mostra que o Pb(II) ao promover alterações na morfologia celular, altera a distribuição dos contatos focais os quais concentram-se nas extremidades dos prolongamentos citoplasmáticos. Tais efeitos são caracterizados pela formação de fibras de *stress*, o que é confirmado também pela imunomarcação dos filamentos de actina. Quando expostos ao Pb(II), os macrófagos concentram a distribuição destas proteínas nas extremidades celulares, constituindo estas as principais regiões de adesão celular ao substrato. Tais resultados podem ser interpretados como um distúrbio na organização do citoesqueleto e distribuição dos contatos focais, alterando a estabilidade dos macrófagos sobre o substrato. Tais eventos são muito complexos e dependem no seu funcionamento de diferentes mecanismos envolvendo a sinalização celular e o controle da expressão gênica (SMITH et al., 1998). Desta forma, os contatos focais são estruturas chave no movimento dos macrófagos sobre a matriz extracelular, e sendo assim essenciais à sua função de defesa.

Estudos *in vitro* realizados por HILBERTZ et al. (1986) e BUCHMULLER-ROVILLER et al. (1989), têm mostrado que a exposição de M ϕ s ao Pb(II) resultou em um decréscimo do metabolismo oxidativo, bem como na fagocitose. Também pode ser observado que M ϕ s expostos ao chumbo têm um menor conteúdo lisossomal e por isso, são menos capazes de digerir bactérias. Estudos *in vivo* também têm mostrado que M ϕ s expostos a metais pesados sofrem redução da capacidade fagocítica (BISHAYI e SENGUPTA, 2003).

Com os resultados obtidos nesses experimentos podemos afirmar que o Pb(II) nas concentrações administradas e nos tempos de exposição é capaz de reduzir o índice fagocítico dos M ϕ s (dado corroborado pela literatura disponível) pela interferência nos mecanismos da fagocitose. Essa redução, (aliada a outras alterações observadas) portanto, poderá levar a um comprometimento do sistema imunológico do organismo.

O Pb(II) altera drasticamente a atividade fagocítica dos M ϕ s o que pode significar um grave efeito do metal com importantes reflexos para o sistema imunológico. A nossa tentativa de explicar a interferência do Pb(II) na atividade fagocítica dos macrófagos esta baseada no efeito do metal na organização dos

filamentos de actina e contatos focais, uma vez que estes desempenham papel vital no movimento celular. Consideramos portanto, que o movimento celular é essencial no fenômeno de fagocitose, e sendo assim vários mecanismos afetados pelo Pb(II) podem potencialmente interferir direta ou indiretamente alterando a função dos Mφs. Para a discussão a seguir, consideramos os efeitos sobre o funcionamento da miosina, contatos focais e organização dos filamentos de actina como os mecanismos chave no movimento celular. O Pb(II) pode interferir inibindo a ativação da miosina pelo seu efeito sobre os sinais de transdução (SHABANI e RABBANI, 2000) inibindo assim o estímulo quimiostático (NIGGLI, 2003). Outra via possível é a ação do Pb(II) diminuindo a concentração de Ca^{++} intracelular, que segundo SMITH et al., (1998) pode alterar o movimento celular diminuindo a ativação da miosina. Uma outra hipótese seria o efeito do Pb(II) da alteração na distribuição dos contatos focais, descritos neste trabalho e confirmados por VILLANUEVA et al., (1997), onde a presença do Pb(II) leva a uma diminuição na adesão de Mφs. Finalmente, a ação de diferentes mecanismos que levam a uma alteração na organização e distribuição dos filamentos de actina, como descrito acima, interfere diretamente com a projeção de lamelopódios e filopódios prejudicando o movimento da célula sobre o substrato (SMALL et al., 1998). Sendo assim, sugerimos que o efeito inibitório do Pb(II) na atividade fagocítica dos Mφs deve-se a uma variedade de fatores e mecanismos que interligados alteram total ou parcialmente o movimento celular, atividade essencial na função destas células.

Outros aspectos, entretanto, estão ligados ao efeito do Pb(II) na função imune dos Mφs, dos quais destacamos a síntese do ácido nítrico (NO), que desempenha um papel importante na função destas células (TIAN e LAWRENCE, 1996). Segundo os mesmos autores, embora outros fatores fisiológicos e patológicos possam regular a produção de ácido nítrico nos Mφs, o Pb(II) pode bloquear a produção de NO *in vitro*, explicando algumas anormalidades promovidas pela presença do metal (LAWRENCE, 1985; SHABANI e RABBANI, 2000; KROCOVA et al., 2000) comprometendo a sua função imune.

A presença de fragmentação do DNA observada neste trabalho pelo teste Cometa, foi também descrita por DONADEVI e colaboradores (2003) em grupos

de pessoas expostas ao Pb(II). Tal evidência pode ser devido a um efeito direto do Pb(II) na estrutura da molécula de DNA, ou indiretamente, via outro mecanismo envolvendo a ativação das caspases no processo de morte celular (SALEH et al., 2003). Neste caso, a participação do Pb(II) alterando a homeostase do Ca^{++} parece ser novamente a via mais provável, pois uma vez ativada a caspase 9 (SALAS e BURCHIEL, 1998), ocorre a ativação da caspase 3 e a conseqüente ativação das endonucleases Ca^{++} e Mg^{++} dependentes. Tais eventos terminam com a quebra enzimática do DNA, caracterizando a fase irreversível da apoptose (ALBERTS et al., 2000). Se considerarmos a primeira hipótese, ou seja, que o Pb(II) seja capaz de provocar diretamente a quebra do DNA sem passar pela via bioquímica das caspases (HARTWIG et al., 1990; WOZNIAK e BLASIAK, 2003), a expressão da proteína P53 é ativada e pode, por diferentes mecanismos, iniciar a via bioquímica de ativação das caspases (SALAS e BURCHIEL, 1998). O aumento na expressão da P53 inibe a síntese da proteína antiapoptótica Bcl_2 (WU et al., 2003), ao mesmo tempo que induz a expressão da Bax (BORNER, 2003) diminuindo conseqüentemente a concentração do dímero Bcl_2 -Bax. Com isso aumenta a concentração da Bax que favorece o efluxo de citocromo c das mitocôndrias para o citosol (SALEH et al., 2003), ativando finalmente a via bioquímica das caspases. Observamos no entanto, que mesmo se o Pb(II) atuar diretamente sobre a estrutura do DNA, o mecanismo de ativação das caspases pode ser ativado via expressão da P53. Embora o mecanismo não seja ainda bem esclarecido, segundo WOZNIAK e BLASIAK (2003), sabe-se que o Pb(II) pode interagir diretamente com a molécula de DNA. Alguns autores sugerem que o princípio de atuação do Pb(II) na estrutura do DNA possa ser sua competição com cátions endógenos em ligações com proteínas e seus sítios de ligação, onde o chumbo pode substituir o Cálcio e o Zinco em várias delas (ZAWIA et al., 2000), possibilitando inclusive a indução de aberrações cromossômicas (BOUTON et al., 2001). Outro aspecto relacionado com o efeito do Pb(II) na estrutura da molécula do DNA, pode ser seu efeito inibitório sobre as enzimas de reparo do DNA, como comentado por WOZNIAK e BLASIAK (2003).

Uma terceira via na indução da apoptose pelo Pb(II) é especulativa mas poderia estar associada ao efeito direto do metal na mitocôndria, promovendo a

liberação de citocromo c no citosol. Segundo SALEH e colaboradores (2003) organofosforados podem alterar o potencial transmembrana da mitocôndria levando a liberação de citocromo c e conseqüente morte celular por apoptose. MORKUNAITE-HAIM e colaboradores (2003) associam a presença de espécies reativas de oxigênio como gatilhos, que oxidando aminoácidos críticos (cisteína) em poros sensores de voltagem (CARLSON e EHRICH, 1999), levariam a uma alteração na permeabilidade da membrana com liberação de citocromo c. O Pb(II) é acumulado nas mitocôndrias (SILBERGELD et al., 1980) e poderia estar ocupando sítios importantes nos poros sensores de voltagem através da sua afinidade por resíduos sulfatados do aminoácido cisteína. Embora o efeito do Pb(II) na abertura dos poros de transição de permeabilidade tenha sido relatado por HE e colaboradores (2000) como o principal fator indutor de apoptose em células da retina, resta saber no entanto, se a ligação do Pb(II) com a cisteína dos poros sensores de voltagem (PSV) das mitocôndrias seriam suficientes para promover o aumento de permeabilidade da membrana externa desta organela. Esta é uma hipótese que merece ser investigada, pois pode ser a chave para o entendimento do efeito de outros metais pesados, que como o Pb(II), poderiam alterar a função dos PSV ativando assim o mecanismo de apoptose via liberação do citocromo c no citosol. Tais informações poderiam ser bastante úteis na compreensão da participação dos metais pesados em doenças do tipo neurodegenerativas.

O teste cometa devido à rapidez, simplicidade, sensibilidade e necessidade de um pequeno número de células, tem sido sugerido como uma técnica ideal para vários estudos de danos ao DNA (ROJAS et al., 1999).

Uma grande parte dos trabalhos neste campo têm sido realizados usando células animais, visto que, somente poucas células são necessárias para este tipo de análise. Roedores são os mais freqüentemente usados, mas outros animais tais como cachorro, carneiro e peixes têm sido empregados. Esta técnica tem sido aplicada para vários outros órgãos e tecidos desses animais, incluindo o tecido sanguíneo, cérebro, rim, fígado, etc. Uma quantidade de produtos química tem sido testada, tais como os metais, pesticidas (ROJAS et al., 1990).

A sensibilidade mostrada por este teste, permite-nos usá-lo como uma ferramenta potente para o estudo da genotoxicidade, já que em aproximadamente

85% dos estudos realizados nesta área são encontrados resultados positivos (ROJAS et al., 1990). Com o teste cometa podemos no futuro estudar os mecanismos de ação de novas drogas e também na análise e interações entre agentes anti-neoplásticos atuando em nível do DNA. Outro interesse, com relação ao teste Cometa, é o alto nível de dano no DNA entre pacientes com câncer, o que pode indicar que a malignidade da doença está associada com danos no DNA ou que os pacientes têm uma grande fragilidade, mais do que os indivíduos saudáveis (VAGHEF et al., 1997; RAO et al., 1997).

RALPH e PETRAS têm demonstrado a utilidade do método para aumentar os níveis de dano no DNA em eritrócitos de carpas coletadas ao redor dos lagos (258) e outras espécies de peixes e invertebrados têm também sido usado (NACCI et al., 1996).

O teste Cometa tem demonstrado ser uma técnica sensível para avaliar o dano no DNA entre uma variedade de tipos de células induzidas por uma variedade de agentes fisiológicos e químicos. Em comparação com outros métodos sensíveis, o teste cometa é simples e de baixos custos e os dados podem ser obtidos em pouco tempo (ROJAS et al., 1990).

O dano no DNA, induzido por uma variedade de metais, pode ser usado como biomarcador em áreas poluídas. Cromo, cobre, cobalto, níquel, cádmio e arsênio (CALDERÓN et al., 2003) e chumbo (LOIKKANEN et al., 2003) estão entre os metais que podem induzir dano no DNA.

Nas últimas décadas, novas metodologias para avaliar o dano de DNA têm sido desenvolvidas. Entre elas, o teste cometa não se tornou apenas um teste útil para genotoxicidade, mas também uma ferramenta inestimável para investigar os aspectos fundamentais de dano no DNA e respostas celulares resultantes do dano. Tem sido usada com sucesso para monitorar o dano de DNA em populações humanas expostas. O teste cometa é capaz de detectar quebras em fita simples de DNA, sítios alcalinos instáveis, ligação cruzada entre DNA, DNA e proteínas, aductos de DNA e quebras na fita de DNA associados com excisão de sítios de reparo (TICE et al., 2000).

Relativamente a outros testes de genotoxicidade, as vantagens do teste cometa incluem sua comprovada sensibilidade para detectar danos leves no DNA,

a necessidade de pequeno número de células por amostra, sua flexibilidade, seu baixo custo, sua facilidade de aplicação, e rapidez para obtenção dos resultados (ROJAS et al., 1990) e (TICE et al., 2000).

Usando o teste cometa, metais como cromo (BLASIAK e KOWALIK, 2000), mercúrio (BEN-OZER et al., 2000), arsênio de sódio e cádmio (HARTMANN e SPEIT, 1994), têm mostrado genotoxicidade *in vitro*, e resultados positivos foram observados com cobre (HAYASHI et al., 2000), nitrato de chumbo (DEVI et al., 2000) e trióxido de arsênio (BANU et al., 2001), ou cádmio (VALVERDE, et al., 2000).

No trabalho realizado por Fracasso e colaboradores (2002), foi observado em linfócitos de trabalhadores expostos ao Pb(II) que este metal induziu a formação de cometas com alta frequência e que este é um parâmetro indicativo de dano no DNA. (FRACASSO et al., 2002). Em Mφs expostos ao chumbo houve aumento da incidência de fragmentação do DNA e estes exibiam padrão similar àquele que sofreram apoptose antes da perda de viabilidade (SHABANI e RABBANI, 2000). Análise citológica de Mφs também confirma, que após um período de exposição, o Pb(II) leva essas células ao processo de morte celular por apoptose (SHABANI e RABBANI, 2000).

Finalmente, estes resultados sugerem que o teste cometa é um bom indicador de genotoxicidade, podendo ser utilizado como uma ferramenta eficiente, de baixos custos e de fácil obtenção para detectar danos no DNA. Podendo ser utilizado para o monitoramento da genotoxicidade do Pb(II), não só de macrófagos peritoneais como também de outros tipos celulares.

Este teste poderia ser utilizado como um pré-indicador de toxicidade. Para maiores e mais detalhadas informações, outras técnicas poderiam ser utilizadas como, microscopia eletrônica de transmissão, microscopia eletrônica de varredura e técnicas de imunomarcção.

Resumindo, embora vários aspectos do mecanismo de toxicidade do Pb(II) na estrutura e função dos Mφs ainda se encontrem sem explicação, destacamos dois aspectos que nos parecem importantes de serem investigados: o papel do Pb(II) na inibição de moléculas que participam na transdução de sinais e os mecanismos desencadeados pelo chumbo na morte celular programada. Estes

eventos merecem a atenção de futuras investigações, pois constituem a chave para entender os mecanismos tóxicos do Pb(II) na expressão gênica e na manutenção da integridade celular e tecidual. Considerando que o Pb(II) tem propriedades químicas que competem com o papel do Cálcio e o Zinco, tais respostas poderiam ser também aplicadas ou abrir campos de investigação para o efeito de outros metais igualmente tóxicos como o Cádmio e Mercúrio.

7. CONCLUSÕES

- ✓ O Pb(II) nas concentrações e tempos de exposição utilizados têm caráter citotóxico e genotóxico para Mφs. Esse xenobionte leva à morte celular (tanto por apoptose – dados de MET, MEV, imunomarcação para Bax - como por necrose), altera o citoesqueleto (organização e arranjo dos microfilamentos de actina, FAK e *clusters* de integrina), causa quebras na molécula de DNA (evidenciado pelo teste Cometa), alterando o funcionamento (causa diminuição no índice fagocítico) e morfologia celular.
- ✓ Vários aspectos do mecanismo de toxicidade do Pb(II) se encontram sem explicação. Dois destes devem ser investigados: (1) o papel do Pb(II) na inibição de moléculas que participem na transdução de sinais; (2) os mecanismos desencadeados pelo Pb(II) na apoptose. Esses eventos constituem a chave para a compreensão dos mecanismos tóxicos do Pb(II) na expressão gênica e na manutenção da integridade celular e tecidual.
- ✓ Esforços devem ser feitos para se reduzir à produção de resíduos contendo chumbo, pois uma vez introduzidos no meio ambiente, como consequência da atividade humana, compostos de Pb(II) não são degradados e se acumulam localmente e nos sistemas biológicos, provocando desequilíbrios ambientais e na saúde. Em casos de impactos já identificados, documentação da extensão desses impactos na saúde humana e ambiental e execução de medidas saneadoras, deve ser implementadas em ações conjuntas entre órgãos de pesquisa, governamentais, empresas e a comunidade local.

7.1. Sugestões para novos trabalhos

- ✓ A citometria de fluxo faz-se necessária para quantificar a porcentagem de macrófagos apoptóticos em curva de tempo e concentração, assim como outros diferentes biomarcadores de toxicidade celular são essenciais para uma melhor compreensão dos mecanismos pelos quais o Pb(II) atua em nível celular e molecular.
- ✓ Utilizar outros modelos, para compreender melhor quais e como os mecanismos de toxicidade do Pb(II) atuam na morfologia e funcionalidade celular.
- ✓ O papel do Pb(II) na inibição de moléculas que participam na transdução de sinais e os mecanismos desencadeados pelo chumbo na morte celular programada.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, P. D. **Water Pollution Biology**. Ellis Horwood, Chichester, 1989.

ABERCROMBIE, M.; HEAYSMAN, J.E.; PEGRUM, S.M. The locomotion of fibroblasts in culture. 4. Electron microscopy of leading lamella. **Exp. Cell Res.**, v.67, n.2, p.359-364, 1971.

ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. Molecular basis of macrophage activation: diversity and its origin. In: **The natural Immune System: The macrophage**. LEWIS, C. E.; McGEE, J. O. D. (Eds.), IRL Press, Oxford, New York, Toquio, p. 75-105, 1992.

ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival? **Science**, v. 281, p. 322-326, 1998.

ADONAYLO, V.N., OTEIZA, P.I. Lead intoxication: antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. **Toxicology**, v. 134, p. 77-85, 1999.

AKIYAMA, S.K.; OLDEN, K.; YAMADA, K.M. Fibronectin and integrins in invasion and metastasis. **Cancer Metastasis Rev.**, v.14, p.173-189, 1995.

AKIYAMA, S.K.; YAMADA, K.M. The interaction of plasma fibronectin with fibroblastic cells in suspension. **J. Biol. Chem.**, v.260, p.4492-4500, 1985

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**. 3 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**. 4 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2000.

ALLEN, W. E.; JONES, G. E.; POLLARD, J. W.; RIDLEY, A. J. Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages. **J. Cell Sci.**, v. 110, p. 707-720, 1997.

ALLEN, W. E.; ZICHA, D.; RIDLEY, A. J.; JONES, G. A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. **J. Cell Biol.**, v. 141, p. 1147-1157, 1998.

ALVAREZ-BUYLLA, A.; MERCHANT-LARIOS, H. Mouse primordial germ cells use fibronectin as a substrate for migration. **Exp. Cell. Res.**, v.165, p.362-368, 1986.

ANSELME, K. Osteoblast adhesion of biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, p. 667-681, 2000.

ANTILA, A.; LAPPALAINEN, R.; TIAINEN, V. M.; HAKOVIRTA, M. Superior attachment of high-quality hydrogen-free amorphous diamond films to solid materials. **Adv. Mater.**, v. 9, p. 1161-1164, 1997.

ANTTILA, A.; HEIKKILA, P.; NYKYRI, E.; KAUPPINEN, T.; PUKKALA, E.; HEMBERG, S.; HEMMINK, K. Risk of nervous system cancer among workers exposed to lead. **J. Occup. Environ. Med.**, v. 38, p. 131-136, 1996.

AOKI, Y.; KUNIMOTO, M.; SHIBATA, Y.; SUZUKI, K. T. Detection of metallothionein on nitrocellulose membrane using western blotting technique and its application to identification of cadmium-binding proteins. **Analyt. Biochem.**, v. 157, p. 117-122, 1986.

APLIN, A. E.; HOWE, A.; ALAHARI, S. K.; JULIANO, R. L. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. **Pharmacol. Ver.**, v. 50, p. 197-263, 1998.

ARAKI, N.; JOHNSON, M. T.; SWANSON, J. A. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. **J. Cell Biol.**, v. 135, p. 1249-1260, 1996.

AREFIEVA, T. L.; KRASNIKOVA, T. L. Monocytic cell adhesion to intact and plasmin-modified fibrinogen: possible involvement of Mac-1 (CD11b/Cd18) and ICAM-1 (CD54). **J. Cell Physiol.**, v. 188, p. 403-409, 2001.

AUGER, M.J.; ROSS, J. A. The biology of macrophages. In: **The natural immune system: The macrophage.**, C. E. LEWIS E J. O'D. MCGEE (Eds.), IRL Press, Oxford, New York, Tokyo, p. 1-57, 1992.

AUMAILLEY, M.; SMITH, N. The role of laminins in basement membrane function. **J. Anat.**, v.193, p.1-21, 1998.

BAARS, B. J. The conscious access hypothesis: origins and recent evidence. **Trends Cogn. Sci.**, v. 6, p. 47-52, 2002.

BAKSI, S. M.; FROZIER, J. M. Isolated fish hepatocytes-model systems for toxicology research: Review. **Aquatic toxicology**, v.16, p. 229 – 256, 1990.

BANU, S.B.; DANADEVI, K.; JAMIL, K.; AHUJA, Y.R.; RAO, V.K.; ISHAQ, M. In vivo genotoxic effect of arsenic trioxide in mice using comet assay. **Toxicology**, v. 162, p. 171-177, 2001.

BATUMAN, V. Lead nephropathy, gout and hypentension. **Am. J. Med. Sci.**, v. 305, p. 241-246, 1993.

BECKER, S.; HALME, J.; HASKILL, S. Heterogeneity and human peritoneal macrophages: cytochemical and flow cytometric studies. **J. Reticuloendothel. Soc.**, v. 33, p. 127 -38, 1983.

BELKIN, A.M.; STEPP, M.A. Integrins as receptors for laminins. **Microsc. Res. Techn.**, v.51, n.3, p.280-301, 2000.

BELLOMO, G.; MIRABETH, I.; RICHELMI, P.; MALORM, W.; LOST, I.; ORRENIUS, S. **Free. Radical. Res. Commun.**, v. 8, p. 391-399, 1990.

BENNETT, M. R. Mechanisms of p53-induced apoptosis. **Biochem. Pharmacol.**, v. 58, p. 1089-1095, 1999.

BEN-OZER, E.Y., ROSENSPIRE, A J. MCCABE, MJ., WORTH, R.J., KINDZELSKII, A L., WARRA, N.S., PETTY. Mercuric chloride damages celular DNA by a non-apoptotic mechanism. **Mutat. Res.**, v. 470, p. 19-27, 2000.

BERNARD, A.M.; VYSKOCIL, A.; KRIZ, J.; KODL, M.; LAUWERYS, R. Renal effects of children living in the vicinity of a lead smelter. **Environm. Res.**, v. 68: p. 91-95, 1995.

BERON, W.; ALVAREZ-DOMINGUEZ, C.; MAYORGA, L.; STAHL, D. P. Membrane trafficking along the phagocytic pathway. **Trends Cell Biol.**, v. 5, p. 100-104, 1995.

BERTON, G.; LOWELL, C. A. Integrin signalling in neutrophils and macrophages. Topical Review. **Cell Sign.**, v. 11, n. 09, p. 621-635, 1999.

BETTI, C.; DAVIN, T.; GIANNESI, L.; LOPRIENO, N.; BARALE, R. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. **Mutat. Res.**, v. 307, p. 323-333, 1994.

BIAGIANTE-RISBOURG, S. Les perturbations (ultra) structurales du foie des milis  es comme biomarqueurs de la qualit   sanitaire des milieux aquatiques. In: LAGADIC, AMIARD, J. C., CAQUET, T. AND RAMANDE F (EDS), Utilization de biomarqueurs en   cotoxicologie, aspects fondamentaux. **Masson Pub.**, Paris, p. 355-391, 1997.

BISHAYI, B.; SENGUPTA, M. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* due to alteration of cellular activity in arsenic and lead intoxicated matures Swiss albino mice. **Toxicol.**, v. 184, p. 31-39, 2003.

BLASIAK, J., KOWALIK, J. comparison of the in vitro genotoxicity of tri- and hexavalent chromium. **Mutat. Res.**, v 9, p. 135-145, 2000.

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Mol. Imminol.**, v. 39, p. 615-645, 2003.

BOURDREAU, N.J.; JONES, P.L. Extracellular matrix and integrin signaling: the shape of things to come. **Biochem. J.**, v.339, p.481-488, 1999.

BOUTON, C. M. L. S.; HOSSAIN, M. A.; FRELIN, L. P.; LATERRA, J.; PEVNER, J. Microarray analysis of differential gene expression in lead-exposed astrocytes, **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 176, p. 34-53, 2001.

BRAGA, V. M. M.; DEL MASCHIO, A.; MACHESKY, L. M.; DEJANA, E. regulation of cadherin function by Rho and Rac: modulation by junction maturation and cellular context. **Mol. Biol. Cell**, v. 10, p. 9-22, 1990.

BRAUBECK, T. Cytological alternations in fish hepatocytes following in vivo and sublethal exposure to xenobiotics: structural biomarkers of environmental contamination. In: BRAUBECK, T.; HINTON, D. E.; STEIT, B. (Eds), **Fish Ecotoxicology**. Birkhäuser, Berlin, p. 61-140, 1998.

BROWN, N.H. An integrin chicken and egg problem: which comes first, the extracellular matrix or the cytoskeleton? **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.12, n.5, p.629-633, 2000a.

BROWN, N.H. Cell-cell adhesion via the ECM: integrin genetics in fly and worm. **Matrix Biology**, v.19, n.3, p.191-201, 2000b.

BRULAND, K. W. Trace elements in seawater. In: **Chemical Oceanography**. RILEY, J. P.; CHESTER, R (Ed.), Academic Press, London, 157p, 1983.

BRYAN, G. W. Heavy metal contamination in the sea. In: **Marine Pollution**. JOHNSTON, R. (Ed), Academic Press, London, 1976.

BUCHI, D. F.; DE SOUZA, W. Internalization of surface components during ingestion of *Saccharomyces cerevisiae* by macrophages. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v. 24, n. 1, p. 135,-141, 1992.

BUCHI, D. F.; DE SOUZA, W. Internalization of surface components during Fc-receptor mediated phagocytosis by macrophages. **J. Cell Struct. Funct.**, v.6, p. 93-100, 1993.

BUCHMULLER-ROVILLER, Y.; RANSIJN, A.; MAUEL, J. Lead inhibits oxidative metabolism of macrophages exposed to macrophages-activating factor. **Biochem. J.**, v. 260, p. 325-332, 1989.

BULL, R. J. Lead and energy metabolism. In: **Lead Toxicity**. R. L. SINGHAL; J. A THOMAS, (Eds.). Urban & Schwarzenberg, Baltimore-Munich, p. 119-160, 1980.

BURGESSON, K.; CHRISTIANO, A.M. The dermal-epidermal junction. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.9, p.651-658, 1997.

BURRIDGE, K.; CHZANOWSKA-WODNICKA, M. Focal adhesions, contractility and signaling. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v.12, p.463-518, 1996.

CALDERÓN, J.; ORTIZ-PÉREZ, D.; YÁÑEZ, L.; DÍAZ-BARRIGA, F. Human exposure to metals. Pathways of exposure, biomarkes of effect, and host factors. **Ecotoxicol. Environm. Safety**, v. 56, p. 93-103, 2003.

CALDERWOOD, D.A.; SHATTIL, S.J.; GINSBERG, M.H. Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. **J. Biol. Chem.**, v.30 – 275, p.22607-22610, 2000.

CAO, H.; WOLFF, R. G.; MELTZER, M. S.; CRAWFORD, R. M. Differential regulation of calss II MHC determinants on macrophages by IFN- γ and IL-4. **J. Immunol.**, v. 143, n. 11, p. 3524-3531, 1989.

CAPUZZO, J. M.; BURT, W. V.; DUEDALL, I. W.; PARK, P. K.; KESTER, D. R. The impact of waste disposal in nearshore environments. In: **Wastes in the Ocean**, vol. 6. **Nearshore Waste Disposal**, KETCHUM, B. H.; CAPUZZO, J. M.; BURT, W. V.; DUEDALL, I. W.; PARK, P. K.; KESTER, D. R. (Eds.). Jonh Wiley & Sons, New York, 3, 1985.

CARLSON, K., EHRICH, E. Organophosphorus compound-induced modification of SH-ST5Y human neuroblastoma mitochondrial transmembrane potential. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 160, p. 33-42, 1999.

CHANDRA, J.; SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 29, p. 323-333, 2000.

CHOQUET, D.; FELSENFELD, D.P.; SHEETZ, M.P. Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. **Cell**; v. 88, p. 39 –48, 1997.

CIMA, F.; BALTARIN, L.; BRESSA, G.; BURIGHEL, P. Cytoskeleton alteration by trybutyltin (TBT) in phagocytes. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 40, p. 160-165, 1998.

CLARK, E.A.; BRUGGE, J.S. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. **Science**, v.268, p.233-239, 1995.

COHEN, M.D.; YANG, Z.; ZELIKOFF, T. Immunotoxicity of particulate lead: in vitro exposure alters pulmonary macrophage tumor necrosis factor production and activity. **J. Toxicol. Environ. Health**, v. 42, p. 377-392, 1994.

COSTA, J. R. M. A. Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por exposição ao chumbo (II): ensaios laboratoriais e estudo de caso preliminar no Rio Ribeira (SP/PR). 2001, Dissertação (mestrado em Biologia Celular). **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular/UFPR**, 2001.

DANEN, E. H. K.; LAFRENIE, R.M.; MIYAMOTO, S.; YAMADA, K.M. Integrin signaling: Cytoskeletal complexes, MAP kinase activation, and regulation of gene expression. **Cell Adhesion Comm.**, v.6, p.217-224, 1998.

DANEN, E. H. K.; YAMADA, K.M. Fibronectin, Integrins, and growth control. **J. Cell. Physiol.**, v.189, p.1-13, 2001.

De ARCANGELIS, A.; GEORGES-LABOUESSE. Integrin and ECM functions: roles in vertebrate development. (v.16, p.389, 2000), **E. Trends in Genetics**, v.16, n.12, p.536-536, 2000.

DE MELKER A.A.; SONNENBERG, A. **Bioessays**, v.21, p.499-509, 1999.

DEBRICK, J. E., CAMPBELL, P. A.; STAERZ, U. D. Macrophages as accessory cells for class I MHC-restricts immune responses. **J. Immunol.**, v. 147, n. 9, p. 2846-2851, 1991.

DEDHAR, S.; HANNINGAN, G.E. Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembranic signalling. **Curr Opin Cell Biol.**, v.8, p.657-669, 1996.

DEVI, K.D, BANU, B.S., GROVER, P., JAMIL, K. Genotoxic effect of lead nitrate on mice using SCGE (comet assay). **Toxicology**, v. 145, p. 195-201, 2000.

DICKESON, S.K.; WALSH, J.J.; SANTORO, S.A. Binding of the $\alpha 2$ integrin I domain to extracellular matrix ligands: structural and mechanistic difference between collagen and laminin binding. **Cell Adhes. Commun.**, v.5, p.273-281, 1998.

DOGIC, D.; ECKES, B.; AUMAILLEY, M. Extracellular matrix, integrin and focal adhesions. **Curr. Top. Pathol.**, v.93, p.75-85, 1999.

DONADEVI, K., ROZATI, R., BANU, B.S., RAO, H.P., GROVER, P. DNA damage in workers exposed to lead using comet assay. **Toxicol.**, v. 187, p. 183-193, 2003.

DU, Y.; BALES, K. R.; DODEL, R. L.; HAMILTON-BYRD, J. W.; HORN, D. I.; CZILLI, L. K.; SIMMONS, B.; NI, S. M. Activation of caspase-3-related cysteine protease is required for glutamate-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 11657-11662, 1997.

DUBAND, J.L.; THIERY, J.P. Distribution of fibronectin in the early phase of avian cephalic neural crest cell migration. **Dev. Cell Biol.**, v.108, p.2507-2517, 1982.

DUINKER, J.C. Suspended matter in estuaries: adsorption and desorption processes. In: **Chemistry and Biogeochemistry of Estuaries**. OLAUSSON, E.; CATO, I. (Eds.), Jonh Wiley & Sons, Chichester, 121p, 1980.

ECKARD, R.; BERTRAM, H.P. Lead in Wine - Toxicological Aspects, **Trace Elem. Med.**, v. 4, p.1 – 3, 1987.

ENGEL, D. W.; BROWER, M. Crustaceans as models for metal metabolism. I. Effects of the molt cycle on blue crab metal metabolism and metallothionein, **Mar. Environ. Res.**, v. 35, p. 1, 1993.

ERICKSON, H. P.; CERRELL, N.; MCDONAGH, J. Fibronectin molecule visualized in electron microscopy: a long, thin, flexible strand. **J. Cell Biol.**, v.91, p.673-678, 1981.

EVAN, G.; LITTLEWOOD, T. A matter of life and cell death. **Science**, v. 281, p. 317-321, 1998.

EWERS, U. & SCHLIPKÖTER, H. W. Lead. In: MERIAN, E. (Ed.) **Metals and their compounds in the environment**: occurrence, analysis, and biological relevance. New York: VCH, Cap. II. 16, 1991.

FELLENBERG, G. **Introdução aos Problemas da Poluição Ambiental** - E.P.U., São Paulo, 1980.

FINKELSTEIN, Y.; MARKOWITZ, M. E.; ROSEN, J. F. Low-level lead-induced neurotoxicity in children: an update on central nervous system effects. **Brain Res. Rev.**, v. 27, p. 168-176, 1998.

FRACASSO, M. E.; PERBELLINI, L.; SOLDÀ, S.; TALAMINI, G.; FRANCESCHETTI, P. Lead induced DNA strand breaks in lymphocytes of exposed workers: role of reactive oxygen species and protein kinase C. **Mut. Res.**, v. 515, p. 159-169, 2002.

FRIEDL, P.; BRÖCKER, E.B.; ZÄNKER, K.S. Integrins, cell matrix interactions and cell migration strategies: fundamental differences in leukocytes and tumor cells. **Cell Adh. Commun.**, v.6, p.225-236, 1998.

FUJIWARA, Y., KAJI, T.. Possible mechanism for lead inhibition of vascular endothelial cell proliferation: a lower response to basic fibroblast growth factor through inhibition of heparan sulfate synthesis. **Toxicol.**, v. 133, p. 147-157, 1999.

GEORGE, S. G.; OLSSON, P. E. Metallothioneins as indicators of trace metal pollution. In: **Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries**, KRAMER, K. J. M. (Eds.). CRC Press. Boca Raton, FL, 151p, 1994.

GERMAN, A. M.; ORRENIUS, S.; CECCATELLI, S. Apoptosis un neuronal cells: role of caspases. **Neuroreport**, v. 9, R49-55, 1998.

GIANCOTTI, F.G.; RUOSLAHTI, E. Elevated levels of the alpha 5 beta 1 fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells. **Cell**, v. 60, p.849-859, 1990.

GILLES, R.; PEQUEUX, A. Interactions of Chemicals and Osmotic Regulation with the Environment. In: VERNBERG, F. J. E VERNBERG, W. B. (Eds.). **The Biology of Crustacea**, v. 8. Academic Press, USA, 383 pp, 1983.

GOLDSTEIN, G. W. Evidence that lead acts as a calcium substitutite in second messenger metabolism. **Neurotoxicology**, v. 14, p. 97-101, 1993.

GORDON, S. Macrophage-restricted molecules: role in differentiation and activation. **Immunol. Lett.**, v. 65, p. 1-2, 1999.

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

GREEN, L.J.; MOULD, A.P.; HUMPHRIES, M.J. The integrin beta subunit. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.30, n.2, p.179-184, 1998.

GREENBERG, S. Signal transduction of phagocytosis. **Trends Cell Biol.**, v. 5, p. 93-99, 1995.

GUAN, J.L.; CHEN, H.C. Signal transduction in cell-matrix interactions. **Int. Rev. Cytol.**, v.168, p.81-121, 1996.

GUAN, J.L.; TREVITHICK, J.E.; HYNES, R.O. Retroviral expression of alternatively spliced forms of rat fibronectin. **J. Cell. Biol.**, v.110, p.833-847, 1990.

GUILARTE, T. R. Glutamatergic system and developmental lead neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 18, p. 665-672, 1997.

GUILTY P., MCCABE, M.J., PITTS, D.K., SANTINI, R.P., POUNDS, J.G. Protein kinase C does not mediate the inhibitory action of lead on vitamin D₃-dependent production of osteocalcin in osteoblastic bone cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 178, p. 109-116, 2002.

GUMBINER, B.M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. **Cell**, v.84, p. 345-357, 1996.

HAAS, T.A.; PLOW, E.F. Integrin-ligand interactions: a year in review. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.6, p.656-662, 1994.

HANAS, J.S.; RODGERS, J.S.; BANTLE, J.A .; CHENG, Y.-G. Lead inhibition of DNA-binding mechanism of Cys2His2 zinc finger proteins. **Mol. Pharmacol.**, v. 56, p. 982-988, 1999.

HAPKE, H. J. Metal Accumulation in the food chain and load of feed and food. In: **Metals and Compounds in the Environment.**, E. MERIAN. VCH (Eds.) p. 469-479, Weinheim -New York, 1991.

HARLAN, J. M. Leukocyte-endothelial interactions. **Blood.**, v. 65, p. 513-525, 1985.

HARTMANN, A, SPEIT, G. Comparative investigations of the genotoxic effects of metals in the single cells gel (SCG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 23, p. 299-305, 1994.

HARTWING, A. Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium-induced genotoxicity: a review. **Environ. Health Perspect.**, v. 102, p. 45-50, 1994.

HARTWIG, A., SCHLEPEGRELL, R., BEYERSMANN, D. Indirect mechanism of lead-induced genotoxicity in cultured mammalian cells. **Mutat. Res.**, v. 241, p. 75-82, 1990.

HAWKER, D. W. Bioaccumulation of metallic substances and organometallic compounds. In: **Bioaccumulation of Xenobiotic Compounds**, CONNELL, D. W. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, 1990.

HAYASHI, M.; KUGE, T.; ENDOH, D.; NAKAYAMA, K.; ARIKAWA, J.; TAKAZAWA, A.; OKUI, T. Hepatic copper accumulation induces DNA strand breaks in the liver cells of Long-Evans Cinnamon strain rats. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 276, p. 174-178, 2000.

HE, L., POBLENZ, A.T., MEDRANO, C.J., FOX, D.A. Lead and calcium produce rod photoreceptor cell apoptosis by opening the mitochondrial permeability transition pore. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 12175-12184, 2000.

HEASMAN, J.; HYNES, R.O.; SWAN, A.P.; THOMAS, V.; WYLIE, C.C., Primordial germ cells of *Xenopus* embryos: the role of fibronectin in their adhesion during migration. **Cell**, v.27, p. 437-447, 1981.

HEATH, A. G. **Water Pollution and Fish Physiology**. CRC Press, Boca Raton, FL, 1987.

HELMERS, E.; MART, L.; SCHULZ-BALDES, M.; ERNST, W. Temporal and spatial variations of lead concentrations in Atlantic surface waters. **Mar. Pollut. Bull.** v. 21, p. 515, 1990.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

HILBERTZ, U.; KRAMER, U.; DE RUITER, N.; BAGINSKI, B. Effects of cadmium and lead on oxidative metabolism and phagocytosis by mouse peritoneal macrophages. **Toxicol.**, v. 39, p. 47-51, 1986.

HINTON, D. E. Cells, cellular responses, and their markers in chronic toxicity of fish. In: Marlins, D. C., OSTRANDER, G.K. (Eds.), **Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives**. Lewis, Boca Raton, p. 207-239, 1993.

HINTON, D. E.; COUCH, J. A. Architectural pattern, tissue and cellular morphology in livers of fishes: relationship to experimentally-induced neoplastic responses. In: BRAUNBECK, T., HINTON, D. E., STREIT, B. (Eds.), *Fish Ecotoxicology*. **Birkhäuser, Boston**, p. 141-164, 1998.

HOGERVORST, F.; KUIKMAN, I.; VONDEMBORNE, A.E.G.K.; SONNENBERG, A. Cloning and sequence-analysis of beta-4 CDNA - an integrin subunit that contains a unique 118 KD cytoplasmic domain. **Embo Journal**, v.9, n3, p.765-770, 1990.

HORWITZ, A.; DUGGAN, K.; GREGGS, R.; DECKER, C.; BUCK, C. The cell substrate attachment (CSAT) antigen has properties of a receptor for laminin and fibronectin. **J. Cell Biol.**, v.101, p.2134-2144, 1985.

HUDSON, L., HAY, P. C. **Practical Immunology**. 508p. 3 ed. Oxford BlackWell Scientific Publication, p. 93, 1989.

HUGHERS, P. E.; ALEXI, T.; SCHREIBER, S. S. A role for the tumor suppressor gene p53 in regulating neuronal apoptosis. **Neuroreport**, v. 8,V-Xii, 1997.

HUMPHRIES, M.J.; YAMADA, K.M. Cell interaction sites of fibronectin in adhesion and metastasis. In: Edelman G.M., Cunningham B.A.; Thiery J.P. eds. *Morphoregulatory molecules*. New York, **Neuroscience**, p.137-172, 1990.

HYNES, R.O.; Integrins: a family of cell surface receptors. **Cell**, v.48, p.549-550, 1987.

HYNES, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell**, v. 69, p. 11-25, 1992.

HYNES, R.O.; ZHAO, Q. The evolution of cell adhesion. **J.Cell Biol.**, v.150, n.2, p.89-96, 2000.

IRELAND, G. W.; DOPPING-HEPENSTAL, P.; JORDAN, P.; O' NEILL C. Effects of patterned surfaces of adhesive islands on the shape, cytoskeleton, adhesion e behaviour of swiss mouse 3T3 fibroblasts. **J. Cell Sci.**, v.8 (suppl.), p. 19-33, 1987.

JANSON, L.W.; SELLERS, J.R.; TAYLOR, D.L. Actin-biding proteins regulate the work performed by myosin II motors on single actin filaments. **Cell Motil.Cytoskeleton**, v. 22, p. 274-280, 1992.

JOHNSON, F.M. The genetic effects of environment lead, **Mutat. Res.**, v. 410, p.123-140, 1998.

JONES, G. E.; ALLEN, W. E.; RIDLEY, A. J. The Rho GTPases in macrophage motility and chemotaxis. **Cell Adhes. Commun.**, v. 6, p. 237-245, 1998.

JONES, J.L.; WALKER, R.A. Integrins: a role as cell signaling molecules. **J. Clin. Pathol. Mol. Pathol.**, v.52, p.208-213, 1999.

JULIANO, R. Clooperation between soluble factors and integrin-mediated cell anchorage in the control of cell growth and differentiation. **BioEssays.**, v.18, p.911-917, 1996.

KAVERINA, I.; KRYLYSHKINA, O.; SMALL, J. V. Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 34, p. 746-761, 2002.

KEER, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apopotosis: A basiv biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.

KELLER, H.U.; NAEF, A.; ZIMMERMANN, A. Effects of colchicine, vinblastine and nocodazole on polarity, motility, chemotaxis and cAMP levels of human polymorphonuclear leukocytes. **Exp. Cell Res.**,v, 153, p.173-185 1984.

KENNISH, M.J. Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution. **CRC Press Boca Raton**, New York, London, Tokyo, 1999.

KLIETSCH, L.; ERVASTI, J.; ARNOLD, W.; CAMPBELL, K.; JORGENSEN, A. Dystrophin-glycoprotein complex and laminin colocalize to the sarcolemma and the transverse tubules of muscle. **Circ Res.**, v. 72, p. 349-360, 1993.

KOLBER, M.; BROCHAT, K. O.; LANDA-GONZALES, B. **Faseb J.**, v. 4, p. 3021-3027, 1990.

KORNBLIHTT, A.R.; VIBE-PEDERSEN, K.; BARALLE, F.E. Isolation and characterization of cDNA clones for human and bovine fibronectins. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.80, p.3218-3222, 1983.

KOUKOULIS, G.K.; HOWEEDY, M.; KORHONEN, I.; VIRTANEN, I.; GOULD, V.E. Distribution of tenascin, cellular fibronectins and integrins in the normal, hyperplastic and neoplastic breast. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, v.25, p.285-295, 1993.

KROCOVA, Z., MACELA, A., KROCA, M., HERNYCHOVA, L. The immunomodulatory effect(s) of lead and cadmium on the cells immune system *in vitro*. **Toxicol. In vitro.**, v. 14, p. 33-40, 2000.

LACKNER, R., Oxidation stress in fish by environmental pollutants. In: BRAUNBECK, T., HINTON, D. E., STREIT, B. (Eds.), **Fish Ecotoxicology. Birkhäuser, Berlin**, p. 203-224, 1998.

LANGHOLZ, O.; ROCKEL, D.; MAUCH, C.; KOZLOWSKA, E.; BANK, I.; KRIEG T.; ECKES B. Collagen and collagenase gene expression in three-dimensional collagen lattices are differentially regulated by $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2 \beta 1$ integrins. **J. Cell. Biol.**, v.131, p.1903-1915, 1995.

LASLEY, S. M.; GILBERT, M. E. Rat hippocampal glutamate and GABA release exhibit biphasic effects as a function on chronic lead exposure level. **Toxicol. Sci.**, v. 66, p. 139-147, 2002.

LAOUAR, L. A.; COLART, F. R.; CHUBB, C. B. H.; XIE, B.; HUBERMAN, E. Interaction between $\alpha 5 \beta 1$ integrin and secreted fibronectin is involved in macrophage differentiation of human HL-60 myeloid leukemia cells. **J. Immunol.**; v. 162, p. 407-414, 1999.

LAWRENCE, D.A. Immunotoxicity of heavy metals. In **Immunotoxicology and immunopharmacology**, DEAN, J.H.; LUSTER, M.I.; MUNSON, A.E.; AMOS, H. (Eds.), p 341-353. Raven Press, New York, 1985.

LEE, J. S. Y.; GOTLIEB, A. I. Microtubule-actin interactions may regulate endothelial integrity and repair. **Cardiovascular Pathol.**, v. 11, p. 135-140, 2002.

LEE, J.; JACOBSON, K. The composition and dynamics of cell-substratum adhesions in locomoting fish keratocytes. **J. Cell Sci.** , v. 110, p. 2833-2844, 1997.

LI, J.; ZHU, Z.; BAO, Z. Role of MacMARCKS in integrin-dependent macrophage spreading and tyrosine phosphorylation of paxilin. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 12985-12990, 1996.

LIN, T. H.; ROSALES, C.; MONDAL, K.; BOLEN, J. B.; HASKIL, S.; JULIANO, R. L. Integrin-mediated tyrosine phosphorylation and cytokine message induction in monocytic cells: a possible signaling role for the Syk tyrosine kinase. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 16189, 1995.

LIN, T. H.; YUROCHKO, A.; KOMBERG, L.; MORRIS, J.; WALKER, J.; HASKILL, S.; JULIANO, R. L. The role of protein tyrosine phosphorylation in integrin-mediated gene induction in monocytes. **J. Cell Biol.**, v. 126, p. 1585, 1994.

LINDER, S.; NELSON, D.; WEISS, M.; AEPFELBACHER, M. Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 9648-9653, 1999.

LIU, J.J.D., FARMER, J., LANE, W.S., FRIEDMAN, J., WEISSMAN, I., SCHREIBER, S.L. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin-A and FKBP-FK506 complexes. **Cell**, v. 66, p. 807-815, 1991.

LOIKKANEN, J.; CHVALOVA, K.; NAARALA, J.; VÄHÄKANGAS, K. H.; SAVOLAINEN, K. M. Pb^{+2} induced toxicity is associated with p53-independent apoptosis and enhanced by glutamate in GT1-7 neurons. **Toxicology Letters**, v. 144, p. 235-246, 2003.

LUTTRELL, L. M.; DAAKA, Y.; LEFKOWITZ, R. J. Regulation of tyrosine kinase cascades by G-proteins-coupled receptors. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 11, p. 177-183, 1999.

MA, T., CHEN, H.H., LIM, D.K., HUMES, A.S., HO, I.K. Excitatory amino acids and lead-induced neurotoxicity. **J. Toxicol. Sci.**, v. 23, p. 181-183, 1998.

MACKANESS, G. B. Cellular resistance to infection. **J. Exp. Med.**, v. 116, p. 381, 1962.

MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food), **Suvereiy of Lead in Food. Working Party on the Monitoring of Foodstuffs for Heavy Metals**, Fith Report. HMSO, London, 1975.

MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food), **Food Additives and Contaminants, Committee Report on the Review of Metals in Canned Food**. HMSO, London, 1983.

MALENKA, R. C.; NICOLL, R. A. Long-term potentiation – a decade of progress? **Science**, v. 285, p. 1870-1874, 1999.

MERCURIO, A. M.; SHAW, L. M. Macrophage interactions with laminin: PMA selectively induces adherence and spreading of mouse macrophages on laminin subtratum. **J. Cell Biol.** v. 107, p. 1873.1880, 1988.

MERIAN, E. **Metals and their compounds in the environment. Occurrence analysis and biological relevance**. VCH, Nova Yorque, 1991.

METCHNIKOFF, E. **Immunity in inefective diseases**. Cambridge University Press, Cambridge, 1905.

MIAO, J. Y.; ARAKI, S.; KAJI, K.; HAYASHI, H. Integrin β_4 is involved in apoptotic signal transduction in endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**; v. 233, p. 182, 1997.

MILOSEVIC, N.; MAIER, P. Lead stimulates intercellular signalling between hepatocytes and Kupffer cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 401, p. 317-328, 2000.

MISRA, U. K.; GAUDI, G.; AKABANI, G.; PIZZO, S. V. **Cell signal**, v. 14, p. 327-340, 2002.

MITCHISON, T.J.; CRAMER, L. P. Actin-based cell motility and cell locomotion. **Cell**, v. 84, p. 371-379, 1996.

MIYASHITA, T.; REED, J. C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. **Cell**, v. 80, p. 293-299, 1995.

MOHRI, H. Fibronectin and integrins interactions. **J. Invest. Med.**, v.44, p.429-44, 1996.

MORKUNAITE-HAIMI, S., KLUGLOV, A.G., TEPLOVA, V.V., STOLZE, K., GILLE, L., NOHL, H., SARIS, N.E. Reactive oxygen species are involved in the stimulation of the mitochondrial permeability transition by dihydrolipoate. **Biochem. Pharmacol.**, v, 65, p. 43-49, 2003.

MOULD, A.P.; KOMORIYA, A.; YAMADA, K.M.; HUMPHRIES, M.J. Affinity chromatographic isolation of the melanoma adhesion receptor for the IIICS region of fibronectin and its identification as the integrin $\alpha_4\beta_1$. **J. Biol. Chem.**, v.265, p.4020-4024, 1991.

NAARALA, J. T.; LOIKKANEN, J. J.; RUOTSALAINEN, M. H.; SAVOLAINEN, K. M. Lead amplifies glutamate-induced oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 19, p. 689-693, 1995.

NACCI, D. E.; CAYULA, S.; JACKIM, E. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. **Aquatic Toxicol.**, v. 35, p. 197-210, 1996.

NEFF, N.T.C.; LOWREY, A.T.; DECKER, C.; DAMSKY, C.; BUCK, C.; HORWITZ, A. A monoclonal antibody detaches embryonic skeletal muscle from extracellular matrices. **J. Cell Biol.**, v.95, p.654-666, 1982.

NEWMAN, S. I.; BECKER, S.; HALME, J. Phagocytosis by receptors for C3b (CR1), iC3b (CR3), and IgG (Fc) on human peritoneal macrophages. **J. Leukoc. Biol.**; v. 38, p. 267 – 78, 1985.

NIENCHESKI, L.F.; WINDON, H. L.; SMITH, R. Distribution of particulate trace metal in Patos Lagoon estuary (Brazil). **Mar. Pollut. Bull.**, v. 28, p. 96, 1994.

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

NIHEI, M. K.; GUILARTE, T. R. Molecular changes in glutamatergic synapses induced by Pb²⁺: association with deficits of LTP and spatial learning. **Neurotoxicology**, v. 22, p. 635-643, 2001.

NRIAGU, J.O. A silent epidemic of environmental metal poisoning. **Environm. Pollut.**, v. 50, p. 139-161, 1988.

OLTVAI, Z. N.; MILLIMAN, C. L.; KORSMEYER, S. J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homologue, Bax, that accelerates programmed cell death. **Cell**, v. 74, p. 609-619, 1993.

PAIN, D. J. Lead in the environment. In: HOFFMEN, D. J.; RATTNER, B. A; BURTON, G. A; CAIRNS, J. (Eds.). **Handbook of ecotoxicology**. Boca Raton: LEWIS, Cap. 16, 1995a.

PAOLIELLO, M. M. B.; DE CAPITANI, E. M.; CUNHA, F. G. C.; MATSUO, T.; CARVALHO, M. F.; SAKUMA, A.; FIGUEIREDO, B. R. Exposure of children to lead and cadmium from mining area of Brazil. **Environm. Res.**, v. 88, n. 2, p. 120-128, 2002.

PARSONS, J. T. Integrin-mediated signalling: regulation by protein tyrosine kinases and small GTP-binding proteins. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 8, p. 146-152, 1996.

PASTOR, A.; HERNANDEZ, F.; PERIS, M. A.; BELTRAN, J.; SANCHO, J., V.; CASTILLO, M. T. Levels of heavy metals in some marine organisms from the western Mediterranean area (Spain), **Mar. Pollut. Bull.**, v. 28, p. 50, 1994.

PAVALKO, F. M.; LAROCHE, S. M. Activation of human neutrophils induces an interaction between the integrin beta 2-subunit (CD18) and the actin binding protein alpha-actinin. **J. Immunol.**, v. 151, p. 3795-3807, 1993.

PAVICIC, J.; RASPOR, B.; MARTINCIC, D. Quantitative determination of metallothionein-like proteins in mussels: methodological approach and field evaluation. **Mar. Biol.**, v. 115, p. 83, 1993.

PETER, M. E.; HEUFELDER, A. E. Advances in apoptosis research. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 12736-12737, 1997.

PETERSEN, T.E.; THOGERSEN, H.C.; SKORSTENGAARD, K.; VIBE-PEDERSEN, K.; SOTTUP-JENSEN, L.; MAGNUSSON, S. Partial primary structure of bovine plasma fibronectin, three types of internal homology. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.80, p.137-141, 1983.

PHAIRE-WASHINGTON, L.; WANG, E.; SILVERSTEIN, S. C. Phorbol myristate acetate stimulates pinocytosis and membrane spreading in mouse peritoneal macrophages. **J. Cell Biol.**, v. 86, p. 634-640, 1980.

PHILLIPS, D. J. H. Macrophytes as biomonitors of trace metals. In: **Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries**, KRAMER, K. J. M. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, 85, 1994.

PHILLIPS, D. J. H.; RAINBOW, P. S. Strategies of trace metal sequestration in aquatic organisms, **Mar. Environ. Res.**, v. 28, p. 207, 1989.

PHILLIPS, D. J. H.; RAINBOW, P. S. **Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants**. Elsevier, London, 1993.

PIERCHBACHER, M.D.; RUOSLAHTI, E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. **Nature**, v.309, p.30-33, 1984.

PIRKLE, J.L.; KAUFMAN, R.B.; BRODY, D.J.; HICKMAN, T.; GUNTER, E.W.; PASCHAL, D.C. Exposure of the U.S. population to lead, 1991-1994. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, n. 11, p. 745-750, 1998.

PLUQUET, O.; HAINAUT, P. Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction. **Cancer Lett.**, v. 174, p. 1-15, 2001.

PORTER, A. G., Ng p, JANICKE, R. U. Death substrates come alive. **Bioessays**, v. 19, p. 501-507, 1997.

QUINTANILLA-VEJA, B.; HOOVER, D.; BAL, W.; SILBERGELD, E.K.; WAALKES, M.P.; ANDERSON, L.D. Lead effects on protamine-DNA binding. **Am. J. Ind. Med.**, v. 38, p. 324-329, 2000.

RAINBOW, P. S. The significance of trace metal concentrations in marine invertebrates. In: **Ecotoxicology of metals in Invertebrates**, DALLINGER, R.; RAINBOW, P. S. (Eds.). Lewis Publishers. Boca Raton, FL, 3, 1993.

RALPH, S.; PETRAS, M. Genotoxicity monitoring of small bodies of water using two species of tadpoles and the alkaline single cell gel (comet) assay. **Environm. Mol. Mutagen.**, v. 29, p. 418-430, 1997.

RAZANI-BOROUJERDI, S.; EDWARDS, B.; SOPORI, M.L. Lead stimulates lymphocyte proliferation through enhanced T cell B-cell interaction, **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v. 288, p. 714-719, 1999.

RAZMIAFSHARI, M., KAO, J., D'AVIGNON, A., ZAWIA, N.H. NMR identification of heavy metal-binding sites in a synthetic zinc finger peptide: toxicological implications for the interactions of xenobiotic metals with zinc finger proteins. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 172, p. 1-10, 2001.

RIDLEY, A. J. Rho proteins, PI 3-kinases, and monocytes/macrophage motility. **FEBS Letters**, v. 498, p. 168-171, 2001.

ROESIJADI, G. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals – review, **Aquat. Toxicol.** v. 22, p. 81, 1992.

ROESIJADI, G. Behavior of metallothionein-bound metals in a natural population of na estuarine mollusc, **Mar. Environ. Res.** 38, 147, 1994.

ROHRBACH, D. H.; TIMPL, R. **Molecular and Cellular aspects of basement membranes**. Cell Biology. Academic Press Inc., 1993.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **J. Chromatography B**, v. 722, p. 225-254, 1999.

ROTTNER, K.; HALL, A.; SMALL, J. V. Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. **Curr. Biol.**, v. 9, p. 640-648, 1999.

SALAS, V.M., BURCHIEL, S.W. Apoptosis in Daudi Human B cells in response to benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 151, p. 367-376, 1998.

SALEH, A.M., VIJAYASARATHY, C., MASOUD, L., KUMAR, L., SHAHIN, A., KAMBAL, A. Paraoxon induces apoptosis in EL4 cells via activation of mitochondrial pathways. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 190, p. 47-57, 2003.

SÀNCHEZ-MADRID, F.; CORBI, A. L. Leukocyte integrins: structure, function and regulation of their activity. **Sem. Cell Biol.**, v. 3, p. 199-210, 1992.

SASTRY, S.K.; HORWITZ, A.F. Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra and intracellular initiated transmembrane signaling. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.5, p.819-831, 1993.

SAVINO, W.; VILLA-VERDE, D.M.S.; LANNES-VIEIRA, J. Extracellular matrix proteins in intrathymic T-cell migration and differentiation. **Immunol. Today**, v.14, p.158-161, 1993.

SCHLENK, D.; RINGWOOD, A. H.; BROUWER-HOEXUM, T.; BROUWER, M. Crustaceans as models for metal metabolism. II. Induction and characterization isoforms from the blue crab (*Callinectes sapidus*), **Mar. Environ. Res.**, v. 35, p. 7, 1993.

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

SILBERGELD, E.K., WOLINSKY, J.S., GOLDSTEIN, G.W. Electron probe microanalysis of isolated brain capillaries poisoned with lead. **Brain Res.**, v. 189, p. 369-376, 1980.

SIMONS, T. J. B. Lead-calcium interactions in cellular lead toxicity. **Neurotoxicology**, v. 14, p. 77-85, 1993.

SINEX, S. A.; WRIGTH, D. A. Distribution of trace metals in the sediments and biota of Chesapeake Bay. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 19, p. 425, 1988.

SINGH, N. P.; McCOY, L. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SLATER, T. F. Biochemical studies on liver injury. In: **Biochemical Mechanisms of Liver Injury**, SLATER, T. F. (Ed.), Academic Press, New York, p. 2-44, 1978.

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.

SMALL, J. V.; ROTTNER, K.; KAVERINA, I. Cytoskeleton cross-talk during cell motility. **FEBS Lett.**, v. 452, p. 96-99, 1999a.

SMALL, J. V.; ROTTNER, K.; KAVERINA, I. Funcional design in the actin cytoskeleton. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 11, p. 54-60, 1999b.

SMALL, J. V.; KAVERINA, I. Microtubules meet substrate adhesion to arrange cell polarity. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 15, p. 40-47, 2003.

SMITH, D.R., KAHNG, M.W., QUINTANILLA-VEGA, B., FOWLER, B.A. High-affinity renal lead-binding proteins in environmentally-exposed humans. **Chemico-Biological Interactions.**, v. 115, p. 39-52, 1998.

SPRINGER, T. A. Adhesion receptors of the immune system. **Nature**, v. 346, p. 425-434, 1990.

STAUTON, M. J.; GAFFNEY, E. F. Apoptosis: basic concepts and potential significance in human cancer. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 122, p. 310-319, 1998.

STEENLAND, K.; BOFFETTA, P. Lead and cancer in humans: where are we now. **Am. J. Ind. Med.**, v. 38, p. 295-299, 2000.

STROH, C.; SCHULZE-OSTHOFF, K. Death by a thousand cuts: na ever increasing list of caspase substrates. **Cell Death Differ.**, v. 5, p. 997-1000, 1998.

STRUZYNSKA, L.; RAFALOWSKA, U. The effect os lead on dopamine, GABA and histidine spontaneous and KCL-dependent release from rat synaptosomes, **Acta Neurobiol. Exp.**, v. 54, p. 201-207, 1994.

SUZUKI, S.; NAITOH, Y. Amino-acid-sequence of a novel integrin beta-4 subunit and primary expression of the messenger-RNA in epithelial-cells. **Embo Journal**, v.9, n.3, p.757-763, 1990.

TAMKUM, J.W., SCHWARZBAUER, J.E.; HYNES, R.O. A single rat fibronectin gene generates three different mRNAs by alternative splicing of a complex exon. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.81, p.5140-5144, 1984.

TAMURA, R.N.; ROZO, C.; STARR, L.; CHAMBERS, J.; REICHARDT, L.F.; COOPER, H.M.; QUARANTA, V. Epithelial integrin $\alpha_6\beta_4$: complete primary structure of α_6 and variant forms of β_4 . **J. Cell Biol.**, v.111, p.1593-1604, 1990.

TAPON, N.; HALL, A. Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 9, p. 86-92, 1997.

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

TIAN, L., LAWRENCE, D.A. Metal-induce modulation of nitric oxide production *in vitro* by murine macrophages: lead, nickel, and cobalt utilize different mechanisms. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 141, p. 540-547, 1996.

TICE, R.R., AGURELLI, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A, KOBAYASHI, H. MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, J.C., SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TULLY, D.B., COLLINS, B.J., OVERSTREET, J.D., SMITH, C.S., DINSE, G.E., MIMTAZ, M.M., CHAPIN, R.E. Effects of arsenic, cadmium, chromium, and lead on gene expression regulated by a battery of 13 different promoters in recombinant HepG2 cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 168, p. 79-90, 2000.

UNANUE, E. R.; ALLEN, P. M. The basis for the immuno-regulatory role of macrophages and other accessory cells. **Science**, v. 236, p. 551-557, 1987.

USPHS. Toxicological profile for lead on CD-ROM. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. **Public Health Service**, 1997.

VAGHEF, H.;NIGREN, P.; EDLING, C.; BERGH, J.; HELLMAN, B. **Mutat. Res.**, v. 395, p. 127, 1997.

VAIRO, G., INNES, K.M., ADAMS, J.M. Bcl-2 has a cell cycle inhibitory function separable from its enhancement of cell survival. **Oncogene**, v. 13, p. 1511-1519, 1996.

VALDERDE, M.; FORTOUL, T. I.; DÍAZ-BARRIGA, F.; MEJÍA, J.; ROJAS, E. Induction of genotoxicity by cadmium chloride inhalation in several organs of CD-1 mice. **Mutagenesis**, v. 15, p. 109-114, 2000.

VAN DE WATER, L.; III. Phagocytosis. In: Plasma Fibronectin : Struture and Function, J. MCDONAGH, (Ed.), p. 175-196. Marcel Dekker, New York, 1985.

VARNER, J.A.; CHERESH, D.A. Integrins and cancer. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.8, p.724-730, 1996.

VASILIEV, J.M.; GELFAND, I.M. **Neoplastic and Normal Cells in Culture**. Cambridge University Oress, Cambridge, 1981.

VAUX, D.; GORDON, S. In: ADAM, D. O.; EDELSON, P. J.; KOREN, H. (Eds.), Methods for studying mononuclear phagocytes. Academic Press, New York, p. 821-860, 1981.

VEIGA, S.S.; ELIAS, M.C.Q.B.; GREMSKI, W.; PORCIONATTO, M.A.; SILVA, R.; NADER, H.B.; BRENTANI, R.R. Post-translational modification of $\alpha_5\beta_1$ integrin by glycosaminoglycan chains. The $\alpha_5\beta_1$ integrin is a facultative proteoglycan. **J. Biol. Chem.**, v.272, n.19, p.12529-12535, 1997.

VIARENGO, A. Biochemical effects of trace metals. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 16, p. 153-158, 1985.

VIARENGO, A. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. **Ver. Aquat. Sci.**, v. 295, 1989.

VILLANUEVA, R.; ALBALADEJO, R.; ORTEGA, P.; ASTASIO, P.; CALLE, M. E.; GIL, A.; GRANADOS, B.; DOMINGUEZ-ROJAS, V. Adherence of mouse peritoneal macrophage following exposure to lead. **Ind. Health**, v. 35, p. 291-293, 1997.

VODICKA, P.; TVRDIK, T.; OSTERMAN-GOLKAR, S.; VODICKOVÁ, L.; PETERKOVÁ, K.; SOUCEK, P.; SARAMANOVÁ, J.; FARMER, P. B.; GRANATH, F.; LAMBERT, B.; HEMMINKI, K. An evaluation of styrene genotoxicity using several biomarkers in a 3 years follow-up study of hand-lamination workers. **Mutat. Res.**, v. 445, p. 205-224, 1999.

YURUKER, B.; NIGGLI, V. Alpha-actinin and vinculin in human neutrophils: reorganization during adhesion and relation to the actin network. **J. Cell Sci.**, v. 101, p. 403-414, 1992.

WANG, N.; BUTLER, J. P.; INGBER, D. E. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. **Science**, v. 260, p. 1124-1127, 1993.

WANG, N. DEI control of cytoskeletal mechanics by extracellular matrix, cell shape and mechanical tension. **J. Biophys.**, v. 66, p. 2181-2189, 1994.

WATERMAN-STORER, C.M.; SALMON, E. Positive feedback interactions between microtubule and actin dynamics during cell motility. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.11, p. 61-67, 1999.

WEBER, K., OSBORN, M. The molecules of the cell matrix. **Sci Am.** v. 253, p. 110-120, 1985.

WEIGERT, P.; et al. Arsen, Blei, Cadimium und Quecksilber in und auf Lebensmitteln. Zentrale Erfassungs - und Bewertungsstelle für Umweltchemikalien des Bundesgesundheitsamtes (ZEBS) ZEBS - Hefte 1, Berlin, 1984.

WELCH, E. B. Ecological Effects of Wastewaters. Cambridge: **University Press**, 343p, 1980.

WHITTARD, J.D.; AKIYAMA, S.K. Activation of β_1 integrins induces cell-cell adhesion. **Exper. Cell Res.**, v.263, p.65-76, 2001.

WOODS, A.; COUCHMAN J.R. Integrin modulation by lateral association. **J. Biol. Chem.**, v.275, p.24233-24236, 2000.

ZELIKOFF, J.T.; LI, J.H.; HARTWIG, A. ; WANG, X.W.; COSTA, M.; ROSSAMAN, T.G. Genetic toxicology of lead compounds. **Carcinogenesis**, v. 9, p. 1727-1732, 1988.

ZHENG, W., ASCHMER, M., GHERSI-EGEA, J.M. Brain Barrier systems: a new frontier in metal neurotoxicological research. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** In Press, 2003.