

CLAUDIA BINCOLETTO

CÉLULAS FORMADORAS DE COLÔNIAS (CFCs) E PRODUÇÃO DE
FATORES ESTIMULADORES DE COLÔNIAS (CSFs), APÓS INFECÇÃO,
EM ANIMAIS EXPOSTOS AO CHUMBO.

TESE DE MESTRADO APRESENTADA À
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ORIENTADORA: PROFESSORA DRA. MARY LUCI DE SOUZA QUEIROZ

CAMPINAS
1993

B51c

20645/BC

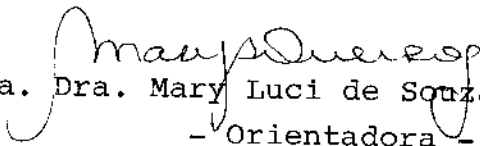
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

DEDICO ESTE TRABALHO

À minha mãe Aparecida,
eterna fonte de amor

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

Campinas, 01 de dezembro de 1993


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

À memória de meu pai, Vitorio

AGRADECIMENTOS

Esta tese é fruto da participação direta e indireta de inúmeras pessoas e a todas elas desejo expressar o meu profundo sentimento de gratidão. Em especial desejo lembrar:

À professora, pesquisadora e amiga, Dra. Mary Luci de Souza Queiroz. O seu constante estímulo, compreensão, clareza de raciocínio que fizeram com que eu assimilasse as condições básicas da minha formação científica.

Aos profissionais e colegas: Mônica, Ana Paula, Almir, Denise, Joseane, Rita, Solange do Laboratório de Cultura de Células do Hemocentro, pela cooperação no decorrer das minhas atividades de mestrado e pelo ambiente de trabalho agradável e harmonioso que me proporcionaram.

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

Ao setor de Microbiologia do Departamento de Patologia Clínica desta Universidade, em especial as funcionárias Dra. Angela e Shirlei pelo auxílio e orientação no desenvolver deste trabalho.

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

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

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

ÍNDICE

I - INTRODUÇÃO	01
II - OBJETIVOS	07
III - MATERIAL E MÉTODOS	08
IV - RESULTADOS	18
V - DISCUSSÃO	64
VI - CONCLUSÃO	69
VII - RESUMO	70
VIII - SUMMARY	72
IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

INTRODUÇÃO

O chumbo, assim como outros metais pesados, tem sido objeto de inúmeras investigações na área de toxicologia, pois é um metal que ocorre frequentemente como contaminante ambiental e ocupacional. Dentre os metais pesados, o chumbo é um dos mais utilizados na indústria, destacando-se a indústria extrativa, a petrolífera, a de acumuladores, de tintas e corantes, a cerâmica, a gráfica e bélica. Seu uso diversificado é atribuído, principalmente, a sua maleabilidade e resistência a corrosão.

A contaminação ambiental pelo chumbo pode ocorrer através da água, do solo, decorrente de minérios naturais, ou de resíduos industriais. A quantidade de chumbo introduzida diariamente no organismo humano está na faixa de 300 a 460ug (LARINI, 1987), correspondente principalmente a alimentos contaminados pelo metal.

Atualmente a intoxicação por exposição a longo prazo ao chumbo e seus compostos é a forma mais comumente encontrada, sendo o saturnismo uma moléstia profissional conhecida há vários anos. Apesar da implantação de medidas de higiene industrial, o chumbo é ainda responsável por alta incidência de intoxicação entre os trabalhadores.

O monitoramento biológico da exposição ao chumbo envolve a utilização de índices de exposição que fornecem informações quanto aos níveis de absorção (chumbo no sangue e urina) e, principalmente, a determinação de alterações causadas pelo metal no sistema hematológico. O chumbo provoca a inibição da produção de hemoglobina devido ao antagonismo com o ferro e a interferência nas reações enzimáticas envolvidas na biossíntese da molécula do heme (PUTNAM, 1986). Os indicadores de exposição ao chumbo mais utilizados na avaliação do grau de exposição envolvem a determinação da taxa de

excreção urinária de ácido delta-aminolevulínico (ALA) e de coproporfirina (CPU); concentração de porfirinas em eritrócitos circulantes e da atividade de enzimas envolvidas na biossíntese de (ALA), como a ALA-desidratase (TOLA et al, 1973; SELANDER & CRAMER, 1970; HAMMOND et al, 1980; ALÉSSIO, 1988; CORNELIS, 1988; TOMOKUNI & OGATA, 1976). Estes índices, no entanto, ocorrem apenas, como sinal agudo de exposição a altas concentrações de chumbo e apresentam fraca correlação com os níveis do metal no sangue (PbS) (GOODMAN & GILMAN, 1978), assim como com os efeitos neurológicos (SPIVEY et al, 1979) e renais (HUANG et al, 1988; HAMMOND et al, 1980) causados pela intoxicação crônica.

Em relação aos efeitos crônicos causados pelo chumbo, podemos mencionar as alterações na função renal com consequente elevação nos níveis de beta-2-microglobulina na urina e as alterações morfológicas e funcionais nas células de revestimento tubular (PUTNAM, 1986; HUANG et al, 1988). Como consequência da insuficiência renal, há uma diminuição de excreção de chumbo, que agrava outros efeitos causados pelo metal (STAESSEN, J., 1990). Ocorre também efeitos neurológicos tais como a insônia, a irritabilidade, as alucinações, as convulsões e o coma (PUTNAM, 1986, SPIVEY et al, 1979). A síndrome neuromuscular verificada em indivíduos expostos ao chumbo, é manifestação de envenenamento sub-agudo avançado. Um estado de fraqueza muscular e de fadiga precedem a paralisia e é um sinal de desenvolvimento da síndrome (GOODMAN & GILMAN 1978).

Estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* tem demonstrado que a exposição ao chumbo pode alterar a resposta imunológica de forma significativa. Trabalhos *in vitro* demonstram que o chumbo leva a um aumento no número de células formadoras de anticorpos (PFC) no baço de camundongos, aumento na atividade proliferativa de linfócitos em presença de mitógenos (LAWRENCE,

1981a; WARNER & LAWRENCE, 1986a; WARNER & LAWRENCE, 1986b), inibição na capacidade fagocitária de macrófagos alveolares de coelho (JJAN et al 1985), supressão na produção de interleucina-2 e no sistema de apresentação do antígeno (SMITH & LAWRENCE, 1988).

Estudos experimentais em camundongos demonstram que a administração crônica de chumbo deprime a produção de anticorpos em resposta a antígenos dependentes de macrófagos (BAKLEY & ARCHER, 1981). Nestes experimentos, a administração de 2-Mercaptoetanol, o qual tem efeito substitutivo ao de macrófagos, restitui a resposta imune deprimida pelo chumbo. Por outro lado, KOWOLENKO et al 1988, observaram que a capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais e esplênicos de camundongos tratados com chumbo em presença do antígeno *Listeria monocytogenes* é mediada por interações entre células T e macrófagos. Os mesmos autores também observaram que a capacidade dos macrófagos destes animais para apresentar antígenos a células T imunes está levemente reduzida sem que haja no entanto, alteração na produção de interleucina-1 por estes macrófagos. Inversamente, KOLLER & ROAN, 1977, observaram aumento na capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais de animais tratados com chumbo e aumento nos níveis de fosfatase ácida nestas células.

Com relação a resposta humoral, a exposição crônica de animais ao chumbo também produziu resultados controversos. Enquanto que LAWRENCE, 1981, não observou alteração no número de células formadoras de anticorpos (PFC) no baço de camundongos expostos, KOLLER & KOVACIC, 1974, encontraram redução no número de PFC em animais tratados com este metal. Redução na formação de rosetas (EAC) por linfócitos B derivados da medula óssea de animais expostos ao chumbo foi documentada por KOLLER & BRAUNER, 1977.

Estudos de certos parâmetros da imunidade celular em presença do chumbo demonstram redução no peso do timo, supressão da resposta de linfócitos em presença de mitógenos e redução na resposta a testes cutâneos de hipersensibilidade tardia (FAITH et al, 1978, MULLER et al, 1977).

Diminuição na resistência à infecção em animais tratados com chumbo foi relatada por alguns autores (HEMPHIL, 1971; LAWRENCE, 1981b). Em estudos *in vitro* MAUEL et al, 1989, correlacionam a redução na atividade microbicida de macrófagos com efeitos inibitórios do metal sobre a via das pentoses.

O chumbo absorvido pelo organismo é transportado pelo sangue com as hemácias. Cerca de 8% do chumbo é absorvido pelo trato gastro intestinal e a seguir dirige-se ao fígado onde é excretado como fluido biliar. A maior parte do chumbo circulante deposita-se nos ossos e medula óssea. Neste sentido, as observações feitas por WESTERMAN et al, 1965, indicam que os níveis de chumbo nos ossos e medula óssea são superiores aqueles encontrados no sangue, sugerindo com isso que se poderia esperar maiores efeitos do metal sobre células da medula óssea em fase de diferenciação. Estudos *in vitro* (KOWOLENKO et al, 1989) demonstraram que a exposição de células da medula óssea ao chumbo reduz a proliferação/diferenciação de células precursoras de macrófagos, assim como a resposta destas células ao fator estimulador de crescimento dos macrófagos (CSF-1).

Os fatores estimuladores de colônias (CSFs) regulam o crescimento e diferenciação de células precursoras hematopoiéticas, as chamadas células formadoras de colônias (CFCs) (METCALF, 1984, QUEIROZ, 1988). Além destes efeitos, estes fatores são responsáveis pela sobrevivência *in vitro* e atividade funcional das células maduras (granulócitos, macrófagos, eosinófilos, etc.).

Granulócitos e macrófagos são vitais na defesa contra infecções bacterianas. Após infecção ocorre aumento de CFCs no baço e também na

atividade de CSFs no soro. Estes efeitos foram bem estudados após infecção experimental com a bactéria *Listeria monocytogenes* (WING et al, 1984; YONG and CHEERS, 1986). Em camundongos infectados com este microorganismo a infecção é erradicada ou controlada quando os mecanismos bactericidas dos macrófagos tornam-se ativados por linfocinas produzidas por linfócitos T (HAHN and KAUFMANN, 1981). No entanto, mesmo antes de ocorrer esta reação de imunidade tipo tardio a resposta inflamatória de macrófagos e polimorfonucleares é fundamental para sobrevivência do animal (NEWBORG and NORTH, 1980; CZUPPRINSK et al, 1984; WOOD et al, 1986).

Tendo em vista que em animais tratados com chumbo ocorre diminuição na resistência à infecção (HEMPHIL, 1971; LAWRENCE, 1981b) e diante do fato já mencionado que níveis de chumbo depositados na medula óssea podem levar a efeitos adversos do metal sobre células em diferenciação (WESTERMAN et al, 1965), neste trabalho investigamos os efeitos da exposição ao chumbo sobre a atividade CSFs no soro de camundongos infectados. Esta atividade dos CSFs foi estudada através do efeito da adição do soro de animais infectados e tratados com chumbo sobre o crescimento e diferenciação de CFCs da medula óssea. Além disso, a possibilidade do chumbo causar alterações diretas nas CFCs interferindo na capacidade de crescimento e diferenciação destas células, foi estudada através do uso de um fator estimulador de colônias produzido a partir do baço de camundongos (SCM) o qual possui atividade multi-CSF. As culturas de CFCs, as quais são totalmente dependentes da presença de CSFs para sua sobrevivência, proliferação e maturação, são estudadas com o intuito de identificar, enumerar e caracterizar células pluripotenciais da medula óssea. Além disso permitem a proliferação e diferenciação destes precursores *in vitro* de forma similar daquela que ocorre *in vivo*. Este fato possibilita a análise dos vários aspectos da biologia de formação da célula sanguínea, permitindo

relacionar cada população clonal madura com a respectiva célula precursora inicial. Portanto, a possibilidade de se reproduzir *in vitro* o comportamento celular que ocorre durante o processo de hemopoiese *in vivo* permite a detecção fiel dos níveis de comprometimento celular nos processos toxicológicos. Infecção com *Listeria monocytogenes* foi escolhida como modelo ideal para responder a estas perguntas.

OBJETIVO

O objetivo principal deste trabalho é o estudo dos efeitos da exposição a várias doses de chumbo sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos da medula óssea de camundongos infectados, assim como, sobre a atividade dos fatores estimuladores de colônias do soro destes animais. Estudos adicionais sobre a resistência do animal à infecção serão realizados com o objetivo de se relacionar possíveis alterações ocorridas na resistência do animal com o crescimento e diferenciação celular.

MATERIAL E MÉTODOS

1 - ANIMAIS:

Para realização dos experimentos *in vivo* foram utilizados camundongos machos com idade entre 8 a 10 semanas, de linhagens diferentes: Balb/cj (susceptível a infecção por *Listeria monocytogenes* e C57BL10 (resistente a esta bactéria), os quais foram fornecidos pelo Biotério Central desta Universidade. Após obtenção, foram divididos em grupos conforme roteiro de estudos e cada grupo submetido ao tratamento de acordo com o protocolo de experimentos, a saber: a) Animais sem tratamento, mas mantidos sob mesmo ambiente que outros grupos; b) Animais apenas infectados; c) Animais infectados e expostos ao chumbo e d) Animais apenas expostos ao chumbo.

2 - TRATAMENTO

2.1 - Exposição ao acetato de chumbo:

As doses de chumbo utilizadas foram determinadas e ajustadas de forma a permitir que alterações imunológicas fossem detectadas, sem perda dos animais por intoxicação aguda. Desta forma, as doses padronizadas foram 13, 130 e 1300ppm de acetato de chumbo em água deionizada, durante 10, 30 e 70 dias (BLAKLEY, B. R. & ARCHER, D. L., 1981; FAITH, R.E. et al, 1979; KOLLER, L.D. & KOVACIC, S. 1974; KOLLER, L.D. 1973). As doses de chumbo utilizadas foram diluídas em água deionizada e administrada, diariamente aos animais. Os camundongos estudados foram pesados antes e após exposição a este metal.

2.2 - Bactéria

A bactéria *Listeria monocytogenes* utilizada para infectar os animais é um coccobacilo gram-positivo, anaeróbio facultativo, móvel por flagelos peritríquios a temperatura ambiente, facilmente cultivável em ágar-sangue. Esta cepa foi adquirida no Departamento de Microbiologia desta Universidade. Após aquisição a bactéria foi submetida a vários testes bioquímicos que confirmaram sua identidade. Os testes realizados demonstraram o seguinte:

Oxidase - positivo

Catalase - positivo

Carboidratos - ação fermentativa

Xilose - negativo

Manitol - negativo

Bile esculina - positivo

Beta hemólise - positivo

CAMP - Test: *Staphylococcus aureus* - positivo

Rhodococcus equi - negativo

2.2.1 - Crescimento em meio (BHI):

Para provocar infecção nos animais foi necessário determinar o número ideal de microorganismos a ser injetado. A dose ideal não deveria provocar a morte do animal muito rapidamente para que fosse possível a realização dos experimentos após infecção.

A bactéria isolada do líquido de indivíduos infectados e mantida em meio de cultura semi-sólido foi imersa em meio (BHI) e incubada por 24 horas a 37°C. Os repiques foram feitos com alça de platina em ágar-sangue, e novamente

incubado a 37°C por 24 horas. As colônias obtidas nas culturas frescas de ágar-sangue foram diluídas em salina e as concentrações determinadas por espectrofotometria através da Escala de McFarland (Cobas Inocheck-Roche).

2.2.2 - Infecção em animais:

Um volume de 0,3ml de suspensão de bactérias foi injetado por via intraperitoneal em cada camundongo. As concentrações de bactéria por animal testadas foram: 3×10^2 ; 3×10^3 ; 3×10^4 ; 3×10^5 ; 3×10^6 ; 3×10^7 . O número de bactérias no sangue circulante dos animais infectados foi determinado através da bacteremia.

A diluição em salina foi ajustada de forma a permitir um período de vida ideal para a realização dos experimentos. A diluição ideal foi de 3×10^2 para Balb/cj e de 3×10^6 para C57Bl10, sendo estas diluições estabelecidas para experimentos futuros. Resultados obtidos estão apresentados nas tabelas: 1- Balb/cj; 2- C57Bl10.

2.2.3 -Calibração da Pipeta Pasteur:

As Pipetas Pasteur utilizadas foram calibradas de forma a produzirem um mesmo número de gotas por ml. Esta calibração foi feita através de aquecimento em bico de bunsen até total amolecimento do vidro com imediata modelagem do diâmetro. O número de gotas produzidas por pipeta foi determinado pipetando-se 1ml de água destilada de um becker e contando-se o número de gotas produzidas, segurando-se a pipeta verticalmente. O número de gotas obtido por cada ml foi de 40. Esse número foi utilizado para o cálculo da bacteremia.

2.2.4 -Bacteremia:

A técnica utilizada para determinar o número de bactérias no sangue circulante dos camundongos infectados foi determinado pelo método de WILSON & MILES (1966).

Os camundongos foram presos firmemente e sua calda mergulhada em água morna para causar vasodilatação local. Secou-se com gaze e fez-se a assepsia com álcool 70%. Com uma tesoura esterilizada foi feito uma pequena incisão na extremidade final da calda. Comprimiu-se gentilmente a calda e o sangue foi retirado com pipeta pasteur calibrada. A gota de sangue obtido com auxílio da pipeta pasteur foi espalhado com alça de platina em meio nutriente ágar-sangue. A seguir incubou-se a 37°C por 24 horas. Após este tempo o número de colônias por ml de sangue foi determinado da seguinte maneira:

Número de colônias por gota x número de gotas produzidas por 1 ml. Os resultados estão apresentados nas tabelas 1- Balb/cj e 2-C57Bl10.

3 - PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA DE (CFU-C)

3.1- Cultura clonal de precursores hematopoiéticos da medula óssea (CFCs):

Para enumerar estas células clonogênicas é importante que o número de células presentes na cultura seja ajustado para evitar um número exagerado de colônias em cada placa de petri com consequente superposição das mesmas. É também importante que o fator estimulador de crescimento (CSF) seja utilizado em concentrações supramáximas. Além disso, a escolha do soro bovino fetal deve ser realizada cuidadosamente devido a variações em atividade dos vários lotes e marcas.

3.2 - Preparação de células de camundongos para cultura:

Após sacrificar o animal através de deslocamento cervical, limpa-se a pele do animal com álcool 70%. Após exposição do fêmur segura-se a tíbia em ângulo reto com o fêmur, separando-se o último nas junções do joelho e da extremidade distal.

A medula óssea é transferida com auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo meio de cultura ou solução salina balanceada e o tubo com as células mantido no gelo.

O número de células na suspensão é contado em câmara hemocitométrica após diluição (1:10) das células em eosina 10%.

3.3 - Escolha do meio semi-sólido:

O meio de cultura torna-se semi-sólido através da adição de ágar ou metilcelulose. O ágar foi utilizado por várias razões:

- a) A preparação da cultura em ágar é mais rápida;
- b) O ágar na concentração utilizada (0,3%) é um gel, enquanto que a metilcelulose, na concentração apropriada é um líquido viscoso. Como consequência os clones que se desenvolvem em ágar são menos dispersos. Um fator ainda mais importante é que em ágar os clones ficam como que fixos em uma matriz tridimensional. Em metilcelulose, ao contrário, durante o período de incubação, eles frequentemente se superpõe próximos ao fundo da placa de petri, o que pode impossibilitar a contagem de clones pequenos;
- c) Muitas preparações de metilcelulose são tóxicas, o que não ocorre com Bacto-ágar (DIFCO);

Diante do exposto, utilizamos ágar para a produção do meio semi-sólido.

3.4 - Descrição da técnica para preparação das células em ágar:

- a) Conta-se o número de células na suspensão;
- b) Prepara-se o meio mais ágar:
 - 30% de meio (DME - DIFCO) 2x concentrado
 - 20% de soro bovino fetal
 - 50% de ágar (0,6%)
- c) Adiciona-se o volume apropriado de células quando o meio mais ágar estiver a 37°C;
- d) Ressuspende-se as células e distribui-se volumes de 1ml em cada placa de petri, a qual já deve conter 0,1ml do fator estimulador;
- e) Distribui-se por toda a superfície da placa de petri;
- f) Deixa-se gelificar e incuba-se por 7 dias a 37°C em presença a 5% de CO₂ no ar;
- g) Conta-se o número de colônias.

3.5 - Contagem de colônias:

Determina-se o número de colônias por placa de petri com o auxílio de um microscópio invertido ou microscópio de dissecação com fonte de luz em sua base. O uso de microscópio invertido é desnecessário na maioria dos casos uma vez que as células podem ser vistas sem dificuldades com aumento de 40x. Além disso, a contagem de colônias com auxílio de um microscópio invertido é muito lenta devido a necessidade constante de ajuste de foco para se poder analisar as culturas nas várias profundidades do ágar.

Para estudo morfológico fixa-se as colônias com glutaraldeído 2,5% (v/v) e cora-se com Luxol Fast Blue/Hematoxilina.

4 - PREPARAÇÃO DO FATOR ESTIMULADOR DO CRESCIMENTO DE COLÔNIAS (CSF):

4.1 - Meio Condicionado de Células Esplênicas (SCM):

Baços de camundongos Balb/cj foram removidos sob condições assépticas e passados delicadamente através de peneira de aço inoxidável estéril.

Preparou-se uma suspensão com 2×10^6 cél/ml em meio RPMI-1640 (DIFCO) contendo 10% de soro humano inativo (30 minutos a 56°C).

Adicionou-se ao meio $5 \times 10^{-5}M$ de M2-mercaptoetanol (concentração final de 0,05 ml de "pokeweed mitogen" por ml de meio).

Incubou-se por 7 dias em estufa úmida contendo 10% de CO₂ no ar.

Centrifugou-se o sobrenadante e filtrou-se em filtros millipore.

A atividade funcional do CSF foi determinada através dos estímulos produzidos sobre o crescimento clonal de células progenitoras hematopoiéticas em meio semi-sólido.

A titulação deste lote de SCM (concentrado 10x) demonstrou que uma diluição de até 1:16 fornecem resultados que estão dentro do "plateau" de resposta supramáxima. Os resultados em duplicata da titulação realizada em cultura de 7 dias estão apresentadas na tabela número 4.

5 - DETERMINAÇÃO DO NÚMERO IDEAL DE CÉLULAS NA CULTURA:

Foram testadas as seguintes concentrações de células por ml de cultura: $0,5 \times 10^4$, $1,0 \times 10^4$; $2,0 \times 10^4$; $2,0 \times 10^4$; $3,5 \times 10^4$; $4,5 \times 10^4$; $5,0 \times 10^4$; e $1,0 \times 10^5$. As células foram cultivadas em presença de fator estimulador específico (SCM), produzido conforme descrição anterior, que regula o crescimento e diferenciação das células precursoras hematopoiéticas. As diluições foram testadas em série: 1:8; 1:16; 1:32; 1:64 e 1:128.

O número de células foi ajustado para proporcionar um número inferior a 100 colônias por placa de petri (35mm de diâmetro) permitindo desta forma que as colônias fossem vistas como entidades discretas e individuais. Estas características foram obtidas com um número de células superior a $3,5 \times 10^4$, utilizando-se a diluição do meio condicionado de células esplênicas (SCM) 1:8 ou 1:16. (Resultados apresentados tabela 3).

Diante destes resultados estabelecemos para os experimentos a concentração de $4,5 \times 10^4$ células por ml de cultura, com uma diluição do meio condicionado de células esplênicas de 1:16. As figuras 1 e 2 mostram respectivamente o aspecto microscópico de uma cultura de CFU-C e de uma colônia obtida de células pluripotenciais da medula óssea.

6 - OBTENÇÃO DO SORO PARA DETECÇÃO DA ATIVIDADE DOS FATORES ESTIMULADORES DE COLÔNIAS (CSFs) :

Sangue de camundongos tratados com 1300ppm de acetato de chumbo por 30 dias e infectados com *Listeria monocytogenes* (3×10^2 - Balb/cj e 3×10^6 - C57Bl10) foi obtido através de punção cardíaca em intervalos de 24, 48 e 72 horas após infecção e deixado coagular por 1 hora à temperatura ambiente, e até o dia seguinte a -4°C . A seguir o soro foi separado através de centrifugação (10 minutos a 1500rpm), e armazenado em "pools" de acordo com o grupo e tempo de exposição. Os grupos estudados foram os mesmos citados anteriormente, ou seja, a) Controle; b) Infectados; c) Infectados/expostos ao chumbo e d) Expostos ao chumbo.

A atividade dos CSFs do soro foi determinada através de sua atividade promotora do crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos da medula óssea de animais normais.

7 - EFEITOS DO CHUMBO SOBRE A RESISTÊNCIA DOS ANIMAIS À INFECÇÃO:

A resistência dos animais foi avaliada através da mortalidade. O período de observação foi de 10 dias após o término do tratamento com chumbo e infecção. Os resultados estão apresentados na tabela 31, Figura 7 - Balb/cj e Tabela 32, Figura 8 - C57Bl10

8 - MÉTODOS ESTATÍSTICOS

8.1 - Teste de Student (teste T) :

A atividade dos fatores estimuladores de colônias (CSFs) foi comparada entre o grupo de animais infectados e expostos ao chumbo/infectados utilizando-se teste T para contraste entre duas médias de amostras independentes.

8.1 - Análise de variância :

Utilizou-se análise de variância para verificar-se a ocorrência de diferenças significativas entre os grupos estudados: controle, infectados, infectados/expostos ao chumbo e apenas expostos ao chumbo. Nos casos em que houve diferença significativa, realizou-se teste de DUNCAN

8.2 - Teste não paramétrico - Fisher:

Utilizou-se o teste de Fisher para análise da sobrevivência dos animais após exposição ao chumbo e infecção.

RESULTADOS

Estudamos neste projeto os efeitos da exposição a 1300, 130 e 13ppm de acetato de chumbo por períodos de 70, 30 e 10 dias em camundongos Balb/cj (susceptíveis a *Listeria monocytogenes*) e camundongos C57BL10 (resistentes à esta infecção). Tendo em vista que a exposição a menor dose, ou seja, 13ppm, não produziu alterações significativas após tratamento por um período de 70 dias, não prosseguimos com o estudo dos efeitos desta dose por períodos menores de tempo.

Em todos os grupos estudados, os animais foram infectados com *Listeria monocytogenes* ao término do tratamento com acetato de chumbo. Estudos adicionais foram realizados com o objetivo de se investigar o efeito do chumbo em maiores intervalos de tempo após a infecção. Para estes estudos, com base nos estudos preliminares, padronizamos a dose de 1300ppm por 30 dias e avaliamos os efeitos supressores do chumbo por períodos de 24, 48 e 72 horas após infecção.

1 - Relação dose resposta do chumbo sobre os precursores hematopoiéticos:

Nas duas linhagens verificou-se um efeito supressor dose-dependente do chumbo. Doses diárias de 130ppm, administradas por um período inferior a 30 dias, assim como doses de 13ppm administradas por um período de 70 dias não causaram alterações na resposta mielopoiética. (Tabelas 5,6; Figuras 1 - Balb\cj, e Tabelas 7,8; Figuras 2 - C57Bl10).

Os efeitos supressores do metal tornaram-se evidentes com a administração de doses diárias de 130ppm por períodos iguais ou superiores a

30 dias, e doses de 1300ppm de acetato de chumbo por períodos iguais ou superiores a 10 dias. (Tabelas 8, 9, 10, 11, 12; Fig. 1 Balb/cj e Tabelas 13, 14, 15, 16, 17; Figura 2 - C57Bl10 ($p < 0.05$ ANOVA; Teste DUNCAN).

2 - Efeito sobre os precursores hematopoiéticos decorrentes da infecção por *Listeria monocytogenes* e da administração de chumbo, observados 24 horas após à infecção.

Na linhagem Balb\cj, susceptível à infecção por *Listeria monocytogenes*, o efeito mielopoiético da infecção não é aparente 24 horas após o inóculo da bactéria. (Tabelas 5, 6, 9, 12, 13, 16,; Figura 4 - Balb/cj. Por outro lado, na linhagem C57Bl10, resistente à infecção, observamos uma supressão já nas primeiras 24 horas após administração da bactéria. (Tabelas 7, 8, 11, 14, 15, 17, 18; Figura 3 - C57Bl10). Este efeito mielossupressor na linhagem resistente foi atribuído por YONG e CHEERS, 1986; WING et al, 1984 a uma migração de células da medula óssea para os tecidos neste estágio da infecção.

O efeito supressor do chumbo decorrente da administração de 1300ppm por um período de 30 dias, já é evidente nas primeiras 24 horas após a infecção nas duas linhagens estudadas. Figura 3 - Balb/cj e Figura 4 C57Bl10. No entanto nenhum efeito adicional mielossupressor foi observado em animais C57Bl10 infectados e tratados com chumbo quando comparado com o efeito mielossupressor observado em animais apenas infectados. (Figura 3)

3 - Efeitos sobre os precursores hematopoiéticos decorrentes da infecção e da administração do chumbo observados 48 e 72 horas após a infecção:

Na linhagem Balb\cj após 24 horas manifesta-se o efeito supressor da infecção e persiste o efeito supressor induzido pelo chumbo. Nesta linhagem podemos observar um efeito somatório significativo ($p < 0.05$ ANOVA; Teste DUNCAN) entre o chumbo e a infecção, comprometendo ainda mais o sistema mielopoiético. (Tabelas 19 e 20; Figura 4)

Em animais C57Bl10, 48 horas após infecção observamos o mesmo quadro obtido após 24 horas, com supressão causada tanto pelo chumbo como pela infecção (Tabelas 21 e 22; Figura 3). No entanto, após 72 horas os efeitos supressores da infecção desaparecem, mantendo-se apenas a mielossupressão causada pelo chumbo.

4 - Atividade (CSFs) do soro após infecção:

Não observamos crescimento celular das células pluripotenciais da medula óssea de camundongos normais, na presença do soro de animais apenas expostos ao chumbo e controle. Porém ao utilizarmos o soro de animais Balb\cj e C57Bl10 infectados, expostos ao chumbo ou não, os níveis séricos de fatores estimuladores de colônias foram suficientes para estimular o crescimento e diferenciação celular. Os resultados obtidos com o soro destes animais foram similares nos diferentes intervalos de tempo estudados, 24, 48 e 72 horas após infecção. Estes resultados mostram que os efeitos supressores do chumbo não se devem a uma interferência na produção de CSFs. (Tabelas 23, 24, 25, Figuras 6 - Balb\cj; Tabelas 26, 27, 28, Figuras 5 - C57Bl10). As fotografias 3 e 4 mostram o aspecto microscópico (aumento 200x) de uma cultura de CFU-C obtida através de estimulação induzida pelo soro de animais infectados. Podemos observar que as colônias obtidas com o meio condicionado de células

esplênicas (SCM) (Fotografias 1 e 2) são mais compactas que aquelas obtidas com soro de animais infectados.

5 - Efeitos do chumbo sobre a resistência do hospedeiro a infecção:

Todos os camundongos Balb/cj expostos ao chumbo e infectados morreram em 6 dias, enquanto que 15 animais do grupo de camundongos apenas infectados sobreviveram por mais de 10 dias (Tabela 29; Figura 7). Na linhagem C57Bl10 3 camundongos infectados/expostos ao chumbo morreram, enquanto que todos os animais apenas infectados sobreviveram (Tab. 30; Figuras 8).

6 - Peso dos animais após exposição ao chumbo:

O peso dos animais de ambas linhagens não foram alterados após exposição a 1300ppm de acetato de chumbo por 30 dias. Tab. 29 - Balb\cj e Tab. 30 - C57Bl10.

Tabela 1 - Bacteremia de camundongos Balb\cj após infecção com Listeria monocytogenes.

Inoculação por animal	Animal	Número de colônias de bactérias por ml de sangue (dias após a infecção)						
		1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
3×10^2	1	40	80	80	80	40	120	morte
3×10^2	2	-	40	40	40	40	120	morte
3×10^2	3	40	40	80	40	80	120	morte
3×10^3	4	40	80	40	120	80	morte	
3×10^3	5	40	40	40	120	120	morte	
3×10^3	6	40	40	80	80	80	morte	
3×10^4	7	80	40	120	morte			
3×10^4	8	80	80	120	morte			
3×10^4	9	40	40	80	80	morte		
3×10^5	10	80	80	160	morte			
3×10^5	11	40	80	120	morte			
3×10^5	12	40	120	morte				
3×10^6	13	200	morte					
3×10^6	14	160	morte					
3×10^6	15	morte						
3×10^7	16	120	morte					
3×10^7	17	morte						
2×10^7	18	240	morte					

Tabela 2 - Bacteremia de camundongos C57Bl10 após infecção com Listeria monocytogenes.

Inoculação por animal	Animal	Número de colônias de bactérias por ml de sangue (dias após infecção).						
		1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª
2×10^2	1	40	-					
2×10^2	2	-						
2×10^2	3	-						
2×10^3	4	40	40	-				
2×10^3	5	40	-					
2×10^3	6	40	-					
2×10^4	7	40	40	40	-			
2×10^4	8	40	80	40	40	-		
2×10^4	9	40	40	-				
2×10^5	10	40	40	-				
2×10^5	11	80	80	40	40	-		
2×10^5	12	40	40	-				
2×10^6	13	80	40	80	40	40	-	-
2×10^6	14	80	40	40	80	40	40	-
2×10^6	15	40	80	40	80	40	morte	
2×10^7	16	80	120	80	120	160	200	morte
2×10^7	17	40	80	80	40	80	40	-
2×10^7	18	40	40	80	40	120	morte	

- Ausência de bacteremia

TABELA 3 - Número de colônias obtidas em cultura de 7 dias, na presença do Meio Condicionado de Células Esplênicas (SCM).

Nº células por ml de cultura	Diluição do meio condicionado (SCM)				
	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
0,5 x 10 ⁴	22	24	23	12	12
1,0 x 10 ⁴	30	36	22	22	11
2,0 x 10 ⁴	34	40	14	22	14
3,5 x 10 ⁴	51	49	39	10	16
4,0 x 10 ⁴	39	40	30	15	10
4,5 x 10 ⁴	67	71	25	13	11
5,0 x 10 ⁴	76	78	61	50	32
1,0 x 10 ⁵	80	82	51	39	20

Tabela 4 - Titulação do lote no 1 do Meio Condicionado de Células Esplênicas (SCM).

Diluição do SCM	No de CFU-C
1:4	112
1:4	110
1:8	89
1:8	102
1:16	106
1:16	102
1:32	80
1:32	104
1:64	93
1:64	90
1:128	49
1:128	50
1:256	25
1:256	30
1:512	3
1:512	10

Obs: O número de células de medula óssea utilizado foi de 5×10^4 /ml de cultura.

Tabela 5 - Número de células formadoras de colônias (CFC) de medula óssea de camundongos Balb/cj, na presença do meio condicionado de células esplênicas (SCM). Animais expostos a 130ppm de acetato de chumbo por 10 dias, sacrificados 24 horas após infecção com $3,0 \times 10^2$ Listeria monocytogenes.

ANIMAL	CONTROLE	INFECTADOS	INFECTADOS/EXP.CHUMBO	EXP.CHUMBO
1	62	46	60	66
2	53	59	68	51
3	69	68	51	53
4	49	73	48	69
5	65	76	76	65
6	71	54	70	63
7	56	63	49	70
8	67	80	55	72
9	70	53	62	74
10	75	54	69	49
11	68	41	71	55
12	69	73	43	63
TOTAL	774	740	722	750
MÉDIA	64,5	61,6	60,1	62,5
DEVI. PADRÃO	7,9	12,4	10,8	8,5

Tabela 6 - Número de células formadoras de colônias (CFC) de medula óssea de camundongos Balb/cj, na presença do meio condicionado de células esplênicas (SCM). Animais expostos a 13ppm de acetato de chumbo por 70 dias, sacrificados 24 horas após infecção com $3,0 \times 10^2$ Listeria monocytogenes.

ANIMAL	CONTROLE	INFECTADOS	INFECTADOS/EXP.CHUMBO	EXP.CHUMBO
1	86	56	50	82
2	62	42	44	38
3	82	41	56	49
4	54	70	60	54
5	138	109	100	89
6	120	110	115	120
7	86	86	120	131
8	85	99	80	98
TOTAL	713	613	625	661
MÉDIA	89,1	76,6	78,1	82,6
D. PADRÃO	27,7	28,5	30,1	33,7

Tabela 7 - Número de células formadoras de colônias (CFC) de medula óssea de camundongos C57Bl10, na presença do meio condicionado de células esplênicas (SCM). Animais expostos a 130ppm de acetato de chumbo por 10 dias, sacrificados 24 horas após infecção com $3,0 \times 10^6$ Listeria monocytogenes.

ANIMAL	CONTROLE	INFECTADOS	INFECTADOS/EXP.CHUMBO	EXP.CHUMBO
1	48	50	30	74
2	32	45	28	35
3	40	65	35	30
4	55	20	30	39
5	35	19	29	30
6	50	20	25	44
7	71	22	30	65
8	39	31	31	31
9	49	30	22	40
10	72	33	30	50
11	59	34	18	56
12	63	20	22	56
TOTAL	613	389	330	550
MÉDIA	51,0	32,4	27,5	45,8
D.PADRÃO	13,3	14,4	4,7	14,5

($p < 0.05$ ANOVA; Teste DUNCAN).

Tabela 8 - Número de células formadoras de colônias (CFC) de medula óssea de camundongos C57Bl10, na presença do meio condicionado de células esplênicas (SCM). Animais expostos a 13ppm de acetato de chumbo por 70 dias, sacrificados 24 horas após infecção com $3,0 \times 10^6$ Listeria monocytogenes.

ANIMAL	CONTROLE	INFECTADOS	INFECTADOS/EXP.CHUMBO	EXP.CHUMBO
1	80	43	44	80
2	92	37	39	77
3	78	44	40	89
4	88	36	38	78
5	90	39	43	80
6	79	44	45	93
OTAL	507	243	249	497
ÉDIA	84,5	40,5	41,5	82,8
.PADRÃO	6,1	3,6	2,8	6,5

p< 0.05 ANOVA; Teste DUNCAN).

abela 09 - Número de células formadoras de colônias (CFC) de medula óssea de camundongos Balb/cj, na presença do meio condicionado de células esplênicas (SCM). Animais expostos a 130ppm de acetato de chumbo por 30 dias, sacrificados 24 horas após infecção com $3,0 \times 10^2$ Listeria monocytogenes.

ANIMAL	CONTROLE	INFECTADOS	INFECTADOS/EXP.CHUMBO	EXP.CHUMBO
1	65	59	56	40
2	55	48	52	31
3	58	77	53	43
4	57	66	48	53
5	127	71	23	77
6	101	77	30	47
7	80	102	32	56
8	96	90	32	45
9	90	93	40	46
10	85	87	36	42
11	76	60	48	33
12	60	63	41	40
TOTAL	950	893	491	553
MÉDIA	79,1	74,4	40,9	46,0
DEVI. PADRÃO	21,9	16,1	10,5	12,0

($p < 0.05$ ANOVA; Teste DUNCAN).

Tabela 10 - Número de células formadoras de colônias (CFC) de medula óssea de camundongos Balb/cj, na presença do meio condicionado de células esplênicas (SCM). Animais expostos a 130ppm de acetato de chumbo por 70 dias, sacrificados 24 horas após infecção com $3,0 \times 10^2$ Listeria monocytogenes.

ANIMAL	CONTROLE	INFECTADOS	INFECTADOS/EXP.CHUMBO	EXP.CHUMBO
1	72	99	50	32
2	52	36	26	50
3	72	76	30	48
4	75	80	36	34
5	50	80	41	20
6	38	22	19	35
7	62	32	39	31
8	60	55	46	34
9	55	35	38	24
10	61	50	20	18
11	64	60	35	20
12	59	51	25	34
TOTAL	720	676	405	380
MÉDIA	60,0	56,3	33,7	31,6
D.PADRÃO	16,8	22,7	9,8	10,2

($p < 0.05$ ANOVA; Teste DUNCAN).

Tabela 11 - Número de células formadoras de colônias (CFC) de medula óssea de camundongos Balb/cj, na presença do meio condicionado de células esplênicas (SCM). Animais expostos a 1300ppm de acetato de chumbo por 10 dias, sacrificados 24 horas após infecção com $3,0 \times 10^2$ Listeria monocytogenes.

ANIMAL	CONTROLE	INFECTADOS	INFECTADOS/EXP.CHUMBO	EXP.CHUMBO
1	63	51	23	23
2	70	55	35	35
3	73	69	39	41
4	71	50	41	32
5	62	71	38	23
6	64	63	41	33
TOTAL	403	359	217	187
MÉDIA	67,1	59,8	36,1	31,1
PADRÃO	4,7	9,1	6,8	7,0

($p < 0.05$ ANOVA; Teste DUNCAN).

Tabela 12 - Número de células formadoras de colônias (CFC) de medula óssea de camundongos Balb/cj, na presença do meio condicionado de células esplênicas (SCM). Animais expostos a 1300ppm de acetato de chumbo por 30 dias, sacrificados 24 horas após infecção com $3,0 \times 10^2$ Listeria monocytogenes.

ANIMAL	CONTROLE	INFECTADOS	INFECTADOS/EXP.CHUMBO	EXP.CHUMBO
1	83	76	48	48
2	76	76	60	53
3	58	69	57	52
4	68	66	52	74
5	95	64	53	47
6	114	89	75	40
7	101	58	38	42
8	80	90	41	37
9	96	71	46	40
10	83	77	45	65
11	76	102	39	36
12	80	90	50	38
TOTAL	1010	928	604	572
MÉDIA	84,1	77,3	50,3	47,6
D.PADRÃO	15,2	12,9	10,3	11,8

($p < 0.05$ ANOVA; Teste DUNCAN).

Tabela 13- Número de células formadoras de colônias (CFC) de medula óssea de camundongos Balb/cj, na presença do meio condicionado de células esplênicas (SCM). Animais expostos a 1300ppm de acetato de chumbo por 70 dias, sacrificados 24 horas após infecção com $3,0 \times 10^2$ Listeria monocytogenes.

ANIMAL	CONTROLE	INFECTADOS	INFECTADOS/EXP.CHUMBO	EXP.CHUMBO
1	109	80	81	79
2	76	74	103	52
3	96	81	66	57
4	72	80	50	41
5	71	76	53	85
6	57	90	85	59
7	99	76	80	89
8	116	90	53	90
9	120	89	46	60
10	95	59	67	71
11	114	86	50	65
12	89	109	61	87
TOTAL	1114	990	795	835
MÉDIA	92,8	82,5	66,2	69,5
D.PADRÃO	20,2	12,3	17,6	16,3

($p < 0.05$ ANOVA; Teste DUNCAN).

abela 14 - Número de células formadoras de colônias (CFC) de medula óssea de camundongos C57Bl10, na presença do meio condicionado de células esplênicas (SCM). Animais expostos a 130ppm de acetato de chumbo por 30 dias, sacrificados 24 horas após infecção com $3,0 \times 10^6$ Listeria monocytogenes.

ANIMAL	CONTROLE	INFECTADOS	INFECTADOS/EXP.CHUMBO	EXP.CHUMBO
1	71	22	15	22
2	44	23	14	13
3	70	19	13	15
4	28	65	18	23
5	74	30	20	96
6	77	29	22	54
7	60	20	15	31
8	34	18	17	55
9	35	19	19	36
10	44	20	20	30
11	70	29	32	34
12	80	25	30	42
TOTAL	687	319	235	451
MÉDIA	57,2	26,5	19,5	37,5
DEVIAC. PADRÃO	18,1	12,8	5,9	22,7

p < 0.05 ANOVA; Teste DUNCAN).

Tabela 15 - Numero de células formadoras de colônias (CFC) de medula óssea de camundongos C57Bl10, na presença do meio condicionado de células esplênicas (SCM). Animais expostos a 130ppm de acetato de chumbo por 70 dias, sacrificados 24 horas após infecção com $3,0 \times 10^6$ Listeria monocytogenes.

ANIMAL	CONTROLE	INFECTADOS	INFECTADOS/EXP.CHUMBO	EXP.CHUMBO
1	74	27	36	13
2	64	35	13	20
3	54	32	28	17
4	62	30	18	20
5	74	50	31	17
6	77	52	49	27
7	72	41	43	26
8	59	30	40	31
9	67	43	62	12
10	44	37	29	78
11	57	44	47	28
12	78	36	38	27
TOTAL	782	457	434	316
MÉDIA	65,1	38,0	36,1	26,3
D.PADRÃO	10,4	8,0	13,5	11,4

p < 0.05 ANOVA; Teste DUNCAN).

Tabela 16 - Número de células formadoras de colônias (CFC) de medula óssea de camundongos C57Bl10, na presença do meio condicionado de células esplênicas (SCM). Animais expostos a 1300ppm de acetato de chumbo por 10 dias, sacrificados 24 horas após infecção com $3,0 \times 10^6$ Listeria monocytogenes.

ANIMAL	CONTROLE	INFECTADOS	INFECTADOS/EXP.CHUMBO	EXP.CHUMBO
1	80	32	33	40
2	72	34	28	51
3	78	41	41	56
4	71	41	47	43
5	80	36	42	39
6	81	49	44	51
TOTAL	462	223	215	280
MÉDIA	77,0	38,8	39,1	46,6
D.PADRÃO	4,3	6,1	7,1	6,9

p< 0.05 ANOVA; Teste DUNCAN).

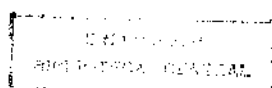


Tabela 17 - Número de células formadoras de colônias (CFC) de medula óssea de camundongos C57Bl10, na presença do meio condicionado de células esplênicas (SCM). Animais expostos a 1300ppm de acetato de chumbo por 30 dias, sacrificados 24 horas após infecção com $3,0 \times 10^6$ Listeria monocytogenes.

ANIMAL	CONTROLE	INFECTADOS	INFECTADOS/EXP.CHUMBO	EXP.CHUMBO
1	68	27	75	53
2	86	80	30	43
3	76	58	31	35
4	74	25	24	82
5	58	30	23	56
6	-	26	30	25
7	-	29	19	29
8	-	18	25	27
9	-	32	18	53
10	-	33	23	31
11	-	27	21	41
12	-	28	31	40
TOTAL	362	413	350	515
MÉDIA	72,4	34,4	29,1	42,9
DEVIAC. PADRÃO	10,3	17,2	15,1	16,2

p< 0.05 ANOVA; Teste DUNCAN).

Tabela 18 - Número de células formadoras de colônias (CFC) de medula óssea de camundongos C57Bl10, na presença do meio condicionado de células esplênicas (SCM). Animais expostos a 1300ppm de acetato de chumbo por 70 dias, sacrificados 24 horas após infecção com $3,0 \times 10^6$ Listeria monocytogenes.

ANIMAL	CONTROLE	INFECTADOS	INFECTADOS/EXP.CHUMBO	EXP.CHUMBO
1	61	35	36	41
2	64	31	40	35
3	70	40	41	31
4	71	49	32	34
5	49	40	39	39
6	61	41	45	23
7	60	43	28	48
8	63	21	34	34
TOTAL	499	300	295	285
MÉDIA	62,3	37,5	36,8	35,6
D.PADRÃO	6,8	8,5	5,4	7,3

($p < 0.05$ ANOVA; Teste DUNCAN).

Tabela 19 - Número de células formadoras de colônias (CFC) de medula óssea de camundongos Balb/cj, na presença do meio condicionado de células esplênicas (SCM). Animais expostos a 1300ppm de acetato de chumbo por 30 dias, sacrificados 48 horas após infecção com $3,0 \times 10^2$ Listeria monocytogenes.

ANIMAL	CONTROLE	INFECTADOS	INFECTADOS/EXP.CHUMBO	EXP.CHUMBO
1	90	63	42	31
2	58	48	45	43
3	66	51	36	33
4	82	48	32	28
5	71	55	22	42
6	67	49	26	29
7	-	33	40	37
8	-	58	31	28
9	-	50	28	29
10	-	59	24	41
11	-	43	30	29
12	-	68	33	34
TOTAL	214	596	389	404
MÉDIA	71,3	52,0	32,4	33,6
D.PADRÃO	16,6	9,3	7,1	5,7

($p < 0.05$ ANOVA; Teste DUNCAN).

Tabela 20 - Número de células formadoras de colônias (CFC) de medula óssea de camundongos Balb/cj, na presença do meio condicionado de células esplênicas (SCM). Animais expostos a 1300ppm de acetato de chumbo por 30 dias, sacrificados 72 horas após infecção com $3,0 \times 10^2$ Listeria monocytogenes.

ANIMAL	CONTROLE	INFECTADOS	INFECTADOS/EXP.CHUMBO	EXP.CHUMBO
1	61	41	28	32
2	57	36	25	41
3	54	37	20	35
4	69	49	23	23
5	-	38	28	31
6	-	39	21	24
7	-	54	26	41
8	-	36	28	32
9	-	41	21	35
10	-	34	22	40
11	-	43	23	43
12	-	39	20	39
TOTAL	241	487	285	416
MÉDIA	60,2	40,5	23,7	34,6
DEVIAC. PADRÃO	6,5	5,7	3,1	6,5

(p < 0.05 ANOVA; Teste DUNCAN)

Tabela 21 - Número de células formadoras de colônias (CFC) de medula óssea de camundongos C57Bl10, na presença do meio condicionado de células esplênicas (SCM). Animais expostos a 1300ppm de acetato de chumbo por 30 dias, sacrificados 48 horas após infecção com $3,0 \times 10^6$ Listeria monocytogenes.

ANIMAL	CONTROLE	INFECTADOS	INFECTADOS/EXP.CHUMBO	EXP.CHUMBO
1	58	37	44	45
2	69	39	36	33
3	54	38	43	46
4	56	49	47	32
5	61	38	42	35
6	72	49	38	43
7	-	33	36	40
8	-	41	39	45
9	-	42	32	32
10	-	46	34	41
11	-	40	31	43
12	-	34	40	39
TOTAL	370	486	462	474
MÉDIA	61,6	40,5	38,5	39,5
D.PADRÃO	7,2	5,2	4,9	5,2

(p 0.05 ANOVA; Teste DUNCAN).

abela 22 - Número de células formadoras de colônias (CFC) de medula óssea de camundongos C57Bl10, na presença do meio condicionado de células esplênicas (SCM). Animais expostos a 1300ppm de acetato de chumbo por 30 dias, sacrificados 72 horas após infecção com $3,0 \times 10^5$ Listeria monocytogenes.

ANIMAL	CONTROLE	INFECTADOS	INFECTADOS/EXP.CHUMBO	EXP.CHUMBO
1	67	54	38	39
2	60	53	44	37
3	53	58	40	41
4	59	44	40	53
5	68	48	41	48
6	-	51	52	39
7	-	53	34	34
8	-	51	49	41
9	-	47	41	44
10	-	59	29	39
11	-	55	45	40
12	-	51	32	43
TOTAL	307	624	485	498
MÉDIA	61,4	52,0	40,4	41,5
DEVIÇÃO PADRÃO	6,1	4,3	6,6	5,0

($p < 0.05$ ANOVA; Teste DUNCAN).

Tabela 23 - Número de colônias obtidas através de estimulação induzida com soro de camundongos Balb/cj expostos ao acetato de chumbo (1300ppm por 30 dias), 24 horas após infecção com 3×10^2 Listeria monocytogenes.

ANIMAL	INFECTADOS	INFECTADOS/EXPOSTOS CHUMBO
1	23	28
2	38	39
3	22	29
4	23	32
5	29	28
6	21	26
7	18	46
8	17	28
9	25	37
10	28	31
11	32	21
12	36	17
13	-	32
14	-	24
15	-	22
16	-	33
17	-	37
18	-	23
TOTAL	312	536
MÉDIA	26	29
D. PADRÃO	6,7	7,1

Tabela 24 - Número de colônias obtidas através de estimulação induzida com soro de camundongos Balb/cj expostos ao acetato de chumbo (1300ppm por 30 dias), 48 horas após infecção com 3×10^2 , Listeria monocytogenes.

ANIMAL	INFECTADOS	INFECTADOS/EXPOSTOS CHUMBO
1	74	21
2	38	34
3	34	64
4	44	78
5	32	46
6	37	36
7	29	29
8	36	18
9	23	47
10	24	54
11	38	29
12	-	36
13	-	30
14	-	37
15	-	39
TOTAL	409	598
MÉDIA	37,1	39,8
D.PADRÃO	13,7	15,9

Tabela 25 - Número de colônias obtidas através de estimulação induzida
 com soro de camundongos Balb/cj expostos ao acetato de
 chumbo (1300ppm por 30 dias), 72 horas após infecção com
 3×10^2 , Listeria monocytogenes.

ANIMAL	INFECTADOS	INFECTADOS/EXPOSTOS CHUMBO
1	19	27
2	11	25
3	12	13
4	18	15
5	19	22
6	16	18
7	23	25
8	22	16
9	10	21
10	11	10
11	18	8
12	19	10
13	10	24
14	16	12
TOTAL	224	246
MÉDIA	16,0	17,5
D.PADRÃO	4,4	6,4

Tabela 26 - Número de colônias obtidas através de estimulação induzida com soro de camundongos C57Bl10 expostos ao acetato de chumbo (1300ppm por 30 dias), 24 horas após infecção com 3×10^6 Listeria monocytogenes.

ANIMAL	INFECTADOS	INFECTADOS/EXPOSTOS CHUMBO
1	56	59
2	69	49
3	37	54
4	75	56
5	47	69
6	57	57
7	66	65
8	71	50
9	40	53
10	46	40
11	67	42
12	54	30
13	37	48
14	38	53
TOTAL	760	745
MÉDIA	54,2	53,2
DEVIAC. PADRÃO	9,0	7,8

Tabela 27 - Número de colônias obtidas através de estimulação induzida com soro de camundongos C57Bl10 expostos ao acetato de chumbo (1300ppm por 30 dias), 48 horas após infecção com 3×10^6 Listeria monocytogenes.

ANIMAL	INFECTADOS	INFECTADOS/EXPOSTOS CHUMBO
1	18	11
2	12	41
3	14	15
4	14	11
5	7	2
6	5	9
7	7	7
8	6	6
9	16	7
10	5	4
11	3	3
12	2	13
13	4	3
14	8	6
15	3	8
TOTAL	114	146
MÉDIA	7,6	9,7
D. PADRÃO	5,0	9,4

Tabela 28 - Número de colônias obtidas através de estimulação induzida com soro de camundongos C57Bl10 expostos ao acetato de chumbo (1300ppm por 30 dias), 72 horas após infecção com 3×10^6 Listeria monocytogenes.

ANIMAL	INFECTADOS	INFECTADOS/EXPOSTOS CHUMBO
1	9	6
2	3	8
3	7	4
4	5	4
5	10	10
6	10	5
7	6	4
8	6	10
9	6	4
10	12	4
11	7	6
12	10	2
13	8	3
14	7	8
15	4	4
TOTAL	110	82
MÉDIA	7,3	5,4
D.PADRÃO	2,5	2,4

Tabela 29 - Peso de animais C57Bl10 após exposição a 1300ppm de acetato de chumbo por 30 dias.

ANIMAL	CONTROLE	EXPOSTOS AO CHUMBO
1	25,80	25,09
2	26,56	22,19
3	25,28	25,84
4	30,18	27,28
5	29,34	25,55
6	28,37	29,32
7	28,01	25,89
8	23,24	27,38
9	27,03	22,03
10	27,75	22,19
TOTAL	271,56	252,76
MÉDIA	27,15	25,27
D. PADRÃO	2,04	2,47

Tabela 30 - Peso de animais Balb\cj após exposição a 1300ppm de acetato de chumbo por 30 dias.

ANIMAL	CONTROLE	EXPOSTOS AO CHUMBO
1	27,50	29,78
2	27,43	28,03
3	28,38	22,70
4	22,47	21,12
5	22,54	21,55
6	28,34	25,30
7	30,99	28,30
8	24,46	29,40
9	25,67	25,80
10	24,94	22,10
11	25,20	29,58
12	23,91	29,53
TOTAL	311,83	313,19
MÉDIA	25,98	26,09
D. PADRÃO	2,50	3,40

abela 31 - Índice de mortalidade de animais Balb\cj expostos a 1300ppm de acetato de chumbo por 30 dias, infectados com Listeria monocytogenes (3×10^2), observados por um período de 10 dias.

DIAS APÓS INFECÇÃO	INFECTADOS	INFECTADOS\EXPOSTOS AO CHUMBO
1º dia	0	2
2º dia	0	1
3º dia	1	3
4º dia	2	4
5º dia	0	3
6º dia	0	5
7º dia	0	2
8º dia	0	-
9º dia	0	-
10º dia	0	-

(p 0.05 - Teste Fisher).

Tabela 32 - Índice de mortalidade de animais C57Bl10 expostos a 1300ppm de acetato de chumbo por 30 dias, infectados com Listeria monocytogenes (3×10^6), observados por um período de 10 dias.

DIAS APÓS INFECÇÃO	INFECTADOS	INFECTADOS\EXPOSTOS AO CHUMBO
1 ^o dia	0	0
2 ^o dia	0	0
3 ^o dia	0	0
4 ^o dia	0	2
5 ^o dia	0	1
6 ^o dia	0	0
7 ^o dia	0	0
8 ^o dia	0	0
9 ^o dia	0	0
10 ^o dia	0	0

N=12

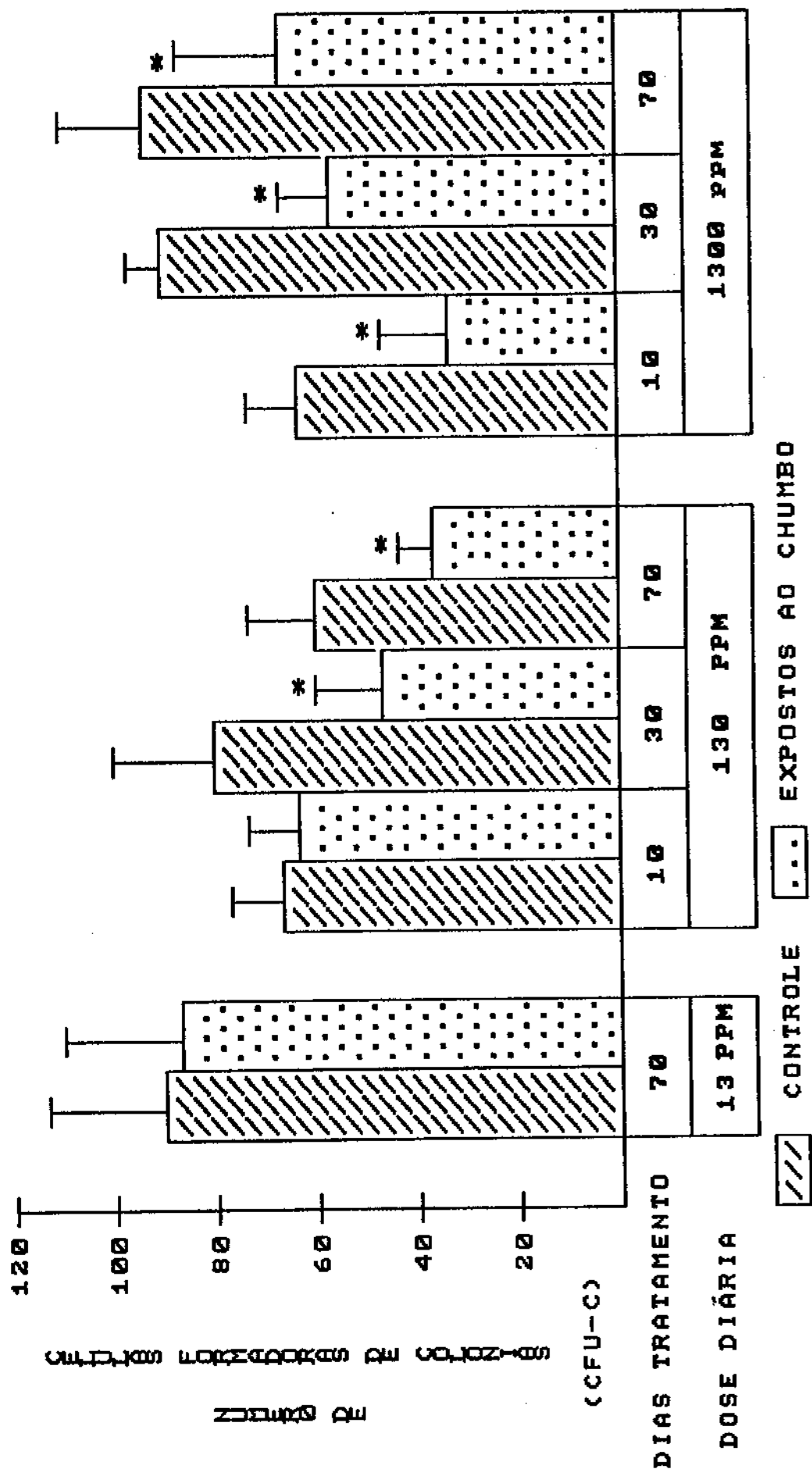


FIG. 1 - EFEITO MIELOSSUPRESSOR DOSE-DEPENDENTE DO ACETATO DE CHUMBO SOBRE AS CÉLULAS FORMADORAS DE COLÔNIAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS BALB/CJ. (* P < 0.05 ANOVA; Teste DUNCAN)

N=12

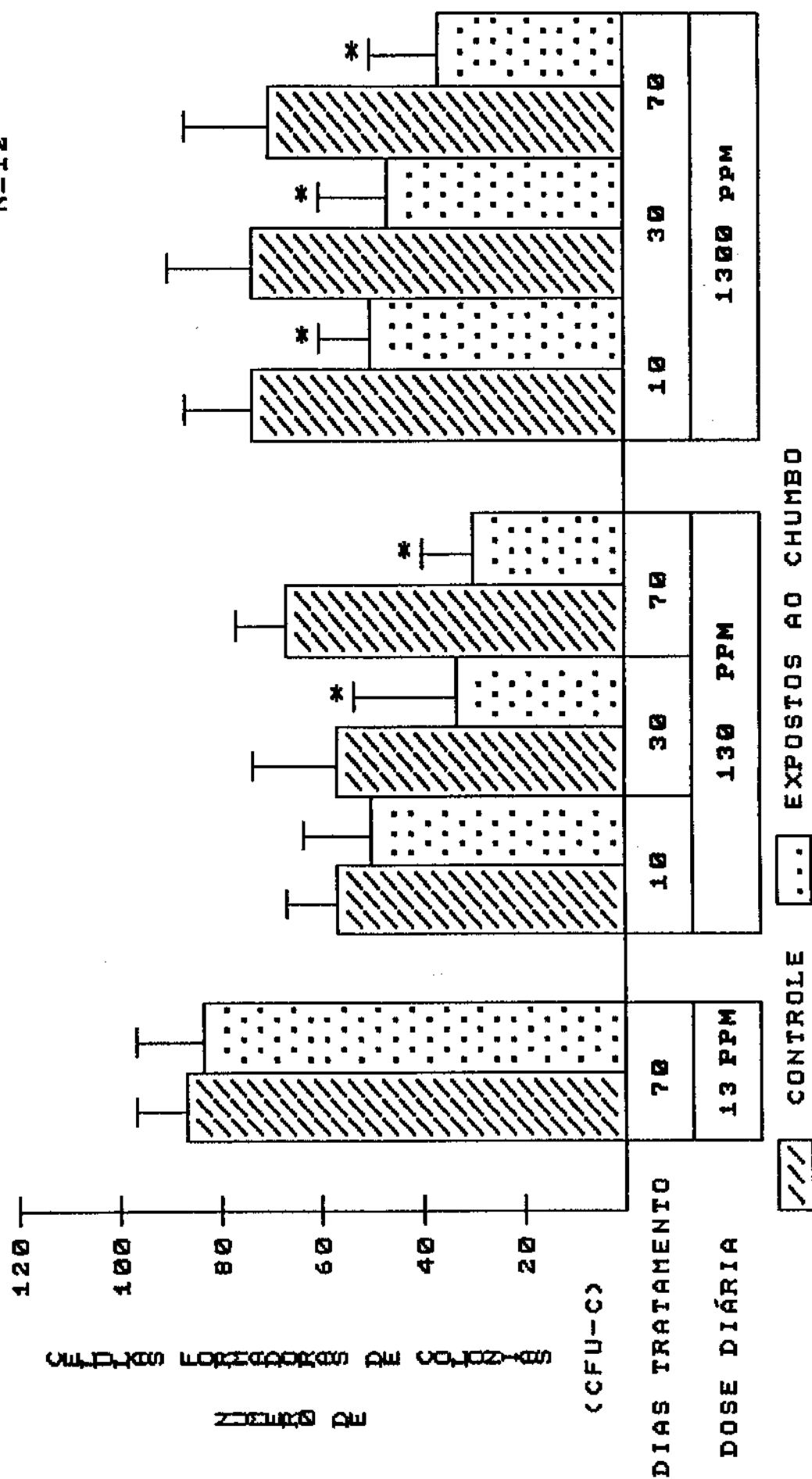


FIG. 2 - EFEITO MIELOSSUPRESSOR DOSE-DEPENDENTE DO ACETATO DE CHUMBO SOBRE AS CÉLULAS FORMADORAS DE COLÔNIAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS C37BL/10 (* P < 0.05 ANOVA; Teste DUNCAN)

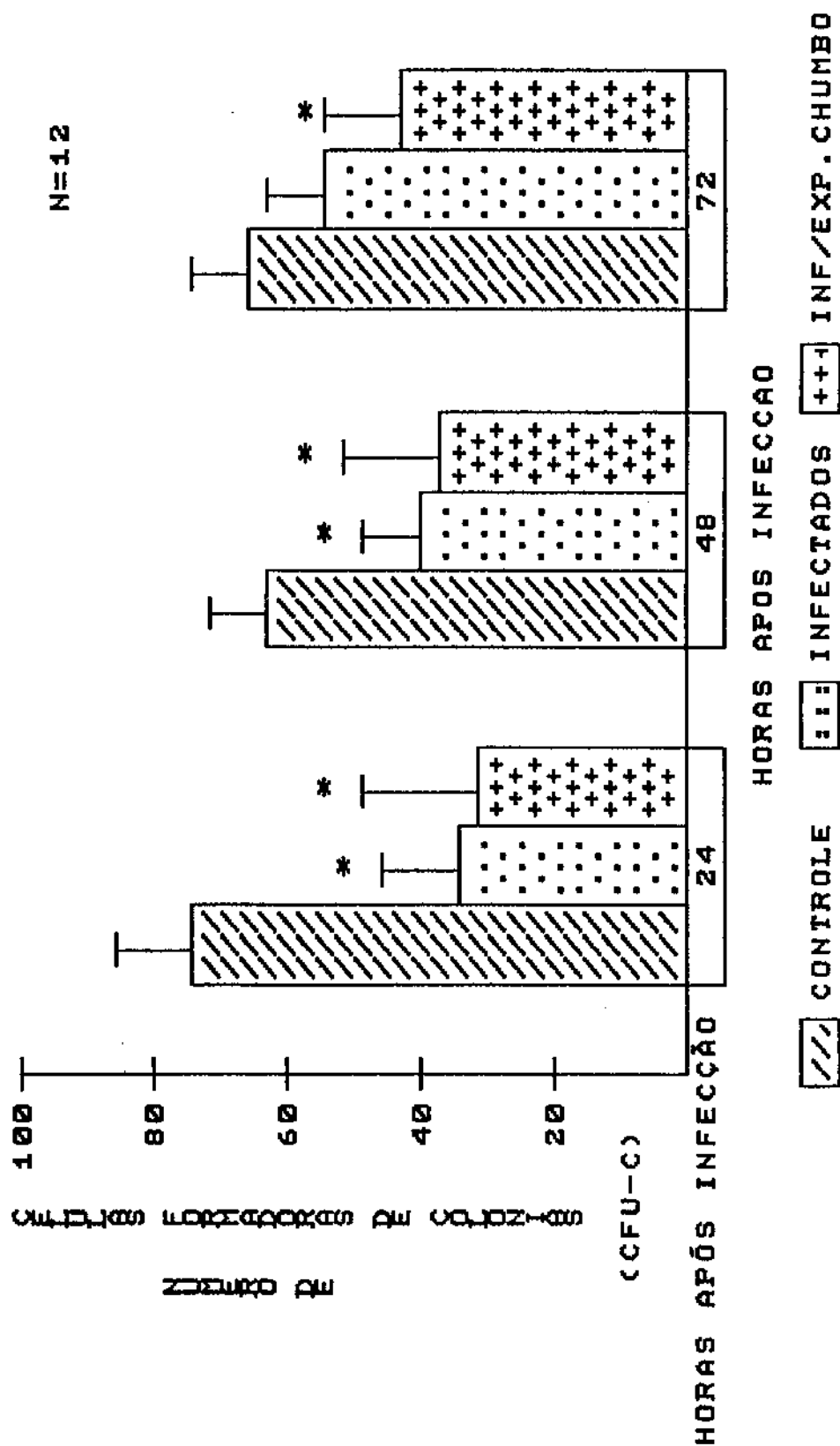


FIG. 3 - ANIMAIS C57BL10 EXPOSTOS A 1300PPM DE ACETATO DE CHUMBO POR 30 DIAS E INFECTADOS COM Listeria monocytogenes. ($P < 0.05$ ANOVA; Teste DUNCAN).

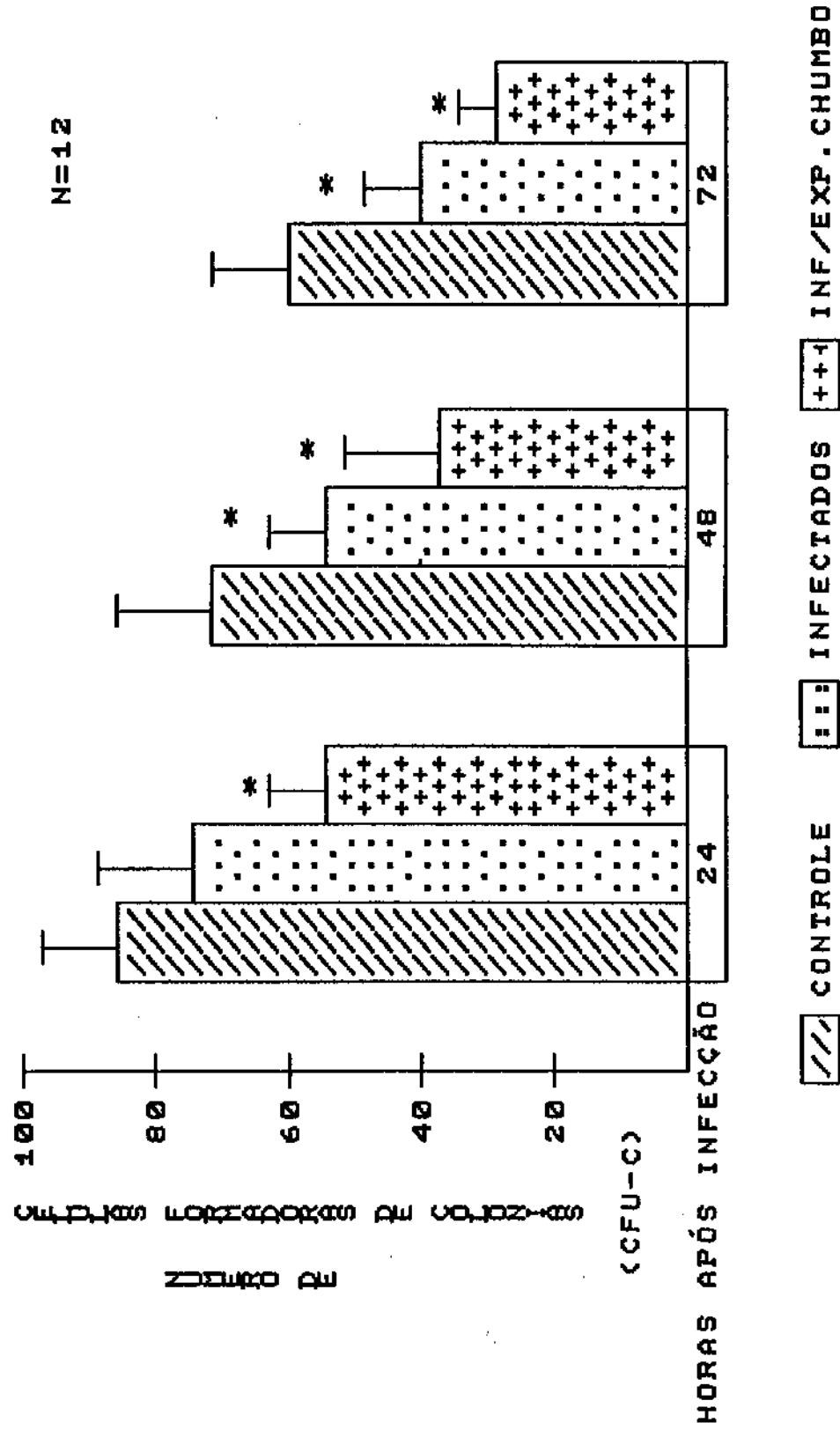


FIG. 4 - ANIMAIS BALB/CJ EXPOSTOS A 1300PPM DE ACETATO DE CHUMBO POR 30 DIAS E INFECTADOS COM Listeria monocytogenes. (P< 0.05 ANOVA; Teste DUNCAN).

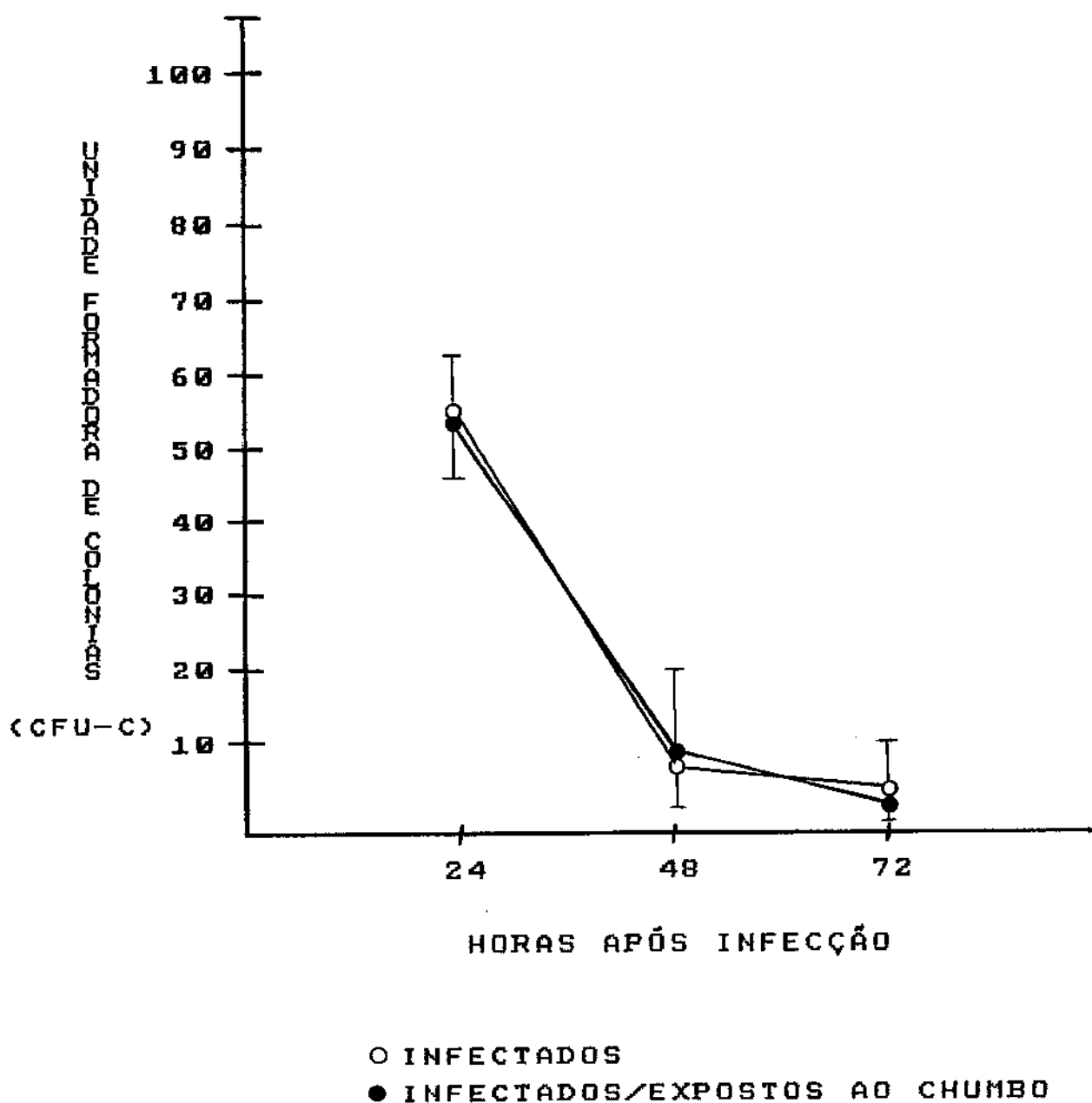


FIG. 5 - NÚMERO DE COLÔNIAS OBTIDAS COM ESTIMULAÇÃO INDUZIDA ATRAVÉS DO SORO DE ANIMAIS C57BL10 EXPOSTOS A 1300PPM DE ACETATO DE CHUMBO POR 30 DIAS, INFECTADOS COM (10^6) Listeria monocytogenes.

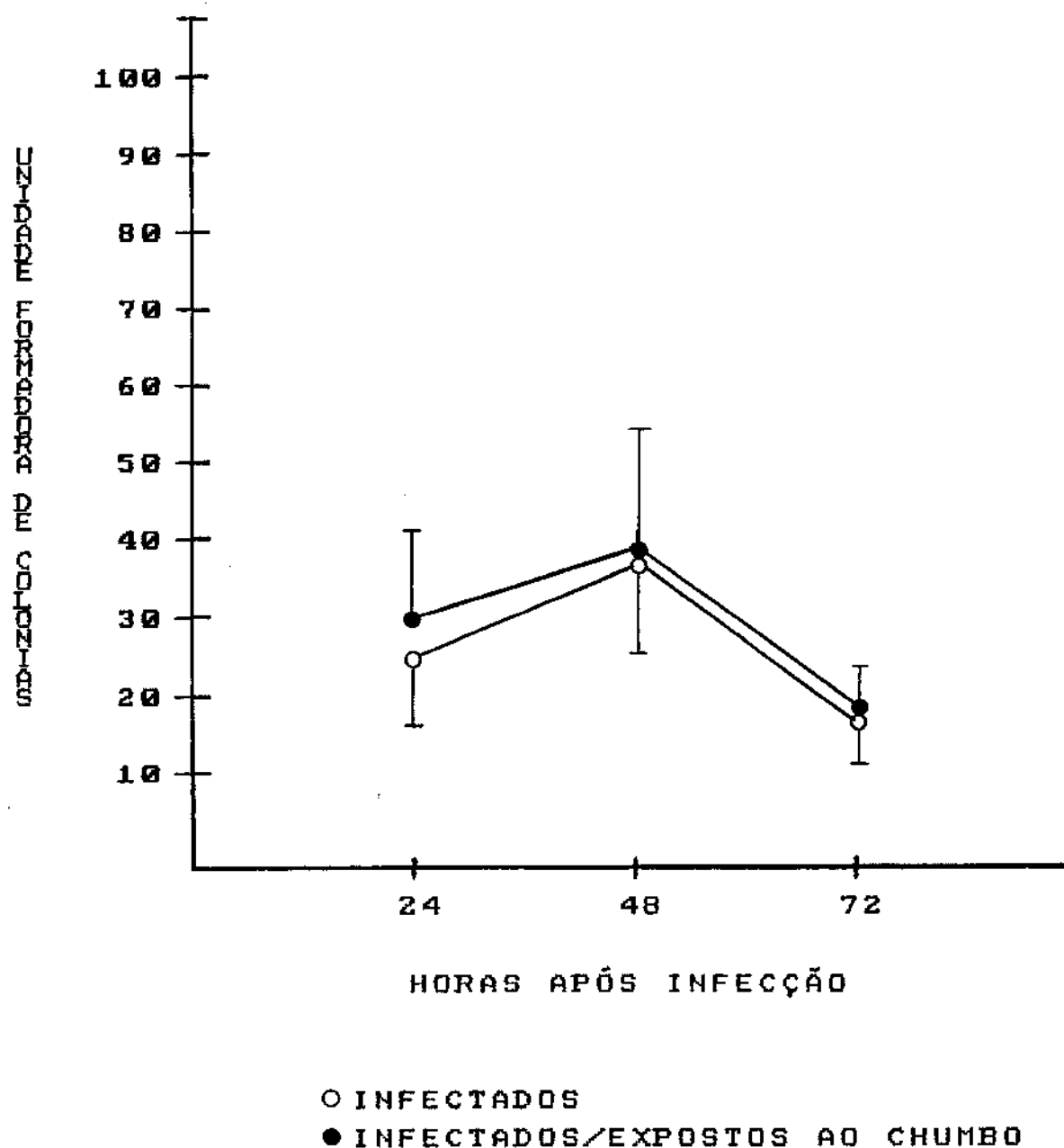


FIG. 6 - NÚMERO DE COLÔNIAS OBTIDAS COM ESTIMULAÇÃO INDUZIDA ATRAVÉS DO SORO DE ANIMAIS BALB/CJ EXPOSTOS A 1300PPM DE ACETATO DE CHUMBO POR 30 DIAS, INFECTADOS COM (10^5) Listeria monocytogenes.

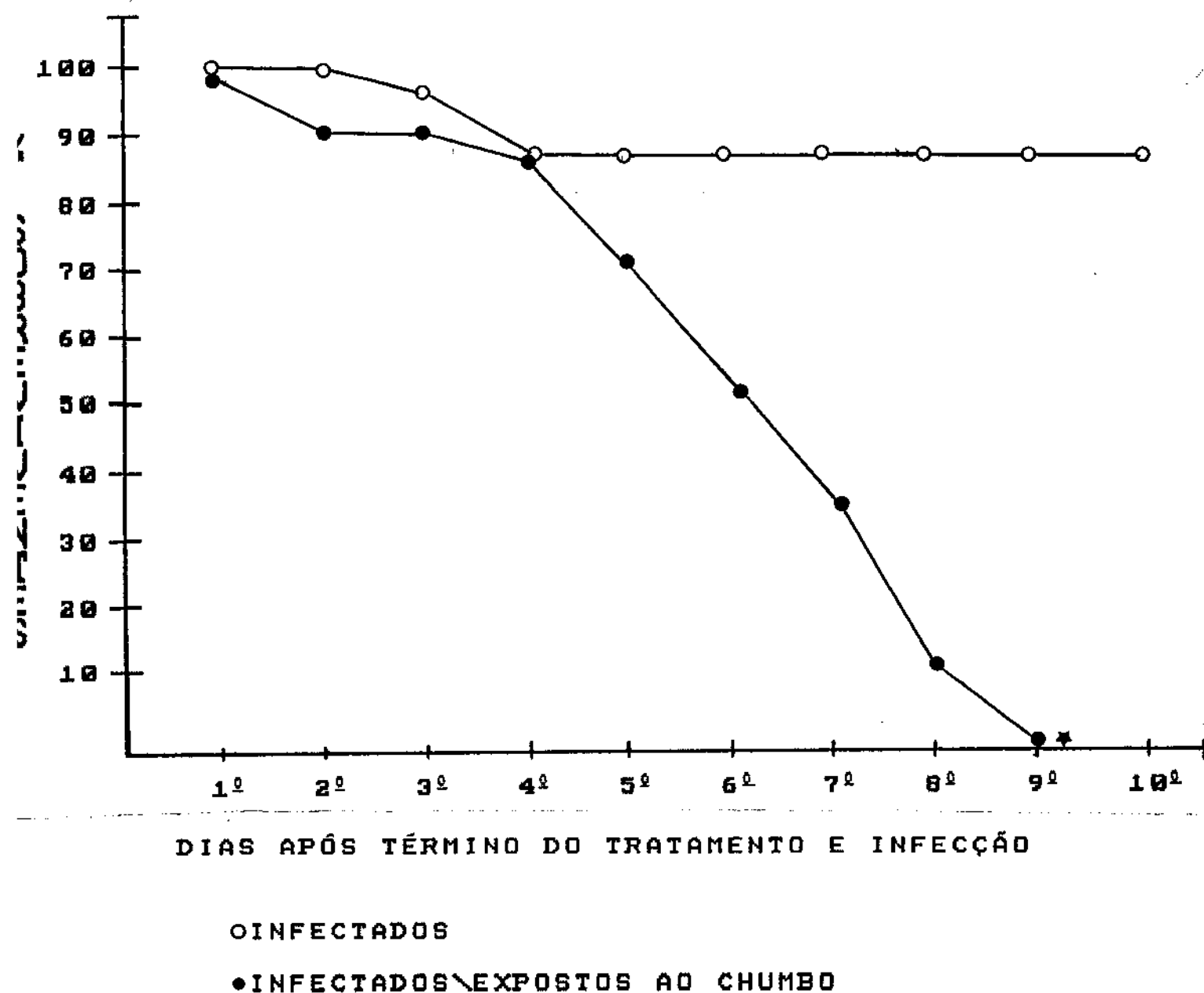


FIG. 7 - SOBREVIVÊNCIA DE ANIMAIS BALB\CJ EXPOSTOS A 1300PPM DE ACETATO DE CHUMBO POR 30 DIAS INFECTADOS COM Listeria monocytogenes.

(n=20) (*p < 0.05 - TESTE DE FISHER).

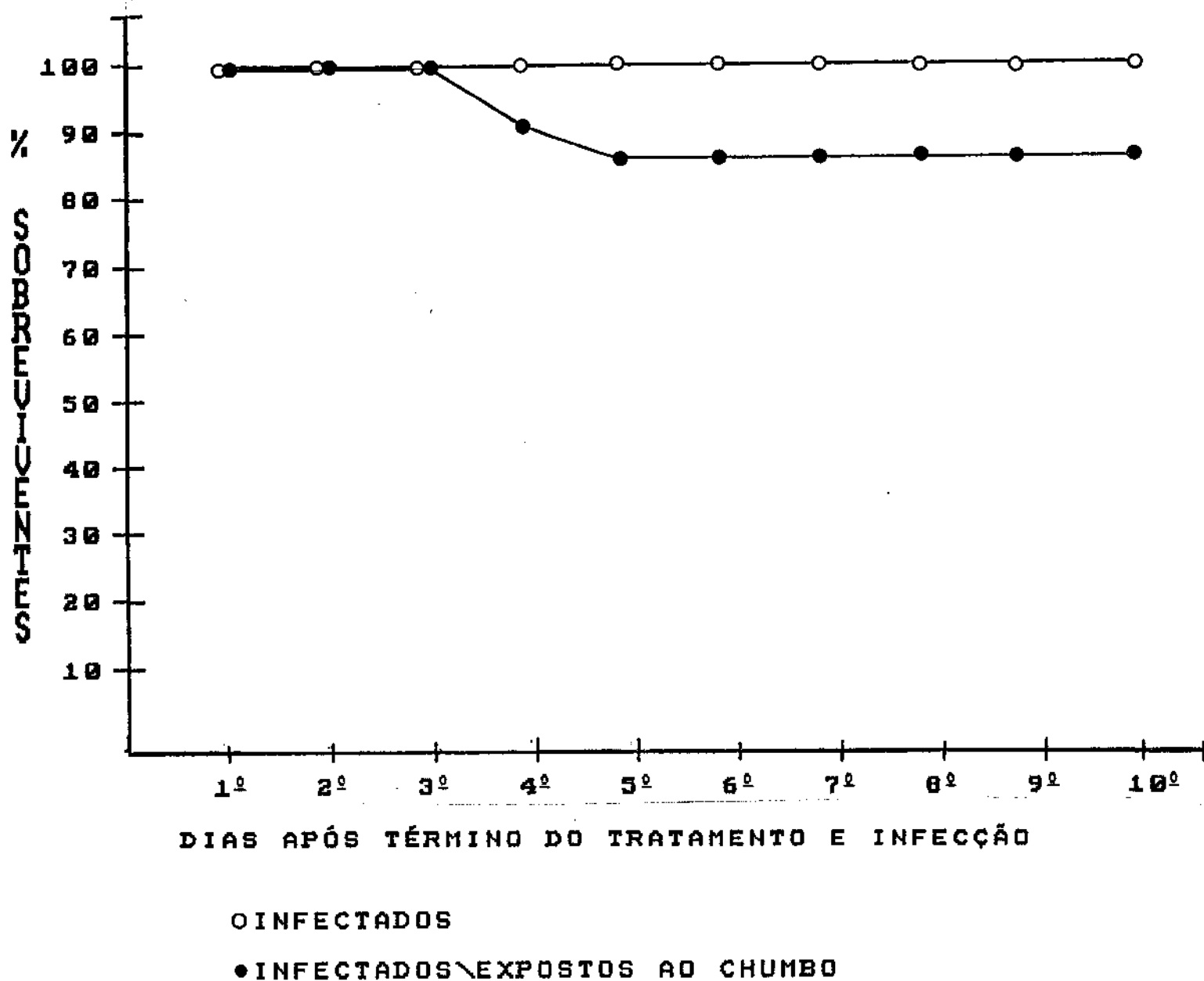
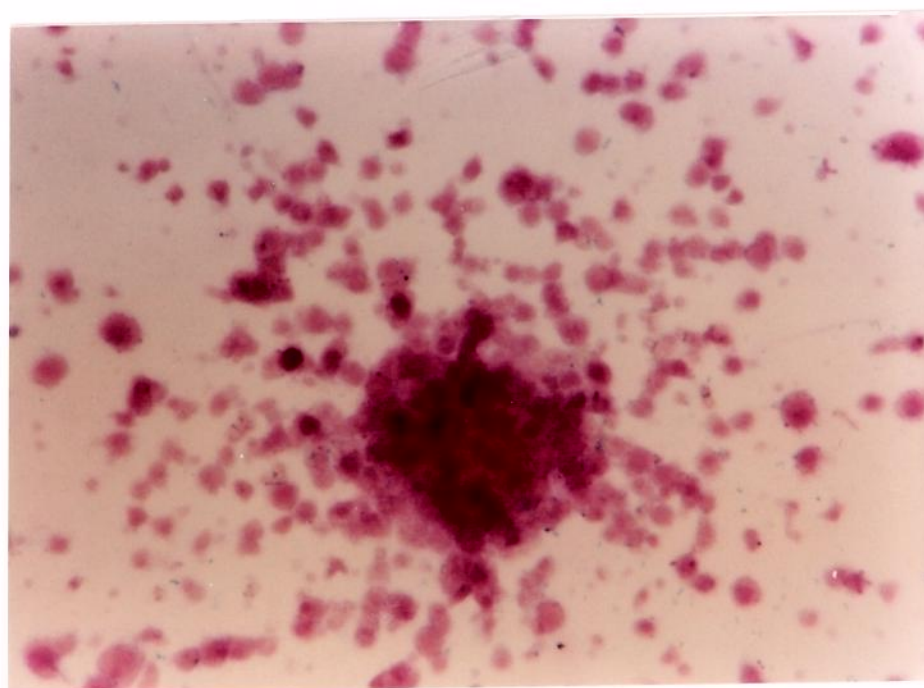
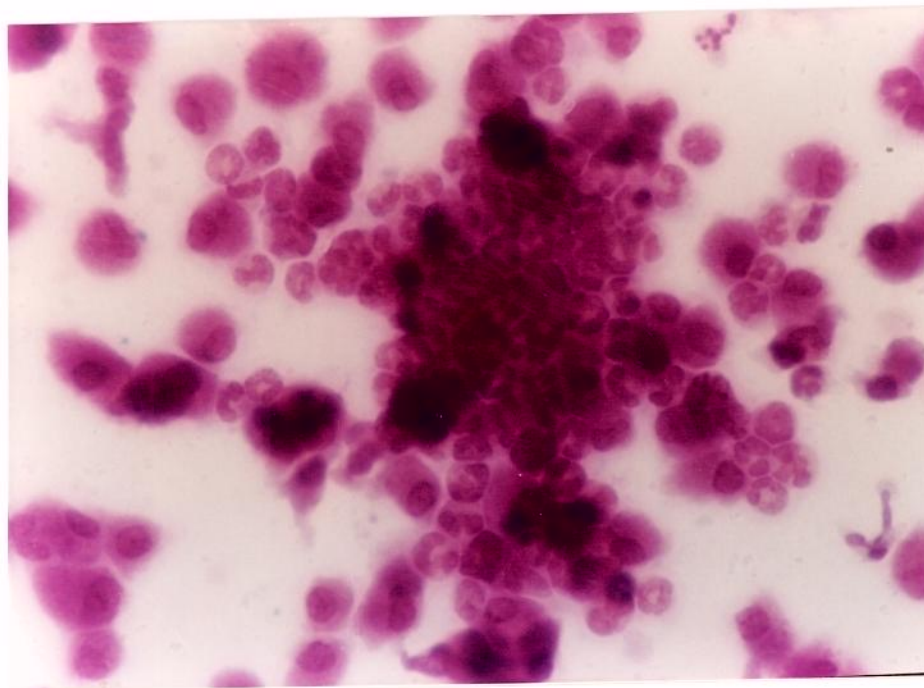
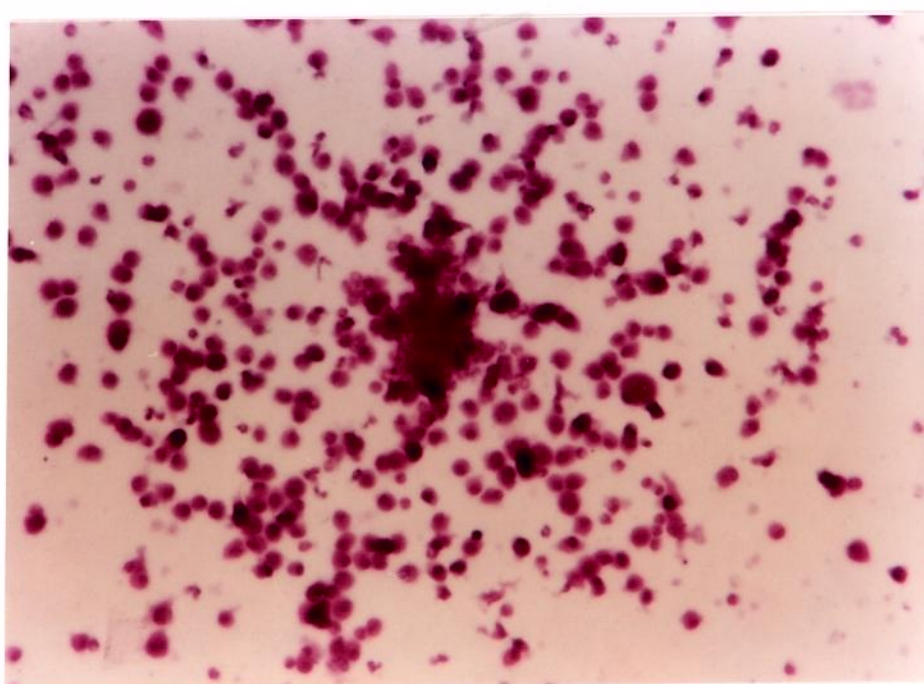
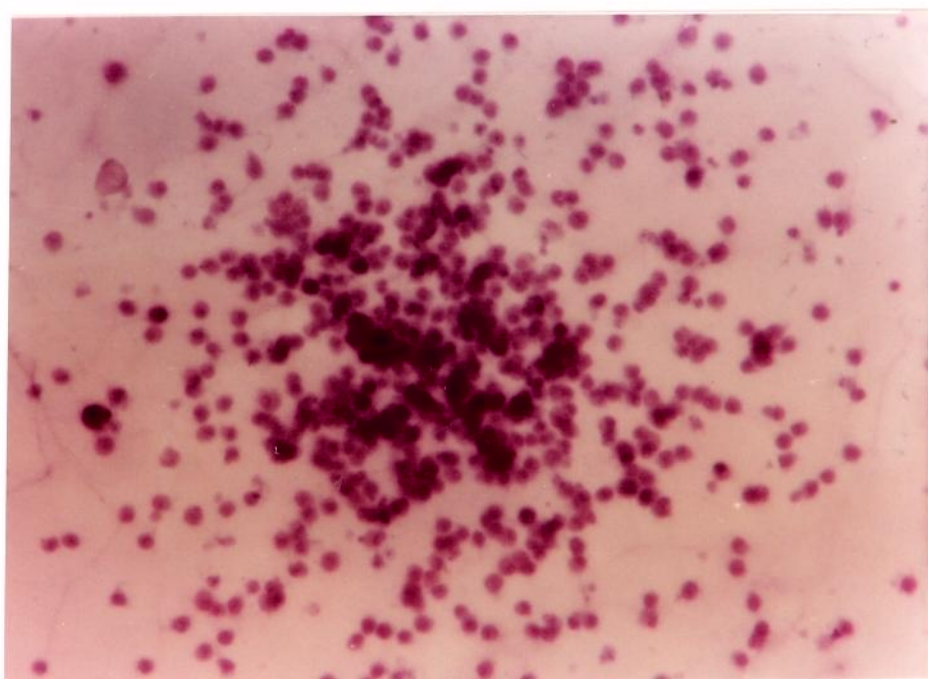


FIG. 8 - SOBREVIVÊNCIA DE ANIMAIS C57BL/10 EXPOSTOS A 1300PPM DE ACETATO DE CHUMBO POR 30 DIAS INFECTADOS COM Listeria monocytogenes. (n=20).



Fotografias 1 e 2 - Aspecto microscópico de uma cultura de CFU-C , na presença do meio condicionado de células esplênicas (SCM), a partir de $4,5 \times 10^4$ cél/ml. 1- aumento 400x. 2- Aumento 200x.



Fotografias 3 e 4 mostram o aspecto microscópico de uma cultura de CFU-C, obtida através de estimulação induzida com soro de animais infectados. Aumento 200x.

DISCUSSÃO

O sistema hematopoiético é constituído basicamente de três populações de células: as células pluripotenciais, as progenitoras, comprometidas com uma determinada linhagem e as células em maturação. As duas últimas podem ser consideradas como populações em trânsito em constante multiplicação e diferenciação. Sendo assim, esse compartimento é extremamente sensível a agentes tóxicos. Exposição a a agentes tóxicos pode resultar em uma alteração no número e função dessas células. Alterações mielotóxicas podem se manifestar através da destruição de elementos sanguíneos, inibição da função de células maduras, destruição de precursores celulares ou ainda, redução do crescimento celular.

O aparecimento de hemopatias após o contato reiterado ou esporádico de indivíduos a certos elementos tóxicos já é um fato conhecido. Entre os elementos tóxicos estudados atualmente, o chumbo destaca-se como objeto de inúmeras investigações na área de toxicologia, pois aparece constantemente como responsável por discrasias sanguíneas e imunológicas nos seres vivos.

Como já citamos anteriormente, dados na literatura relatam que as concentrações de chumbo nos ossos e medula óssea são superiores aos encontrados em outros compartimentos do organismo (WESTERMAN et al, 1965). Esse fato sugere um maior envolvimento deste metal no crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos.

Envolvimento das células maduras da série monocítica e granulocítica são fundamentais na resposta inicial a infecções bacterianas. Foi demonstrado que animais expostos ao chumbo e infectados com concentrações sub-letais de *Listeria monocytogenes* demonstram um aumento significativo na mortalidade (LAWRENCE, 1981b).

Em nossos estudos, camundongos Balb/cj quando infectados e expostos ao chumbo, apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0.05$ Teste Fisher - correção Yates) na resistência à infecção em relação a animais apenas infectados. O mesmo pode ser observado na linhagem C57Bl10, a qual, mesmo sendo resistente à infecção por *Listeria monocytogenes* apresentaram uma queda na resistência, sendo que 15% ($n=20$) dos animais do grupo exposto ao chumbo foram mortos em 3 dias após infecção, enquanto que, no grupo apenas infectados todos sobreviveram.

Esses dados de aumento na mortalidade sugerem uma supressão pelo chumbo no recrutamento inicial de macrófagos, o qual normalmente deveria impedir a patogenicidade da *Listeria monocytogenes* (KOWOLEMKO et al, 1991). Trabalhos recentes apontam para uma inibição significativa da linhagem monocítica após infecção em animais expostos tanto a doses elevadas de acetato de chumbo (10mM), assim como doses menores (0.4mM) (KOWOLENKO et al, 1991). O efeito mais acentuado sobre a mortalidade, observada por outros autores, após o uso de doses elevadas, sugere uma ação do chumbo não apenas sobre a linhagem monocítica, mas também sobre células acessórias (PMNS), assim como frações do complemento (C5), as quais são conhecidas como moduladoras da infecção pela *Listeria monocytogenes* (LAWRENCE AND SCHELL, 1978).

Paralelamente, trabalhos *in vitro* apontam para uma inibição na resposta de progenitores da linhagem monocítica ao fator estimulador de crescimento de macrófagos (CFC-1) após exposição destas células ao chumbo (0.1 μ M) (KOWOLENKO et al, 1989), sugerindo mais uma vez, que esse aumento na mortalidade em animais expostos ocorra provavelmente através de uma ação do metal sobre a linhagem monocítica.

A medula óssea serve como sítio primário da geração de precursores hematopoiéticos (CFCs). O crescimento e diferenciação dessas células formadoras de colônias é acelerado em resposta a *Listeria monocytogenes*, ocorrendo também um aumento nos níveis de fatores estimuladores de crescimento celular no soro desses animais (CHEERS et al, 1988; WING et al, 1984).

Em nosso trabalho, ao estudarmos o efeito da exposição ao chumbo no crescimento e diferenciação de células formadoras de colônias, observamos um comprometimento dose-dependente no número desses precursores hematopoiéticos em ambas linhagens de camundongos estudadas. Porém, não observamos alterações morfológicas decorrentes da exposição ao chumbo.

Para a linhagem Balb/cj, observada por um período de 24, 48 e 72 horas após infecção, verificamos uma diminuição no número de colônias obtidas nos grupos de camundongos expostos ao chumbo, infectados ou não, em relação ao controle, não sendo verificada nenhuma alteração decorrente da infecção. Em animais C57Bl10, tanto o chumbo quanto a infecção desencadearam respostas mielossupressoras. O efeito mielossupressor observado nas primeiras 24 horas após infecção na linhagem resistente está bem documentado na literatura, estando relacionado com uma migração das células da medula óssea para os tecidos, com objetivo de erradicar rapidamente a infecção (YOUNG AND CHEERS, 1988). No entanto, 72 horas após infecção, observamos um restabelecimento no número de células formadoras de colônias em animais apenas infectados, sendo que o mesmo não ocorreu em animais expostos ao metal na presença da infecção, evidenciando assim, os efeitos supressores do acetato de chumbo também nesta linhagem.

Ao estudarmos a presença de fatores estimuladores de crescimento no soro de animais infectados, expostos ao chumbo ou não, verificamos que os

resultados obtidos foram similares, não ocorrendo nenhuma alteração decorrente da exposição ao chumbo.

Diante desses resultados podemos sugerir que a supressão observada em animais expostos ao chumbo não é devido a qualquer ação sobre os fatores estimuladores de crescimento, e sim, através de uma ação direta sobre células pluripotenciais da medula óssea em estágio de crescimento e diferenciação. Provavelmente este efeito pode ser atribuído ao acúmulo do chumbo na medula óssea, como sugerido inicialmente por WESTERMAN et al., 1965.

Esses resultados podem ser explicados, pelo menos em parte, devido a uma ação do chumbo sobre os radicais sulfidrilas. Esses radicais são importantes nos processos fisiológicos celulares. Um grande número de processos dependentes de grupamentos sulfidrilas são envolvidos para manter as funções de membrana celular, tais como: secreção, fagocitose, transporte, comunicação inter-celular e sinais de transdução a superfície. Células hematopoiéticas são dependentes de interações celulares para manter seu crescimento e diferenciação em equilíbrio. Essas interações celulares ocorrem através de ligações com receptores localizados na membrana celular. Esses receptores são ricos em grupamentos sulfidrilas, que auxiliam a interação ligante\receptor, sendo desta forma, extremamente sensitivos a substâncias tóxicas com afinidade por estes radicais. (PEFEIFER, R.W. & IRONS, R.D., 1985).

Além da capacidade do chumbo de interagir diretamente com grupamentos sulfidrilas contidos em receptores localizados na membrana celular através de ligações covalentes com enxofre, sendo esta propriedade responsável pela maioria dos efeitos biológicos causados pelo metal, alguns estudos relatam que o chumbo pode agir indiretamente na membrana celular através da modulação de produtos oxidativos, comprometendo o estado de "redox" celular, o qual

pode alterar a peroxidação lipídica, modulando a síntese de produtos imunomoduladores como os leucotrienos (PARKER, C.W., 1987), ou prostaglandinas (CUNNANE, S.C., 1982). De particular interesse estão leucotrienos sulfidopeptídios C4, D4 e E4; os quais, requerem glutatona para sua síntese. Essas substâncias possuem uma grande variedade de efeitos sobre o sistema imune, entre eles, estão envolvidas no aumento da formação de colônias mielóides (PARKER, C.W., 1987). Visto que a glutatona apresenta grupamentos sulfidrila em sua configuração, esta, pode ser influenciada pelos metais pesados alterando a síntese dos leucotrienos. Isto sugere que uma ação indireta do chumbo em substâncias presentes na membrana celular, também pode comprometer a formação de colônias de precursores hematopoiéticos.

Outros trabalhos também apontam para uma supressão causada pelo chumbo na atividade funcional de células pluripotenciais da medula óssea (SCHLICK, E.; FRIEDBERG, K.D., 1981), sugerindo que esta supressão seja atribuída a desordens na região sub-celular, inibindo DNA, RNA celular e biossíntese de proteínas (HABAZIN-NOVAK and SKREB, 1978). Uma vez que todos os sinais de transdução se iniciam na superfície celular, e esta, como já citamos anteriormente, pode ser responsável pelos efeitos biológicos do metal, tanto diretamente através de ligação com radicais sulfidrilas, ou indiretamente através da modulação de produtos oxidativos, estes efeitos também podem estar relacionados com a supressão observada neste trabalho.

CONCLUSÃO

O presente estudo sobre os efeitos da exposição ao chumbo no crescimento e diferenciação de células formadoras de colônias (CFCs) da medula óssea e na atividade sérica dos fatores estimuladores de colônias (CSFs) do soro após infecção permite concluir:

1 - O número de células formadoras de colônias (CFCs) apresentou uma redução dose-dependente nas duas linhagens de camundongos estudadas decorrente da exposição ao acetato de chumbo. Na linhagem susceptível à infecção pela *Listeria monocytogenes* (Balb\c), o efeito supressor do chumbo foi evidente em todos os grupos estudados, infectados ou não, durante o período de observação: 24, 48 e 72 horas após infecção. Em camundongos C57BL10, resistentes a este microorganismo, o efeito supressor observado em animais infectados foi superado após 48 horas, permanecendo apenas a supressão nos grupos expostos ao chumbo.

2 - A atividade dos CSFs não apresentaram nenhuma alteração decorrente da exposição ao acetato de chumbo, pois os resultados obtidos foram similares entre os grupos de animais infectados\expostos ao chumbo e apenas infectados, quando comparados entre si.

3 - A diminuição observada na resistência dos animais à infecção, quando expostos ao chumbo, pode estar relacionada com efeitos do metal diretamente sobre os precursores hematopoiéticos. Esse efeito do chumbo sobre esses precursores, pode estar relacionado com uma maior deposição do chumbo na medula óssea, como sugerido por WESTERMAN et al., 1965.

RESUMO

Neste trabalho, investigamos os efeitos da exposição ao chumbo sobre o crescimento e diferenciação de células hematopoiéticas, as chamadas células formadoras de colônias (CFCs) da medula óssea de animais infectados e tratados com chumbo. Estudamos também os efeitos da exposição ao metal sobre a atividade dos fatores de crescimento de colônias (CSFs) no soro, assim como a sobrevivência destes animais após infecção.

Para a realização dos experimentos através da técnica de cultura clonal, em meio semi-sólido, os animais foram infectados com a bactéria *Listeria monocytogenes* após final do tratamento com acetato de chumbo. Após infecção com esta bactéria ocorre um aumento no número de células formadoras de colônias (CFCs) no baço, assim como nos níveis séricos de fatores estimuladores de colônias (CSFs). Utilizamos duas linhagens de camundongos: Balb/cj, susceptível a *Listeria monocytogenes*, e C57Bl10 resistente a esta infecção.

As doses de acetato de chumbo utilizadas foram: 1300, 130 e 13 ppm por períodos de 70, 30 e 10 dias. Ao final do tratamento os animais foram inoculados com doses de 3×10^2 - Balb/cj e 3×10^6 - C57Bl10 e sacrificados 24, 48 e 72 horas após inoculação. A sobrevivência destes animais foi determinada após observação destes camundongos por um período de 10 dias.

Nossos resultados demonstraram que o efeito supressor do chumbo foi evidente em ambas linhagens. Na linhagem susceptível à infecção os efeitos da exposição ao chumbo ficou evidente em todos os grupos expostos, infectados ou não, nos três intervalos de tempo estudados após infecção. Nos animais resistentes a esta infecção o efeito supressor do acetato de chumbo também ficou evidente. Nesta linhagem, nas primeiras 24 horas após infecção tanto o

chumbo como a infecção apresentaram efeitos supressores. Entretanto após 48 horas o efeito supressor da infecção foi superado, permanecendo apenas o efeito supressor induzido pelo chumbo.

Não observamos alterações na atividade dos fatores estimuladores de colônias no soro dos animais em decorrência da administração do chumbo, sugerindo que este metal atue através de ação direta sobre os precursores hematopoiéticos.

Observamos também um aumento na mortalidade em animais infectados com doses sub-letais de *Listeria monocytogenes* em ambas linhagens estudadas, quando expostas ao metal.

SUMMARY

In this work we have investigated the effects of lead exposure on the growth and differentiation of hematopoietic cells from bone marrow, the so called colony forming cells (CFCs), in normal and infected mice. We also studied the effects of this exposure the serum activity of hemopoietic colony stimulating factors (CSFs), as well as, the survival of these mice after the infection.

For this purpose, we used the technique for the clonal culture of hemopoietic cells in semi-solid medium. Mice were infected with the bacteria *Listeria monocytogenes* after treatment with lead acetate. Two strains of mice were used: Balb\cj (susceptible to *Listeria monocytogenes*) and C57Bl10 (resistent to this bacteria).

The doses of lead acetate were: 1300, 130 and 13ppm in periods of 70, 30 and 10 days. At end of this treatment, mice were infected and killed 24, 48 and 72 hours after the inoculation of the bacteria. The survival of these mice was determineted after a period of ten days.

The suppressives effects of lead were observed in both strains in the three different periods studied. The dose-response relationship was observed with the 3 doses of lead used in relation to the effects of the infection, however, we observed that in the resistant strain the suppressives effects were overcome 48 hours after the administration of the bacteria. In the susceptible strain the suppressives effects of the infection were evident in the 3 periods studied.

No changes were observed in the serum activity of CSFs due to the administration of lead, thus suggesting that this metal acts by a direct action on the myelopoietic cells.

A significant decrease in host resistance, as measured by the mortality rate, was found when both strain of mice, after treatment with 1300ppm of lead

for 30 days, were challenged with sub-lethal doses of *Listeria monocytogenes*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALESSIO, L.: Relationship between "chelatable" and the indicators of exposure and effect in current and past occupational exposure. *Sci. Total Environ.* 71(3): 293-299, 1988.
- BLAKLEY, B.R.; ARCHER, D. L.: The effect of lead acetate on the immune response in mice. *Toxicology Applied Pharmacology*. 61, 18-26, 1981.
- CHEERS, C.; HAIGH, A.; KELSO, A.; METCALF, D.; STANLEY, E.R.; AND YONG, A.M.: Production of colony stimulating factors (CSFs) during infection: Separate determinations of macrophage; granulocyte; granulocyte-macrophage, and multi-CSFs. *Infect. Immunol.* 56, 24, 1988.
- CORNELIS, R.: Analytical procedures and clinical reference materials in monitoring human exposure to trace metals with special reference to Cr, Pb and Tl. *Sci. Total Environ.*, 71: 269-283, 1988.
- CZUPRINSKI, C.J.; HENSON, P.M. & CAMPBELL, P.A.: Killing of *Listeria monocytogenes* by inflammatory neutrophils and mononuclear phagocytes from immune and non-immune mice. *J. Leukocyte Biol.*, 35, 193-208, 1984.
- CUNNANE, S.C.: Differential regulation of essential fatty acid metabolism to the prostaglandins: Possible basis for the interaction of zinc and copper in biological systems. *Prog. Lipid. Res.*, 21:73-90, 1982.

- FAITH,R.E.; LUSTER,M.I. & KIMMEL,C.A.: Effect of chronic developmental lead exposure on cell-mediated immune functions. **Clin. Exp. Immunol.**,**35**, 413-420, 1979.
- GOODMAN, S. & GILMAN, A.: **As bases farmacológicas da terapêutica**. 5a.ed. Editora Guanabara Koogan, pp. 832-834 - Rio de Janeiro.
- HABAZIN-NOVAK, V.; SKREB, Y.: Additive effects of lead and X-irradiation on RNA-and protein synthesis in cultured human cells. **Studia Biophys** (Berlin),**72**, 109-110, 1978.
- HAHN, H. & KAUFMANN 1981. The role of cell - mediated immunity in bacterial infections. **Rev. Infect. Dis.**, **3**(6), 1221 - 1250.
- HAMMOND, P. B.; LERNER, S.L.; GARISIDE, P.S.; HANENSON, I.B.; RODA, S.B.; FOULKES, E.C.; JOHSON, D.R. & PESCE, A.J.: The relationship of biological indices of lead exposure to the health status of workers in a secondary lead smelter. **J. Occup. Med.**, **22**(7): 475-484, 1980.
- HEMPHILL,F.E.; KAEBERLE,M.L. & BUCK,W.B.: Lead suppression of mouse resistance to *Salmonella typhimurium*. **Science**, **172**, 1031-1032,1971.
- HUANG, J.; HE, F.; WU, Y. & ZHANG, S.: Observations on renal function in workers exposed to lead. **Sci. Total Environ.**, **71**(3): 535-538, 1988.
- JJAN,Z.; YING-HAN, X. & HONG-FU,C.: The effects of lead on immune function of rabbit alveolar macrophages: quantification of immune phagocytosis and

rosette formation by ^{51}Cr *in vitro*. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, **78**, 484-487, 1985.

KOLLER, L.D. & BRAUNER, J.A.: Decreased B-lymphocyte response after exposure to lead and cadmium. **Toxicol Appl. Pharmacol.**, **42**, 621-624, 1977.

KOLLER, L.D.: Immunosuppression produced by lead, cadmium and mercury. **Am. J. Vet. Res.**, **36**, 1501, 1973.

KOLLER, L.D. & KOVACIC, S.: Decreased antibody formation in mice exposed to lead. **Nature**, **250**, 148, 1974.

KOLLER, L.D. & ROAN, J.G.: Effects of lead and cadmium on mouse peritoneal macrophages. **J. Reticuloendothel. Soc.**, **21**, 7-12, 1977.

KOWOLENKO, M.; TRACY, L.; MUDZINSKI, S. & LAWRENCE, D.A.: Effect of lead on macrophage function. **J. Leukocyte Biol.**, **43**, 357-364, 1988.

KOWOLENKO, M.; TRACY, L. & LAWRENCE, D.A.: Lead-induced alterations of *in vitro* bone marrow cell responses to colony stimulating factor-1. **J. Leukocyte Biol.**, **45**, 198-206, 1989.

KOWOLENKO, M.; TRACY, L.; LAWRENCE, D.: Early effects of lead on bone marrow cell responsiveness in mice challenged with *Listeria monocytogenes*. **Fundamental and Applied Toxicology**, **17**, 75-82, 1991.

- LARINI, L.: **Toxicologia** . 250p. Ed. Manole Ltda. - São Paulo/SP 1987.
- LAWRENCE,D.A.: Heavy metal modulation of lymphocyte activities. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, **57**, 439-451, 1981a.
- LAWRENCE,D.A.: *in vivo* and *in vitro* effects of lead on humoral and cell-mediated immunity. **Infect. Immun.**, **31**, 136-143, 1981b.
- LAWRENCE, D.A., AND SCHELL, R.F.: Susceptibility of C-5 deficient mice to Listeriosis: Modulation by Con A. **Cell Immunol.** **30**, 336-344, 1978.
- MAUEL, J.; RANSIJN, A. & BUCHMULLER-ROUILLER, Y.: Lead inhibits intracellular killing of Leishmania parasites and extracellular cytolysis of target cells by macrophages exposed to macrophage activating factor. **J. Leukocyte Biol.** (45), 401-409. 1989.
- METCALF,D.: **The hemopoietic colony stimulating factors**. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984.
- MULLER,S.; GILLERT,K.E.; KRAUSE,C.; GROSS,U.; LAGE-STEHR,J. & DIAMANTSTEIN,T.: Suppression of delayed type hypersensitivity of mice by lead. **Experientia**, **33**, 667-668, 1977.
- NEWBORG,M.R. & NORTH,J.R.: On the mechanism of T cell - independent anti - Listeria resistance in nude mice. **J. Immunol.**, **124**, 571-6, 1980.

PARKER, C.W.: Lipid mediators produced through lipxygenase pathway. **Ann. Rev. Immunol.**, 5:65-84, 1987.

PFEIFER, R.W.; IRONS, R.D.: Mechanism of sulfhydryl-dependent Immunotoxicity. **Immunotoxicology and Immunopharmacology**. Raven Press, New York, 1985.

PUTMAN, R.D.: Review of toxicology of inorganic lead. **Am. Ind. Hyg. Assoc.** 47(11) - 000-703, 1986.

QUEIROZ, M.L.S.: Células pluripotenciais hematopoiéticas em cultura - revisão bibliográfica. **Ciência e Cultura**, 40(5), 421-426, 1988.

SELANDER, S. & CRAMER, K: Interrelationships between lead in blood, lead in urine and ALA in urine during work. **Br. J. Ind. Med.** 27, 28-30, 1970.

SCHLICK, E.; FRIEDBERG, K.D.: Bone marrow cells of mice under the influence of low lead doses. **Arch. Toxicology**. 49, 227-236, 1981.

SPIVEY, G.H.; BROWN, C.P.; BALOH, R.W.; CAMPION, D.S.; VALENTINE, J.; MASSEY, F.J.; BROWDY, B.L. & CULVER, B.D.: Subclinical effects of chronic increased lead absorption prospective study. **J. Occup. Med.** 21(6): 423-429, 1979.

STAESSEN, J.; YEOMAN, W.B.; FLETCHER, A.E.; MARKOWE, H.L.; E, H.L.; MARMOT, M.G.; ROSE, G.; SEMMENCE, A; SHIPLEY, M.J. & BULPITT, C.J.:

Blood lead concentration, renal function and blood pressure in London civil servants. *Br. J. Ind. Med.* (47): 442-447, 1990.

TOLA, S.; HERNBERG, S.; ASP, S. & NIKKANEN, J.: Parameters indicative of absorption and biological effect in new lead exposure: a prospective study. *Br. J. Industr. Med.* (30) - 134-141, 1973.

TOMOKUNI, K. & OGATA, M.: Relationship between lead concentration in blood and biological response for porphyrin metabolism in workers occupationally exposed to lead. *Arch. Toxicol.* (35): 239-246, 1976.

WARNER, G.L. & LAWRENCE, D.A.: Stimulation of murine lymphocyte responses by cations. *Cell. Immunol.*, 101, 425-439, 1986a.

WARNER, G.L. & LAWRENCE, D.A.: Cell surface and cell cycle analysis of metal-induced murine T cell proliferation. *Eur. J. Immunol.*, 16, 1337-1342, 1986b.

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

WILSON, G.S. & MILES, A.S.: Technique of counting bacteria. In: **Principles of Bacteriology and Immunity**, 5th edition, Edward Arnold (Publishers) Ltda. pp. 100-166, 1966.

WING, E.J.; WAHEED, A., & SHADDUCK. Changes in serum colony-stimulating factor and monocytic progenitor cells during *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Infect. Immun.* (45), 180-184, 1984.

WOOD,P.R.; SPANIDIS,V.; FRANGOS,K. & CHEERS,C.: The *in vitro* bactericidal activity of peritoneal and spleen cells from Listeria - resistant or susceptible mice. *Cell. Immunol.*, **99**, 160-9, 1986.

YOUNG, A.M. & CHEERS, C.: Colony-forming cells and colony-stimulating activity during listeriosis in genetically resistant or susceptible mice. *Cell. Immunol.* **97**, 227-237, 1986.