



IMUNOTOXICIDADE EM LEUCÓCITOS DE INDIVÍDUOS OCUPACIONALMENTE EXPOSTOS A SOLVENTES E METAIS PESADOS

Suelen da Rocha Abdallah¹, Ana Paula Frielink², Gabriela Bonfanti Azzolin³ Josiane
Woutheres Bortolotto³, Mariana Migliorini Parisi³

Palavras-chave: Indústria metalomecânica. Leucócitos. Estresse oxidativo. Mitocôndria. Morte Celular.

1 INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento industrial e a necessidade de produção de bens de consumo, a indústria metalomecânica ganhou grande espaço na sociedade (SANTIAGO, 2012). Os processos de transformação dos metais na indústria metalomecânica ocupam ou geram compostos químicos, tais como solventes e metais pesados, que podem ter impactos negativos na saúde humana (MOREIRA, 2015).

Os solventes BTX (benzeno, tolueno e xileno) e os metais pesados gerados na indústrias metalomecânicas são fontes exógenas de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (SOARES, 2015; KUMAR *et al.*, 2017), as quais podem levar ao dano oxidativo em macromoléculas, como proteínas, DNA e lipídios. A oxidação destas biomoléculas pode ocasionar a perda de sua função, resultando em desequilíbrio da homeostase e comprometimentos das células e tecidos (BARBOSA, 2010), levando, em última instância, ao aumento da morte celular. Além disso, aumento da atividade mitocondrial ou disfunção da mitocôndria podem ser fonte de aumento de produção das ERO (NUÑEZ, 2017).

Desta forma, considerando que a disfunção mitocondrial e o aumento de ERO podem ser induzidos por substâncias tóxicas exógenas e podem levar a citotoxicidade através da morte celular, o objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros de dinâmica mitocondrial, produção de ERO e presença da morte celular por apoptose e necrose em leucócitos de indivíduos trabalhadores de indústria metalomecânica expostos aos solventes BTX e metais pesados.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo observacional caso-controle no qual foram incluídos 60 indivíduos divididos em um grupo de casos e um grupo de controles. O grupo de casos (n=40) foi composto de indivíduos trabalhadores de indústrias metalomecânicas com exposição crônica a solventes e metais

¹ Bolsita PROBIC/FAPERGS/Unicruz. Discente do curso de Biomedicina, da Universidade de Cruz Alta - Unicruz, Cruz Alta, Brasil. E-mail: susi.abdallah@gmail.com

² Biomédica

³ Docentes do Centro de Ciências da Saúde e Agrárias da Universidade de Cruz Alta - Unicruz, Cruz Alta, Brasil. E-mail: gbonfanti@unicruz.edu.br; bortolotto@unicruz.edu.br; mparisi@unicruz.edu.br



pesados. O grupo de controles (n=20) foi constituído por indivíduos sem contato crônico ocupacional aos compostos BTX e a metais pesados e sem doenças crônicas.

Todos os indivíduos participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), em duas vias de igual teor. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Cruz Alta sob o parecer 2.442.325. Todo protocolo de pesquisa foi realizado de acordo com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde e com a Declaração de Helsinki. Os resultados deste trabalho fazem parte de um projeto guarda-chuva maior intitulado “Avaliação de alterações hematológicas, toxicidade celular e qualidade de vida em indivíduos ocupacionalmente expostos a solventes e metais pesados”.

Os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa responderam a um questionário com perguntas sociodemográficas e ocupacionais. Além disso, de cada participante foram coletados 10 mL de sangue venoso periférico em tubo contendo anticoagulante EDTA. Do sangue total foram isolados os leucócitos, os quais foram utilizados para realização do ensaio de morte celular por Anexina V e Iodeto de Propídeo, que permite a detecção simultânea da ocorrência de necrose e apoptose, em estágio inicial ou tardio de execução. Os leucócitos também foram utilizados para realizar os ensaios de dinâmica mitocondrial, com as sondas *Mitotracker Green* e *Mitotracker Red*, de acordo com as instruções do fabricante, e de produção de EROs, pela técnica de oxidação do DCFH-DA, de acordo com as instruções do fabricante. Todos ensaios foram quantificados em Citômetro de Fluxo *Accuri C6 Plus* (BD Biosciences, EUA).

Os dados foram expressos através de média e desvio padrão e comparados através de Teste T Student. Para estabelecer possíveis correlações entre variáveis foi utilizado o Teste de Correlação de Pearson. As análises foram realizadas considerando-se um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) e foram executadas no software *GraphPad Prism 6®* (GraphPad Software Inc., version 6.01).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Em relação aos dados demográficos, não houve diferença significativa entre a idade (controles $33,35 \pm 11,46$ versus casos $30,53 \pm 10,63$, $p > 0,05$) e o índice de massa corporal (controles $25,05 \pm 2,4$ versus casos $26,45 \pm 3,8$, $p > 0,05$) dos participantes. O grupo de controles incluiu 8 (40 %) homens e o grupo de casos incluiu 20 homens (50%). No que diz respeito às características dos trabalhadores das indústrias metalomecânicas, contactou-se que o tempo médio de trabalho foi de $3,22 \pm 2,10$ anos e que prevaleceu os trabalhadores do setor de solda (n=10, 34,5 %). Foi relatado pelos indivíduos que o uso de EPIs recomendados era feito diariamente, os quais eram óculos de proteção, protetor auricular, luvas, botina de couro com ponteira de aço, protetor solar, pomada impermeabilizante para as mãos, e uniforme confeccionado com raspa de couro para os trabalhadores do setor de solda.



A avaliação da oxidação de DCFH-DA mostrou que leucócitos de indivíduos trabalhadores de indústria metalomecânica apresentam produção de EROs significativamente maior que leucócitos de indivíduos controles (controles 11.711 ± 4.155 versus casos 17.057 ± 8.452 , $p < 0.05$). Além disso, o ensaio de *Mitotracker Green* e *Mitotracker Red* mostrou que leucócitos de indivíduos trabalhadores de indústria metalomecânica apresentam maior massa mitocondrial (controles 37.943 ± 16.603 versus casos 53.393 ± 10.683 , $p < 0.05$) e maior potencial de membrana mitocondrial (controles 24.813 ± 9.884 versus casos 69.167 ± 15.849 , $p < 0.05$) em relação aos leucócitos de indivíduos controles, sugerindo uma maior atividade mitocondrial que pode aumentar a produção de ERO via mitocôndrias.

Além disso, foi possível constatar que leucócitos dos indivíduos trabalhadores da referida indústria apresentam índice aumentado de morte celular por apoptose (controles $8,5 \pm 5,9\%$ versus casos $14,2 \pm 7,6\%$; $p < 0,05$), com consequente diminuição da viabilidade celular. Ainda, houve uma correlação positiva significativa entre o tempo de trabalho dos indivíduos e a taxa de apoptose nos leucócitos ($r=0,52$, $p < 0,05$).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram detectadas alterações na dinâmica mitocondrial de leucócitos de indivíduos ocupacionalmente expostos a PHA e metais pesados. Estas alterações incluíram aumento da massa e do potencial de membrana mitocondrial. Foi constatado um aumento da produção de EROs sugerindo um ambiente pró-oxidante nas células destes indivíduos. Demonstramos o efeito citotóxico que a exposição ocupacional a agentes químicos da indústria metalomecânica pode ocasionar em leucócitos, mesmo quando os indivíduos utilizam EPIs. Assim, as alterações encontradas neste estudo podem ser um preditor de uma maior susceptibilidade dos trabalhadores de indústrias metalomecânicas ao desenvolvimento de comorbidades. Os dados obtidos neste trabalho serão retornados a empresa participante do trabalho e aos indivíduos participantes afim de conscientizá-los da importância da utilização de EPIs e do monitoramento ocupacional de marcadores de saúde.

REFERÊNCIAS

MOREIRA, Karen Bruski *et al.* Avaliação do perfil hepático e toxicológico em trabalhadores metalúrgicos de Caxias do Sul, RS, Brasil. **III Congresso de Pesquisa e Extensão da FSG.** p. 940-949. 2015.

NUÑEZ, Antonio *et al.* Estrés oxidativo en la asfíxia perinatal y la encefalopatía hipóxico-isquémica. **Anales de pediatria.** 2017.

PARK, Robert M. Risk assessment for metalworking fluids and cancer outcomes. National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). p. 198-203. 2018.



SANTIAGO, Emerson. **Indústria metal-mecânica**. 2012. <http://www.infoescola.com/economia/industria-metal-mecanica>. Acessado em: 13 ago. 2017.

SOARES, Elaine dos R. *et al.* Compostos bioativos em alimentos, estresse oxidativo e inflamação: uma visão molecular da nutrição. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**. p. 64-71. 2015.