Sarita Maria de Fátima Martins de Carvalho Bezerra

**Efeitos da radiação solar crônica e prolongada
sobre o sistema imunológico de pescadores do
Recife**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte

**São Paulo
2007**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Bezerra, Sarita Maria de Fátima Martins de Carvalho
Efeitos da radiação solar crônica e prolongada sobre o sistema
imunológico de pescadores do Recife / Sarita Maria de Fátima
Martins Carvalho Bezerra – São Paulo, 2007.

Tese (doutorado)—Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Dermatologia.
Área de concentração: Dermatologia
Orientador: Alberto José da Silva Duarte.

Descritores: 1. Raios ultravioleta/efeitos adversos 2. Pele/Imunologia
3. Marcadores biológicos 4. Dermatologia.

USP/FM/SBD-231/07

Dedico este trabalho

aos meus pais, Nelson e Teresa

aos meus filhos, Mirella e Márcio

AGRADECIMENTOS

Ao concluir esta tese, quero agradecer a todas as pessoas sem as quais, com certeza, esta pesquisa não teria se desenvolvido.

Ao Prof. Dr. Luís Carlos Cucé, um amigo especial, pela receptividade e apoio, quando o procurei com planos de realizar esta pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte, meu orientador, pela amizade, apoio, motivação, críticas e sugestões relevantes durante todas as etapas deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Mírian Nakagami Sotto, por sua contribuição e gentileza em todos os momentos.

A meu marido, Márcio Lobo Jardim, por transmitir valores éticos e morais a minha formação de médica dermatologista.

A Noemi Orie, pela amizade, dedicação, disponibilidade e competência nas etapas da realização da citometria de fluxo.

A Cleiton Alves, pela competência na etapa da realização da imunohistoquímica.

Aos Professores Doutores José Eduardo Costa Martins, Marluce Vilela e Cídia Vasconcelos, pelas excelentes sugestões por ocasião do exame de qualificação.

A todos os pesquisadores e funcionários do LIM 56, pela gentileza e atenção em todos os momentos.

A Cyro Alves de Brito, pela competente revisão da tese.

Às secretárias, Olivete Ribeiro Venâncio, Odair Anne Merli e Eli Maria de Freitas Ferreira, pela eficiência e carinho na parte burocrática do curso.

Ao Laboratório Marcelo Magalhães, na pessoa de sua diretora Dr^a. Vera Magalhães, pela disponibilidade em facilitar a realização dos exames laboratoriais.

À Patrícia Ramos, pela esmerada análise estatística.

À Dr^a. Laís Vieira, incansável em nos apoiar nas maiores dificuldades técnicas que tive durante a realização desta pesquisa.

À colônia de pescadores do Pina, na pessoa do Sr. Ediniz Nunes Filho, pela abertura, irrestrito apoio, receptividade que tive na realização deste trabalho.

A todos os pescadores, sem exceção, pela cooperação e disponibilidade em fazer parte deste trabalho.

A Deus, por estar sempre ao meu lado em todos os dias da minha vida.

“A morte do homem
começa no instante em
que ele desiste de
aprender.”

Albino Teixeira

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptadas do *Internacional Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Valhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE QUADROS	
LISTA DE FOTOS	
LISTA DE GRÁFICOS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
LISTA DE SIGLAS	
LISTA DE SÍMBOLOS	
RESUMO	
SUMMARY	

1	INTRODUÇÃO	22
2	OBJETIVOS	26
2.1	Geral	26
2.2	Específicos.....	26
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	28
3.1	O controle da imunidade da pele em circunstâncias fisiológicas ...	31
3.2	Resposta imunológica à radiação solar	39
4	INDIVÍDUOS E MÉTODOS.....	56
4.1	Desenho do estudo	56
4.2	Local de estudo.....	56
4.3	População estudada	58
4.4	Amostra.....	58
4.4.1	Tamanho amostral	58
4.4.2	Critérios de inclusão e de exclusão	59
4.4.3	Descrição amostral	60
4.4.4	Caracterização amostral	62
4.4.4.1	Aspectos clínicos gerais	66
4.4.4.2	Antecedentes de saúde	68
4.4.4.3	Resultados de exames laboratoriais.....	69
4.5	Métodos	73
4.5.1	Avaliação clínica dermatológica.....	73
4.5.2	Exame histopatológico em biópsia de pele	73
4.5.2.1	Biópsia de pele	73
4.5.2.2	Exame histopatológico de biópsia de pele.....	74
4.5.2.3	Demonstração de mastócitos em biópsias de pele.....	75
4.5.2.4	Análise imuno-histoquímica de biópsia de pele para quantificação de células de Langerhans, de subpopulações de linfócitos e de monócitos/macrófagos.....	75

4.5.2.5	Quantificação dos elementos celulares imunomarcados ou corados	80
4.5.3	Quantificação de subpopulações de linfócitos em amostra de sangue, por citometria de fluxo	81
4.5.4	Colheita dos dados	83
4.6	Aspectos éticos.....	85
4.7	Processamento e análise de dados	85
5	RESULTADOS.....	87
5.1	Achados ao exame dermatológico.....	87
5.2	Comparação entre pele coberta e pele exposta ao sol.....	95
5.2.1	Resultados do exame histopatológico de biópsias de pele da região coberta e da região exposta ao sol	95
5.2.2	Demonstração e quantificação de células imunocompetentes e mastócitos em pele coberta e exposta a radiação solar	101
5.3	Resultados de marcadores imunológicos em sangue.....	107
6	DISCUSSÃO.....	112
7	CONCLUSÕES.....	125
8	BIBLIOGRAFIA	129

APÊNDICES

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição etária, de tipo de pele, estado civil e escolaridade de pescadores e não pescadores – Recife - set 2005 a set 2006.....	63
Tabela 2 – Distribuição de tempo de profissão, tempo de exposição solar, uso de filtro solar, tabagismo e ingesta alcoólica de pescadores e não pescadores – Recife - set 2005 a set 2006	65
Tabela 3 – Distribuição pondo-estatural de pescadores e não pescadores – Recife - set 2005 a set 2006	67
Tabela 4 – Distribuição de pressão arterial de pescadores e não pescadores – Recife - set 2005 a set 2006	68
Tabela 5 – Distribuição de alterações hematológicas diagnosticadas em pescadores – Recife - set 2005 a set 2006	70
Tabela 6 – Distribuição de dosagens bioquímicas de pescadores e não pescadores – Recife - set 2005 a set 2006	71
Tabela 7 – Distribuição de alterações dermatológicas diagnosticadas em pescadores – Recife - set 2005 a set 2006	88
Tabela 8 – Distribuição dos achados histopatológicos em biópsia de pele coberta e de pele exposta ao sol de 19 pescadores – Recife - set 2005 a set 2006	96
Tabela 9 – Distribuição da contagem dos marcadores imunológicos em biópsia de pele coberta e de pele exposta ao sol de 19 pescadores – Recife - set 2005 a set 2006.....	102
Tabela 10 – Distribuição de subpopulações linfocitárias presentes em sangue periférico de pescadores e não pescadores – Recife - set 2005 a set 2006	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Resposta imunológica da pele à exposição aguda à radiação solar: vias passíveis de serem estimuladas	40
Figura 2 – Eventos promovidos pela radiação ultravioleta nas células de defesa da pele.....	53
Figura 3– Mapa de situação geográfica da cidade do Recife - INPE	57
Figura 4– Esquema amostral dos 19 pescadores segundo critérios de inclusão e de exclusão – Recife, Setembro 2005-Setembro 2006.....	84

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Tipos de linfócitos <i>helper</i> , com respectivas citocinas, funções imunológicas e tipo de sinal de ativação	35
Quadro 2 – Principais marcadores de diferenciação e maturação celular na pele e respectivas funções.....	51
Quadro 3 – Interpretação de resultados de quantificação de marcadores de diferenciação de células imunocompetentes.....	52
Quadro 4 – Anticorpos monoclonais utilizados	76
Quadro 5 – Especificação técnica dos reagentes empregados para quantificação de subpopulações de linfócitos em amostra de sangue total .	82

LISTA DE FOTOS

Foto 1 - Elastose solar em pescoço	89
Foto 2 – Bronzeamento e enrugamento da pele em face	89
Foto 3 – Elastose em dorso de mão e quirodáctilos.....	90
Foto 4 – Melanose solar em sulco nasogeniano	90
Foto 5 – Elastose, efélides e melanose solar em dorso	91
Foto 6 – Elastose, queratose seborréica e melanose solar em tórax.....	91
Foto 7 – Hiperkeratose palmar ocupacional.....	92
Foto 8 – Hiperkeratose plantar fissurada em calcâneo	92
Foto 9 – Queratite actínica e melanose solar em mento.....	93
Foto 10 – Deformidade em 1º quirodáctilo, secundária a acidente de trabalho por trauma.....	93
Foto 11 – Distrofia ungueal ocupacional	94
Foto 12 – Distrofia ungueal associada a ressecamento intenso em hálux... 94	
Foto 13 - Corte histológico de biópsia de pele	98
Foto 14 - Corte histológico de biópsia de pele	99
Foto 15 - Corte histológico de biópsia de pele	100
Foto 16 – Linfócitos T CD45RO+ em biópsia de pele	104
Foto 17 - Marcação imuno-histoquímica de CD68 em biópsia de pele	105
Foto 18 – Marcação histológica de mastócitos em biópsia de pele.....	106

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Dispersão em relação à mediana dos marcadores imunológicos em pele coberta e exposta 103

Gráfico 2 – Média de contagem de CD3CD8CD45RO em sangue 111

LISTA DE ABREVIATURAS

cód. - código

Dr. – Doutor

Dr^a. – Doutora

Prof. – Professor

Prof^a. - Professora

LISTA DE SIGLAS

ALT – Alanina aminotransferase

AMP - Adenosina monofosfato

AST – Aspartato aminotransferase

ATPase – Adenosina trifosfato-ase

AUDIT – *Alcohol Use Disorders Identification Test*

CD – *Cluster of differentiation*

CDC – *Center for Disease Control and Prevention*

CGRP – *Calcitonin gene-related protein* (proteína de liberação do fator de calcitonina)

CL – Células de Langerhans

CSA – *Catalysed signal amplification*

DNA – Ácido desoxirribonucléico

ECAM - Moléculas de adesão de células endoteliais

EDTA – Etileno-diamino-tetracetato de potássio

FC – Fração de complemento

FC ? II – Fração de complemento ? II

FL – Fluorescência

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

HLA-DR – antígeno leucocitário humano classe II

ICAM – Molécula de adesão intercelular

IFN - Interferon

IGG1 - Isotiocianato de fluoresceína /IgG1 ficoeritrina /IgG1 5-cianoficoeritrina

IL – Interleucina

IMC – Índice de massa corpórea

INPE - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais

LFA – Antígeno associado à função linfocitária

LIM-56 – Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica e Experimental

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

NK – *Natural killer*

PA – Produto químico com grau de pureza para análise

PAF – Fator de ativação plaquetária

PBS – Solução de tampão fosfato

pH – Potencial hidrogênio iônico

SALT – *Skin-associated lymphoid tissue*

TCR – Receptor de Célula T

TGF- β – *Transforming growth factor β*

TH – *T helper*

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TNF- β – Fator de necrose tumoral beta

TNF- γ – Fator de necrose tumoral gama

TR1 – Linfócitos T reguladores tipo 1

UV – Ultravioleta

UVA - Ultravioleta A

UVB – Ultravioleta B

UVC – Ultravioleta C

USA – *United States of America*

VCAM – molécula de adesão celular vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – graus Célsius

min - minutos

nm - nanômetro

µL – microlitro

mL - mililitro

µm – micrômetro

® - marca registrada

s – segundos

kg – quilograma

mm Hg – milímetros de mercúrio

g/dL – grama por decilitro

RESUMO

Introdução: Os efeitos da radiação ultravioleta sobre o sistema imunológico humano são altamente complexos e alteram alguns componentes da resposta imunológica. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos clínicos, histopatológicos e imunológicos da radiação solar em pescadores do sexo masculino com mais de dez anos de atividade ininterrupta. **Métodos:** Um estudo prospectivo, transversal, observacional e analítico, foi realizado para determinar as lesões dermatológicas diagnosticadas pelo exame físico, comparando grupos, para a análise de marcadores imunológicos na pele e no sangue, assim como alterações histológicas na pele. Este estudo foi realizado numa comunidade de pescadores, no Pina, no estado de Pernambuco, Brasil. Dezenove pescadores, com tempo médio de profissão de $29,0 \pm 10,3$ anos, foram incluídos no estudo. As variáveis desta amostra foram: idade, sexo, tipo da pele (segundo classificação de Fitzpatrick) estado civil, grau de instrução, número de filhos, tipo e tempo de atividade profissional, índice de massa corpórea, exposição diária à radiação solar e qualquer tipo de doença atual ou prévia (nos 12 meses anteriores à coleta de dados). As variáveis dermatológicas foram quaisquer alterações em pele, mucosa e anexos. Para comparar a subpopulação de linfócitos no sangue, foram empregados 10 indivíduos não pescadores, vivendo na mesma região e exercendo profissão ao abrigo do sol. As idades médias igualaram-se a $42,5 \pm 16,1$ anos. Os marcadores imunológicos da pele e do sangue foram determinados por citômetro de fluxo. O teste de Mann-Whitney, para a hipótese de igualdade, entre os grupos expostos e não expostos ao sol, foi usado. O teste de Fisher foi empregado para análise de independência dos grupos e o teste de Wilcoxon, para comparação dos achados imunológicos e histopatológicos em pele exposta e coberta, todos em igual nível de significância (0,05). **Resultados:** Comparando pele exposta à coberta, elastose (73,7% contra 23,1%, respectivamente; $p=0,03$), vasos ectásicos dérmicos (78,9% contra 31,6%, respectivamente; $p=0,012$) e número de células nos segmentos da epiderme entre os cones ($5,8 \pm 1,08$ contra $5,2 \pm 0,42$; $p=0,029$) foram significativamente mais freqüentes na pele exposta. Também os marcadores CD45RO+, CD68+ e mastócitos ($p=0,040$, $p<0,001$ e $p=0,001$) foram estatisticamente significantes na pele exposta. O aumento de CD3CD8CD45RO+ no sangue periférico foi mais freqüente em pescadores do que em não pescadores ($p=0,016$). **Conclusões:** O efeito barreira à penetração da radiação solar, representado por elastose, aumento do número de células nas camadas entre os cones, aumento de melanócitos e da vasculatura térmica, representada pela ectasia, sugere a existência de um efeito de tolerância ao dano da radiação solar, o qual provavelmente inibe a instalação da imunodepressão. Esse efeito é reforçado pelo aumento

do CD3CD8CD45RO+ e pelo aumento da expressão da linhagem CD28+, capaz de proteger as células CD4+ da apoptose induzida pelo CD95 (Faz).

Palavras-chave: Radiação ultravioleta. Imunologia-pele. Dermatologia. Marcadores imunológicos.

SUMMARY

Introduction: The ultraviolet radiation effects on the human immunological system are highly complex, disturbing some components of immune response. **Objective:** The objective of this study was to evaluate the clinical, histopathological and immunological effects from solar radiation in male fishermen with more than 10 years of uninterrupted activity. **Methods:** A prospective, transversal, observational and analytical study was done observing the dermatological lesions diagnosed by a physical exam, comparing groups, for the analysis of immunologic markers on the skin and in the blood, as well as histological alterations on the skin. This study was developed at a fishing community in Pina, in the state of Pernambuco, Brazil. Nineteen fishermen with an average professional working time of $29,0 \pm 10,3$ years were included in this study. The variable of this sample was: age, sex, skin type (according to Fitzpatrick classification), civilian status, degree of instruction, number of children, type and time of professional activity, body mass index, daily sun radiation exposure and any kind of current or past (12 months prior of the collection of data) illness. The dermatological variable was any alterations on the skin, mucosa and annexes. In order to compare the lymphocytes subpopulation in the blood, we used 10 non fishermen living in the same region with an indoor profession. The average ages ranged $42,5 \pm 11,6$ years. The immunological markers of the skin and blood were determined by flow cytometer. The Mann-Whitney test had been used, for equality hypothesis, between the sun-exposed and non-exposed group. The Fisher test was used for independence group analyzing and Wilcoxon test, as a comparison between the immunological and histopathological findings on exposed and non-exposed skin, all in equal level of significance (0,05). **Results:** Comparing exposed and non-exposed skin, elastosis (73,7% against 23,1% respectively; $p = 0,03$) dermis ectasic vases (78,9% against 31,6% respectively; $p=0,012$) and number of cells in epidermis segments between cones ($5,8 \pm 1,08$ against $5,2 \pm 0,42$; $p=0,029$) were significantly more frequent in the exposed skin. Also, the CD45RO+, Cd68+ markers and mastocytes ($p=0,040$, $p<0,001$ and $p=0,001$) had been significantly statistic on exposed skin. The increase of CD3CD8CD45RO+, in peripheral blood, was more frequent in fishermen than the non fishermen workers ($p=0,016$) **Conclusions:** The barrier effect to the penetration of the solar radiation established by elastosis, the increase of cellular number of cell layers between the cones, increase of melanocytes and increase of dermal vasculature, represented for the ecstasy, suggests the existence of a tolerance effect to sun radiation damage, wich probably inhibts the installation of immunodepression. This effect is endorsed by the increasing

of CD3CD8CD45RO+ and increase in trend of CD28+ expression, capable to protect Cd4+ cells apoptosis induced from CD95 (Fas).

Key-words: Ultraviolet radiation. Immunology/skin. Dermatology. Immunological markers

1 INTRODUÇÃO

O sol é responsável pelo desenvolvimento e existência da vida na Terra e seus raios infravermelhos, além de nos aquecer, podem ser vistos por nossos olhos, e respondem pelo espectro visível do sol. Os raios solares são também essenciais para a fotossíntese dos vegetais, fonte indispensável para nossa alimentação e energia. Eles também alteram nossa composição química, controlam nosso nível de maturação e dirigem nosso ritmo biológico (Diffey, 2004). Apesar disso, a radiação solar resulta em atividade carcinogênica, propriedade esta conhecida por aproximadamente um século.

O componente ultravioleta da radiação, que compreende aproximadamente 5% da radiação solar, é largamente responsável pelos efeitos deletérios associados à exposição solar. Na última década, foi reconhecido que a exposição da pele à luz solar também resulta em profundos efeitos sobre o sistema imunológico do hospedeiro e que estas mudanças contribuem para o desenvolvimento de câncer na pele, além de alterar a resistência da pele a doenças infecciosas (Yaron *et al.*, 1995).

Estudos demonstram que a radiação ultravioleta na pele produz não só uma supressão imune não específica local, mas também uma supressão sistêmica específica contra antígenos introduzidos na fase crítica da

exposição (Aboutalebi, Strickland, 2006; Narbutt *et al.*, 2004; Norval, 2006). Outros autores sugerem que o dano induzido ao DNA pela radiação ultravioleta desencadeia uma cascata de eventos: imunodepressão sistêmica mediada pelo linfócito T, diminuição das células *natural killer* (NK), regulação imprópria das citocinas e mudanças na apresentação dos antígenos às células de Langerhans (Duthie *et al.*, 1999). Os componentes-chaves desta cascata são as citocinas epidérmicas, que modulam a resposta imunológica a antígenos introduzidos no hospedeiro, que foi submetido à radiação ultravioleta, redirecionando a resposta a um estado de imunodepressão (Godar, Lucas, 2005).

Kripke (1984) é o pesquisador que primeiro observa os efeitos imunossupressores da radiação solar em murinos. Embora os mecanismos envolvidos nesses efeitos tenham sido amplamente investigados em modelos animais, têm sido pouco estudados no homem (Duthie *et al.*, 1999). Vale ressaltar que todas essas conseqüências induzidas pela radiação ultravioleta B (UVB) são bastante relevantes para o homem, pois ocorrem durante as atividades normais e as exposições de lazer ao sol (Aubin, Mousson, 2004).

Os efeitos da radiação ultravioleta no sistema imunológico do homem são altamente complexos envolvendo vários componentes da resposta imune. A fotobiologia tem exercido enorme influência na imunologia, com grande relevância nas doenças e estados infecciosos; apesar disso continua precariamente entendida. Enquanto a redução da camada de ozônio

atmosférico tem sido relativamente bem documentada e atualmente vem sendo corrigida, seu potencial efeito sobre a radiação solar e suas consequências sobre a saúde somente agora têm sido estudados.

Por esses motivos, os estudos sobre o efeito da radiação solar na saúde do homem têm sido considerados relevantes, no intuito de desenvolver medidas preventivas eficientes contra o câncer da pele e de reeducação para a saúde, como o desenvolvimento de produtos naturais e industrializados para proteção solar da pele (Aboutaleb, Strickland, 2006).

Apesar de se ter especulado que a exposição à radiação ultravioleta em baixas doses, ou seja, por poucas horas, pode exercer alguns efeitos benéficos, por reduzir a resposta imunológica da pele e o risco de desenvolvimento de processos auto-imunes, principalmente em indivíduos atópicos (Schwarz, 2005), há consenso de que a radiação ultravioleta determina alterações no sistema imunológico da pele. Por esse motivo, o interesse científico tem priorizado a compreensão da quantificação desses efeitos, em função do tempo de exposição solar (Narbutt *et al.*, 2004; Tobin, 2006).

Esse consenso permite que se avente a hipótese de que a exposição prolongada e crônica ao sol pode representar uma das maiores agressões ambientais à saúde humana (Schwarz, 2005). Dentre as ocupações, que requerem necessariamente a exposição prolongada e crônica ao sol, está a de pescador. No entanto a experiência clínica dermatológica, amalhada ao longo de vários anos de exercício da Medicina, não parece confirmar essa

hipótese, uma vez que não se tem constatado um risco aumentado de câncer da pele em pescadores.

Empregando os descritores “pescador”, “pele”, “UV”, “marcador imunológico”, “células de Langerhans”, “queratinócitos”, “envelhecimento da pele” e seus correspondentes nos vernáculos inglês, francês e espanhol, foi localizado apenas um trabalho, publicado em 1989. A constatação clínica associada à escassez de trabalhos publicados sobre alterações de pele em pescadores motivou a presente pesquisa.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos clínicos, histopatológicos e imunológicos, decorrentes da radiação solar, em pescadores masculinos, com mais de 10 anos de profissão.

2.2 Específicos

a) Identificar, em pescadores, as alterações clínico-dermatológicas, decorrentes da exposição crônica da pele à radiação solar, comparando com a pele coberta;

b) Identificar, em pescadores, as alterações histopatológicas da pele exposta à radiação solar, comparando com a pele coberta;

c) Analisar a distribuição de células imunocompetentes da pele: células de Langerhans, linfócitos, células *natural killer*, monócitos e

macrófagos de pescadores, em biópsias, comparando pele coberta à exposta à radiação solar.

d) Avaliar a imunidade celular de pescadores com mais de 10 anos de profissão, por meio da quantificação de subpopulações de linfócitos no sangue periférico, comparados a não pescadores.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O espectro da radiação solar é amplo, desde os raios cósmicos (raios X ou raios de Milikan), que aparentemente cruzam o espaço interplanetário em todas as direções, até as radiações do infravermelho. As radiações de menor comprimento de onda, ou seja, até 200 nanômetros (nm), não atingem a Terra, pois são absorvidas pelo oxigênio e pelo ozônio atmosféricos. A radiação ultravioleta (UV) e a luz visível situam-se entre 200 nm e 760 nm e constituem o espectro fotobiológico, composto por: radiação ultravioleta, entre 200 nm e 400 nm, e a radiação visível, que engloba os comprimentos de onda entre 400 nm e 760 nm, resultando na seqüência do espectro luminoso de cores: violeta, azul, verde, amarelo, alaranjado e vermelho. Além desse limite, até 17.000 nm, está o infravermelho, que é indutor de calor (Sampaio, Rivitti, 1998).

A radiação UV é dividida em três categorias, dependendo de seu comprimento de onda: radiação ultravioleta C (UVC), entre 100 nm e 280 nm, radiação ultravioleta B (UVB), entre 280 nm e 315 nm, e radiação ultravioleta A (UVA), entre 315 nm e 400 nm. Além da diferença de comprimento de onda, essas radiações são distintas quanto aos efeitos biológicos que exercem. A UVC é basicamente germicida, pelo fato de ser absorvida por proteínas e aminoácidos, mas contém o pico de absorção da molécula do DNA (260 nm) e só não causa maior prejuízo à pele pelo fato de

ter curta penetração (Souza *et al.*, 2004). A UVB é a mais eficiente em produzir danos diretos ao DNA, foto-imunossupressão, eritema, espessamento da camada córnea e melanogênese, sendo, por isso, considerada o maior fator etiológico das três formas de câncer cutâneo (Kadekaro *et al.*, 2003; Schwarz, 2002). A UVA, apesar de causar efeitos semelhantes aos da UVB, não o faz uniformemente ao longo de seu espectro e, por esse motivo, foi subdividida em duas regiões: UVA-1, compreendendo a faixa de absorção de 340 nm a 400 nm, e a UVA-2, entre 315 nm e 340 nm, que é mais eritrogênica. A UVA-1, devido a sua maior capacidade de penetração, reage com o oxigênio molecular, produzindo espécies reativas capazes de induzir reações inflamatórias na pele e danos no DNA, do que derivam aumento da pigmentação, fotossensibilização e câncer cutâneo, efeitos que são potencializados pela atuação sinérgica com a UVB (Kochevar, Taylor, 2005).

Os radicais livres, produto da ação UVA-1, parecem promover alterações nos fibroblastos dérmicos, os quais sintetizam maior quantidade de enzimas. Por ação dessas enzimas, a estrutura protéica do tecido conjuntivo se altera, ocorrendo acúmulo maciço de fibras elásticas anormais, perda de colágeno, aumento de glicosaminoglicanas e formação de vasos telangiectásicos. Essas alterações culminam com a degeneração do tecido fibroso numa massa elastótica, amorfa, associada à destruição da matriz dérmica extracelular (Bosset *et al.*, 2003a).

Esta afirmação é muito convincente uma vez que os cânceres de células escamosas ocorrem quase que exclusivamente em áreas expostas ao sol, como face, pescoço e braços, e sua incidência está comprovadamente correlacionada à latitude geográfica, sendo maior nas áreas mais ensolaradas do mundo (Diffey, 2004).

Além do aumento da pigmentação, em resposta à irradiação, a pele é capaz de se adaptar limitando o dano de futuras exposições à radiação UV por meio de espessamento e hiperplasia epidérmica. Cerca de 72 h após a exposição e como resultado direto dela, mas não em consequência de um dano cutâneo ou de uma predisposição genética, se inicia um aumento da divisão celular na epiderme inferior, resultando no espessamento da epiderme e do extrato córneo (Diffey, 2004).

Apesar da função imunológica da pele ter sido enunciada na década de 1940, com a primeira demonstração da imunidade celular em enxertos, apenas nos últimos 20 anos as pesquisas se intensificaram e se pôde comprovar que a pele é o um órgão distinto dos demais, exercendo o papel de maior transdutor de sinais do meio ambiente para o indivíduo e entre indivíduos. Por isso, a pele é considerada o maior órgão imunológico que protege o hospedeiro contra a invasão de microorganismos. Contêm muitas células e mediadores solúveis envolvidos na resposta imune a antígenos exógenos e endógenos (Tobin, 2006).

3.1 O controle da imunidade da pele em circunstâncias fisiológicas

A epiderme é uma forte barreira, coberta por uma parede tridimensional, auto-sustentada, de corneócitos embebidos num envelope rico em lipídeos, formada por diversas camadas de queratinócitos, firmemente conectados por meio de desmossomos. Os componentes desmossomais transmembranosos de células vizinhas, as desmogleínas e desmocolinas se intercalam e formam pontes de adesão conectadas a moléculas intracelulares das placas desmossomais, que interagem com componentes do citoesqueleto. A parede cutânea tem seu limite mais interno formado pela zona de membrana basal dermoepidérmica (Tobin, 2006).

A epiderme protege contra danos mecânicos, físicos, biológicos e químicos, quer por sua estrutura molecular, quer por apresentar terminações nervosas sensitivas. Ela também pode se defender, até um determinado grau, por ser equipada com um sistema eficaz de defesa primária denominado sistema imunológico inato, mas o principal mecanismo de defesa é formado por citocinas multifuncionais que acessam a derme pelos vasos sanguíneos. Isto é fundamental, porque a pele está exposta a uma quantidade grande de agentes potencialmente prejudiciais, que aguardam apenas a ruptura da barreira, para entrar no organismo.

O sistema imunológico adaptativo da pele (*skin-associated lymphoid tissue* - SALT) pode ser classificado como um programa flexível, poderoso de aprendizagem de sobrevivência, que complementa e amplia as funções

da barreira epidérmica. Resumidamente, pode-se afirmar que o sistema SALT está formado pelos seguintes elementos (Streilein *et al.*, 1999):

- a) Subpopulação de linfócitos com afinidade especial para a pele, formada por igual proporção de linfócitos CD4 e CD8 nos tecidos, capazes de expressar interleucina 2R (IL-2R) do CD25.
- b) Células de Langerhans, responsáveis por captação, processamento e apresentação de antígenos ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC);
- c) Queratinócitos, que atuam liberando citocinas e quimiocinas, que ativam ou inibem o sistema imunológico da pele;
- d) Células endoteliais, dos vasos presentes na pele, com capacidade de se relacionar com células T;
- e) Macrófagos e dendrócitos dérmicos, com função de promover fagocitose na pele, assim como auxiliar na quimiotaxia de leucócitos;
- f) Fibras do sistema nervoso periférico, situadas na pele, com capacidade de sintetizar neuropeptídeos imunologicamente ativos, como a proteína relacionada ao gene da calcitonina (CGRP) responsável pela liberação de IL-10 e pela ativação de mastócitos, e a substância P, que promove hipersensibilidade de contato;
- g) Linfonodos de drenagem, responsáveis pela depuração de catabólitos da pele, além de servirem como sede dos processos de proliferação e diferenciação de linfócitos T.

Alguns detalhes do sistema SALT devem ser expostos, para subsidiar a compreensão da imunologia da pele submetida à radiação UV, quer nas reações locais na pele, quer nas reações sistêmicas, mediadas por substâncias químicas, que atuam como sinalizadores, inibindo ou ativando o sistema.

O sistema imunológico, normalmente, ignora substâncias estranhas do meio ambiente que entram em contacto com a pele e ataca aquelas que penetram, quando a barreira é rompida. Essa omissão imunológica garante a ausência de ação inflamatória local, que mantém a homeostase. Para que estes objetivos sejam alcançados, há três níveis de controle exercido pelos linfócitos T:

Nível 1 – mediadores solúveis, de entrada da barreira, de locomoção direta

Antes de entrar no órgão alvo, os linfócitos T e outras células inflamatórias interagem com células endoteliais, via moléculas de adesão e selectinas, que lhes conferem quimiotaxia para migrar aos locais agredidos. Em outras palavras, os linfócitos T só migram para o tecido, quando expressam um conjunto apropriado de receptores a quimiocinas e quando o órgão alvo possui ligantes desses receptores.

Nível 2 – início da resposta imunológica

A ativação linfocitária, ou seja, a função efetora, depende do tipo, do *status* funcional, da expressão de moléculas de superfície e do repertório de citocinas das células apresentadoras de antígeno.

Nível 3 – contra-regulação ativa

Os linfócitos T CD4 desempenham o papel mais importante na regulação imunológica, incluindo o controle da auto-imunidade e a manutenção da tolerância periférica. Uma subpopulação de linfócitos T CD4, os linfócitos T CD4+CD25+ ou T regulatórios, que são produzidos regularmente no timo e podem corresponder a até 10% dos linfócitos T CD4 periféricos, inibem a ativação do T *helper* (Th) de uma forma antígeno-independente, mediada pelo contato direto célula-célula. Em contraste, os linfócitos T regulatórios tipo 1 são induzidos na periferia, em determinadas condições tolerogênicas, mediadas pela tolerância antígeno específica por meio da secreção de IL-10 e TGF- β (*transforming growth factor* β).

Em relação aos linfócitos residentes na pele, é importante, também, abordar a dicotomia funcional das células auxiliares ou indutoras, conhecidas pela sigla Th. Em linhas gerais, conforme as citocinas que essas células são capazes de liberar, os linfócitos Th são subdivididos em pelo menos três grupos, que correspondem a funções imunológicas distintas. No Quadro 1, estão expressos os tipos de linfócitos T *helper*, assim como as citocinas que liberam e as ações imunológicas desempenhadas na pele.

Quadro 1 – Tipos de linfócitos *helper*, com respectivas citocinas, funções imunológicas e tipo de sinal de ativação

Linfócito Th	Citocinas liberadas	Funções	Tipo de sinal de ativação
Th-0	Padrão irrestrito, na dependência do sinal recebido	Diferenciação em Th-1 ou Th-2, conforme o sinal de ativação recebido	Ocupação do receptor de membrana
Th-1	IL-2, TNF- β , IFN- γ	Indução da produção de anticorpos opsonizantes e fixadores de complemento pelos linfócitos B, ativação de macrófagos, citotoxicidade celular dependente de anticorpo, e hipersensibilidade tardia	Liberação da IL-12 pela célula de Langerhans ou por célula dendrítica da pele (células apresentadoras de antígeno)
Th-2	IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10	Indução da síntese de imunoglobulinas IgM, IgG1, IgA, IgE e IgG4, reações alérgicas e hipersensibilidade imediata. Por meio das interleucinas IL-3, IL-4 e IL-10, ativam mastócitos e eosinófilos	Ativação por células epiteliais apresentadoras de antígeno não profissionais, em ausência de IL-12

NOTA: IL – interleucina, TNF- β – fator de necrose tumoral beta, IFN- γ – interferon gama, Ig - imunoglobulina

O processo de diferenciação de Th-0 em Th-1 ou Th-2 depende, pelo menos, de dois eventos na ativação. O primeiro consiste na ocupação do receptor de célula T (TCR) pela molécula co-estimulatória CD28 do linfócito T, com seus respectivos ligantes, presentes na superfície das células apresentadoras de antígeno, o complexo antígeno MHC-II, e pelas moléculas B7. O segundo evento é representado pelas citocinas secretadas pela célula apresentadora de antígeno, cujo tipo definirá o sentido de diferenciação. Quando a ativação se faz por célula de Langerhans ou célula dendrítica epidérmica, capaz de sintetizar IL-12, são diferenciados em Th-1, que iniciará a liberação de interferon gama (IFN- γ). No entanto, se a célula

geradora do sinal não liberar IL-12, a diferenciação far-se-á em Th-2, com liberação de IL-4, IL-5 e IL-10 (Nickoloff, Turka, 1994).

Esse conhecimento é importante para o entendimento do significado dos estudos que comprovaram que, na pele submetida à radiação UV, ocorre inibição da linhagem Th-1 e estimulação da linhagem Th-2, para compreender o efeito alergênico e o desencadeamento de reação inflamatória (Young, 2006).

Por outro lado, as células dendríticas são as mais potentes apresentadoras de antígenos, envolvidas na iniciação das respostas imunológicas primárias. Estão presentes nos tecidos periféricos, como células imaturas, com eficiência para capturar antígenos. As células de Langerhans representam as células dendríticas imaturas na epiderme e nas mucosas. O primeiro passo para a apresentação de antígeno ao linfócito T imunocompetente é a captura, o processamento antigênico e sua acumulação como peptídeo do MHC na superfície celular (Schröder *et al.*, 2006).

A captura dos antígenos pelas células dendríticas imaturas é mediada por dois mecanismos distintos. Um é a macropinocitose, que consiste na captura de antígenos solúveis, induzida por fatores de crescimento de macrófagos ou de células epiteliais, na qual se formam macropinosomos. O outro mecanismo é a endocitose, mediada por receptores, tais como o receptor de manose e o receptor da fração de complemento gama II (FcγII), que permitem captura eficiente de antígenos manosilados e de complexos imunológicos, respectivamente. Os receptores FcγII são internalizados junto

com seus ligantes e são degradados nos lisossomos. Os receptores Fc estão disponíveis para apenas um ciclo de captação antigênica, mas os receptores de manose, nas células dendríticas, são constantemente reciclados, após liberarem sua carga, e podem atuar na internalização de ligantes, em diversos ciclos. No entanto as células de Langerhans epidérmicas não disponibilizam a endocitose mediada por esses receptores, mas apenas a pinocitose de fluídos, não específica, via enrugamento da membrana, que requer polimerização e reorganização de actina (Mizuno *et al.*, 2004), fato que parece servir para evitar a hiperresponsividade a antígenos protéicos não agressivos, freqüentemente encontrados na pele. Em outras palavras, enquanto as células dendríticas imaturas capturam antígenos via macropinocitose e endocitose receptor-mediada, as células de Langerhans o fazem apenas por macropinocitose e pinocitose (Schröder *et al.*, 2006).

Esse conhecimento é importante, porque a radiação UVB inibe a migração e a maturação de células de Langerhans dendríticas-*like*, pelo dano à atividade endocítica. Um dos mecanismos propostos para essa inibição é o aumento da concentração local de IL-10 no tecido irradiado por UVB, o que impede a diferenciação de monócitos a células de Langerhans, mas favorece a diferenciação para macrófagos maduros, com alto poder de endocitose. Esse aumento de endocitose macrofágica reduz a concentração local de antígenos e promove imunossupressão, quer pelo menor número de células de Langerhans, quer pela menor concentração de antígenos, por terem sido fagocitados por macrófagos (Allavena *et al.*, 1998).

Nickoloff e Turka, em 1994, conferiram ao queratinócito o papel de “imunócito-chave do tegumento”, por exercer a função de sentinela da pele, desencadeando o sistema celular e humoral de defesa, pela secreção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-1 e IL-8. A presença de TNF- α e de IL-1 promove a ativação parácrina das células endoteliais da vasculatura da pele, que expressam moléculas de adesão intercelular (ICAM-1), moléculas de adesão celular vascular (VCAM-1) e moléculas de adesão de células endoteliais (ECAM-1), aumentando a quimiotaxia de linfócitos T de memória para a região lesada, enquanto que o aumento de concentração local de IL-1 e IL-8 acarreta a quimiotaxia de linfócitos T LFA1+, os quais migram para a epiderme e interagem com os queratinócitos ICAM-1, ativados por TNF- α e IFN- γ (ICAM-1+), num mecanismo antígeno-independente, o que confere ao queratinócito a capacidade de se transformar em célula acessória efetiva para linfócitos T autólogos, frente a superantígenos.

A presença de IFN- γ , por sua vez, induz a expressão do antígeno leucocitário humano classe II (HLA-DR) na superfície do queratinócito e o transforma em célula apresentadora de antígeno ou, ainda, em célula alvo para linfócitos T citotóxicos, caso o queratinócito esteja infectado por vírus ou tenha sofrido transformação neoplásica (Allavena *et al.*, 1998).

No presente estudo, este conhecimento é útil para compreender que a expressão da proteína HLA-DR significa ativação do queratinócito pela radiação UV, ou seja, da liberação de TNF- α pela radiação, com conseqüente reação dérmica. Por esse motivo, a expressão da HLA-DR é empregada como marcador de reatividade da pele.

Com exceção da porção geradora de cabelo e unha, a pele dispõe de um mecanismo imunológico inato e adaptativo e de abundante plexo de capilar dérmico, como processo de proteção para qualquer invasão. Por esse motivo, a pele é um local de manifestação alérgica freqüente e de condições inflamatórias, auto-imunes e crônicas. Difere dos demais órgãos dos mamíferos, pelo grau com que fatores ambientais alteram seu sistema imunológico. Por esse motivo, a pele deve ser considerada como um sítio imunológico que, paradigmaticamente, reflete uma dificuldade extrema de contrabalançar defesa e tolerância, controle genético e modulação ambiental, proteção e doença (Norval, 2006).

3.2 Resposta imunológica à radiação solar

O estudo da resposta imunológica da pele teve início a partir da identificação de que pacientes, submetidos a transplante e a terapia imunossupressora de longa duração, em altas doses, apresentaram um risco aumentado de desenvolvimento de câncer da pele. Esse risco foi 10 vezes maior para carcinoma de células basais, 65 a 250 vezes maior de carcinomas de células escamosas e duas a três vezes maior de melanoma, que a população em geral, sem aumento da incidência de outros tipos de câncer (Hanneman *et al.*, 2006).

A este conhecimento, somam-se os estudos epidemiológicos, nos quais se verifica um aumento de câncer da pele submetida à radiação solar.

Essa constatação permitiu aventar a hipótese de que a radiação UV, mesmo em doses menores que as necessárias para causar câncer, é capaz de suprimir as respostas de hipersensibilidade de contato aos haptenos e de hipersensibilidade tardia a antígenos protéicos e a agentes infecciosos, como *Herpes simplex vírus*, *Leishmania*, *Candida albicans* e micobactérias.

Para sistematizar o detalhamento da atividade imunológica da pele à radiação solar, apresenta-se a seqüência de eventos bioquímicos e histológicos, na figura 1, na qual se observa que a ação da exposição aguda à radiação UV se faz tanto na pele, ou seja, localmente, como de forma sistêmica.

Figura 1 – Resposta imunológica da pele à exposição aguda à radiação solar: vias passíveis de serem estimuladas

NOTA: À esquerda, dentro do retângulo, estão representados os fenômenos envolvidos na imunossupressão na pele, à direita, o detalhamento desses eventos

FONTE: Concepção da Autora

Os mecanismos pelos quais a radiação ultravioleta suprime a resposta imunológica cutânea têm início pelo dano ao DNA, que desencadeia alterações na morfologia e na função das células de Langerhans apresentadoras de antígenos, assim como promove a liberação de citocinas, IL-1, IL-10 e TNF- α . Além disso, promove síntese de prostaglandina E2, citocina regulatória, produzida pelos queratinócitos irradiados por UV, assim como pelos macrófagos da corrente circulatória que infiltram o tecido inflamado (Schröder *et al.*, 2006).

A radiação ultravioleta também atua na bioquímica do ácido urocânico, que é sintetizado no caminho metabólico do aminoácido essencial histidina e se acumula no extrato córneo quando faltam as enzimas necessárias para catabolizá-lo nas células epidérmicas. Esse ácido existe nas formas isoméricas trans e cis. O ácido transurocânico é a forma predominante na epiderme não irradiada e a cis, na pele irradiada por UVB. A forma cis inibe, parcialmente, a resposta imunológica, por alterar a função apresentadora de antígeno das células de Langerhans e, assim, suprimir a hipersensibilidade tardia a vários agentes infecciosos e a hipersensibilidade de contato aos haptenos (Aubin, 2003, Aboutaleb, Strikland, 2006).

Pela exposição aguda à UVA, pode ocorrer a formação de dímeros de ciclobutilpirimidina, que acarretará a síntese de proteínas alteradas, pela fusão T-T ou T-C, mais freqüentemente em áreas expostas ao sol, do que deriva a denominação de mutações induzidas pela UV em áreas quentes. Essas lesões sempre promovem alterações histológicas e imunológicas, na

dependência da ação dos sistemas de reparo de DNA e da proteína p53, capaz de induzir apoptose da célula para inibir a carcinogênese (Aboutalebi, Strikland, 2006, Friedrich *et al.*, 2003).

Muitas mudanças bioquímicas e histológicas na pele, devidas a baixas e altas doses de UVB, têm sido descritas na literatura. Dentre as alterações fototóxicas, ocorridas nas 48 horas que sucedem a exposição da pele à dose eritematosa mínima de radiação ultravioleta, identificadas pela análise histopatológica de biópsias, estão um decréscimo inicial ou depleção das células T intra-epidérmicas, sem significativo acúmulo de leucócitos polimorfonucleares, mas com expressão pronunciada da proteína Ki-67, no extrato basal da epiderme, que é uma marcadora intracelular de células proliferativas em todas as fases do ciclo mitótico, exceto a fase M. Além disso, ocorre aumento dose-dependente do infiltrado de células T na epiderme e na derme, assim como aumento da relação cutânea CD4/CD8 (Baba *et al.*, 2005, Norval, 2006, Tobin, 2006, Van der Vleuten *et al.*, 1996).

Também foi demonstrado que, embora os queratinócitos sejam uma das células responsáveis pela resposta imunológica na pele, são as células T as que apresentam maior fotossensibilidade à radiação ultravioleta, sobrepassando a de monócitos e de células B. A radiação ultravioleta também causa uma inibição dose-dependente da atividade das células NK na pele, que não se acompanha de aumento em número (Young, 2006).

A UVB altera o padrão dos queratinócitos. Até recentemente, o queratinócito parecia ter apenas um papel de célula-alvo na resposta

imunológica, vítima do ataque dos linfócitos T. No entanto, na última década, com a descoberta das citocinas e as moléculas de adesão, tornou-se claro que o queratinócito participa ativamente da resposta imune e pode orquestrar o início da inflamação cutânea (Kelly *et al.*, 2000, Schwarz, 2005).

Dentre os papéis imunológicos dos queratinócitos, está a função sentinela. Esta função baseia-se na habilidade de o queratinócito responder de forma rápida e direta, porém totalmente indiscriminada às perturbações ambientais como exposição da pele à radiação ultravioleta, a alérgenos de contato, a irritantes químicos, a agentes infecciosos e a promotores de tumores. Sob efeito da UVB, os queratinócitos produzem e secretam um grande número de interleucinas que atuam como fatores pró-inflamatórios: IL-1, IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral gama (TNF- γ) e prostaglandina E2. Esta última é a responsável pelo início da inflamação e pela indução da quimiotaxia dos neutrófilos e macrófagos dentro da pele. Estes achados foram detectados no soro de voluntários humanos expostos à UVB (Carneiro *et al.*, 2005, Schwarz, 2005, Young, 2006).

Além dos queratinócitos, monócitos, macrófagos, mastócitos, células de Langerhans, células dendríticas e linfócitos estão envolvidos na imunologia da pele, independente da radiação ultravioleta, mantendo entre si uma relação de progênie, exceção feita aos linfócitos.

Para compreender o imbricado processo de resposta imunológica da pele à radiação ultravioleta, é necessário se reportar aos trabalhos de Takahashi (2001) e de Ginhoux *et al.* (2006), nos quais comprovaram serem

os monócitos as células a partir das quais se formam macrófagos, células de Langerhans e células dendríticas. Esses autores comprovaram que, a partir da *stem cell* da medula óssea, originam-se as células progenitoras totipotentes as quais se diferenciam em monócitos ou em mastócitos. Os monócitos, por sua vez, ativados pela IL-15 e pelo fator de crescimento tumoral beta (FNT- β), diferenciam-se na superfície da pele em células de Langerhans e, nas camadas mais profundas da pele e no tecido conjuntivo, respectivamente, em células dendríticas e macrófagos. Esse processo de diferenciação de monócitos é ativado pela secreção de citocinas pelos linfócitos e pelas células de Langerhans, ativadas pela presença de antígenos.

O conhecimento desse mecanismo permitiu a Bosset *et al.* (2003b), lançar algumas hipóteses para explicar um comportamento diferente da pele exposta cronicamente à radiação ultravioleta, quando comparada àquela submetida à exposição aguda. Esses autores, constatando o aumento dos marcadores CD68, CD45RO e mastócitos em pele cronicamente exposta ao sol, em ausência de processo inflamatório ou eritema, admitiram que essa exposição acarreta quimiotaxia de monócitos à superfície da pele irradiada. As moléculas de DNA alteradas pela radiação UV atuam como antígenos para as células de Langerhans as quais, liberando interleucinas, desencadeiam a diferenciação de monócitos em macrófagos, células de Langerhans e células dendríticas, promovendo um processo adaptativo e inibindo a imunossupressão, que ocorre na exposição aguda à radiação ultravioleta. Foi esse mecanismo que Ginhoux *et al.* comprovaram, em 2006.

O conhecimento dessa inter-relação facilitou a compreensão das funções das células de defesa da pele irradiada, as quais passam a ser explicitadas com detalhes.

As células de Langerhans, que correspondem a 2% a 5% das células epidérmicas, são as maiores células apresentadoras de antígenos da epiderme (Tobin, 2006).

Dentre as ações da UVB sobre as células de Langerhans (CL), têm sido relatadas: diminuição na quantidade e na função dessas células e supressão da expressão de moléculas de superfície, incluindo a atividade da ATPase, MHC classe II, além de moléculas ICAM-1 e B7 (Aubin, 2003). Todas essas alterações resultam em uma profunda depressão das CL e podem ser explicadas por dois mecanismos. O primeiro consiste na migração estrutural e funcionalmente enfraquecida das CL da epiderme para o linfonodo regional; o segundo está baseado na apoptose das CL remanescentes na epiderme. Além disso, considerando que as CL normais têm igual capacidade de apresentar antígenos às células Th-1 e Th-2, quando irradiadas pela UVB, apresentam os antígenos a Th-2 e não a Th-1. Isso se deve à presença de desidrogenação dos dímeros de pirimidina da molécula do DNA dentro da CL, o que desestabiliza alguns exons, reduzindo a síntese de proteínas ativadoras da linhagem Th-1 (Tobin, 2006, Young, 2006).

Além das CL, outras células dérmicas, com função de apresentação de antígenos, também são comprometidas pela exposição à UVB. Doses de

UVB reduzem a função das células epidérmicas, assim como das células dendríticas dérmicas CD1a+. Após 72 horas da exposição aguda da pele humana à UVB, ocorre uma indução da célula T supressora, de células dendríticas CD1a-, HLA-DR+, CD11b+ e macrófagos, promovendo o mecanismo adaptativo ou imunossupressivo, conforme a exposição seja prolongada e crônica ou aguda e esporádica, respectivamente (Kolgen, 2003).

Os macrófagos inflamatórios são a principal fonte de IL-10 na pele humana irradiada pela UVB, mas eles falham em secretar IL-12, contribuindo, assim, para a indução da imunossupressão ou tolerância à UVB, na dependência do tipo de exposição. É também interessante notar que a UVB ativa a cascata epidérmica das reações imunológicas mediadas por complemento, particularmente pela fração C3b (Aubin, 2003, Godar, Lucas, 2005).

Os mastócitos também têm um papel importante nas reações de hipersensibilidade imediata, induzidas pela UVB, entretanto o exato mecanismo é ainda desconhecido. Admite-se que a UVB promove oxidação de mediadores lipídicos com formação de subprodutos do ciclo do ácido aracdônico, que expressam comportamento semelhante aos receptores de fator de ativação plaquetária (PAF), um fosfolípídeo que atua como mediador inflamatório por meio de seu receptor existente nas células do sistema imunológico inato e nos queratinócitos da pele. O PAF é o agonista fosfolípídico mais potente já identificado, sintetizado em resposta a diversos

estímulos, incluindo citocinas, endotoxinas ou produtos de oxidação de fosfolípidos poliinsaturados, capazes de se ligar aos receptores PAF (Marathe *et al.*, 2005).

Assim sendo, concomitante ao aumento da síntese de ligantes de receptores PAF pelos queratinócitos irradiados, ocorre a ativação dos mastócitos, potencializada pela isomerização do ácido urocânico e por neuropeptídeos, tais como a proteína relacionada ao gene da calcitonina (CGRP) e a substância P (Marathe *et al.*, 2005).

A CGRP é uma molécula presente no sistema nervoso central e periférico, assim como está associada às fibras nervosas da pele, exercendo diversas funções na imunossupressão (Seiffert, Granstein, 2002):

- ❖ Nas células T, aumenta os níveis de AMP cíclico, reduzindo a síntese energética, o que promove inibição de proliferação, de liberação de IL-2 e da expressão de TNF- α , TNF- β e IFN- γ ;
- ❖ Nos macrófagos, ela estimula a expressão da IL-10, a qual, por sua vez, promove um aumento de diferenciação de monócitos em macrófagos e em células dendríticas superficiais e profundas, ao que se associa a inibição da expressão da IL-1 β ;
- ❖ Inibe a atividade das células NK e aumenta a quimiotaxia de polimorfonucleares;

- ❖ Inibe, ao mesmo tempo, a apresentação de antígenos às células de Langerhans, afetando, com isso, o início da resposta imunológica da pele.

Sabe-se que a radiação UVB induz um dano no DNA por dois mecanismos: efeito direto da UVB no DNA, causando mutações genéticas específicas, ou efeito indireto no sistema imunológico, enfraquecendo a habilidade de gerar uma resposta imune contra o antígeno tumoral (Aubin, 2003).

A radiação solar pode ser tanto benéfica quanto prejudicial aos sistemas biológicos, dependendo da dose, do comprimento de onda da radiação incidente e dos alvos moleculares no tecido. A exposição excessiva à radiação ultravioleta pode causar queimadura solar, envelhecimento precoce da pele e mutações genéticas, as quais podem desencadear câncer da pele (Tong *et al.*, 2005).

A prevenção do câncer da pele tem hoje seu foco em evitar a exposição ao sol, assim como no uso de protetores solares e de roupas protetoras. Os protetores solares químicos são eficazes na redução da incidência do câncer da pele, mas evidências em humanos e em ratos sugerem que sua maior eficácia está em prevenir queimaduras solares mais do que em proteger a resposta imunológica. Essa eficácia é avaliada por meio da habilidade em prevenir o eritema derivado da exposição à radiação solar simulada e é apresentada com fator de proteção solar. O fator de

proteção imunológica é a habilidade de um composto proteger a pele contra os efeitos imunomoduladores da radiação UV. Este conceito permite afirmar que o fator de proteção solar não se correlaciona com o de proteção imunológica, pois protetores solares com valores de proteção solar altos têm fator de proteção imunológico mínimo (Deirdre *et al.*, 2000, Schwarz, 2005).

Além disso, quando os protetores solares químicos reduzem a ocorrência de dor na queimadura solar, podem aumentar o risco do desenvolvimento de câncer da pele porque as pessoas poderão aumentar o tempo que se expõem ao sol. Por esse motivo, estão sendo desenvolvidos novos agentes para prevenir os efeitos imunossupressivos da radiação UV por diversas vias, tais como redução da geração de radicais livres, aumento do reparo do DNA e prevenção da síntese de mediadores inflamatórios de imunossupressão. Para que isso seja possível, é necessário que se conheça o funcionamento da resposta imune no câncer da pele (Aboutaleb, Strickland, 2006).

Para que se compreendam as alterações imunológicas da radiação solar ao nível sistêmico, é de bom alvitre rever alguns conceitos de imunologia, sendo o principal deles o processo de linfopoiese, ou seja, de maturação e diferenciação de linfócitos. Os timócitos, durante o processo de maturação intratímica, adquirem moléculas de superfície, genericamente conhecidas pela sigla CD (*cluster of differentiation* – marcadores de diferenciação) acompanhada de um numeral ordinal. Essas moléculas são próprias dos diferentes estágios maturativos e de diferenciação e podem ser

usadas para identificá-los funcionalmente. No Quadro 2, estão expressos os principais marcadores de diferenciação da pele e respectivas funções imunológicas.

A quantificação desses marcadores de diferenciação, isolados ou associados, pode permitir a identificação de alteração no sistema imunológico. Para tanto, a frequência das células deve ser avaliada cuidadosamente. A análise dos resultados de alterações na imunologia da pele, secundárias à exposição prolongada à radiação UV, deve ser feita considerando cada marcador em separado, assim como associado a outros, possibilitando reduzir o erro de interpretação.

Quadro 2 – Principais marcadores de diferenciação e maturação celular na pele e respectivas funções

Marcador	Função
CD3	Associado aos receptores de antígeno de linfócitos T (TCR); exigido para expressão na superfície celular e para transdução de sinal pelo TCR
CD4	Proteína de superfície celular importante para o reconhecimento de linfócitos T auxiliares a peptídeos antigênicos ligados à molécula MHC de classe II. Atua como co-receptor pela ligação à porção lateral da molécula MHC de classe II
CD8	Proteína de superfície celular importante para o reconhecimento de linfócitos T citotóxicos a peptídeos antigênicos ligados à molécula MHC de classe I. Atua como co-receptor pela ligação à porção lateral da molécula MHC de classe I
CD19	Marcador de linfócitos B. Associado ao CD21 e CD81, forma o complexo co-receptor de linfócitos B, o qual pode potencializar a resposta do linfócito B ao antígeno
CD25	Cadeia α do receptor de IL-2. Expresso por linfócitos T ativados, linfócitos B e monócitos. Também utilizado como marcador de uma subpopulação de linfócitos T, os linfócitos T regulatórios, responsáveis pela supressão da auto-imunidade e mediação da imunossupressão induzida pela radiação UV
CD28	Molécula co-estimulatória de linfócitos T que induz o segundo sinal para ativação celular
CD45RA	Marcador de linfócitos T <i>naïves</i> . Relacionado com a supressão e indução de linfócitos T e B, na reação de hipersensibilidade retardada no endotélio regional da pele, expressando selectina E e VCAM-1
CD45RO	Marcador de linfócito T de memória
CD56	Marcador de células <i>natural killer</i> (NK)
CD68	Marcador de macrófagos e monócitos
CD69	Ativação de células NK, linfócitos T e B
HLA-DR	Marcador de ativação celular molécula do MHC classe II

FONTE: Concepção da Autora

A título de ilustração, no Quadro 3, apresentam-se alguns exemplos de interpretação de aumento do número de linfócitos, macrófagos ou monócitos com esses marcadores, feita com base no Quadro 2.

Quadro 3 – Interpretação de resultados de quantificação de marcadores de diferenciação de células imunocompetentes

Marcador em quantidade aumentada	Significado
CD3+	Aumento de linfócitos T CD4, CD8 ou ambos
CD4+	Aumento de linfócitos T CD4, isoladamente
CD3 CD4 CD25	Ativação de linfócitos T CD4 ou população de linfócitos T regulatórios com imunossupressão induzida pela radiação UV
CD3 CD4 CD45RA	Aumento de linfócitos T auxiliares não ativados
CD28	Aumento do segundo sinal de ativação celular
CD3 CD4 CD45RO	Aumento de linfócitos T auxiliares de memória
CD56	Aumento da quantidade de linfócitos NK
CD68	Aumento do recrutamento de monócitos e macrófagos para a pele e ativação de queratinócitos como apresentadores de antígeno, induzidos pela radiação UV
HLA-DR	Aumento do recrutamento de monócitos e macrófagos para a pele, induzido pela radiação UV. Ativação de linfócitos B e linfócitos T CD4
HLA-DR classe I	Ativação da proliferação e diferenciação de linfócitos B CD8, assim como ativação do queratinócito como apresentador de antígeno
HLA-DR classe II	Ativação de linfócitos B e linfócitos T CD4, assim como ativação do queratinócito como apresentador de antígeno

FONTE: Concepção da Autora

Na Figura 2, resumem-se os eventos promovidos pela radiação UV nas células de defesa da pele.

Figura 2 – Eventos promovidos pela radiação ultravioleta nas células de defesa da pele

FONTE: Concepção da Autora

O mecanismo da imunossupressão da pele pela radiação solar tem sido tema de diversos artigos, principalmente abordando a exposição aguda. Em linhas gerais, a modificação sistêmica promovida pela radiação solar consiste na supressão da IL-12, o que impede a diferenciação dos linfócitos T em Th-1, estimulando a atividade citotóxica das células NK. A esse processo se associa o aumento da liberação da IL-10 e da IL-4, o que promove maior diferenciação na linhagem Th-2. O aumento da concentração dessas duas interleucinas circulantes inibe a expressão de outras citocinas e de mediadores pró-inflamatórios, aumentando o dano celular pela ação exacerbada das células NK (Figura 1) (Ivry *et al.*, 2006).

Cabe questionar se esse mecanismo, investigado para a exposição esporádica e de curta duração à radiação ultravioleta, ocorreria de forma semelhante nos casos de exposição crônica e prolongada, como se observa em algumas profissões, como jardineiros, vendedores ambulantes, policiais e pescadores, dentre outras.

Um único trabalho foi localizado, na literatura consultada, comparando a exposição à UV entre jardineiros irlandeses e dinamarqueses (Thieden *et al.*, 2005), para orientar o desenvolvimento de programas de prevenção do câncer da pele em profissionais cuja atividade requer esse tipo de exposição solar, no sentido de programar atividades em ambiente fechado durante o período de maior incidência solar.

A região Nordeste do Brasil geograficamente se caracteriza por apresentar alta incidência solar, devido à proximidade com a linha do

Equador. Profissionais como os pescadores, além de estarem expostos a alta incidência de UV, o fazem cronicamente e por tempo prolongado a cada exposição, além de sua atividade não permitir períodos de trabalho em ambiente fechado. Por esse motivo, é interessante estudar o comportamento histológico e imunológico desses profissionais, em pele e sangue.

4 INDIVÍDUOS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

O estudo foi prospectivo, transversal, observacional, analítico, para as características dermatológicas diagnosticadas ao exame físico, e, com comparação de grupos, para a análise de marcadores imunológicos em pele e em sangue e alterações histológicas em pele.

4.2 Local de estudo

O estudo foi desenvolvido na cidade do Recife, localizada no estado de Pernambuco, nas coordenadas geográficas: latitude 8°04'03"S, longitude 34°55'00"W. Em relação ao nível do mar, está a uma altitude de 4 m e tem por temperatura média 25,2° C (Figura 3).

Figura 3– Mapa de situação geográfica da cidade do Recife - INPE

FONTE: Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) – Laboratório de Ozônio (2007)

4.3 População estudada

Compuseram a população 3.000 pescadores, do sexo masculino, residentes no bairro do Pina, em Recife, Pernambuco, Brasil, provenientes de uma colônia de profissionais registrados.

4.4 Amostra

4.4.1 Tamanho amostral

Admitiu-se que, na população de 3.000 pescadores, 95% deles tivessem alterações cutâneas secundárias à exposição prolongada à radiação solar, em virtude do exercício profissional. Adotando precisão igual a 5% e efeito desejado igual a 1, com nível de significância de 0,05, com a fórmula de Pocock, estimou-se tamanho amostral em 72 pescadores.

$$n = \frac{N \times z^2 \times p(1-p)}{d^2 \times (N-1) + z^2 \times p(1-p)}$$

onde:

N → tamanho populacional (N=3000)

z^2 → valor para área sob curva normal ao nível de significância de 5%

d → efeito desejado igual a 1

Fórmula 1 - Fórmula de Pocock

4.4.2 Critérios de inclusão e de exclusão

Foram incluídos, no estudo, 75 indivíduos do sexo masculino que apresentavam registro profissional de pescador e exerciam a profissão há mais de 10 anos consecutivos, membros da Colônia de Pescadores do Pina, bairro da cidade do Recife, Pernambuco, Brasil, no período de Setembro de 2005 e Setembro de 2006, que concordaram em participar do estudo por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Apêndice A).

Para a quantificação das subpopulações de linfócitos, também foram incluídos 20 indivíduos, do sexo masculino, moradores do bairro do Pina, não pescadores, para quem o exercício profissional não exigia exposição prolongada à radiação solar. Os não pescadores foram investigados quanto

à obediência aos critérios de inclusão e de exclusão, tal como os pescadores.

Foram excluídos os indivíduos com história prévia ou com alteração de exames complementares laboratoriais indicativos de: diabetes *mellitus*, nefropatia, hepatopatia, desnutrição, anemia, infecção ou alergia. Também foram excluídos os sujeitos com: depressão, vacinação há menos de três meses da coleta de dados, qualquer forma de neoplasia maligna, uso de quaisquer medicações ou suplementos alimentares.

Para triagem dos sujeitos da pesquisa quanto à existência de problemas relacionados ao consumo de álcool, utilizou-se o questionário *Alcohol Use Disorders Identification Test* (AUDIT). Foram categorizados como portadores de problema com alcoolismo os sujeitos que obtiveram pontuação igual ou maior que oito no AUDIT e, normais, com menos de oito pontos (Bush *et al.*, 1998).

4.4.3 Descrição amostral

Por meio de ficha clínica estruturada, padronizada para esta pesquisa, foram investigadas as variáveis de descrição amostral relativas a: idade, sexo (masculino ou feminino), tipo de pele (segundo classificação de Fitzpatrick, categorizada em tipos 1 a 6), estado civil (categorizado como solteiro, casado), grau de instrução (considerada como o maior nível de

escolaridade alcançado pelo sujeito), número de filhos, tipo e tempo de ocupação profissional (Apêndice B).

Foram também pesquisados, por anamnese estruturada dirigida à investigação dos fatores de risco para redução da competência imunológica dos sujeitos da pesquisa: classificação de adequação peso-estatura por índice de massa corpórea, obedecidos aos parâmetros do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) da Organização Mundial de Saúde (NIH, 2000); tempo de exposição diária à radiação solar expressa em horas; doenças atuais ou manifestadas num período máximo de 12 meses antecedendo a coleta de dados; antecedentes alérgicos; uso de medicações e suplementos alimentares auto-administrados ou prescritos por médico; tabagismo e história de submissão a procedimento cirúrgico ou vacinação, no trimestre anterior à coleta de dados.

Registraram-se os resultados de exames laboratoriais realizados para avaliação do estado geral e investigação de alterações que poderiam atuar como fator de confundimento por comprometer o estado imunológico dos sujeitos da pesquisa. Os exames laboratoriais foram: hemograma, eletroforese de proteínas, uréia, creatinina, glicemia, aspartato-aminotransferase (AST) e alanina-aminotransferase (ALT), assim como exame coproparasitológico de três amostras fecais de evacuações subseqüentes.

4.4.4 Caracterização amostral

Foram estudados 19 indivíduos do sexo masculino, com idade entre 30 e 60 anos e média etária de $46,3 \pm 9,5$ anos, pescadores residentes no bairro do Pina, em Recife, Pernambuco, Brasil, provenientes de uma colônia de profissionais registrados, com tempo médio de profissão igual a $29,0 \pm 10,3$ anos, que obedeceram aos critérios de inclusão e não aos de exclusão.

Como controles da quantificação de subpopulações de linfócitos em sangue dos pescadores analisados, foram empregados 10 indivíduos, do sexo masculino, moradores do bairro do Pina, exercendo profissão que não exigia exposição prolongada à radiação solar, com idade variando entre 26 e 58 anos, média etária igual a $42,5 \pm 11,6$ anos e exercício de ocupação incluída no Grande Grupo 7 ou 8 da Classificação Brasileira de Ocupações (Brasil, 2002).

No intuito de constatar a semelhança das características entre pescadores e não pescadores, assim como a obediência aos critérios de inclusão e não aos de exclusão, procedeu-se à análise estatística comparativa dos parâmetros demográficos, clínicos e laboratoriais.

Os pescadores tinham idade média igual a $46,3 \pm 9,54$ anos, variando entre 30 e 60 anos, enquanto que os não pescadores apresentaram média etária igual a $42,5 \pm 11,63$ anos e variação entre 26 e 58 anos. No entanto a diferença de idade não teve significância estatística ($p=0,377$) e a distribuição etária independeu do grupo a que o sujeito pertencia (Tabela 1).

Quanto à distribuição de tipo de pele, no grupo de pescadores, houve predomínio do tipo 4 da classificação de Fitzpatrick, enquanto que o tipo 6 esteve presente exclusivamente no grupo de não pescadores. Não se identificou diferença significativa entre os grupos quanto ao tipo de pele ($p=0,137$) (Tabela 1).

Dentre 14 pescadores que informaram estado civil, 71,4% declararam-se solteiros, enquanto que, dentre os não pescadores, houve predomínio de casados (70%), mas essa diferença não foi significativa ($p=0,095$) (Tabela 1).

Em relação à escolaridade, o grupo de pescadores diferiu estatisticamente dos não pescadores, pela maior frequência de iletrados (não sabiam ler ou escrever) (33,3%), assim como pela inexistência de indivíduos com segundo grau incompleto ou completo (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição etária, de tipo de pele, estado civil e escolaridade de pescadores e não pescadores – Recife - set 2005 a set 2006

Variável	Grupos		Comparação entre os grupos	
	estatística	Não pescadores	Pescadores	valor de p conclusão a 5%
Número de indivíduos	total	10 (34,5%)	19 (65,5%)	
Idade (anos)				teste de Mann-Whitney
média (dp)		42,5 (11,63)	46,3 (9,54)	0,377 ns
IC95% média		34,2; 50,8	41,7; 50,9	
1ºq; med; 3ºq		33,8; 41,5; 56,3	36,0; 47,0; 55,0	
Mínimo; máximo		26,0; 58,0	30,0; 60,0	
	freqüência			teste de independência*
≤ 40 anos (n)		50,0% (5)	26,3% (5)	0,244 ns
> 40 anos (n)		50,0% (5)	73,7% (14)	
coef.de Cramer			0,237	

continua

Variável	Grupos		Comparação entre os grupos	
	estatística	Não pescadores	Pescadores	valor de p conclusão a 5%
Tipo de pele				teste de independência**
freqüência				0,137 ns
tipo 2 (n)		40,0% (4)	36,8% (7)	
tipo 4 (n)		40,0% (4)	63,2% (12)	
tipo 6 (n)		20,0% (2)	0,0% (0)	
coef.de Cramer		0,392		
Estado Civil				teste de independência*
freqüência				0,095 ns
casado (n)		70,0% (7)	28,6% (4)	
solteiro (n)		30,0% (3)	71,4% (10)	
total (n)		100,0% (10)	100,0% (14)	
coef.de Cramer		0,392		
Escolaridade				teste de independência*
freqüência				0,018 s
não lê, não escreve (n)		0,0% (0)	33,3% (5)	
1º grau comp/incomp (n)		70,0% (7)	66,7% (10)	
2º grau comp/incomp (n)		30,0% (3)	0,0% (0)	
total (n)		100,0% (10)	100,0% (15)	
coef.de Cramer		0,560		

NOTA: dp - desvio padrão ; 1ºq - méd 3ºq - 1º quartil mediana 3º quartil; coef. Cramer – coeficiente de Cramer com valor zero se independência e variação entre zero e 1

* - Análise de independência feita pelo teste exato de Fisher

ns=não significante (p= 0,05) s=significante (p< 0,05)

Obedecendo ao critério de inclusão, todos os não pescadores exerciam profissões que não exigiam exposição prolongada ao sol. Os pescadores declararam exercer a profissão por um tempo médio de $29 \pm 10,3$ anos, com variação entre 12 e 45 anos, no que diferiram significativamente dos não pescadores, cujo tempo médio de profissão igualou-se a $13,8 \pm 9,3$ anos, com variação entre 5 e 34 anos ($p=0,001$) (Tabela 2).

O tempo de exposição diária ao sol dos pescadores foi de 12 h enquanto que, para o grupo de não pescadores, o tempo médio de exposição diária solar igualou-se a $1,2 \pm 0,42$ h, variando entre uma a duas horas. Nos grupos de pescadores e de não pescadores foi raro o tabagismo

e o uso de filtro solar e a diferença não foi significativa (ausência de uso: 100% do grupo de não pescadores e 94,1% dos pescadores) (Tabela 2).

A ingesta alcoólica foi referida por 80% do grupo de não pescadores e por 68,4% dos pescadores, variável que não esteve associada ao grupo a que o indivíduo pertencia ($p=0,567$) (Tabela 2).

Tabela 2 – Distribuição de tempo de profissão, tempo de exposição solar, uso de filtro solar, tabagismo e ingesta alcoólica de pescadores e não pescadores – Recife - set 2005 a set 2006

Variável	Grupos		Comparação entre os grupos	
	estatística	Não pescadores	Pescadores	valor de p conclusão a 5%
Tempo de profissão				teste de Mann-Whitney
média (dp)		13,8 (9,30)	29,0 (10,30)	0,001 s
IC95% média		7,2; 20,4	24,0; 34,0	
1ºq; méd; 3ºq		5,8; 11,0; 19,5	21,0; 30,0; 40,0	
Mínimo; máximo		5,0; 34,0	12,0; 45,0	
Tempo de exposição solar				
média (dp)		1,2 (0,42)	12,0 (0,00)	
IC95% média		0,9; 1,5		
1ºq; méd; 3ºq		1,0; 1,0; 1,2		
Mínimo; máximo		1,0; 2,0	12,0; 12,0	
Uso de filtro solar				teste de independência*
freqüência				1,000 ns
não (n)		100,0% (10)	94,1% (16)	
sim (n)		0,0% (0)	5,9% (1)	
total (n)		100,0% (10)	100,0% (17)	
coef.de Cramer		0,150		
Fumante				teste de independência*
freqüência				0,367 ns
não (n)		90,0% (9)	68,4% (13)	
sim (n)		10,0% (1)	31,6% (6)	
total (n)		100,0% (10)	100,0% (19)	
coef.de Cramer		0,240		
Bebida				teste de independência*
freqüência				0,567 ns
não (n)		20,0% (2)	31,6% (6)	
sim (n)		80,0% (8)	57,9% (11)	
às vezes (n)		0,0% (0)	10,5% (2)	
total (n)		100,0% (10)	100,0% (19)	
coef. de Cramer		0,253		

NOTA: dp - desvio padrão ; 1ºq - méd - 3ºq - 1º quartil mediana 3º quartil; coef. Cramer – coeficiente de Cramer com valor zero se independência e variação entre zero e 1

* - Análise de independência feita pelo teste exato de Fisher

ns=não significativa ($p=0,05$) s=significante ($p<0,05$)

Para efeito de comparação, os resultados da avaliação clínica dermatológica foram subdivididos em quatro itens: a) aspectos clínicos gerais, envolvendo peso, estatura, índice de massa corpórea (IMC) e pressão arterial; b) antecedentes de saúde, correspondendo a história de alergia, vacinação, cirurgia e internamento hospitalar, além do uso de medicamentos nos 12 meses que antecederam a pesquisa; c) achados ao exame dermatológico e d) achados de exames laboratoriais.

4.4.4.1 Aspectos clínicos gerais

Os pescadores apresentaram peso médio corporal maior que o dos não pescadores ($76,5 \pm 15,19$ kg e $67,3 \pm 9,96$ kg, respectivamente) e estatura semelhante ($1,7 \pm 0,06$ m e $1,7 \pm 0,05$ m, respectivamente), parâmetros pondo-estaturais que não diferiram significativamente entre os grupos ($p=0,164$ e $p=0,247$, respectivamente). No entanto, da análise do índice de massa corpórea se pode identificar diferença significativa entre esses dois grupos, estando os pescadores com IMC médio maior que o dos não pescadores ($27,6 \pm 4,64$ kg/m² e $23,3 \pm 3,11$ kg/m², respectivamente), ficando a obesidade de graus I ou II restrita a 42,1% dos pescadores (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição pondo-estatural de pescadores e não pescadores – Recife - set 2005 a set 2006

Variável	Grupo		Comparação entre os grupos	
	Não pescadores	Pescadores	valor de p	conclusão a 5%
Núm.de indivíduos				
estatística				
total	10 (34,5%)	19 (65,5%)		
Peso (kg)			teste de Mann-Whitney	
média (dp)	67,3 (9,96)	76,5 (15,19)	0,164	ns
IC95% média	60,2 ; 74,4	69,2; 83,8		
1ºq; méd; 3ºq	61,8: 67,0: 73,5	65,0: 79,0: 90,0		
mínimo; máximo	52,0: 84,0	49,0: 100,0		
Altura (m)			teste de Mann-Whitney	
média (dp)	1,7 (0,05)	1,7 (0,06)	0,247	ns
IC95% média	1,7; 1,7	1,6; 1,7		
1ºq; méd; 3ºq	1,7: 1,7: 1,7	1,6: 1,7: 1,7		
Mínimo; máximo	1,6: 1,8	1,5: 1,8		
IMC (kg/m²)			teste de Mann-Whitney	
média (dp)	23,3 (3,11)	27,6 (4,64)	0,016	s
IC95% média	21,1 ; 25,6	25,3; 29,8		
1ºq; med; 3ºq	20,5: 23,7: 25,6	24,5: 26,1: 32,0		
mínimo; máximo	19,1: 28,0	20,4: 35,3		
freqüência			teste de independência *	
normal (n)	80,0% (8)	36,8% (7)	0,058	ns
sobrepeso (n)	20,0% (2)	21,1% (4)		
obeso grau I (n)	0,0% (0)	36,8% (7)		
obeso grau II (n)	0,0% (0)	5,3% (1)		
coef. de Cramer		0,476		

NOTA: dp - desvio padrão; 1ºq méd 3ºq - 1º quartil mediana 3º quartil; coef. Cramer – coeficiente de Cramer com valor zero se independência e variação entre zero e 1; IMC – índice de massa corpórea

* - Análise de independência feita pelo teste exato de Fischer

ns=não significante (p= 0,05) s=significante (p< 0,05)

Quanto à pressão arterial, identificou-se que os pescadores apresentaram pressões médias sistólica e diastólica maiores que os não pescadores (141,6 ± 19,79 mm Hg e 123,0 ± 10,59 mm Hg, respectivamente para pressão sistólica, e 85,8 ± 12,16 mm Hg e 79,0 ± 5,68 mm Hg, respectivamente, para pressão diastólica). Os pescadores apresentaram também pressão arterial média significativamente maior que a de não pescadores (104,4 ± 13,70 mm Hg e 93,7 ± 6,93 mm Hg, respectivamente) (p=0,019). Houve diferença significativa entre pescadores e não pescadores

em relação à pressão arterial sistólica média ($p=0,009$), sendo significativamente mais freqüente a normotensão arterial entre não pescadores e pressão limítrofe ou hipertensão sistó-diastólica, entre pescadores ($p=0,028$) (Tabela 4).

Tabela 4 – Distribuição de pressão arterial de pescadores e não pescadores – Recife - set 2005 a set 2006

Variável	Grupo		Comparação entre os grupos	
	Não pescadores	Pescadores	valor de p	conclusão a 5%
Núm.de indivíduos				
total	10 (34,5%)	19 (65,5%)		
Pressão sistólica			teste de Mann-Whitney	
média (dp)	123,0 (10,59)	141,6 (19,79)	0,009	s
IC95% média	115,4; 130,6	132,0; 151,1		
1ºq; méd; 3ºq	117,5; 120,0; 132,5	130,0; 140,0; 160,0		
mínimo; máximo	110,0; 140,0	110,0; 180,0		
Pressão diastólica			teste de Mann-Whitney	
média (dp)	79,0 (5,68)	85,8 (12,16)	0,211	ns
IC95% média	74,9; 83,1	79,9; 91,7		
1ºq; méd; 3ºq	77,5; 80,0; 80,0	80,0; 80,0; 90,0		
mínimo; máximo	70,0; 90,0	70,0; 110,0		
Pressão média			teste de Mann-Whitney	
média (dp)	93,7 (6,93)	104,4 (13,70)	0,019	s
IC95% média	88,7; 98,6	97,8; 111,0		
1ºq; méd; 3ºq	90,8; 93,3; 97,5	93,3; 100,0; 106,7		
mínimo; máximo	83,3; 106,7	83,3; 133,3		
HAS			teste de independência*	
freqüência				
normal/ótima (n)	80,0% (8)	26,3% (5)	0,028	s
limítrofe (n)	0,0% (0)	15,8% (3)		
hipertensão (n)	0,0% (0)	31,6% (6)		
sistólica isolada (n)	20,0% (2)	26,3% (5)		
coef. de Cramer	0,559			

NOTA: dp - desvio padrão; 1ºq méd 3ºq - 1º quartil mediana 3º quartil; coef. Cramer – coeficiente de Cramer com valor zero se independência e variação entre zero e 1, HAS – hipertensão arterial sistêmica

* - Análise de independência feita pelo teste exato de Fisher

ns=não significante ($p=0,05$) s=significante ($p<0,05$)

4.4.4.2 Antecedentes de saúde

Apenas entre os não pescadores, houve referência de prurido cutâneo (1 pescador; 25%) e de rinite a poeira (1 pescador; 25%).

Nenhum dos não pescadores referiu uso de medicamentos nos 12 meses que antecederam a pesquisa, mas sete (36,8%) pescadores fizeram tal relato, estando um (14,3%) em uso de medicação anti-hipertensiva, cinco (71,4%), de antiinflamatório não hormonal e um (14,3%), de antiácido.

Não houve qualquer referência, por parte dos pescadores e não pescadores, de cirurgia, vacinação e internamento hospitalar nos 12 meses que antecederam a pesquisa.

4.4.4.3 Resultados de exames laboratoriais

No hemograma, foram diagnosticados sete (36,8%) pescadores e dois (20%) não pescadores com discreta redução da concentração de hemoglobina. Este achado se refletiu no grupo de pescadores por um valor médio significativamente menor que no grupo dos não pescadores ($14,5 \pm 0,91$ g/dL e $15,4 \pm 0,88$ g/dL, respectivamente) ($p=0,031$) (Tabela 5). No entanto, nenhum desses sujeitos de pesquisa apresentava sintomas ou sinais clínicos sugestivos de anemia.

Quanto aos leucócitos, não se observou diferença significativa entre pescadores e não pescadores, conforme demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5 – Distribuição de alterações hematológicas diagnosticadas em pescadores – Recife - set 2005 a set 2006

Variável	Grupo		Comparação entre os grupos	
	estatística	Não pescadores	Pescadores	valor de p conclusão a 5%
Num.de indivíduos	total	10 (34,5%)	19 (65,5%)	
Hemoglobina				teste de Mann-Whitney
média (dp)		15,4 (0,88)	14,5 (0,91)	0,031 s
IC95% média		14,8; 16,1	14,1; 15,0	
1ºq; méd; 3ºq		14,6; 15,5; 16,2	13,9; 14,6; 15,1	
mínimo; máximo		14,3; 16,8	12,9; 16,4	
Hematócrito				teste de Mann-Whitney
média (dp)		46,1 (3,01)	43,7 (2,92)	0,050 ns
IC95% média		43,9; 48,2	42,3; 45,1	
1ºq; méd; 3ºq		42,7; 46,3; 49,7	40,6; 44,1; 45,4	
mínimo; máximo		42,5; 49,8	39,3; 49,5	
Leucócitos				teste de Mann-Whitney
média (dp)		6,93 (1,648)	7,15 (2,134)	0,982 ns
IC95% média		5,75; 8,11	6,12; 8,18	
1ºq; méd; 3ºq		5,75; 6,15; 9,00	5,00; 7,00; 8,20	
mínimo; máximo		5,00; 9,00	4,00; 11,70	
Bastonetes				teste de independência *
freqüência				
valor 1 (n)		0,0% (0)	5,3% (1)	1,000 ns
valor 0 (n)		100,0% (10)	94,7% (18)	
Segmentados				teste de Mann-Whitney
média (dp)		62,4 (9,72)	55,7 (10,05)	0,138 ns
IC95% média		55,4; 69,4	50,9; 60,6	
1ºq; méd; 3ºq		54,8; 63,5; 71,3	49,0; 56,0; 62,0	
mínimo; máximo		47,0; 74,0	34,0; 74,0	
Eosinófilos				teste de Mann-Whitney
média (dp)		2,8 (1,69)	5,4 (6,21)	0,804 ns
IC95% média		1,6; 4,0	2,4; 8,4	
1ºq; méd; 3ºq		1,8; 2,0; 4,3	1,0; 2,0; 8,0	
mínimo ; máximo		1,0; 6,0	1,0; 20,0	
Basófilos				teste de independência *
valor 1 (n)		0,0% (0)	5,3% (1)	1,000 ns
valor 0 (n)		100,0% (10)	94,7% (18)	
Linfócitos típicos				teste de Mann-Whitney
média (dp)		26,8 (8,46)	31,1 (8,15)	0,330 ns
IC95% média		20,8; 32,8	27,1; 35,0	
1ºq; méd; 3ºq		19,0; 25,0; 34,0	26,0; 30,0; 37,0	
mínimo; máximo		19,0; 41,0	17,0; 47,0	
Linfócitos atípicos				teste de Mann-Whitney
valor 2 (n)		10,0% (1)	5,3% (1)	1,000 ns
valor 1 (n)		0,0% (0)	5,3% (1)	
valor 0 (n)		90,0% (9)	89,5% (17)	
coef.de Cramer		0,160		
Monócitos				teste de Mann-Whitney
média (dp)		7,8 (1,69)	7,6 (2,12)	0,573 ns
IC95% média		6,6; 9,0	6,6; 8,6	
1ºq; méd; 3ºq		6,8; 7,5; 9,3	6,0; 7,0; 9,0	
mínimo; máximo		5,0; 10,0	5,0; 13,0	

NOTA: dp - desvio padrão; 1ºq méd 3ºq - 1º quartil mediana 3º quartil; coef Cramer – coeficiente de Cramer com valor zero se independência e variação entre zero e 1

* - Análise de independência feita pelo teste exato de Fisher

ns=não significante (p= 0,05) s=significante (p< 0,05)

Considerando-se as dosagens bioquímicas a que foram submetidos ambos os grupos, identificou-se diferença significativa exclusivamente no aumento da fração beta da eletroforese de proteínas dos pescadores ($p=0,021$) (Tabela 6).

Tabela 6 – Distribuição de dosagens bioquímicas de pescadores e não pescadores – Recife - set 2005 a set 2006

Variável	Grupo		Comparação entre os grupos	
	estatística	Não pescadores	Pescadores	valor de p conclusão a 5%
Albumina				teste de Mann-Whitney
média (dp)		63,38 (2,544)	60,80 (4,076)	0,151 ns
IC95% média		61,56; 65,20	58,84; 62,77	
1ºq; méd; 3ºq		61,30:63,49:64,43	56,31:60,40: 65,16	
mínimo; máximo		60,20: 68,96	54,72: 67,06	
Alfa1				teste de Mann-Whitney
média (dp)		2,78 (0,536)	2,68 (0,655)	0,542 ns
IC95% média		2,39; 3,16	2,37; 3,00	
1ºq; méd; 3ºq		2,23: 2,78: 3,18	2,25: 2,45: 2,96	
mínimo ; máximo		2,07: 3,81	2,07: 4,46	
Alfa2				teste de Mann-Whitney
média (dp)		7,22 (1,078)	7,54 (1,277)	0,668 ns
IC95% média		6,45; 7,99	6,93; 8,16	
1ºq; méd; 3ºq		6,21: 6,82: 8,21	6,39: 7,52: 7,89	
mínimo; máximo		6,02: 9,12	6,12: 10,52	
Beta				teste de Mann-Whitney
média (dp)		10,47 (0,823)	11,61 (1,220)	0,021 s
IC95% média		9,88; 11,06	11,02; 12,19	
1ºq ; méd; 3ºq		9,79: 10,39:11,13	10,77: 11,68: 12,65	
mínimo; máximo		9,36: 11,88	9,22: 13,36	
Gama				teste de Mann-Whitney
média (dp)		16,54 (2,250)	17,45 (2,940)	0,456 ns
IC95% média		14,93; 18,15	16,048,87	
1ºq; méd; 3ºq		14,69:17,02:18,42	14,72: 18,20 : 18,73	
mínimo ; máximo		12,62: 18,91	12,77: 23,41	
Proteínas totais				teste de Mann-Whitney
média (dp)		7,35 (0,395)	7,28 (0,308)	0,573 ns
IC95% média		7,07; 7,63	7,13; 7,43	
1ºq; med; 3ºq		7,15: 7,30: 7,63	7,00: 7,30: 7,50	
mínimo ; máximo		6,60: 8,00	6,80: 8,00	
Razão A/G				teste de Mann-Whitney
média (dp)		1,77 (0,154)	1,57 (0,253)	0,050 ns
IC95% média		1,65; 1,88	1,45; 1,69	
1ºq; méd; 3ºq		1,68: 1,77: 1,87	1,40: 1,53: 1,83	
mínimo; máximo		1,51: 2,03	1,21: 2,04	
Uréia				teste de Mann-Whitney
média (dp)		33,0 (14,96)	29,5 (7,95)	0,839 ns
IC95% média		22,3; 43,7	25,6; 33,3	
1ºq med; 3ºq		22,8: 29,0: 35,3	21,0: 30,0: 38,0	
mínimo ; máximo		22,0: 73,0	17,0: 40,0	

continua

Variável	Grupo		Comparação entre os grupos	
	estatística	Não pescadores	Pescadores	valor de p conclusão a 5%
Creatinina				teste de Mann-Whitney
média (dp)		0,9 (0,08)	1,0 (0,14)	0,151 ns
IC95% média		0,9 ; 1,0	0,9 ; 1,1	
1ºq ; med ; 3ºq		0,9 : 0,9 : 0,9	0,9 : 1,0 : 1,1	
mínimo ; máximo		0,8 : 1,1	0,8 : 1,3	
Glicemia				teste de Mann-Whitney
média (dp)		90,80 (6,510)	95,90 (11,060)	0,286 ns
IC95% média		86,10; 95,50	90,60; 101,20	
1ºq; med; 3ºq		84,50:91,50:95,00	90,00: 93,00: 98,00	
mínimo ; máximo		81,00: 103,00	82,00: 125,00	
Alanina aminotransferase				teste de Mann-Whitney
média (dp)		26,4 (7,69)	27,5 (8,35)	0,636 ns
IC95% média		20,9; 31,9	23,5; 31,6	
1ºq; med; 3ºq		20,5: 22,5: 35,5	21,0: 25,0: 34,0	
mínimo; máximo		18,0: 38,0	15,0: 45,0	
Aspartato aminotransferase				teste de Mann-Whitney
média (dp)		31,1 (20,93)	42,3 (19,99)	0,077 ns
IC95% média		16,1; 46,1	32,7; 51,9	
1ºq; med; 3ºq		13,0: 25,5 : 44,8	26,0: 32,0: 64,0	
mínimo; máximo		11,0: 77,0	19,0: 80,0	

NOTA: dp - desvio padrão; 1ºq med 3ºq - 1º quartil mediana 3º quartil; coef.Cramer – coeficiente de Cramer com valor zero se independência e variação entre zero e 1, ALT – alanina aminotransferase;

AST – aspartato aminotransferase

ns=não significativa (p= 0,05) s=significante (p< 0,05)

Ao exame coproparasitológico, foi diagnosticada infestação por *Ascaris lumbricoides* em um pescador, que foi submetido ao tratamento com mebendazol, no esquema de um comprimido de 100 mg, duas vezes ao dia, durante três dias consecutivos.

4.5 Métodos

4.5.1 Avaliação clínica dermatológica

Do exame clínico dermatológico, foram consideradas quaisquer alterações presentes em pele, mucosas ou anexos, independente dos fatores etiológicos envolvidos.

4.5.2 Exame histopatológico em biópsia de pele

4.5.2.1 Biópsia de pele

Cada pescador foi submetido a duas biópsias de pele íntegra com *punch* de 4 mm, sob anestesia local com lidocaína sem vasoconstritor: uma na linha média do terço cranial próxima à região cranial medial da escápula, área esta exposta ao sol, e outra, na linha média da região glútea esquerda, correspondente à área não exposta à radiação solar (área coberta). Os fragmentos de biópsia, assim que colhidos, foram fixados em solução de formol a 10%, tamponado (pH 7,4).

Os espécimes foram processados por técnicas histológicas de rotina e, posteriormente, seccionados em cortes de 4 µm de espessura. Cada corte histológico foi estendido em uma lâmina de vidro, com dimensões de 26 x 76 mm, recoberto por solução adesiva de 3-aminopropiltrioetoxissilano (*Marca Sigma Chemical[®]*, cód. A3648) na concentração de 3%, em acetona PA.

4.5.2.2 Exame histopatológico de biópsia de pele

Os cortes histológicos foram corados pelo método de hematoxilina-eosina, obedecida a rotina do Laboratório de Dermatopatologia do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao exame microscópico, para cada uma das biópsias, foram observadas hiperqueratose, média do número de camadas de células da epiderme nos cones epiteliais e nos segmentos de epiderme entre cones epiteliais. Na derme, foram investigadas: presença ou ausência de elastose solar, ectasia dos vasos sanguíneos dérmicos superficiais, intensidade, composição e localização do infiltrado inflamatório (se em torno das estruturas vasculares superficiais e/ou profundas). Os achados histológicos foram categorizados segundo intensidade em: ausente, leve, moderado ou intenso.

4.5.2.3 Demonstração de mastócitos em biópsias de pele

Para a quantificação dos mastócitos, procedeu-se à coloração de secções de biópsia de pele com solução aquosa de azul de toluidina-HCl a 0,5%, sendo reconhecidos por microscopia óptica por meio da presença dos grânulos citoplasmáticos corados em púrpura.

4.5.2.4 Análise imuno-histoquímica de biópsia de pele para quantificação de células de Langerhans, de subpopulações de linfócitos e de monócitos/macrófagos

Os cortes histológicos foram submetidos à técnica imuno-histoquímica da estreptavidina-biotina peroxidase (modificado de Hsu *et al.*, 1981) para demonstração de linfócitos T CD8+, células NK e células de Langerhans. Os marcadores CD4 e CD68 foram determinados empregando o método de detecção *StreptoABComplex/HRP (Kit Duet, Mouse/Rabbit, code nº. K0492, Dako Cytomation® , Carpinteria, California)*.

No Quadro 4, apresentam-se os anticorpos monoclonais utilizados, segundo procedência, diluições de uso e células por eles marcadas.

Quadro 4 – Anticorpos monoclonais utilizados

Anticorpo	Código/Marca	Diluição	Células Marcadas
Mouse anti-human T cell CD4(OPD4)	Labvision Corportion®	1:200	Linfócitos T CD4+
Mouse anti-human T cell (CD8)	M7103 / DAKO	1:50	Linfócitos T CD8+
Mouse anti-CD56	MS204-P / Neomarkers	1:20	Células natural <i>killer</i>
Mouse anti-CD1a	1590 - Immunotech	Puro	Células de Langerhans
Mouse anti-CD45RO		1:50	Linfócitos T ativados
Mouse monoclonal anti-CD68	MO814 – Dako Cytomation	1:800	Monócitos/Macrófagos

FONTE: Concepção da Autora

As reações imuno-histoquímicas para identificação de CD56, CD8 e CD1a foram feitas de acordo com o protocolo descrito a seguir. Retirou-se a parafina dos cortes histopatológicos por meio de dois banhos de xilol, um a 58° C, durante 30 min, e outro, à temperatura ambiente. O material foi, então, hidratado em seqüência de concentração decrescente de etanol (absoluto, 95% e 70%) por 20 s, cada. Seguiu-se uma lavagem com água destilada, durante 5 min, e o bloqueio da peroxidase endógena em câmara escura com três incubações em água oxigenada a 3%, durante 10 min cada, e, em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada por 10 min. Para a reação com anticorpo anti-CD56, fez-se a exposição antigênica por meio de calor úmido com o uso de panela de vapor e banho com a solução “*Target retrieval solution*” (Dako®, código S1699), diluída a 1/10. Após esses procedimentos, fez-se o bloqueio de proteínas do tecido com incubação em solução de leite desnatado (Molico®, Nestlé) a 10%, durante 30 min, à temperatura ambiente. A seguir, procedeu-se à incubação das lâminas com os anticorpos primários, diluídos em solução 1% de albumina bovina fração V (Serva®, cód. 11930) acrescida de azida sódica 0,1% em solução salina

0,01M tamponada com fosfato (pH 7,4) (PBS) durante toda a noite, a 4°C. Os preparados foram então lavados, por duas vezes, em PBS, por 5 min cada, antes de se proceder à incubação com o anticorpo secundário anti-imunoglobulina de camundongo produzido em cabra (Dako®, cód. K492), diluído 1:1000 em PBS, durante 30 min, a 37°C. As lâminas foram, a seguir, lavadas em PBS e incubadas com o complexo SABC (Dako®, cód. K492), diluído 1:1000 em PBS, durante 30 min, a 37°C. Para as reações com os anticorpos anti-CD8 e anti-CD1a, utilizou-se sistema de amplificação CSA (*Catalysed Signal Amplification*, Dako®, cód. K1500), que consiste da utilização do reagente biotinil-tiramida após a incubação com o complexo SABAC, durante 15 min. Esse reagente tem por finalidade a multiplicação da biotina presente no sistema. Finalmente, as lâminas foram incubadas com estreptavidina conjugada à enzima peroxidase e, após nova lavagem em PBS, os sítios de reação foram revelados com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3'-diaminobenzidina, *Sigma Chemical Co*®, Saint Louis, USA, cód. D5637) 0,03%, acrescida de 1,2 mL de água oxigenada a 3%. A intensidade de cor foi controlada ao microscópio óptico por meio dos controles positivos, que acompanhavam cada reação. Na seqüência, os cortes histológicos foram lavados em água corrente por 10 min, contra-corados com hematoxilina de *Harris* por 10 s, lavadas em água corrente, desidratadas em etanol e diafanizadas em xilol. A seguir as lâminas foram cobertas com resina *Permout* (*Fisher Scientific, Fair Lawn*®, USA, cód. SP15-100) e montadas com lamínula de vidro.

As reações imuno-histoquímicas para identificação de CD4 e CD68 foram feitas de acordo com o protocolo a seguir. Os preparados histológicos foram submetidos à reação de imuno-histoquímica, utilizando o método de detecção *StreptoABComplex/HRP (Kit Duet[®], Mouse/Rabbit, code nº. K0492, Dako Cytomation[®], Carpinteria, California)*. Seguiu-se desparafinização em dois banhos de xilol, um a 58°C, durante 30 min, e outro à temperatura ambiente. Posteriormente, os preparados foram hidratados por imersão em uma série de concentração decrescente de etanol (100%, 95% e 70%), por 20 s, cada. Uma lavagem em água destilada, por 5 min, foi procedida e as secções histológicas recuperadas para os antígenos, utilizando solução de ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) (*Merck[®], Germany*) a 0,01M, pH 6,0, em panela de pressão, por 2 min.

As lâminas, então, foram resfriadas, por 20 min, à temperatura ambiente, e foi procedida nova lavagem em água corrente, por 10 min. O bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 20 volumes durou 20 min e nova lavagem em água destilada, por 5 min, foi realizada, seguida por uma lavagem em Tris-HCl, por 5 min. Os anticorpos primários CD4 e CD68, diluídos em solução de albumina bovina a 1%, (cód. A- 6003, *Sigma[®], St. Louis, USA*), foram incubados em câmara úmida, à temperatura de 4°C por um período de 12 h, e uma lavagem por três vezes em tampão Tris-HCl (pH 7,4–7,6), por 5 min, foi procedida. Na seqüência, fez-se incubação com anticorpo secundário biotinilado (*Kit Duet[®]*), em câmara úmida, à temperatura ambiente, por 30 min. Nova lavagem foi realizada, em tampão Tris-HCl (pH 7,4–7,6), por 5 min, por três vezes. Na seqüência, o

complexo estreptoavidina-biotina (*Kit Duet*[®]) foi incubado em câmara úmida, à temperatura ambiente, por 30 min. Nova lavagem em tampão Tris-HCl (pH 7,4–7,6), por 5 min, por três vezes foi realizada. Procedeu-se à revelação da reação, com 60 mg de diaminobenzidina (*Sigma*[®], *Saint Louis, USA*) diluídos em 100 mL de Tris-HCl, acrescido de 600 µL de peróxido de hidrogênio a 6%, e, então, se fez o controle da revelação pela observação ao microscópio óptico. Nova lavagem em tampão Tris-HCl (pH 7,4–7,6), por 5 min, por três vezes, foi realizada seguida de uma lavagem em água destilada, durante 5 min. A contra-coloração com hematoxilina de Harris, por 1 min, foi então procedida seguida de nova lavagem em água destilada, durante 5 min. Finalmente, os cortes histológicos foram desidratados pela passagem em cadeia de concentração crescente de etanol (70%, 95% e 100%), seguida de passagem em xilol (dois banhos) e os preparados montados em resina *Permount* (*Fisher Scientific*[®], *USA*), com lamínula de vidro, para leitura em microscópio óptico.

Os tempos de lavagem com tampão e de incubação foram seguidos rigorosamente, de acordo com as instruções dos fabricantes. Fragmentos histológicos de gânglio linfático para os subtipos de linfócitos e células NK e de biópsia de pele de histiocitose X, para células CD1a+, foram utilizados como controles positivos das reações. O controle negativo de cada reação foi obtido por meio da substituição dos anticorpos primários por PBS.

4.5.2.5 Quantificação dos elementos celulares imunomarcados ou corados

O número de linfócitos T CD4+, CD8+, células *natural killer*, monócitos/macrófagos CD68, CD45RO e mastócitos foi obtido por meio da contagem do número de células imunomarcadas dérmicas, utilizando-se ocular de 10x com grátícula e objetiva de 40X. A área do quadrículo, nesse aumento, corresponde a 0,0625 mm².

Para cada um dos fragmentos, foram analisadas as áreas de pelo menos seis campos (três junto aos vasos do plexo dérmico superficial e três em plano mais profundo da derme). Desse modo, obteve-se a média do número de células imunomarcadas por milímetro quadrado de área de derme.

A avaliação de células CD1a+ epidérmicas (células de Langerhans) foi obtida por meio da fração de área epidérmica com expressão de antígeno CD1a (Bieber *et al.*, 1988). Optou-se por esse método de aferição uma vez que as células de Langerhans exibem dendritos que se dispõem por entre os queratinócitos e podem se anastomosar, o que torna difícil a individualização das células para contagem. A fração de área CD1a+ foi obtida pela contagem do número de pontos (cruzamento de duas retas na grátícula) que incidiam sobre reação positiva, dividido pelo total de pontos que incidam sobre a epiderme, excluída a camada córnea. Para isso, utilizaram-se a mesma ocular de 10X com grátícula e objetiva de 40X. Toda a epiderme de cada fragmento de pele foi avaliada.

4.5.3 Quantificação de subpopulações de linfócitos em amostra de sangue, por citometria de fluxo

Cada sujeito da pesquisa (pescador e não pescador) foi submetido à coleta de 10 mL de sangue total, por meio de punção periférica em veia cefálica mediana, utilizando tubo a vácuo contendo etileno-diamino-tetracetato de potássio (EDTA) na concentração final de 1 mg/dL. Todas as amostras foram rotuladas com o nome do respectivo sujeito da pesquisa.

De cada um deles, um tubo de sangue contendo 4,5 mL em EDTA foi enviado para o Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica e Experimental – LIM 56 - Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por via aérea, sendo processadas, em média, 24 h após a coleta.

A cada 50 µL de sangue total homogeneizado, foi adicionado volume de 1 µL a 5 µL de anticorpo monoclonal, de fabricação *IMMUNOTECH*[®], marcado por corantes diferentes, de tal forma que as subpopulações celulares puderam ser distinguidas por citometria de fluxo. Os anticorpos monoclonais empregados estão discriminados no Quadro 5.

Após incubação por 20 min, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as amostras foram transferidas para equipamento MULTI Q-PREP (*Beckman-Coulter*[®], USA) e receberam adição de solução lisante de hemácias IMMUNOPREP (*Beckman-Coulter*[®], USA). Em seguida, foram analisadas em citômetro de fluxo marca EPICS-XL MCL (*Beckman-Coulter*[®], USA), equipado com laser de argônio, em comprimento de onda de 488 nm,

com capacidade para análise de quatro fluorescências diferentes, por meio do programa *SISTEM II*, após alinhamento do laser com a utilização de pérolas de poliestireno marcadas com corante 4-fluorescente (Quadro 5). Foram adquiridas imagens de 5.000 células, num *gate* de linfócitos, empregando-se gráfico de coordenadas cartesianas com abscissa para análise de dispersão frontal e ordenadas, para dispersão lateral (FS x SS). O gráfico esteve composto por quatro quadrantes identificados pela sigla FL (fluorescência) e direção do eixo: FL1 x FL2, FL1 x FL3, FL4 x FL2 e FL4 x FL3. As imagens capturadas foram reanalisadas no módulo de listagem (*LISTMODE*), adotando como *gate* a contagem de CD3+. Os valores relativos de contagem das subpopulações de linfócitos e de HLA foram convertidos em contagem absoluta, com base no total de linfócitos determinado em contador hematológico de células, modelo STKS (*Beckman-Coulter*® – USA), aproximadamente no período de 24 h pós-coleta.

Quadro 5 – Especificação técnica dos reagentes empregados para quantificação de subpopulações de linfócitos em amostra de sangue total

Reagentes	especificação técnica da IMMUNOTECH®
Anticorpos Monoclonais	
CD3 isotiocianato de fluoresceína/CD16-56 ficoeritrina	IM 2076
IGG1 Isotiocianato de fluoresceína /IGG1 ficoeritrina /IGG1 5-cianoficoeritrina	IM 1672
CD4 isotiocianato de fluoresceína	IM 0448
CD3 5-cianoficoeritrina	IM 2635
CD8 ficoeritrina-Texas Red – X	737659
CD8 isotiocianato de fluoresceína	IM 2638
CD19 5-cianoficoeritrina	IM 2643
CD25 cianoficoeritrina	IM 0479
CD45 RO - ficoeritrina-Texas Red – X	IM 2711
CD45 RA - ficoeritrina-Texas Red – X	IM 2712
CD28 ficoeritrina	IM 2071
HLA-DR ficoeritrina	IM 2741
CD69 ficoeritrina	IM 1943
Fluoroesferas de controle	6605359
Solução lisante IMMUNOPREP	7546999

FONTE: Concepção da Autora

4.5.4 Colheita dos dados

Em uma sala especialmente cedida para a pesquisa, no Ambulatório do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, a cada pescador e não pescador foi solicitado o preenchimento do questionário AUDIT para investigação de distúrbio por consumo inadequado de álcool, identificado pela presença de uma soma de pontos igual ou maior que oito. Nessa etapa, foram excluídos 21 pescadores e sete não pescadores (Figura 4).

Cada um dos pescadores e dos não pescadores foi submetido pela pesquisadora à anamnese dirigida e ao exame clínico dermatológico, com documentação fotográfica das lesões diagnosticadas em pele, mucosa ou anexos da pele. Nessa etapa, foram excluídos 10 pescadores e três não pescadores.

Procedeu-se então à coleta de amostra de sangue venoso periférico, que foi subdividida em duas alíquotas. Uma foi empregada para a realização dos exames complementares laboratoriais bioquímicos e citohematológicos, para identificação de presença de critérios de exclusão devido a doenças pré-existentes à época da colheita de dados. A segunda alíquota foi enviada para o Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica e Experimental – LIM 56 - Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por via aérea, para quantificação de células imunocompetentes em sangue circulante por citometria de fluxo. Nessa etapa, foi excluído um pescador, por diagnóstico de leucemia linfóide.

Num terceiro momento, a pesquisadora submeteu os pescadores à colheita de material de biópsia de pele, para determinação dos marcadores imunológicos e exame histopatológico, realizados no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Na Figura 4, estão detalhados os eventos ocorridos durante o levantamento amostral.

Figura 4– Esquema amostral dos 19 pescadores segundo critérios de inclusão e de exclusão – Recife, Setembro 2005-Setembro 2006

NOTA: Estão representados os 10 não pescadores.

FONTE: Concepção da Autora

4.6 Aspectos éticos

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, informando o caráter da pesquisa, foi fornecido e assinado por todos os pescadores e não pescadores, antes do início dos exames (Apêndice A).

Após aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo, a pesquisadora participou de uma reunião com os pescadores, na Colônia do bairro do Pina, Recife, Pernambuco, na qual lhes explicou os objetivos da pesquisa e a importância da participação dos pescadores. Enfatizou os direitos do participante da pesquisa ao sigilo de qualquer dado que o identifique neste ou em qualquer trabalho que venha a ser publicado com os dados gerados da pesquisa e o de desistência de participação a qualquer tempo, sem prejuízo de atendimento de saúde que viesse a necessitar. Setenta e cinco pescadores manifestaram o desejo de participação, tendo assinado o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Apêndice A).

4.7 Processamento e análise de dados

Para descrição amostral, foram empregados os parâmetros da estatística descritiva na caracterização de variáveis em escala intervalar,

compreendendo: média, mediana, quartis e desvio padrão. Para as variáveis em escala nominal ou ordinal, empregou-se a distribuição de frequências absolutas e relativas.

Para testar a hipótese de igualdade entre os grupos de pescadores e não pescadores utilizou-se o teste de *Mann-Whitney*, assim como o teste exato de Fisher, para análise de independência entre o grupo e as características analisadas. Em ambos os testes, adotou-se nível de significância igual a 0,05, monocaudal à direita.

Para a análise de independência entre os grupos de pescadores e de não pescadores, empregou-se o coeficiente de *Cramer*, cujo valor zero correspondeu à independência.

Na comparação entre os achados histopatológicos e imunológicos de pele coberta e exposta à radiação solar, foram empregados o teste de *Wilcoxon*, admitindo-se como hipótese nula a igualdade entre as duas regiões biopsiadas, assim como o teste de sinais para determinação da relação entre as variáveis estudadas e a região biopsiada. Os dois testes foram realizados admitindo-se nível de significância de 0,05, monocaudal à direita.

5 RESULTADOS

5.1 Achados ao exame dermatológico

Ao exame dermatológico, não foram diagnosticadas alterações em cabeça, face, tronco, membros superiores e inferiores, mãos, pés e unhas do grupo dos não pescadores, assim como estiveram ausentes alterações em cavidade oral.

Dentre os pescadores, foram diagnosticadas as alterações constantes da Tabela 7. Independente de distribuição topográfica, a elastose (Fotos 1, 2 e 3), a melanose solar (Fotos 4, 5, 6) e a hiperqueratose (Fotos 7, 8) foram mais freqüentes. Houve um caso de queilite actínica (Foto 9). As distrofias ungueais foram diagnosticadas acometendo quirodáctilos e pododáctilos (Fotos 10, 11 e 12).

**Tabela 7 – Distribuição de alterações dermatológicas diagnosticadas em pescadores
– Recife - set 2005 a set 2006**

Alterações dermatológicas	Frequência	Percentual
Face		
Elastose	6	28,6
Melanose solar	2	10,6
Nevos	2	10,6
Cicatriz de acne	1	5,3
Eférides	1	5,3
Tronco		
Elastose	6	28,6
<i>Ptíriasis versicolor</i>	1	5,3
Ceratose seborréica	1	5,3
Melanose solar e efélides	1	5,3
Nevos	1	5,3
Membros superiores		
Melanose solar	1	5,3
Lipoma	1	5,3
Mãos		
Hiperceratose palmar	9	47,4
Elastose	6	28,6
Nevos	1	5,3
Membros inferiores		
Ceratose seborréica e melanose solar	1	5,3
Melanose solar	1	5,3
Pés		
Hiperceratose	5	26,4
Hiperceratose fissurada	1	5,3
Amputação de hálux	2	10,6
Unhas		
Distrofia	2	10,6
Onicofagia	1	5,3
Cavidade oral		
Dentes em estado precário	10	52,6
Queilite solar	1	5,3

NOTA: Percentuais calculados para 19 pacientes, porque cada paciente apresentava mais de uma alteração dermatológica, em topografias distintas.

Foto 1 - Elastose solar em pescoço

FONTE: Foto da Autora

Foto 2 – Bronzeamento e enrugamento da pele em face

FONTE: Foto da Autora

Foto 3 – Elastose em dorso de mão e quirodáctilos
FONTE: Foto da Autora

Foto 4 – Melanose solar em sulco nasogeniano
FONTE: Foto da Autora

Foto 5 – Elastose, efélides e melanose solar em dorso

FONTE: Foto da Autora

Foto 6 – Elastose, queratose seborréica e melanose solar em tórax

Observar enrugamento, presença de efélides, angiomas estelares, discromia (melanoses e acromias). Em algumas áreas há afinamento da pele, que se alterna por regiões espessadas.

FONTE: Foto da Autora

Foto 7 – Hiperceratose palmar ocupacional
FONTE: Foto da Autora

Foto 8 – Hiperceratose plantar fissurada em calcâneo
FONTE: Foto da Autora

Foto 9 – Queilite actínica e melanose solar em mento
FONTE: Foto da Autora

Foto 10 – Deformidade em 1º quirodáctilo, secundária a acidente de trabalho por trauma
FONTE: Foto da Autora

Foto 11 – Distrofia ungueal ocupacional
FONTE: Foto da Autora

Foto 12 – Distrofia ungueal associada a ressecamento intenso em hálux
FONTE: Foto da Autora

5.2 Comparação entre pele coberta e pele exposta ao sol

Os achados histopatológicos e imuno-histoquímicos da região exposta à radiação solar comparados aqueles da região coberta estão apresentados nas Tabelas 8 e 9.

5.2.1 Resultados do exame histopatológico de biópsias de pele da região coberta e da região exposta ao sol

Ao exame histopatológico da pele, a hiperqueratose de intensidade moderada predominou na pele exposta ao sol (26,3%) quando comparada a pele coberta (10,5%). No entanto, essa diferença não foi significativa. A ausência de hiperqueratose foi observada apenas na pele coberta de dois pescadores (10,5%) (Tabela 8).

A variação do número de camadas celulares nos cones e nos segmentos da epiderme entre os cones foi maior em pele exposta do que em pele coberta, mas essa diferença só teve significância para o número de camadas celulares nos segmentos da epiderme entre os cones (Foto 13, 14) (Tabela 8).

A elastose esteve significativamente relacionada à exposição da pele à radiação solar (Foto 15), tendo sido diagnosticada também ao exame físico (Fotos 1, 2, 3) e, quando presente, teve maior intensidade na pele exposta (Tabela 8).

Comparando a pele exposta à radiação solar à pele coberta, detectou-se predomínio significativo de vasos dérmicos ectásicos (78,9% contra 31,6%, respectivamente) ($p=0,012$) (Foto 14). O infiltrado inflamatório perivascular linfo-histiocitário superficial leve também foi mais freqüente em pele exposta, exceção feita a três casos, nos quais esse infiltrado foi de intensidade moderada, no entanto essas diferenças não foram significantes (Tabela 8).

Tabela 8 – Distribuição dos achados histopatológicos em biópsia de pele coberta e de pele exposta ao sol de 19 pescadores – Recife - set 2005 a set 2006

Variável	estatística	Região		Comparação entre as regiões	
		coberta	exposta	valor p	conclusão a 5%
Hiperceratose	freqüência			teste do sinal	
				0,125	ns
	ausente (n)	10,5% (2)	0,0% (0)		
	leve (n)	78,9% (15)	73,7% (14)		
	moderado (n)	10,5% (2)	26,3% (5)		
Cones	média (dp)	10,1 (1,29)	10,8 (0,96)	teste de Wilcoxon	
	IC95% média	9,5; 10,7	10,4; 11,3	0,051	ns
	1ºq; med; 3ºq	9,0; 10,0; 11,0	10,0; 11,0; 12,0		
	mínimo; máximo	8,0; 13,0	9,0; 12,0		
Segmentos da epiderme entre os cones	média (dp)	5,2 (0,42)	5,8 (1,08)	teste de Wilcoxon	
	IC95% média	5,0; 5,4	5,3; 6,3	0,029	s
	1ºq; méd; 3ºq	5,0; 5,0; 5,0	5,0; 6,0; 6,0		
	mínimo; máximo	5,0; 6,0	5,0; 9,0		
Elastose	freqüência			teste do sinal	
				0,003	s
	ausente (n)	73,7% (14)	21,1% (4)		
	leve (n)	21,1% (4)	47,4% (9)		
	moderada (n)	0,0% (0)	10,5% (2)		
	intensa (n)	5,3% (1)	21,1% (4)		

continua

Variável	Região		Comparação entre as regiões	
	estatística	coberta	exposta	valor p conclusão a 5%
Ectasia	freqüência			teste do sinal
				0,012 s
	ausente (n)	68,4% (13)	21,1% (4)	
	presente (n)	31,6% (6)	78,9% (15)	
Infiltrado inflamatório linfocitário perivascular superficial	freqüência			teste do sinal
				0,250 ns
	ausente (n)	0,0% (0)	0,0% (0)	
	leve (n)	100,0% (19)	84,2% (16)	
	moderada (n)	0,0% (0)	15,8% (3)	
	intensa (n)	0,0% (0)	0,0% (0)	
Infiltrado inflamatório histiocitário perivascular superficial	freqüência			teste do sinal
				0,250 ns
	ausente (n)	0,0% (0)	0,0% (0)	
	leve (n)	100,0% (19)	84,2% (16)	
	moderada (n)	0,0% (0)	15,8% (3)	
	intensa (n)	0,0% (0)	0,0% (0)	
Infiltrado inflamatório perivascular superficial de outras células	freqüência			teste do sinal
				0,625 ns
	ausente (n)	94,7% (18)	84,2% (16)	
	leve (n)	5,3% (1)	10,5% (2)	
	moderada (n)	0,0% (0)	5,3% (1)	
	intensa (n)	0,0% (0)	0,0% (0)	
Infiltrado inflamatório linfocitário perivascular profundo	freqüência			teste do sinal
				0,625 ns
	ausente (n)	94,7% (18)	84,2% (16)	
	leve (n)	5,3% (1)	15,8% (3)	
	moderada (n)	0,0% (0)	0,0% (0)	
	intensa (n)	0,0% (0)	0,0% (0)	
Infiltrado inflamatório histiocitário perivascular profundo	freqüência			teste do sinal
				0,625 ns
	ausente (n)	94,7% (18)	84,2% (16)	
	leve (n)	5,3% (1)	15,8% (3)	
	moderada (n)	0,0% (0)	0,0% (0)	
	intensa (n)	0,0% (0)	0,0% (0)	
Infiltrado inflamatório perivascular profundo de outras células	freqüência			teste do sinal
				1,000 ns
	ausente (n)	100,0% (19)	100,0% (19)	
	leve (n)	0,0% (0)	0,0% (0)	
	moderada (n)	0,0% (0)	0,0% (0)	
	intensa (n)	0,0% (0)	0,0% (0)	

NOTA: dp - desvio padrão ; 1ºq med 3ºq - 1º quartil mediana 3º quartil
 ns=não significativa (p= 0,05) s=significante (p< 0,05)

Paciente n°. 45
HE (100X)

Foto 13 - Corte histológico de biópsia de pele

LEGENDA: (A) coberta e (B) exposta

NOTA: Observar em (B) presença de elastose em derme e aumento das camadas celulares nos segmentos da epiderme entre os cones

Paciente n°. 54
HE (200X)

Foto 14 - Corte histológico de biópsia de pele

LEGENDA: (A) coberta e (B) exposta

NOTA: Observar em (A) presença de elastose em derme e aumento das camadas celulares nos segmentos da epiderme entre os cones

Paciente n°. 53
HE (200X)

Foto 15 - Corte histológico de biópsia de pele
 LEGENDA: (A) coberta (B) exposta
 NOTA: Observar em (B) presença de ectasia na derme

5.2.2 Demonstração e quantificação de células imunocompetentes e mastócitos em pele coberta e exposta a radiação solar

A análise comparativa dos elementos celulares estudados permitiu identificar aumento significativo em pele exposta ao sol de linfócitos CD45RO+ ($p=0,04$) (Foto 16), de macrófagos revelados pelo anticorpo CD68 ($p<0,001$) (Foto 17) e de quantidade de mastócitos ($p=0,001$) (Foto 18). Na pele exposta à radiação solar, os macrófagos predominaram nas camadas dérmicas superior e média, em torno de vasos sanguíneos, adjacentes ao material elastótico, diferente da pele coberta, na qual se localizaram disseminados na camada superior da derme (Foto 17). Na pele exposta, os mastócitos apresentaram tamanho maior que aqueles da pele coberta. Houve aumento de células NK (CD56+) em pele exposta à radiação solar, porém sem significância estatística ($p=0,413$). A pele coberta assemelhou-se à pele exposta quanto aos demais elementos celulares relacionados a resposta imune da pele estudados: células de Langerhans (CD1a+), linfócitos CD4+ e CD8+ (Tabela 9).

Tabela 9 – Distribuição da contagem dos marcadores imunológicos em biópsia de pele coberta e de pele exposta ao sol de 19 pescadores – Recife - set 2005 a set 2006

Variável	Região		COMPARAÇÃO ENTRE AS REGIÕES	
	estatística	coberta	exposta	valor de p conclusão a 5%
CD1a				Teste de Wilcoxon
média (dp)		0,0089 (0,00775)	0,0085 (0,01539)	0,313 ns
IC95% média		0,0052; 0,0126	0,0011; 0,0159	
1ºq; med; 3ºq		0,0020:0,0080:0,0150	0,0010:0,0060:0,0090	
mínimo;máximo		0,0000: 0,0280	0,0000: 0,0700	
CD4				Teste de Wilcoxon
média (dp)		38,7 (36,31)	43,0 (35,51)	0,360 ns
IC95% média		21,2 ; 56,2	25,9; 60,1	
1ºq; med; 3ºq		10,7: 22,7: 72,0	17,3: 30,7: 61,3	
mínimo;máximo		1,3: 122,7	5,3: 128,0	
CD8				Teste de Wilcoxon
média (dp)		29,2 (25,41)	36,9 (39,16)	0,360 ns
IC95% média		17,0; 41,5	18,0; 55,7	
1ºq; med; 3ºq		13,3: 25,3: 41,3	5,3: 18,7: 64,0	
mínimo;máximo		0,0: 82,7	0,0: 125,3	
CD56				Teste de Wilcoxon
média (dp)		0,49 (1,347)	1,05 (2,375)	0,413 ns
IC95% média		0,00; 1,14	0,00; 2,20	
1ºq; med; 3ºq		0,00: 0,00: 0,00	0,00: 0,00: 1,33	
mínimo;máximo		0,00: 5,33	0,00: 9,33	
CD45RO				Teste de Wilcoxon
média (dp)		12,7 (27,92)	14,4 (14,90)	0,040 s
IC95% média		0,0; 26,2	7,2; 21,6	
1ºq; med; 3ºq		2,7: 5,3: 9,3	5,3: 13,3: 18,7	
mínimo;máximo		0,0: 125,3	1,3: 69,3	
CD68				Teste de Wilcoxon
média (dp)		0,42 (1,093)	16,77 (17,380)	< 0,001 s
IC95% média		0,00 ; 0,95	8,39 ; 25,15	
1ºq; med; 3ºq		0,00: 0,00: 0,00	5,33: 13,33: 21,33	
mínimo ; máximo		0,00: 4,00	0,00: 73,33	
Mastócitos				Teste de Wilcoxon
média (dp)		33,7 (13,02)	50,8 (18,81)	0,001 s
IC95% média		27,4; 40,0	41,7; 59,9	
1ºq; med; 3ºq		21,3: 34,7: 46,7	33,3: 49,3: 69,3	
mínimo;máximo		13,3: 53,3	22,7: 86,7	

NOTA: dp - desvio padrão ; 1ºq med 3ºq - 1º quartil mediana 3º quartil
ns=não significante (p= 0,05) s=significante (p< 0,05)

No Gráfico 1, observa-se que as contagens dos marcadores CD45RO e CD68, assim como o número de mastócitos foi significativamente maior em pele exposta à radiação ultravioleta que a pele coberta.

Gráfico 1 – Dispersão em relação à mediana dos marcadores imunológicos em pele coberta e exposta

Foto 16 – Linfócitos T CD45RO+ em biópsia de pele

LEGENDA: (A) pele coberta – raras células imunomarcadas ao redor de vasos da derme (aumento original X100)

(B) pele exposta- Notar numerosas células imunomarcadas ao redor de vasos da derme superficial (aumento original X400)

Paciente n° 63
Imuno-histoquímica
(anticorpo CD45RO)

Paciente n° 74
Imuno-histoquímica
(anticorpo CD68)

Foto 17 - Marcação imuno-histoquímica de CD68 em biópsia de pele
LEGENDA: (A) pele coberta – raras células imunomarcadas ao redor de vasos da derme (aumento original X100)
(B) pele exposta- Notar numerosas células imunomarcadas ao redor de vasos da derme superficial (aumento original X400)

Paciente n°. 17
Azul de toluidina

Foto 18 – Marcação histológica de mastócitos em biópsia de pele
NOTA: (A) pele coberta (B) pele exposta

5.3 Resultados de marcadores imunológicos em sangue

Comparando os resultados de marcadores imunológicos do grupo de pescadores ao grupo de não pescadores, em pescadores observou-se aumento da quantidade de todas as subpopulações de linfócitos: CD3, CD3CD4, CD3CD8CD19, CD45RA, CD3CD4CD45RA, CD3CD8CD45RA, CD45RO, CD3CD45RO, CD3CD4CD45RO, CD28, CD3CD28, CD3CD4CD28, CD3CD8CD28, CD3CD4CD25 e HLA-DR, e redução daqueles que expressam CD3CD56, CD3CD45RA, CD69, CD3CD69, CD3CD4CD69, CD3CD8CD69, CD25, CD3CD25, CD3CD8CD25, CD3HLA-DR, CD3CD4HLA-DR e CD3CD8HLA-DR. Apesar das diferenças relatadas, apenas o aumento da subpopulação CD3CD8CD45RO foi significativo ($p=0,016$) (Tabela 10) (Gráfico 3).

Tabela 10 – Distribuição de subpopulações linfocitárias presentes em sangue periférico de pescadores e não pescadores – Recife - set 2005 a set 2006

Variável	Grupo		COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS	
	estatística	Não pescadores	Pescadores	valor de p conclusão a 5%
Num.de indivíduos	total	10 (34,5%)	19 (65,5%)	
CD3	média (dp)	1287,2 (477,73)	1611,4 (637,8)	teste de Mann-Whitney
	IC95% media	945,5; 1628,9	1304,0; 1918,9	0,151 ns
	1ºq; med; 3ºq	903,8; 1221,0; 1783,5	1216,0; 1583,0; 2016,0	
	mínimo; máximo	676,0; 2082,0	654,0; 2993,0	

continua

Variável	Grupo		COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS	
	estatística	Não pescadores	Pescadores	valor de p conclusão a 5%
CD3CD4				teste de Mann-Whitney
média (dp)		719,6 (221,64)	950,1 (402,57)	0,151 ns
IC95% media		561,0; 878,2	756,0; 1144,1	
1ºq; med; 3ºq		510,0: 735,0 : 938,3	589,0: 946,0: 1235,0	
mínimo; máximo		369,0: 1032,0	355,0: 1791,0	
CD3CD8				teste de Mann-Whitney
média (dp)		479,6 (226,17)	615,2 (288,32)	0,195 ns
IC95% media		317,8; 641,4	476,2; 754,1	
1ºq; med; 3ºq		295,0: 436,0: 634,5	454,0: 567,0: 801,0	
mínimo; máximo		241,0: 971,0	171,0: 1.318,0	
CD19				teste de Mann-Whitney
média (dp)		284,3 (305,47)	323,5 (192,18)	0,266 ns
IC95% media		0,0; 502,8	230,9; 416,2	
1ºq; med; 3ºq		100,0: 192,5: 345,3	188,0: 305,0: 423,0	
mínimo; máximo		67,0: 1106,0	75,0: 861,0	
CD3CD56				teste de Mann-Whitney
média (dp)		304,5 (203,95)	259,5 (150,74)	0,542 ns
IC95% media		158,6; 450,4	186,8; 332,1	
1ºq; med; 3ºq		161,8: 235,0: 521,0	133,0: 201,0: 395,0	
mínimo; máximo		60,0: 626,0	63,0: 558,0	
CD45RA				teste de Mann-Whitney
média (dp)		1066,2 (514,37)	1147,1 (483,85)	0,604 ns
IC95% media		698,2; 1434,2	913,9; 1380,3	
1ºq; med; 3ºq		611,5: 1005,0:1384,0	825,0: 1007,0:1436,0	
mínimo; máximo		513,0: 2058,0	434,0: 2444,0	
CD3CD45RA				teste de Mann-Whitney
média (dp)		571,1 (325,03)	571,4 (265,08)	0,769 ns
IC95% media		338,6; 803,6	443,6; 699,1	
1ºq; med; 3ºq		302,3: 481,5: 852,0	399,0: 448,0: 816,0	
mínimo; máximo		223,0: 1162,0	200,0: 1182,0	
CD3CD4C45RA				teste de Mann-Whitney
média (dp)		237,5 (131,60)	250,6 (129,38)	0,839 ns
IC95% media		143,4 ; 331,6	188,2; 312,9	
1ºq; med ; 3ºq		103,0: 208,0: 342,8	141,0: 217,0: 345,0	
mínimo ; máximo		83,0: 485,0	45,0: 484,0	
CD3CD8C45RA				teste de Mann-Whitney
média (dp)		299,1 (218,28)	301,6 (166,75)	0,636 ns
IC95% media		143,0; 455,2	221,3; 382,0	
1ºq; med; 3ºq		117,8: 249,0: 354,3	193,0: 252,0: 356,0	
mínimo; máximo		113,0: 772,0	118,0: 752,0	
CD45RO				teste de Mann-Whitney
média (dp)		680,3 (215,41)	974,9 (433,83)	0,056 ns
IC95% media		526,2 ; 834,4	765,8; 1184,0	
1ºq; med; 3ºq		483,8: 656,0: 824,5	718,0: 925,0: 1147,0	
mínimo máximo		370,0: 1091,0	316,0: 1928,0	
CD3CD45RO				teste de Mann-Whitney
média (dp)		651,0 (229,61)	925,6 (435,57)	0,094 ns
IC95% media		486,7; 815,3	715,6; 1135,5	
1ºq; med; 3ºq		441,5: 577,0: 844,3	579,0: 846,0: 1101,0	
mínimo; máximo		355,0: 1070,0	337,0: 1894,0	

continua

Variável	Grupo		COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS	
	estatística	Não pescadores	Pescadores	valor de p conclusão a 5%
CD3CD4CD45RO				teste de Mann-Whitney
média (dp)		461,7 (150,90)	650,6 (316,77)	0,094 ns
IC95% media		353,8; 569,6	498,0; 803,3	
1ºq; med; 3ºq		292,5: 455,5: 596,0	423,0: 688,0: 787,0	
mínimo; máximo		261,0: 669,0	150,0: 1508,0	
CD3CD8CD45RO				teste de Mann-Whitney
média (dp)		160,5 (105,39)	315,7 (222,35)	0,016 s
IC95% media		85,1; 235,9	208,5; 422,9	
1ºq; med; 3ºq		91,3: 132,0: 190,0	148,0: 264,0: 388,0	
mínimo; máximo		71,0: 429,0	66,0: 901,0	
CD28				teste de Mann-Whitney
média (dp)		1.176,0 (445,81)	1.367,2 (480,64)	0,308 ns
IC95% media		857,1 ; 1494,9	1135,5 ; 1598,9	
1ºq; med; 3ºq		756,0: 1083,0:1603,0	1010,0:1259,0:1795,0	
mínimo ; máximo		635,0: 1.967,0	674,0: 2.337,0	
CD3CD28				teste de Mann-Whitney
média (dp)		1043,9 (373,79)	1267,1 (481,78)	0,228 ns
IC95% media		776,5; 1311,3	1.034,9; 1499,3	
1ºq; med; 3ºq		711,3: 929,5: 1432,0	888,0: 1178,0:1617,0	
mínimo;máximo		593,0: 1655,0	519,0: 2192,0	
CD3CD4CD28				teste de Mann-Whitney
média (dp)		695,9 (210,95)	1286,4 (1745,97)	0,115 ns
IC95% media		545,0 ; 846,8	444,9 ; 2.128,0	
1ºq ; med ; 3ºq		503,8 : 666,5 : 907,3	588,0 : 892,0 :1078,0	
mínimo ; máximo		384,0 : 1014,0	364,0 : 8342,0	
CD3CD8CD28				teste de Mann-Whitney
média (dp)		321,2 (188,09)	347,3 (149,80)	0,456 ns
IC95% media		186,7; 455,7	275,1; 419,5	
1ºq ; med; 3ºq		185,3: 249,5: 467,0	211,0: 333,0: 477,0	
mínimo ; máximo		156,0: 733,0	94,0: 585,0	
CD69				teste de Mann-Whitney
média (dp)		650,8 (506,67)	493,6 (234,79)	0,982 ns
IC95% media		288,3; 1013,3	380,5; 606,8	
1ºq; med; 3ºq		246,5: 419,5: 1120,0	354,0: 451,0: 666,0	
mínimo ; máximo		174,0: 1525,0	146,0: 1169,0	
CD3CD69				teste de Mann-Whitney
média (dp)		404,4 (388,13)	268,8 (177,46)	0,982 ns
IC95% media		126,7 ; 682,1	183,3 ; 354,4	
1ºq; med; 3ºq		109,0: 153,0: 850,5	161,0: 185,0: 415,0	
mínimo ; máximo		72,0: 1024,0	70,0: 784,0	
CD3CD4CD69				teste de Mann-Whitney
média (dp)		190,7 (174,38)	158,5 (102,44)	0,875 ns
IC95% media		66,0; 315,4	109,1; 207,8	
1ºq; med; 3ºq		43,8: 102,0: 402,8	74,0: 109,0: 264,0	
mínimo ; máximo		34,0: 461,0	25,0: 372,0	
CD3CD8CD69				teste de Mann-Whitney
média (dp)		185,9 (204,12)	93,4 (79,16)	1,000 ns
IC95% media		39,9; 331,9	55,2; 131,5	
1ºq; med; 3ºq		34,5: 58,0: 386,8	46,0: 67,0: 123,0	
mínimo ; máximo		24,0: 570,0	23,0: 382,0	

continua

Variável	Grupo		COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS	
	estatística	Não pescadores	Pescadores	valor de p conclusão a 5%
CD25				teste de Mann-Whitney
média (dp)		526,5 (403,47)	488,7 (260,66)	0,512 ns
IC95% media		237,9; 815,1	363,1; 614,3	
1ºq; med; 3ºq		214,3: 323,0: 976,0	306,0: 411,0: 649,0	
mínimo ;máximo		191,0: 1210,0	96,0: 1172,0	
CD3CD25				teste de Mann-Whitney
média (dp)		376,0 (311,19)	331,2 (219,22)	0,668 ns
IC95% media		153,4; 598,6	225,5; 436,9	
1ºq; med; 3ºq		145,3: 192,5: 775,8	173,0: 267,0: 425,0	
mínimo;máximo		136,0: 851,0	60,0: 850,0	
CD3CD4CD25				teste de Mann-Whitney
média (dp)		261,1 (172,97)	267,9 (167,86)	0,769 ns
IC95% media		137,4; 384,8	187,0; 348,9	
1ºq; med; 3ºq		129,3: 178,5: 440,3	152,0: 214,0: 322,0	
mínimo ;máximo		111,0: 562,0	52,0: 704,0	
CD3CD8CD25				teste de Mann-Whitney
média (dp)		105,0 (148,66)	60,8 (68,46)	0,636 ns
IC95% media		0,0; 211,3	27,8; 93,8	
1ºq; med; 3ºq		9,8: 13,5: 234,0	17,0: 30,0; 97,0	
mínimo;máximo		7,0: 418,0	5,0: 295,0	
HLA-DR				teste de Mann-Whitney
média (dp)		390,1 (250,74)	474,3 (220,35)	0,228 ns
IC95% media		210,7; 569,5	368,1; 580,5	
1ºq; med; 3ºq		181,8: 296,0: 587,3	282,0: 490,0: 590,0	
mínimo;máximo		142,0: 896,0	208,0: 942,0	
CD3HLA-DR				teste de Mann-Whitney
média (dp)		159,7 (136,75)	105,1 (65,15)	0,456 ns
IC95% media		61,9; 257,5	73,7; 136,5	
1ºq; med; 3ºq		51,3: 97,0: 298,8	52,0: 90,0: 137,0	
mínimo ;máximo		36,0: 416,0	30,0; 279,0	
CD3CD4HLA-DR				teste de Mann-Whitney
média (dp)		62,7 (30,50)	47,7 (24,72)	0,228 ns
IC95% media		40,9; 84,5	35,8; 59,6	
1ºq; med; 3ºq		32,3: 60,5: 93,8	23,0: 42,0: 71,0	
mínimo;máximo		26,0: 111,0	13,0: 86,0	
CD3CD8HLA-DR				teste de Mann-Whitney
média (dp)		86,7 (109,72)	74,7 (109,81)	0,660 ns
IC95% media		8,2; 165,2	21,8; 127,6	
1ºq; med; 3ºq		13,5: 29,5: 189,8	20,0: 46,0: 65,0	
mínimo;máximo		8,0: 316,0	6,0: 490,0	

NOTA: dp - desvio padrão ; 1ºq med 3ºq - 1º quartil mediana 3º quartil
 ns=não significativa (p= 0,05) s=significante (p< 0,05)

Gráfico 2 – Média de contagem de CD3CD8CD45RO em sangue

6 DISCUSSÃO

Cumprir destacar, nessa discussão de resultados, alguns aspectos relevantes, quer relativos a características próprias dos pescadores, que os faz constituir um grupo especial para o estudo da exposição prolongada e crônica à radiação ultravioleta, quer referentes às alterações histopatológicas e imunológicas decorrentes dessa exposição solar.

A principal dificuldade metodológica na realização do presente trabalho foi a falta de referência na literatura consultada de padronização do número de elementos das subpopulações de linfócitos envolvidos na imunologia da pele de indivíduos expostos crônica e prolongadamente a radiação solar, o que se constituiu no aspecto inédito desta pesquisa, posto que, em sua grande maioria, os estudos restringem-se à imunologia da pele submetida esporadicamente à radiação solar ou por curto espaço de tempo. Neste caso, adotou-se como controle um grupo de indivíduos não pescadores, não expostos crônica e prolongadamente à radiação solar, que comprovadamente tinham características epidemiológicas e socioeconômicas semelhantes a dos pescadores.

Para análise histopatológica e imuno-histoquímica da pele prolongada e cronicamente exposta à radiação solar, admitiram-se, como controle de cada paciente, os parâmetros da pele coberta, portanto não exposta diretamente à radiação solar.

Para estabelecer o protocolo para análise das alterações imunológicas sistêmicas, inicialmente buscou-se comparar o grupo de pescadores ao grupo de não pescadores, com relação às variáveis demográficas, identificando-se diferença significativa no que se referiu a escolaridade e tempo de profissão. Quanto ao maior número de pescadores sem escolaridade, iletrados, quando comparados aos não pescadores, pode-se afirmar, a partir do convívio com a realidade de vida desses profissionais, que a baixa escolaridade deriva do próprio exercício profissional. São obrigados a permanecer a maior parte do tempo no mar, retornando à terra já ao entardecer, cansados e preocupados com o preparo da embarcação para a viagem do dia seguinte. Isso os desestimula aos estudos.

A diferença significativa verificada no tempo de profissão, tendo sido maior para os pescadores, talvez possa ser atribuída ao processo de formação para o exercício da ocupação. Pescadores são formados empiricamente pela convivência familiar com outros pescadores, processo que se inicia ainda na adolescência e prossegue ao longo de toda a vida, acarretando, então, tempo de profissão mais prolongado. Os componentes do grupo de não pescadores exerciam ocupações que exigiam formação profissional no ensino formal, portanto iniciaram suas funções laborais mais tardiamente do que os pescadores.

Quanto às diferenças significantes identificadas nas variáveis clínicas pondo-estaturais e de pressão arterial, algumas explicações parecem plausíveis. A obesidade detectada nos pescadores pode ser atribuída aos

hábitos alimentares, ou seja, ao uso freqüente de frituras e ao consumo de farináceos, que se torna a alimentação mais adequada ao fato de os pescadores permanecerem por dias ou semanas em alto mar, no exercício profissional. Além disso, a ingesta alimentar nas três refeições praticamente não difere, pois todas se caracterizam pela ingesta de farináceos, café e peixe, geralmente frito.

Por outro lado, deve-se considerar também o baixo nível de escolaridade como um fator que contribui indiretamente para a obesidade, pela dificuldade de mudança de hábitos, derivada da falta de compreensão dos riscos que a obesidade envolve (Dressler, Santos, 2000).

O aumento da prevalência de hipertensão sisto-diastólica ou sistólica isolada dentre os pescadores, quando comparados aos não pescadores, pode derivar do uso freqüente e abundante de cloreto de sódio, empregado na conservação do pescado, quando em alto mar, pescado esse que se constitui no principal alimento durante esses períodos. Assim sendo, a elevada ingesta de sal associada à obesidade pode ter atuado como fator agravante para hipertensão, aumentando sua freqüência entre pescadores.

A análise das características sócio-demográficas e clínicas permitiram identificar o grupo de pescadores como portador de características próprias, quanto ao tempo de profissão, escolaridade, hábitos alimentares, variáveis pondo-estaturais e pressóricas, além da exposição prolongada e crônica à radiação ultravioleta, secundárias às especificidades que revestem seu exercício profissional.

Em relação às alterações clínicas dermatológicas diagnosticadas em pescadores, pode-se afirmar que derivaram tanto da exposição solar prolongada e crônica, quanto a fatores próprios da ocupação que exerciam.

Eférides são pequenas máculas de cor castanho-amarelada, presentes em áreas fotoexpostas, derivadas de um fenômeno protetor, oriundo do aumento de melanina em nível de camada basal devido à hiperatividade focal de melanócitos. É a primeira reação que a pele desenvolve quando exposta ao sol, que habitualmente tem início na infância, sem qualquer risco de degeneração maligna, fato encontrado em pescadores que, mesmo com a intensa exposição solar, não apresentavam qualquer neoplasia maligna no restante da cobertura dérmica.

A ausência de lesões pré-malignas e neoplásicas na pele de pescadores permite supor a existência de adaptação da pele por exposição prolongada e crônica ao sol. Isto sugere que o organismo cria mecanismos protetores contra a radiação solar, do que deriva dano menor que aquele presente em indivíduos que se expõem esporadicamente ao sol, portanto sem defesa específica da pele.

Essa hipótese foi aventada por Schwartz, em 2005, ao estudar o efeito da radiação ultravioleta em indivíduos caucasianos, embora o autor tenha concluído que a afirmação deveria ser confirmada com futuros estudos. No entanto não se pode abandonar a hipótese de que esses pescadores apresentem uma adaptação genética da pele à radiação solar crônica, por serem descendentes de pais e avós pescadores, como será

discutido em seguida. Esses aspectos, a nosso ver, também precisam ser estudados em seus descendentes não pescadores, o que confirmaria esta hipótese.

O efeito reacional à exposição prolongada e crônica ao sol também pode ser identificado nos pescadores pesquisados pela presença freqüente de elastose e melanose solar nas áreas fotoexpostas. A elastose, também conhecida como *peau citriné*, é uma alteração caracterizada por espessamento coreáceo da pele, de cor amarelada e superfície sulcada. Caracteriza-se por manchas de cor castanho claro a escuro. A elastose e o aumento do número e da atividade dos melanócitos atuam impedindo a penetração solar nas camadas mais profundas da pele e, assim, reduzindo o risco de um dano maior.

A queilite solar, clinicamente caracterizada por escamação e crostas ao nível do lábio inferior foi diagnosticada em um pescador e atribuída ao seu fototipo. Fenômeno semelhante foi relatado por Nicolini *et al.*, em 1989, ao estudarem 556 pescadores de Valparaíso, Chile, com biotipo loiro ou ruivo e olhos azuis ou verdes, nos quais diagnosticaram queilite solar em 43% da amostra, de severidade aguda em 8% e, crônica, em 35% dos casos.

Diferentemente, a queratodermia palmo-plantar (hiperceratose) e a distrofia ungueal, diagnosticadas em pescadores, foram atribuídas ao exercício profissional e não pareceram se relacionar à exposição solar. A hiperkeratose palmar de coloração amarelada característica se deveu ao

atrito com corda no ato de puxar rede e manusear utensílios rústicos de pesca, como remos, madeirame e cordoalha da embarcação, enquanto que a queratodermia plantar pareceu ter sido originada pelo hábito de andar descalço ou em uso de sandália plástica, o que promove atrito maior e continuado da planta dos pés. Essa injúria desencadeia o mecanismo de defesa de espessamento da camada córnea.

A queratodermia plantar é tão intensa que promoveu fissuras que são acompanhadas de dor e sangramento, pela exposição da derme. Mereceu especial atenção da pesquisadora porque, embora a conduta deva ser o uso de calçado apropriado, esta não se mostrou adequada aos pescadores, pois requer uma mudança de hábito à qual não estão afeitos. Alegam que o trabalho em alto mar, com os pés calçados, oferece dificuldades no manejo do barco e do pescado. Identificou-se novamente a baixa escolaridade como fator de risco para exposição a agravos à saúde.

Ainda, a presença de distrofia ungueal pareceu derivar da associação de dois fatores. O contato demorado com água, hidratando a lâmina ungueal, tornando-a maleável e predisponente à destruição, associou-se ao traumatismo pelo uso constante de cordas, exercendo atrito continuado e destruindo a matriz ungueal.

Em resumo, os achados clínico-dermatológicos diagnosticados nos pescadores, em sua maioria, refletiram alterações adaptativas à atividade da pesca, consideradas adequadas por profissionais formados empiricamente,

com baixa escolaridade, o que lhes dificulta a compreensão da necessidade de adotar condutas preventivas contra tais agravos.

A frequência significativamente maior de dentes em estado precário entre os pescadores, quando comparados aos não pescadores, pareceu ter origem na falta de educação para a saúde e na dificuldade de assistência médico-odontológica. Por um lado, há que se reconhecer que o baixo nível de escolaridade influencia nos cuidados e na higiene bucal, o que facilita o aparecimento de cáries dentárias. No entanto esse fato, isoladamente, não explicaria a presença de dentes em estado precário, nem tampouco a alta frequência de dentes perdidos entre os pescadores. A explicação para este achado talvez esteja relacionada ao fato de os pescadores iniciarem a jornada de trabalho ao raiar do dia, aproximadamente às 4 horas da manhã, e chegarem em terra ao final da tarde ou à noite, não conseguem encontrar postos de saúde abertos, ficando sem condição de atendimento de saúde odontológica. Daí deriva a extração de dentes, já em estado precário.

Não conseguem atendimento ambulatorial odontológico e médico, restando-lhes, como única opção, a assistência em nível emergencial. A constatação acima descrita permite sugerir uma mudança de horário de atendimento de postos de saúde para contemplar pessoas cujo turno de trabalho os impeça de cumprir as exigências administrativas para obter assistência médico-odontológica.

Em relação aos resultados de exames laboratoriais, não foram valorizadas as alterações de concentração de hemoglobina e de hematócrito

porque, ao exame físico, nenhum, dentre os pescadores e os não pescadores, apresentou sintomas e sinais clínicos compatíveis com repercussão do estado geral por anemia.

Buscou-se, na bioquímica, a explicação para a alteração detectada à eletroforese de proteínas de pescadores, representada por significativo aumento da fração beta e redução da relação albumina/globulina, sem hipoalbuminemia. A fração beta da eletroforese de proteínas é constituída por proteínas como transferrina, ceruloplasmina, beta-lipoproteínas e fração C3 do complemento. Dado que o aumento de fração beta da eletroforese de proteínas ocorreu dentre pescadores obesos, pode-se supor que essa alteração resulta do aumento das beta-lipoproteínas, freqüente nestes casos de obesidade. Por outro lado, embora não tenha sido dosada neste trabalho, a alteração da concentração de hemoglobina e de hematócrito em ausência de sintomas e sinais clínicos poderia ter como causa a manutenção dos estoques de ferro à custa do aumento da concentração da transferrina. Por outro lado, esses dois fatores poderiam explicar a hiperbetaproteinemia.

As proteínas da fração beta integram as globulinas, juntamente com as frações alfa1, alfa2 e gama. Assim sendo, a hiperbetaproteinemia gerou aumento da fração de globulinas e conseqüente redução da relação entre albumina e globulinas, pelo fato de a concentração de albumina ter se mantido dentro dos limites de normalidade para todos os pescadores.

Dessa forma, as alterações laboratoriais valorizadas no presente trabalho restringiram-se ao processo metabólico identificado pela hiperbetaproteinemia secundária à obesidade.

Quanto às alterações identificadas ao exame histopatológico de biópsia de pele coberta e exposta, houve dois achados que merecem detalhamento. A predominância de elastose em pele exposta comprova os efeitos de exposição crônica à radiação solar, promovendo degradação do colágeno e acúmulo de elastina anormal na derme.

Vale ainda ressaltar que se tem descrito que a radiação UV promove danos à molécula de DNA e dos queratinócitos, mas já se comprova o comprometimento dos fibroblastos, cuja alteração de síntese protéica explicaria a presença de elastina anormal, responsável pela elastose solar. Bosset *et al.* (2003a), ao comprovarem a concomitância de aumento de elastose, de ectasia e aumento do número de células TCD4+ e CD45RO+ em pele cronicamente exposta ao sol, enunciaram a hipótese de que o dano celular do DNA levaria à síntese de moléculas anormais, cuja presença desencadearia a secreção de mediadores inflamatórios pelos mastócitos, modulando direta ou indiretamente a síntese de proteinases que degradariam a matriz extracelular ou desencadeariam a ativação da metaloproteinases. Os mastócitos ativados sofreriam degranulação nos locais de inflamação crônica e alterariam o metabolismo dos fibroblastos, que passariam a sintetizar elastina anormal, principalmente sob a ação da metaloproteinase-9 (MMP-9). Esse processo, adverso à pele, promoveria a

recirculação de células de memória na pele, como a CD4+CD45RO+, provavelmente em resposta à ativação das células endoteliais induzida pela expressão da E-selectina, um mediador do tráfego linfocitário na pele inflamada (Bosset *et al.*, 2003b; Souza *et al.*, 2004; Zak-Prelich *et al.*, 2004).

Ainda neste contexto, a diferença significativa de células imunologicamente marcadas nos segmentos da epiderme entre os cones veio comprovar os achados de Baba *et al.*, em 2005. Esses autores identificaram que a estimulação da epiderme pela radiação solar promove hiperproliferação das células da camada basal, nos cones, com conseqüente extensão das projeções epidérmicas entre os cones, que irão formar um número maior de camadas celulares, atuando como defesa a essa injúria.

Essa constatação parece comprovar a existência de um fenômeno adaptativo de proteção, quando da exposição prolongada e crônica da pele à radiação solar. Baba *et al.* (2005) demonstraram que as projeções celulares entre os cones se instalam ao terceiro dia da exposição à UVB e desaparecem ao décimo dia, cessada a exposição. Argumentaram que esse mecanismo seria semelhante àquele que ocorre na cicatrização de feridas da epiderme. Parece plausível supor que o mesmo mecanismo se manteria na exposição prolongada e crônica à radiação solar, promovendo aumento da profundidade dos cones para dentro da derme e, conseqüentemente, maior distanciamento dos queratinócitos capazes de mitose, em relação à radiação solar. A migração celular entre os cones promoveria o aumento do número de queratinócitos em fase pós-mitótica, portanto mais capazes de

apoptose. No entanto não se conseguiu confirmar esta hipótese a partir dos achados.

Por outro lado, o aumento de elastose, comprovado na presente pesquisa pelo aumento da resistência da pele ao *punch*, à biópsia, pelo engrossamento e endurecimento da pele, identificados ao exame físico, assim como pelo exame histopatológico, promove maior resistência da pele à tensão e à pressão. Isso poderia ter atuado dificultando a penetração dos cones hiperplasiados, o que promoveria uma migração celular ainda maior entre os cones, aumentando o número de camadas celulares que atuariam como fator de proteção à penetração da radiação UV na região mais profunda da pele.

Em resumo, as alterações histopatológicas, relativas à proliferação das camadas celulares nos segmentos da epiderme nos cones e entre os cones, à elastose e à ectasia, são processos protetores e adaptativos à exposição crônica e prolongada à radiação solar, derivados das atividades metabólica de fibroblastos e imunológica de mastócitos, associadas à proliferação celular.

Por meio da imuno-histoquímica, pôde-se identificar ausência de imunossupressão na pele exposta à radiação solar porque os marcadores CD1a, CD4, CD8 e CD56 foram semelhantes aos da pele coberta, considerada, na presente pesquisa, como controle. O aumento significativo do CD45RO+, CD68+ e mastócitos, maior em pele exposta, permitem aventar a hipótese de a radiação solar promover um efeito de tolerância

representado pelo aumento do sinal imunológico capaz de desencadear aumento do afluxo de leucócitos, macrófagos e mastócitos em pele irradiada, compatível com a presença significativa de ectasia, associando a exposição crônica e prolongada à inflamação crônica e ao foto-envelhecimento da pele (Aubin, 2003; Bosset *et al.*, 2003b; Clydesdale *et al.*, 2001).

Considerando o mecanismo local das alterações da pele atribuídas à radiação solar, referidas na literatura, pode-se lançar a hipótese de que o mecanismo de tolerância consistiu no desencadeamento do efeito barreira à penetração da radiação solar pela elastose, pelo aumento das camadas celulares entre os cones e pelo bronzeamento da pele, que se constitui na expressão fenotípica do aumento de melanócitos. A esses processos, associou-se o aumento da vasculatura, representado pela ectasia, com sinal imunológico em pele favorecendo o afluxo leucocitário, expresso pela elevação do CD45RO+, dos macrófagos e dos mastócitos.

Quanto às alterações sistêmicas desencadeadas pela radiação solar, não se comprovou a imunossupressão dado que o comportamento dos marcadores imunológicos em pescadores se assemelhou àquele de indivíduos não submetidos à exposição solar prolongada e crônica. No entanto o aumento significativo da relação CD3+CD8+CD45RO+ exclusivamente em pescadores pareceu corroborar o comportamento local, sinalizando um efeito imunológico, protetor, sistêmico, de tolerância.

Isto significa dizer que, provavelmente, a radiação solar desencadeia imunossupressão na pele, quando a exposição é eventual e de curta duração, já que outros estudos comprovaram que as alterações nos marcadores se verificam nas primeiras horas pós-exposição e normalizam decorridas 24 a 48 horas. Assim, a imunossupressão associada ao dano ao DNA atuaria como fator de risco de neoplasia, principalmente nos indivíduos geneticamente susceptíveis.

No caso da exposição prolongada e crônica, tanto pelo efeito barreira, quanto pela adaptação imunológica, essa inativação do DNA não ocorreria, do que pareceu derivar a inexistência de qualquer caso de neoplasia maligna na pele de pescadores.

O presente estudo não esgota o assunto, porque não se encontrou na literatura consultada qualquer trabalho investigando o comportamento histológico e imunológico da pele exposta à radiação solar por longos períodos e cronicamente. Desenvolveu-se uma linha de raciocínio lógica do ponto de vista da fisiologia, porém são necessários novos estudos para elucidar a tese aqui defendida.

7 CONCLUSÕES

1. o efeito barreira à penetração da radiação solar estabelecida pela elastose, aumento das camadas celulares entre os cones, aumento de melanócitos e aumento da vasculatura, representado pela ectasia, sugere a existência de um efeito tolerância à radiação solar.

2. o efeito da tolerância à radiação solar, promovido pelas alterações reconhecidas ao nível da pele, provavelmente inibe a instalação da imunossupressão esperada. Este efeito tem respaldo no aumento das células CD3+CD8+CD45RO+ e da tendência do aumento da expressão CD28 capaz de proteger as células CD4+ da apoptose induzida pelo CD95 (Fas), como já documentado.

3. o aumento observado das células CD45RO+, mastócitos e macrófagos, na pele, e de CD3+CD8+CD45RO+, no sangue periférico, sugere participação da memória imunológica que se reflete na proteção a infecções virais e, conseqüentemente, a neoplasias decorrentes destas.

ANEXO

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 28.07.05 **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **489/05** intitulado "Efeito da radiação solar sobre o sistema imunológico de pescadores do Recife", apresentando pelo Departamento de DERMATOLOGIA, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parcial e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "C").

Pesquisador(a) Responsável: Prof.Dr. Alberto José da Silva Duarte

Pesquisador(a) Executante : Sarita M.F. de C. Bezerra

CAPPesq, 28 de julho de 2005.

PROF. DR. CLAUDIO LEONE

Vice- Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

FACULDADE DE MEDICINA
da Universidade de São Paulo
Departamento de Dermatologia

Nº Fenix	5258229	Código do Programa	5133
----------	---------	--------------------	------

À Comissão de Pós-Graduação Senso Estrito

ASSUNTO: MUDANÇA DE TÍTULO

NOME: Sarita Maria de Fátima Martins de Carvalho Bezerra
ORIENTADOR: Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte
PROGRAMA: Dermatologia
CURSO: Mestrado () Doutorado (X)

Informo a V. Sa. a mudança do título da
(X) Tese de Doutorado
() Dissertação de Mestrado

DE: EFEITOS DA RADIAÇÃO SOLAR SOBRE O SISTEMA IMUNOLÓGICO DE PESCADORES DO RECIFE.

PARA: EFEITOS DA RADIAÇÃO SOLAR CRÔNICA E PROLONGADA SOBRE O SISTEMA IMUNOLÓGICO DE PESCADORES DO RECIFE.

De acordo 02 / 02 / 2007.

Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte

Nome do Orientador
Orientador

Prof. Dr. Maria Mécia

8 BIBLIOGRAFIA

Aboutalebi S, Strickland FM. Immune protection, natural products, and skin cancer: is there anything new under the sun? *J Drugs Dermatol* 2006;5(6):512-517.

Allavena P, Piemonti L, Longoni D, Bernasconi S, Stoppacciaro A, Ruco L, Mantovani A. IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur J Immunol* 1998;28(1):359-369.

Aubin F, Mousson C. Ultraviolet light-induced regulatory (suppressor) T cells: an approach for promoting induction of operational allograft tolerance? *Transplantation* 2004;77(1):S29-S31.

Aubin F. Mechanisms involved in ultraviolet light-induced Immunosuppression. *Eur J Dermatol* 2003;13:515-23.

Baba H, Yoshida M, Yokota T, Uchiwa H, Watanabe S. Human epidermal basal cell responses to ultraviolet-B differ according to their location in the undulating epidermis. *J Dermatol Sci* 2005;38:41-46.

Bieber T, Ring J, Rieber EP. Anti-IgE monoclonal antibodies as tools for demonstration of cutaneous IgE bearing dendritic cells. *J Invest Dermatol* 1988;91(3):284.

Bosset S, Bonnet-Duquennoy M, Barré P, Chalon A, Lazou K, Kurfurst R, et al. Decreased expression of keratinocyte $\beta 1$ integrins in chronically sun-exposed skin *in vivo*. *Br J Dermatol* 2003a;148:770-778.

Bosset S, et al. Photoageing shows histological features of chronic skin inflammation without clinical and molecular abnormalities. *British J Dermatol* 2003b;149:826-835.

Brasil. Ministério do trabalho. Classificação Brasileira de ocupação (CBO) 2002.

Bush K, Kivlahan DR, McDonell MB, Fihn SD, Bradley KA. The AUDIT alcohol consumption. Questions (AUDIT-C). *Arc Intern Med* 1998;158:1789-1795.

Carneiro RV, Sotto MN, Azevedo LS, Ianhez LE, Rivitti EAS. Acitretin and skin cancer in kidney transplanted patients. Clinical and histological evaluation and immunohistochemical analysis of lymphocytes, natural killer cells and Langerhans' cells in sun exposed and sun protected skin. *Clin Transplant* 2005;19:115-121.

Clydesdale GJ, Dandie GW, Muller HK. Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunol Cell Biol* 2001;79:547-568.

Deirdre AK, Young AR, McGregor JM, Seed PT, Potten CS, Walker SL. Sensitivity to sunburn is associated with susceptibility to ultraviolet radiation-induced suppression of cutaneous cell-mediated immunity. *J Exp Med* 2000;191(3):561-566.

Diffey B. Climate change, ozone depletion and the impact on ultraviolet exposure of human skin. *Phys Med Biol* 2004;49:R1-R11.

Dressler W, Santos JE. Social and cultural dimensions of hypertension in Brazil: a review. *Cad Saude Publica (Rio de Janeiro)* 2000; 16(2):303-315.

Duthie MS, Limber I, Norval M. The effects of ultraviolet radiation on the human immune system. *Br J Dermatol* 1999;140(6):995-1009.

Friedrich M, Holzmann R, Sterry W, Wolk K, Truppel A, Piazena H, *et al.* Ultraviolet B radiation-mediated inhibition of interferon- γ -induced keratinocyte activation is independent of interleukin-10 and other soluble mediators but associated with enhanced intracellular suppressors of cytokine-signaling expression. *J Invest Dermatol* 2003;121:845-852.

Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubeau M, Dai XM. *et al.* Langerhans cells arise from monocytes *in vivo*. *Nature Immunol* 2006;7(3):265-273.

Godar DE, Lucas AD. Ultraviolet-A1 (340-400 nm)-mediated receptor and cytokine changes of transformed lymphocytes. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2005;21:23-31.

Hanneman KK, Cooper KD, Baron ED. Ultraviolet Immunosuppression: mechanisms and consequences. *Dermatol Clin* 2006;24(1):19-25.

Hollis DE, Scheibner A. Ultrastructural changes in epidermal Langerhans cells and melanocytes in response to ultraviolet irradiation, in Australians of Aboriginal and Celtic descent. *Br J Dermatol* 1988;119:21-31.

Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochemist Cytochemist* 1981;29(4):577-580.

INPE. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Org. Neusa Paes Leme. Disponível em: <http://www.dge.inpe.br/ozônio/publicae.htm>. Acessado: 17/01/2007.

Ivry GB, Ogle CA, Shim EK. Role of sun exposure in melanoma. *Dermatol Surg* 2006;32:481-492.

Kadekaro AL, Kavanagh RJ, Wakamatsu K, Shosuke I, Pipitone MA, Abdel-Malek ZA. Cutaneous photobiology. The melanocyte vs. the sun: who will win the final round? *Pigment Cell Res* 2003;15(5):434-447.

Kelly DA, Young AR, McGregor JM, Seed PT, Potten CS, et al. Sensitivity to sunburn is associated with susceptibility to ultraviolet radiation-induced suppression of cutaneous cell-mediated immunity. *J Exp Med* 2000;191(3):561-566.

Kölgen W, van Meurs M, Jongsma M, van Weelden H, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Knol EF. *et al.* Differential expression of cytokines in UV-B-exposed skin of patients with polymorphous light eruption. *Arch Dermatol* 2004; 140(3):295-302.

Kölgen W. *Unraveling the pathogenesis of polymorphous light eruption*. University Medical Center Utrecht. Department of Dermatology and Allergology. 2003. chapp. 7.

Kripke ML. Immunological unresponsiveness induced by ultraviolet radiation. *Immunol Rev* 1984;80:69-106.

Marathe GK, Johnson C, Billings SD, Southal MD, PEI y, Spandau D, Murphy RC, Zimmerman GA, McIntyreTM, Travers, JB. Ultraviolet B radiation generates platelet-activating factor-like phospholipids underlying cutaneous damage. *J Biol Chem* 2005;280(42):35448-35457.

Mizuno K, Okamoto H, Horio T. Ultraviolet B radiation suppresses endocytosis, subsequent maturation, and migration activity of Langerhans cell-like dendritic cells. *J Invest Dermatol* 2004;122(2):300-306.

Narbutt J, Skibinska M, Lesiak A, Wozniacka A, Sysa-Jedrzejowska A, Cebula B, et al. Exposure to low doses of solar-simulates radiation induces an increase in the myeloid subtype of blood dendritic cells. *Scand J Immunol* 2004;60:429-435.

Nickloff BJ, Turka LA. Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunology Today* 1994;15(10):464-469.

Nicolini S, Ascorra C, Guaman C, Latife AV. Actinic cheilitis in Quinta fishing workers: prevalence and associated histopathological aspects. *Odontol Chil* 1989;37(1):160-174.

NIH. National Institutes of Health. National Heart, Lung, and Blood Institute. North American Association for the study of obesity. The practical guide. Identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults. 2000.

Norval M. The mechanisms and consequences of ultraviolet-induced immunosuppression. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2006; 92:108-118.

Sampaio SAP, Rivitti EA. *Fotodermatoses in dermatologia*. 1th ed. São Paulo. 1998:629-644.

Schröder JM, Reich K, Kabashima K, Lin FT, Romani N, Metz M *et al*. Who is really in control of skin immunity under physiological circumstances – lymphocytes, dendritic cells or keratinocytes? *Exper Dermatol* 2006;15:913-920.

Schwarz T. Mechanisms of UV-induced Immunosuppression. *Keio J Med* 2005; 54(4):165-171.

Schwarz T. Photoimmunosuppression. School in photodermatology. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2002; 18(3):141-145.

Seiffert K, Granstein RD. Neuropeptides and neuroendocrine hormones in ultraviolet radiation-induced Immunosuppression. *Methods* 2002;28:97-103.

Souza SRP, Fischer FM, Souza JMP. Suntanning and risk of cutaneous melanoma: a literature review. *Rev Saude Publica* 2004;38(4):588-598.

Streilein JW, Alard P, Niizeki H. A new concept of skin-associated lymphoid tissue (SALT): UVB light impaired cutaneous immunity reveals a prominent role for cutaneous nerves. *Keio J Med* 1999;48(1):22-27.

Takahashi K. Development and differentiation of macrophages and related cells: historical review and current concepts. *J Clin Exp Hematopat* 2001; 41(1):1-33.

Thieden E, Collins SM, Philipsen PA, Murphy GM, Wulf HC. Ultraviolet exposure patterns of Irish and Danish gardeners during work and leisure. *Br J Dermatol* 2005;153:795-801.

Tobin DJ. Biochemistry of human-skin-our brain on the outside. *Chem Soc Rev* 2006;35:52-67.

Tong A, Nguyen J, Lynch KW. Differential expression of CD45 isoforms is controlled by the combined activity of basal and inducible splicing-regulatory elements in each of the variable exons. *J Biol Chem* 2005;280:38297-38304.

Van der Vleuten CJM, Kroot EJA, de Jong EMGJ, van de Kerkhof PCM. The immunohistochemical effects of a single challenge with an intermediate dose of ultraviolet B on normal skin. *Arch Dermatol Res* 1996;288:510-516.

Yaron I, Zakheim AR, Oluwole SF, Hardy MA. Effects of ultraviolet-B irradiation on human LAK and NK cytotoxic activity. *Cellular Immunol* 1995;185:168-176.

Young AR. Acute effects of UVR on human eyes and skin. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2006; 92:80-85.

Zak-Prelich M, Narbutt J, Sysa-Jedrzejowska A. Environmental risk factors predisposing to the development of basal cell carcinoma. *Dermatol Surg* 2004;30(Suppl.2):248-252.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. Nome do paciente: _____ Documento de identidade Nº: _____

Sexo: M ☐ F ☐ Data de nascimento: ____/____/____

Endereço: _____ nº: _____ Apto. _____

Bairro: _____ Cidade: _____

CEP: _____ Telefone: DDD (____) _____

2. Responsável legal: _____

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.): _____

Documento de identidade nº: _____ Sexo: M ☐ F ☐

Data de nascimento: ____/____/____

Endereço: _____ Nº: _____ Apto: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

CEP: _____ Telefone: DDD (____) _____

II – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. **Título do Protocolo de Pesquisa:** EFEITOS DA RADIAÇÃO SOLAR SOBRE O SISTEMA IMUNOLÓGICO DE PESCADORES DE RECIFE

Pesquisador: Dr^a. Sarita Maria de Fátima Martins de Carvalho Bezerra

Cargo/Função: Prof^a. Voluntária de Dermatologia da UFPE. Inscrição no Conselho Regional de Medicina nº. 4166/PE

Unidade do HCFMUSP: Laboratório de Investigação Médica LIM-56 do Departamento de Dermatologia.

2. Avaliação do Risco da Pesquisa: sem risco ☐ risco mínimo ☐ risco médio ☐
risco baixo ☐ risco maior ☐ (Probabilidade de que
o indivíduo sofra algum dano como consequência
imediate ou tardia do estudo)

3. Duração da Pesquisa: 12 meses

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA

1. Justificativa e objetivos da pesquisa: Como nos últimos anos os pesquisadores passaram, a partir de seus resultados, a acreditar que a radiação solar prejudica a resposta imune, diminuindo a resistência do indivíduo a infecções, de um modo geral, e que este efeito não está restrito à pele, mas também pode estar associado a infecções sistêmicas que acometem várias partes do corpo, resolvemos estudar os efeitos da radiação solar sobre o sistema de defesa (sistema imunológico) de pescadores da cidade do Recife.

Você está convidado a participar da presente pesquisa que envolverá 20 indivíduos do sexo masculino, com idade entre 30 anos e 65 anos, pescadores registrados na colônia de pesca do bairro do Pina, em Recife, e 20 indivíduos de igual sexo e faixa etária, também residentes no bairro do Pina, com profissões que exijam trabalho interno sem exposição constante do sol.

2. Procedimentos e propósitos que serão utilizados, incluindo a identificação dos procedimentos experimentais: O presente estudo avaliará as modificações surgidas na pele, do ponto de vista clínico e imunológico (sistema de defesa do organismo). Todos os participantes serão submetidos a questionário sobre hábitos diários, antecedentes clínicos, além da aferição do peso, altura, pressão arterial e exame dermatológico completo. Após esse primeiro contato, será agendada a coleta do sangue e biópsia da pele em duas localizações: uma da área exposta ao sol (dorso) e outra da área em região coberta (região glútea). A coleta do sangue será feita com material descartável, na veia do braço, por pessoal treinado (técnico em enfermagem) e as duas biópsias de pele de 4 mm de diâmetro, serão feitas sob anestesia local por mim, Dr^a. Sarita Martins, em sala de cirurgia ambulatorial.

3. Desconfortos e riscos esperados: Este procedimento poderá causar dor no momento da aplicação do anestésico e pequeno sangramento após a retirada do fragmento de pele, que será resolvido com aplicação e medicação local. Uma pequena ferida resultará deste procedimento, que desaparecerá dentro de 10 dias.

4. Benefícios que poderão ser obtidos: Todos os participantes terão uma avaliação clínica e um minucioso exame dermatológico de toda a pele e mucosas; orientação e tratamento com relação a possíveis dermatoses que venham a ser diagnosticadas; orientação sobre os efeitos da foto-exposição sobre a pele, principalmente relacionadas aos riscos de câncer, além de exames laboratoriais como hemograma, eletroforese de proteínas, uréia, creatinina, glicemia, ALT e AST e parasitológico de fezes (três amostras). Tanto o sangue como as biópsias serão usadas exclusivamente neste projeto de pesquisa.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas. As informações e dúvidas sobre os efeitos da foto-exposição sobre a pele serão sempre esclarecidas. Orientações sobre foto-proteção e os resultados dos exames realizados serão fornecidos a todos os participantes da pesquisa.

2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. O indivíduo poderá solicitar a sua saída do protocolo da pesquisa a qualquer momento.

3. Salvaguarda de sigilo e privacidade. Os dados obtidos serão acessados somente pelos investigadores e pela Comissão de Ética da Instituição.

4. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

5. Viabilidade de indenização, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

V – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pela pesquisadora e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

Recife, _____ de _____ de 2005

(Assinatura do sujeito da pesquisa ou o responsável legal)

Assinatura da pesquisadora

(carimbo ou nome legível)

APÊNDICE B – Protocolo de levantamento de dados

FICHA CLÍNICA

1. Nome: _____ 2. Idade: ☐☐
3. Sexo: masculino ☐ feminino ☐ 4. Cor: _____ 5. Estado civil: solteiro ☐ casado ☐
6. Escolaridade: não lê, não escreve ☐ 1º grau comp/incomp ☐ 2º grau comp/incomp ☐
7. Peso: ☐☐☐ 8. Altura: ☐☐☐ 9. PA: ☐☐☐ X ☐☐☐ 10. Fotografia: sim ☐ não ☐
11. Estado nutricional (IMC): _____ 12. Profissão: _____
13. Tempo de profissão: _____ 14. Tempo de exposição ao sol diária em horas: _____
15. Uso de filtro solar: sim ☐ não ☐ 16. Frequência: sempre ☐ às vezes ☐ raramente ☐
17. Doenças associadas: atual: _____ nos últimos seis meses: _____
no último ano: _____ 18. Qual: _____
19. Antecedentes alérgicos: _____
20. Uso de medicação: sim ☐ não ☐ 21. Qual: _____
22. Toma alguma vitamina: sim ☐ não ☐ 23. Toma algum suplemento alimentar: sim ☐ não ☐
24. Qual: _____ 25. Fumante: sim ☐ não ☐
26. Faz uso de bebida alcoólica: sim ☐ não ☐
27. Fez algum procedimento cirúrgico recente: sim ☐ não ☐ 28. Qual: _____
29. Tomou alguma vacina nos últimos três meses: sim ☐ não ☐ 30. Qual: _____
31. Fez algum tratamento ou teve algum internamento psiquiátrico no último ano: sim ☐ não ☐
32. Qual: _____

EXAME DERMATOLÓGICO

33. Cabeça: _____ 34. Face: _____
35. Tronco: _____ 36. MMSS: _____
37. Mãos: _____ 38. MMII: _____
39. Pés: _____ 40. Unhas: _____
41. Mucosa oral: _____

EXAMES LABORATORIAIS REALIZADOS

42. Hemograma: _____ 43. Albumina: _____
44. Alfa1: _____ 45. Alfa2: _____
46. Beta: _____ 47. Gama: _____
48. Proteínas totais: _____ 49. Razão A/G: _____
50. Uréia: _____ 51. Creatinina: _____
52. Glicemia: _____ 53. ALT e AST: _____
54. Parasitológico de fezes (3 amostras): _____

BIÓPSIA DE PELE LOCAL

55. a) Área exposta: _____
56. b) Área coberta: _____

RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS DE BIÓPSIA DE PELE

ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS	PELE COBERTA	PELE EXPOSTA
Hiperceratose		
Cones		
Segmentos da epiderme entre os cones		
Elastose		
Ectasia		
Infiltrado inflamatório histiocitário perivascular superficial		
Infiltrado inflamatório perivascular superficial de outras células		
Infiltrado inflamatório linfocitário perivascular profundo		
Infiltrado inflamatório histiocitário perivascular profundo		
Infiltrado inflamatório perivascular profundo de outras células		
Infiltrado inflamatório linfocitário perivascular superficial		

RESULTADOS IMUNOLÓGICOS**Resultados de marcadores em sangue**

LINFO: ____ CD3: ____ CD3CD4: ____ CD3CD8: ____ CD19: ____ CD3CD56: ____
CD45RA: ____ CD3CD45RA: ____ CD3CD4C45RA: ____ CD3CD8C45RA: ____
CD45RO: ____ CD3CD45RO: ____ CD3CD4C45RO: ____ CD3CD8CD45RO: ____
CD28: ____ CD3CD28: ____ CD3CD4CD28: ____ CD3CD8CD28: ____
CD69: ____ CD3CD69: ____ CD3CD4CD69: ____ CD3CD8CD69: ____
CD25: ____ CD3CD25: ____ CD3CD4CD25: ____ CD3CD8CD25: ____
HLA-DR: ____ CD3HLA-DR: ____ CD3CD4HLA-DR: ____ CD3CD8HLA-DR: ____

Resultados de marcadores em pele

MARCADORES	PELE COBERTA	PELE EXPOSTA
CD1a		
CD4		
CD8		
CD56		
CD25		
CD45RO		
CD68		
Mastócitos		

**TESTE DE IDENTIFICAÇÃO DE DISTÚRBIO DE USO DE ÁLCOOL (AUDIT), CRIADO POR
PICCINELLI E COLABORADORES**

Responda as questões:

1. Com qual frequência você utiliza bebidas com álcool (cerveja, vinho, cachaça, etc.)?
(0) nunca (1) mensalmente ou menos (2) 2-4 vezes ao mês
(3) 2-3 vezes por semana (4) 4 ou mais vezes por semana
2. Quantas doses de bebidas alcoólicas você costuma tomar nesses dias?
(0) 1 ou 2 (1) 3 ou 4 (2) 5 ou 6 (3) 7 a 9 (4) 10 ou mais
3. Com que frequência toma mais que 6 ou mais doses alcoólicas em uma única ocasião?
(0) nunca (1) menos que mensalmente (2) mensalmente (3) semanalmente
(4) quase diária
4. Com que frequência no último ano você se sentiu incapaz de parar de beber depois que começou?
(0) nunca (1) menos que mensalmente (2) mensalmente (3) semanalmente
(4) quase diária
5. Com que frequência no último ano você não conseguiu fazer algo ou atender a um compromisso devido ao uso de bebida alcoólica?
(0) nunca (1) menos que mensalmente (2) mensalmente (3) semanalmente
(4) quase diária
6. Com que frequência no último ano você precisou de uma primeira dose pela manhã para sentir-se melhor depois de uma bebedeira? (0) nunca (1) menos que mensalmente (2) mensalmente
(3) semanalmente (4) quase diária
7. Com que frequência no último ano você sentiu-se culpado ou com remorso após beber?
(0) nunca (1) menos que mensalmente (2) mensalmente (3) semanalmente
(4) quase diária
8. Com que frequência no último ano você não conseguiu se lembrar o que aconteceu na noite anterior porque havia bebido? (0) nunca (1) menos que mensalmente (2) mensalmente
(3) semanalmente (4) quase diária
9. Você já se machucou ou machucou alguém como resultado de uma bebedeira sua?
(0) não (1) sim, mas não no último ano (4) sim, no último ano
10. Algum parente ou amigo ou médico ou outro profissional de saúde se preocupou com seu hábito de beber ou sugeriu que parasse ou diminuísse a quantidade?
(0) não (1) sim, mas não no último ano (4) sim, no último ano

Some os números em parêntesis. Um valor maior que oito indica problemas com bebidas.