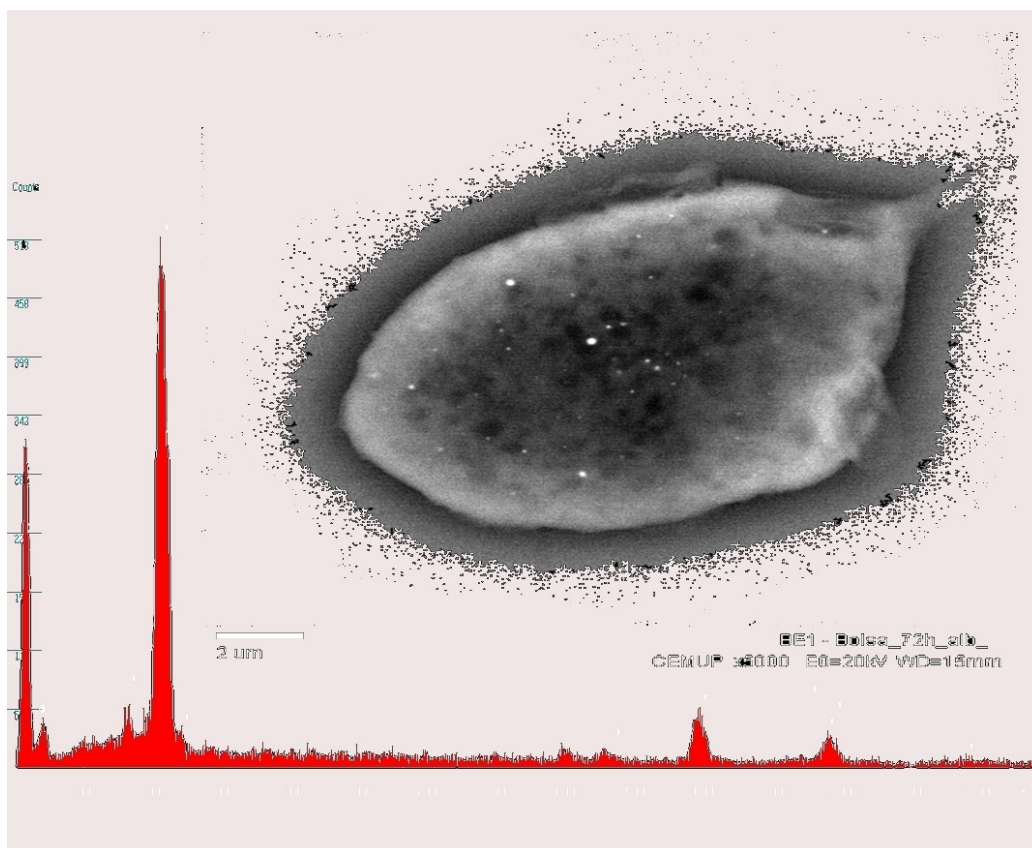


Interacção entre Mercúrio e Sistemas Biológicos

Mónica Elisabete da Silva Cunha



Dissertação de doutoramento em Ciências Biomédicas

2008

Mónica Elisabete da Silva Cunha

Interacção entre Mercúrio e Sistemas Biológicos

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Ciências Biomédicas, submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador- Professor Doutor Artur Perez Águas, professor catedrático, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Co-orientador- Doutora Maria João Rodrigues Oliveira, professora associada, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Esta tese foi financiada pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT). Bolsa com a referência: SFRH/ BD/ 19806/2004.

Ao meu PAI

À minha FILHA

Preceitos legais

De acordo com o nº 2 do Artigo 8º do Decreto-Lei nº 388/70, foram utilizados para esta tese resultados contidos nos seguintes trabalhos publicados.

Cunha EM and Águas, AP. (2003) High Resolution Identification of Mercury in Particles in Mouse Kidney after Acute Lethal Exposure: A study by Scanning Electron Microscopy Coupled with X-ray Elemental Microanalysis, *BioMetals*, 16, 583-590.

Cunha EM, Oliveira MJR, Ferreira PG and Águas AP. (2003) Quantification of particles of lethal mercury in mouse viscera: high-resolution study of mercury in cells and tissues, *Toxicology and Industrial Health*, 19, 55-61.

Cherdwongcharoensuk D, Cunha EM, Upatham S, Pereira AS, Oliveira MJR and Águas AP. (2004) *In vivo* ingestion of heavy metal particles of Se, Hg and W by murine macrophages. A study using scanning electron microscopy coupled with X-ray microanalysis, *Toxicology and Industrial Health*, 18, 397-403.

Cunha EM, Cherdwongcharoensuk D and Águas AP. (2004) Mercury intake by inflammatory phagocytes: *in vivo* cytology of mouse macrophages and neutrophils by X-ray elemental microanalysis coupled with scanning electron microscopy, *Human & Experimental Toxicology*, 23, 447-453.

Madureira P, Cunha EM, Águas AP. (2007) Acute depletion and recovery of peritoneal B-1 lymphocytes in BALB/c mice after a single injection of mercury chloride. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 29, 1-12.

Agradecimentos

A prova que agora apresento não é resultado de um trabalho individual mas fruto do trabalho de uma equipa que tem o privilégio de ser orientada pelo Professor Doutor Artur Perez Águas. A sua forma de estar na ciência reflecte o facto de ser um discípulo do Mestre, Professor Doutor Nuno Grande.

Ao Professor Doutor Nuno Grande, expresso um agradecimento especial, o seu exemplo será sempre uma referência na minha vida tanto pessoal como profissionalmente. Agradeço a honra de integrar aquela que será sempre a sua equipa de investigação.

Ao iniciar estas linhas, vêm-me à ideia nomes de tantas pessoas (amigos, professores, colegas), às quais, de uma forma ou de outra, fico a dever um agradecimento e, por recear esquecer-me de alguém, digo-lhes apenas que estou grata a todos, mesmo que os seus nomes não estejam nestas páginas.

Esta dissertação de candidatura ao grau de doutor foi o resultado de uma caminhada iniciada no ICBAS, no departamento de anatomia, onde tive a sorte de integrar, como bolsista, em Março de 2003, um projecto de investigação do Professor Doutor Artur Perez Águas. À minha muito querida Professora Doutora Paula Ferreira também por isso lhe agradeço.

Ao professor Doutor Perez Águas, meu orientador, dificilmente conseguirei transmitir como merece o meu reconhecimento e profunda gratidão pela sua postura de inultrapassável tenacidade, espírito crítico e humanismo, a sua disponibilidade e incentivo foram fundamentais na condução dos trabalhos que constituem esta dissertação. A sua preocupação com o meu crescimento científico, a sua paciência infinita foi essencial para a realização deste trabalho. Obrigada pela confiança que sempre depositou em mim. Foi uma honra trabalhar consigo. A frontalidade com que defende as suas convicções é para mim um exemplo.

À Doutora Maria João Rodrigues Oliveira, minha co-orientadora, agradeço a forma amiga como sempre escutou as minhas preocupações e a sua disponibilidade constante para me ajudar. O seu espírito científico pragmático é algo que nunca esquecerei e sempre tentarei colocar em prática.

Ao Professor Doutor António Sousa Pereira, Director do departamento de Anatomia em 2003, agradeço a forma amiga como me recebeu no seu Departamento.

Uma palavra de enorme apreço e admiração é também devida ao Professor Doutor José Teixeira Gomes. As suas críticas sempre construtivas, o estímulo

constante, o empenho nas reuniões científicas do departamento foram muito importantes para a realização dos trabalhos que constituem a tese.

Às minhas amigas e colegas de trabalho, Doutora Paula Ferreira, Dra. Maria Rodrigues, Doutora Mariana Monteiro, Dra. Raquel Marques e Dra. Andreia Ribeiro, agradeço a ajuda incondicional durante a elaboração dos trabalhos desta tese. Ao Dr. Pedro Madureira um obrigada muito especial pela paciência. À Doutora Judite Novais Barbosa um agradecimento, também especial, desde a contagem das células até hoje, obrigada pela sua presença.

À Dra. Madalena Costa pela sua extraordinária competência técnica, pela sua característica forma de estar na ciência como na vida agradeço a valiosa ajuda técnica nos trabalhos que constituem esta dissertação.

Gostava de neste momento especial retribuir a minha amizade, e de lhes dedicar um agradecimento especial à extraordinária equipa técnica do meu departamento. Ao Sr. António Costa e Silva, o seu optimismo, a sua amizade, mesmo sem o saber, foram fundamentais para mim, obrigada. Ao Sr. Emanuel Monteiro o rigor no processamento das amostras, o seu jeito único e peculiar foram fundamentais para este trabalho, até do ponto crítico eu vou sentir falta! Obrigada Sr. Emanuel. À Sra. D. Alexandrina Ribeiro, um agradecimento especial pela palavra amiga e por toda a preciosa ajuda no processamento das amostras. Ao Sr. Duarte Monteiro agradeço o apoio técnico, o arranjo gráfico e encadernação desta dissertação. À Sra. D. Manuela Silva e à Ana Pinto agradeço a disponibilidade permanente em me ajudarem. Não quero nem posso esquecer que embora actualmente aposentados também colaboraram nesta dissertação os Srs. Agostinho Correia e José Aurélio Mexedo.

I offer my deepest thanks to my close friend, Duangrudee, for her lovely friendship, warmest heart, understanding and helping. You will stay in my mind and in my heart forever!

Agradeço também ao Sr. Engenheiro Carlos Sá, Director do Centro de Materiais da Universidade do Porto, CEMUP, a sua disponibilidade para a utilização do microscópio electrónico e o seu interesse no acompanhamento dos trabalhos. O meu muito obrigado à minha amiga Dra. Daniela Silva do CEMUP pelo seu magnífico desempenho técnico tão precioso para o trabalho experimental. O seu rigor, a sua disponibilidade, a entrega e o empenho com que sempre executou as suas tarefas, foram fundamentais para o trabalho e nunca o poderei esquecer.

Ao Professor Doutor Luís Baldaia agradeço a tradução do resumo.

Agradeço à Sra. D. Madalena Oliveira o meu obrigado pela preciosa ajuda na impressão da tese.

À minha Amiga Cristina Abreu, a quem tanto devo, aqui só lhe agradeço a valiosa ajuda na tradução do resumo, na formatação da tese e na revisão bibliográfica.

À minha mana Sandra Teixeira, por me fazer acreditar nos momentos de desalento e incerteza... o meu eterno obrigado!

À minha Mãe, tudo o que agradeço e lhe devo, nem conseguiria escrevê-lo... ela também não o queria... um simples beijinho...

Aos meus Amigos e à minha Família que nunca estiveram ausentes, eles e eu sabemos quem são... agradeço o encorajamento, e o carinho que nunca me negaram. Espero que finalmente percebam o que é que eu tenho andado a fazer nos últimos anos!

Resumo

A progressiva utilização do mercúrio (Hg) para fins industriais e o emprego de compostos mercuriais na agricultura resultaram no aumento significativo da contaminação ambiental do nosso planeta especialmente da água e dos alimentos.

Nesta dissertação tivemos como objectivo fundamental investigar a distribuição tecidual e intracelular de Hg em sistemas biológicos e caracterizar, a nível celular, a ingestão de Hg por fagócitos e os efeitos agudos de imunotoxicidade induzidos pelo metal. Como método principal de detecção de Hg *in situ* escolhemos a microscopia electrónica de varrimento acoplada a um sistema de detecção Noran Voyager de microanálise elementar de raios-X com sistema de detecção EDS (Energy Dispersive Spectrometry). Este método permitiu a observação com alta resolução do Hg nos tecidos e em circulação.

Na presente dissertação foram realizados estudos *in vivo* em ratinhos BALB/c. Foi utilizado um modelo animal de inflamação que consiste na formação de uma bolsa de ar subcutânea. O estudo foi mais direccionado para a resposta aguda inicial, tanto inflamatória como imunotóxica.

Mostramos que em circulação o Hg organiza-se em micropartículas esféricas que raramente se agregam com diâmetro de 31.4 ± 14.1 nm e com densidade de cerca de 1920 ± 1320 partículas por mm^2 de tecido renal quando se injecta uma dose letal de cloreto de mercúrio. Observamos ainda que 89% do Hg circulante é captado pelo fígado, principal órgão-alvo na sequestração do metal, que o rim é o segundo órgão a captar Hg circulante e o terceiro órgão a captar o Hg em circulação é o baço, sendo escassa a deposição de Hg nos pulmões.

A resposta de fagocitose a três partículas metálicas de diferentes tamanhos W, Hg e Se foi estudada e concluímos que o tamanho da partícula a ser fagocitada pelo macrófago modula a fisiologia deste: a ingestão pelos macrófagos de partículas grandes leva-os a um estado de dormência e a ingestão de partículas ultrafinas são alvo para intensa actividade metabólica dos macrófagos.

Estudos comparativos dos dois tipos principais de fagócitos, granulócitos e macrófagos na sua capacidade de remoção do Hg *in vivo*, durante uma resposta inflamatória aguda, permitiu-nos documentar que mais de metade dos fagócitos ingerem Hg (70% macrófagos e 50% neutrófilos), em número superior a 20/30 microesferas por célula. Intracelularmente, as partículas de Hg

aparecem como microesferas de pequeno diâmetro (< 20nm). Este metal é internalizado rapidamente por pinocitose sob a forma de pequenas partículas.

Foram também caracterizados os efeitos agudos de imunotoxicidade sobre os linfócitos B induzidos pelo Hg. De facto, demonstramos que a população de linfócitos B (em particular células B-1) é severamente afectada pelos efeitos tóxicos do Hg após uma única injeção do metal.

Em conjunto, os resultados desta dissertação mostram por microscopia electrónica como o Hg é distribuído pelos tecidos e células do ratinho, como decorre a citologia da ingestão de Hg por macrófagos e neutrófilos inflamatórios e demonstram a vulnerabilidade particular da subpopulação linfocitária B-1 à toxicidade deste metal.

Summary

The increasing use of mercury (Hg) for industrial purposes and the use of mercury compounds in agriculture resulted in the significant increase in environmental contamination of our planet especially water and food.

This study had as its fundamental objective to investigate the tissue and intracellular distribution of Hg in biological systems and to characterize, at the cellular level, the intake of Hg by phagocytes and the acute effects of immunotoxicity induced by the metal. As a primary method of detection of Hg in situ, the scanning electron microscopy was chosen, coupled with a detection system Noran Voyager of basic microanalysis X-ray, with detection system EDS (Energy Dispersive Spectrometry). This method allowed the observation with high resolution of Hg in the tissues and in circulation.

In this study were performed in vivo studies in mice BALB/c. An animal model of inflammation was used, that consisted in the formation of a subcutaneous pocket of air. This study was focussed mainly the acute initial response, both as inflammatory and immunotoxic. It was demonstrated that the Hg in circulation was organized in spherical microparticles that rarely are aggregated, with a diameter of 31.4 ± 14.1 nm and with a density of about 1920 ± 1320 particles per mm² of kidney tissue, when injected a lethal dose of mercuric chloride. It was also observed that 89% of Hg stock was captured by the liver, the main target organ in the capture of the metal, that the kidney was the second organ to capture the Hg stock and that the third organ to capture the Hg in circulation was the spleen. It was verified a low deposition of Hg in the lungs.

The response of phagocytosis to three metallic particles of different sizes W, Hg and Se has been studied and it was concluded that the size of the particle being fagocitated by macrophages modulates its physiology. The ingestion, by the macrophages, of large particles leads them to a state of dormancy and the ultra fine particles are subject to intense metabolic activity by the macrophages.

Comparative studies of the two main types of phagocytes, granulocytes and macrophages in its ability to remove the Hg in vivo, during an acute inflammatory response, allowed the verification that more than half of phagocytes ingest Hg (70% of macrophages and 50% of neutrophils), in more than 20/30 microspheres per cell.

At intracellular level, the particles of Hg appear as microspheres of small diameter (<20nm). This metal is rapidly internalized by pinocytosis in the form of small particles.

It was also characterized the acute effects of immunotoxicity on the B lymphocytes induced by Hg. Indeed, it was shown that the population of B lymphocytes (particularly B-1 cells) was severely affected by the toxic effects of Hg after a single injection of the metal.

Together, the results of this study have shown, by electron microscopy, how the Hg is distributed by tissues and cells of the mouse. It was also demonstrated the cytology intake of Hg by macrophages and neutrophils and the vulnerability of a particular lymphocytic subpopulation (B-1) to the toxicity of this metal.

Résumé

L'utilisation progressive du mercure (Hg) surtout dans l'industrie et l'emploi de composés de mercure dans l'agriculture mène à une augmentation significative de la contamination environnementale de notre planète surtout en ce qui concerne l'eau et les aliments.

L'objectif principal de ce travail était l'étude de la distribution tissulaire et intracellulaire de Hg dans des systèmes biologiques et la caractérisation, au niveau cellulaire, de l'ingestion de Hg par des phagocytes et les effets aigus d'immunotoxicité induits par le métal. La méthode principale de détection *in situ* du Hg était la microscopie électronique de balayage accolé à un système Noran Voyager de microanalyse élémentaire de rayons X pourvu d'un système de détection EDS (Energy Dispersive Spectrometry). Cette méthode nous a permis l'observation à haute résolution du Hg soit dans les tissus soit dans la circulation.

Nous avons fait des études *in vivo* chez des souris BALB/c. Un modèle animal d'inflammation provoquée par une bourse d'air souscutanée était utilisé. Cette étude fût directionné vers la réponse aigue initiale, soit inflammatoire soit immunotoxique.

Nous montrons que, dans la circulation, le Hg est organisé en microparticules sphériques rarement sous la forme d'agregats et avec un diamètre de 31.4 ± 14.1 nm et une densité d'environ 1920 ± 1320 particules par mm^2 de tissu rénal si on injecte une dose létale de chlorure de mercure. Nous observons aussi que 89% du Hg circulant est capté par le foie, principal organe cible dans la séquestration du métal, que les reins sont le deuxième organe a capter le Hg circulant, suivie de la rate et finalement une déposition très faible sur les poumons.

La réponse par phagocytose à trois particules métalliques de différentes tailles W, Hg et Se fût étudiée et nous a permis de conclure que la taille de la particule a phagocyter par le macrophage module la physiologie de celui-ci : l'ingestion par les macrophages de grandes particules les conduit à un stade de repos tandis que l'ingestion de particules ultrafines mène à une activité métabolique intense des macrophages.

L'étude comparatif des deux types de phagocytes, granulocytes et macrophages en ce qui concerne leur capacité d'enlever le Hg *in vivo*, pendant une réponse inflammatoire aigue, nous a permis d'observer que la plupart des phagocytes ingèrent Hg (70% macrophages et 50% neutrophiles), en nombre supérieur à 20/30 microsphères par cellule. Dans la cellule les particules de Hg sont observées comme

microsphères de petit diamètre (< 20nm). Ce métal passe rapidement à l'intérieur par pinocytose sous la forme de petites particules.

Les effets aigus de l'immunotoxicité sur les lymphocytes B induits par le Hg sont aussi étudiés. Nous avons démontré que la population de lymphocytes B (en particulier les cellules B-1) est fortement conditionnée par les effets toxiques du Hg après une seule injection du métal.

L'ensemble de ces résultats montrent comme le Hg est distribué dans les tissus et cellules du souris, en utilisant la microscopie électronique, la façon dont la cytologie de l'ingestion du Hg par les macrophages et neutrophiles se fait et mettent en évidence la vulnérabilité particulière de la sous population de lymphocytes B-1 à la toxicité de ce métal.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJECTIVOS E ESTRUTURA DA TESE	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO E MICROANÁLISE POR RAIO-X.....	19
3.2. CITOMETRIA DE FLUXO	21
4. RESULTADOS EXPERIMENTAIS SOB A FORMA DE ARTIGOS CIENTÍFICOS	23
4.1. HIGH-RESOLUTION IDENTIFICATION OF MERCURY IN PARTICLES IN MOUSE KIDNEY AFTER ACUTE LETHAL EXPOSURE.....	25
4.2 QUANTIFICATION OF PARTICLES OF LETHAL MERCURY IN MOUSE VISCERA: HIGH-RESOLUTION STUDY OF MERCURY IN CELLS AND TISSUES	27
4.3. IN VIVO INGESTION OF HEAVY METAL PARTICLES BY MURINE MACROPHAGES. A STUDY USING SCANNING ELECTRON MICROSCOPY COUPLED WITH X-RAY MICROANALYSIS	29
4.4. MERCURY INTAKE BY INFLAMMATORY PHAGOCYTES: IN VIVO CYTOLOGY OF MOUSE MACROPHAGES AND NEUTROPHILS BY X-RAY ELEMENTAL MICROANALYSIS COUPLED WITH SCANNING ELECTRON MICROSCOPY	31
4.5. ACUTE DEPLETION AND RECOVERY OF PERITONEAL B-1 LYMPHOCYTES IN BALB/C MICE AFTER A SINGLE INJECTION OF MERCURY CHLORIDE.....	Erro!
MARCADOR NÃO DEFINIDO.	
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÕES	45
7. BIBLIOGRAFIA	49

Capítulo



Introdução

1. Introdução

O mercúrio (Hg) é um metal líquido e inodoro à temperatura ambiente mas quando a temperatura aumenta transforma-se em vapores tóxicos e corrosivos mais densos do que o ar. Este metal vem sendo usado na indústria e na medicina desde há séculos. O seu nome homenageia o Deus grego Mercúrio, mensageiro dos deuses, lembrando a fluidez do metal. O símbolo Hg vem do latim “hydrargyrum” (*hydor* que significa “água” e *argyros* que era o nome grego da “prata”), que significa prata líquida. O mercúrio é um elemento químico de número atômico 80 e massa atômica 200,59 (massa atômica relativa ao átomo de carbono-12 e recomendada pela IUPAC em 2001). Em conjunto com o gálio são os únicos metais líquidos à temperatura ambiente. Pertence ao grupo 12 (anteriormente designado de 2B), integrando a classe dos metais de transição. Pode ainda ser encontrado em termômetros e medidores pressão arterial utilizados nos hospitais e, comercialmente, em baterias, luz fluorescente e interruptores (Clarkson *et al.*, 2003). Grande quantidade de mercúrio metálico é utilizada em eléctrodos usados na produção industrial electrolítica de cloreto e sódio a partir do sal. Esta aplicação industrial do mercúrio potencia o risco de exposição ocupacional e acidental (Clarkson *et al.*, 2003). No entanto, a União Europeia pretende que num futuro próximo não ocorra contacto entre humanos e instrumentos frágeis contendo mercúrio.

De um modo geral existem três formas de apresentação do mercúrio: (i) elemento metálico, mercúrio elementar (Hg^0), (ii) sais inorgânicos, também designados como sais de mercúrio, quando este se combina com elementos como o cloro, enxofre ou oxigénio, ou (iii) compostos orgânicos, se um átomo de mercúrio se liga covalentemente a pelo menos um átomo de carbono, originando compostos de metilmercúrio, etilmercúrio ou fenilmercúrio.

O Hg pode encontrar-se em três estados de oxidação (0, +1, +2), interconvertíveis. O estado elementar Hg^0 , existe na forma líquida à temperatura ambiente, é volátil e liberta o vapor de mercúrio, muito importante no ciclo do mercúrio pois sofrendo oxidação pode formar os outros estados, o mercurioso Hg^{+1} e mercúrico, Hg^{+2} .

Hoje em dia a exposição da população em geral surge a partir das duas formas orgânicas do metal, metilmercúrio (CH_3Hg^+) e etilmercúrio ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$), provenientes de três fontes distintas: o consumo de peixe contaminado, as amálgamas dentárias e algumas vacinas. Apesar de distintas estas formas são relacionáveis. O peixe contaminado é a maior, senão a única, fonte de

metilmercúrio, uma vez que hoje em dia a utilização de fungicidas contendo esta molécula não é comum.

As amálgamas dentárias (Gioda *et al.*, 2007), que consistem em aproximadamente 50% de mercúrio combinado com outros metais (35% de prata e 15% de cobre e vestígios de zinco) são usadas há mais de 150 anos sendo de mais barata e fácil aplicação do que amálgamas exclusivamente de ouro. As primeiras emitem mercúrio sob forma de vapor que é inalado e absorvido na corrente sanguínea. Os profissionais de saúde, para além da população em geral, que contactam ou possuem amálgamas dentárias (vulgo “chumbos”) estão expostos a esta forma de mercúrio.

Os argumentos partilhados entre proponentes e antagonistas destas amálgamas têm sido referidos como a guerra das amálgamas. Estes tornaram-se mais acentuados a partir de 1970 com a descoberta de que as amálgamas dentárias podem libertar vapor de mercúrio na cavidade oral, em concentrações superiores às referenciadas como aceitáveis. Posteriormente, foi tido em conta que a dose inalada é relativamente pequena considerando o pequeno volume da cavidade oral. Mesmo assim, as amálgamas dentárias são a principal fonte de exposição ao mercúrio sob a forma de vapor na população humana em geral. Apenas como curiosidade, é referido que o equivalente à superfície de 10 amálgamas dentárias eleva a concentração de mercúrio na urina de 1 µg do metal por litro e que a quantidade de vapor de mercúrio na boca de pessoas com amálgamas dentárias é cerca de 50-150 µg/cc (Kingman *et al.*, 1998).

Uma questão merece ser colocada: quais os riscos para a saúde deste tipo de exposição? Casos de envenenamento por inalação de vapores de mercúrio são reconhecidos há séculos (Ramazzini B, 1964). A personagem “Mad Hatter” no livro “Alice in Wonderland” terá sido imaginada por Lewis Carrol muito provavelmente a partir de vítima de intoxicação ocupacional por mercúrio. Hoje em dia, as exposições resultantes de actividades profissionais são já muito mais controladas do que no século passado. As concentrações na urina de pessoas com amálgamas dentárias (2 a 4 µg de mercúrio por litro), são muito mais baixas do que as concentrações encontradas em pessoas que estão, pela sua actividade profissional, em contacto com o mercúrio (20 a 50 µg de mercúrio por litro), (Santos *et al.*, 2007).

Em muitos países, os bebés continuam a ser expostos ao etilmercúrio sob a forma de vacinas, uma vez que esta forma de mercúrio orgânico é o ingrediente activo usado no timerosal (etilmercuritiosalicilato, composto

rapidamente metabolizado a etilmercúrio (Havarinasab *et al.*, 2005)), preservante usado em algumas preparações médicas, incluindo as vacinas. A exposição ao mercúrio a partir de amálgamas dentárias ou pelo consumo de peixe contaminado é uma questão presente há várias décadas. Já o possível risco associado ao timerosal usado em vacinas é uma questão relativamente recente.

Esta preocupação crescente com o mercúrio teve o seu auge na recente recomendação da “Environmental Protection Agency (EPA)” dos EUA (2001) que estabeleceu como a dose diária de metilmercúrio segura por dia como 0.1 µg por Kg de peso corporal, contrariando o valor estabelecido em 1978 pela “FAO/WHO Expert Committee on Food Additives” de 0.5 µg/Kg/dia. O efeito crónico provocado por este metal poderá dever-se a uma exposição ocupacional, como por exemplo, garimpagem, fábrica de lâmpadas ou odontologia, (Pinheiro *et al.*, 2000, Sigeyuki *et al.*, 2000, Tsugane *et al.*, 1987). O mercúrio pode estar associado a hidrocarbonetos gasosos e líquidos (petróleo e betumes), e é um elemento de origem profunda (manto terrestre) que ascende na forma de metil ou dimetil mercúrio. Nos depósitos vulcanogénicos, quando há disponibilidade de enxofre, o mercúrio pode precipitar como sulfeto (HgS).

A tabela 1, elaborada por Gossel and Bricker (1990), sumariza os aspectos toxicológicos e clínicos do vapor de mercúrio, do metilmercúrio e do etilmercúrio. Nesta tabela é também possível encontrar as manifestações clínicas resultantes da absorção deste metal sob a forma inorgânica divalente, uma vez que se acredita ser a espécie tóxica produzida nos tecidos após a inalação do vapor. Hg^{2+} é também a espécie química responsável por lesões renais.

Variable	Mercury Vapor	Inorganic Divalent Mercury	Methyl Mercury	Ethyl Mercury
Route of exposure	Inhalation	Oral	Oral (from fish consumption)	Parenteral (through vaccines)
Target organ	Central nervous system, peripheral nervous system, kidney	Kidney	Central nervous system	Central nervous system, kidney
Local clinical signs				
Lungs	Bronchial irritation, pneumonitis (>1000 µg/m ³ of air)			
Gastrointestinal tract	Metallic taste, stomatitis, gingivitis, increased salivation (>1000 µg/m ³ of air)	Metallic taste, stomatitis, gastroenteritis		
Skin		Urticaria, vesication		
Systemic clinical signs				
Kidney	Proteinuria (>500 µg/m ³ of air)	Proteinuria, tubular necrosis		Tubular necrosis
Peripheral nervous system	Peripheral neuropathy (>500 µg/m ³ of air)	Acrodynia		Acrodynia
Central nervous system	Erethism (>500 µg/m ³ of air), tremor		Paresthesia, ataxia, visual and hearing loss (>200 µg/liter of blood)	Paresthesia, ataxia, visual and hearing loss
Approximate half-life (whole body) (days)	60	40	70	20†
Treatment‡	Meso-2,3-dimercaptosuccinic acid	Meso-2,3-dimercaptosuccinic acid	Chelators not effective§	Chelators not effective§

Tabela 1.

A exposição crónica a vapores de mercúrio poderá estar associada a doenças degenerativas, tais como a doença de Alzheimer ou a doença de Parkinson (Ahlqwist *et al.*, 1999, Bjorkman *et al.*, 1996). Estudos “in vitro” indicam que o mercúrio pode afectar processos bioquímicos que se acredita estarem envolvidos na doença de Alzheimer (Leong *et al.*, 2001). Contudo, a inibição de vários processos bioquímicos “in vitro” provocada pelo metal, poderá não ocorrer “in vivo”, pelo que existem ainda dúvidas relativamente ao seu efeito neste campo.

O mercúrio é um fascinante objecto de brincadeira para as crianças, especialmente em países subdesenvolvidos, e se ingerido sob a forma líquida é rapidamente absorvido pelo tracto intestinal.

De acordo com tradições religiosas e culturais em determinados locais, indivíduos pertencentes a alguns cultos espalham o metal no chão das casas ou no carro, ou misturando-o com perfumes e pomadas de uso cutâneo (Riley *et al.*, 2001). Nestas situações o risco de toxicidade é muito elevado. Devido ao facto do vapor de mercúrio ser muito “pesado” quimicamente e tender a formar uma camada muito perto do chão, o risco da exposição de crianças pequenas e bebés é grande. Há séculos atrás, este metal era muito utilizado no tratamento de obstipações (Goldwater LJ, 1972). Este é, aliás, um dos mais polémicos assuntos das primeiras práticas médicas, assim como a sua generalizada utilização no princípio do século XX no tratamento da sífilis.

Metilmercúrio

O mercúrio inorgânico pode ser convertido em metilmercúrio e dimetilmercúrio pela acção de microrganismos, as designadas bactérias metanogénicas, particularmente em sedimentos. (Gossel e Bricker, 1990).

A biotransformação do mercúrio inorgânico em metilmercúrio representa um sério risco ambiental uma vez que leva à sua acumulação na cadeia alimentar aquática por um fenómeno que se designa de bioamplificação, isto é, a concentração do metal aumenta à medida que se avança nos níveis tróficos. Pode-se pois concluir da capacidade do metilmercúrio de permanecer por longos períodos de tempo nos tecidos do organismo.

Nos humanos, a única fonte de contaminação pelo metilmercúrio é o consumo de peixe contaminado. O metilmercúrio é produzido no ambiente por biometilação do mercúrio inorgânico presente nos sedimentos aquáticos, Figs. 1A e 1B, (Gossel e Bricker).

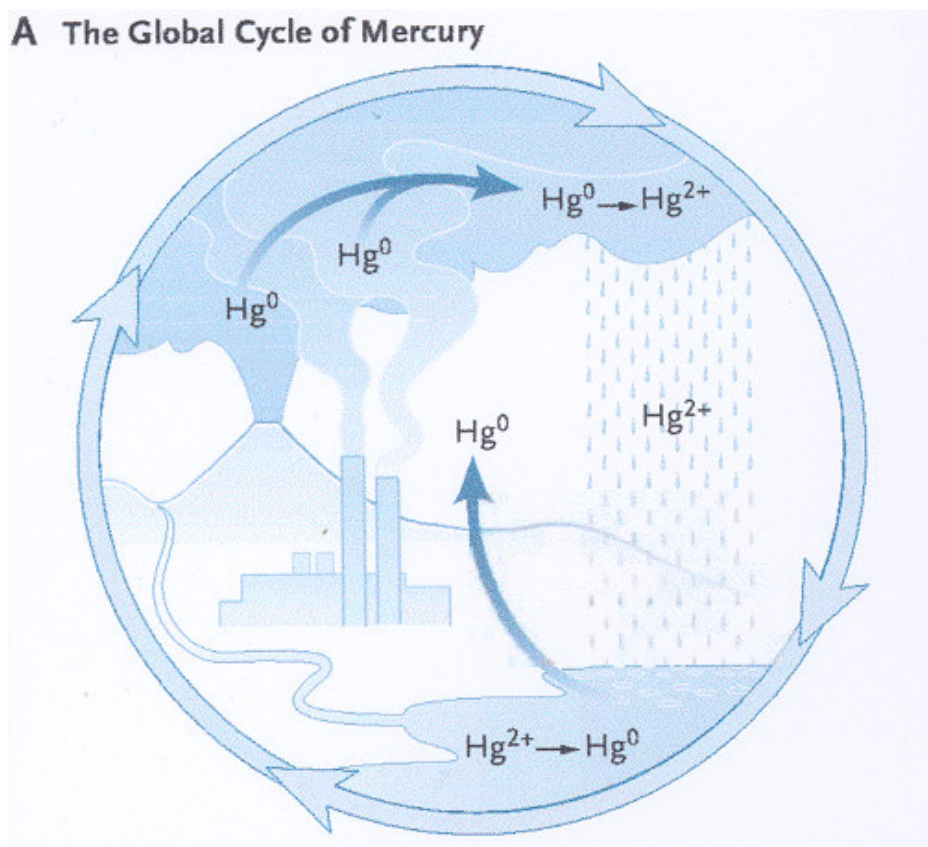


Fig. 1 A

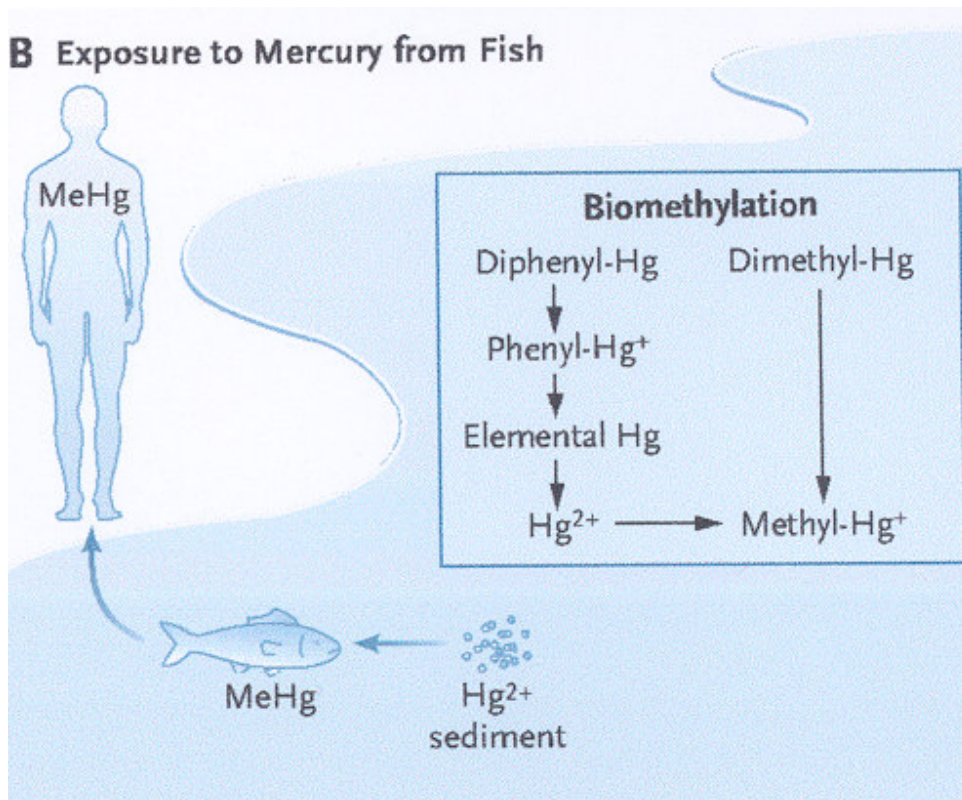


Fig. 1 B

Existem alguns trabalhos publicados sobre este assunto, relativos ao peixe-espada preto da Madeira (Grandjean *et al.*, 1991, Carvalho *et al.*, 2008).

Exemplos de casos graves, mesmo fatais, de envenenamento por metilmercúrio remontam a 1860 em Inglaterra (Hunter D, 1969). Inúmeros casos se seguiram relacionados com exposição relativa à dieta e à ocupação profissional. Como exemplos podem-se referir os acidentes ecológicos de origem industrial do século passado, como o caso da Baía de Minamata no Japão (Eto *et al.*, 1992), nos anos 50, no Iraque (Bakir, *et al.*, 1973) em 1971 ou nos Estados Unidos da América (Lange *et al.*, 1994) em 1990.

Vários estudos têm demonstrado os efeitos neurotóxicos do metilmercúrio em populações expostas a este contaminante. Um exemplo é são os resultados obtidos numa população ribeirinha da Bacia Amazónica, exposta ao metilmercúrio (Hacon *et al.*, 2008). Avaliando-se as funções visuais e motoras dos indivíduos através de testes neurofuncionais sensíveis, observou-se um decréscimo destas funções, estabelecendo-se uma relação com o aumento nos níveis de mercúrio no cabelo, sendo que estas manifestações estavam presentes com níveis de mercúrio abaixo de 50 µg/g. Entre as funções motoras

comprometidas encontravam-se a destreza manual, a coordenação manual e a fadiga muscular.

Estudos publicados no *New England Journal of Medicine* (2002) reportam associação entre doenças cardiovasculares e mercúrio, principalmente na forma de metilmercúrio. Dois destes estudos mostram uma relação directa entre uma dada concentração de mercúrio e o risco de enfarte do miocárdio (Guallar *et al.* 2002, Yoshizawa *et al.* 2002)

De todos os compostos de mercúrio orgânico, o metilmercúrio é o mais tóxico e é responsável pelos danos mais importantes observados em humanos. Este facto tem a ver com a sua lenta eliminação, podendo mesmo prolongar-se por alguns anos no cérebro e rins. O sistema nervoso central é o alvo principal do metilmercúrio, onde áreas específicas do cérebro são afectadas como os lobos temporais e o cerebelo. A intoxicação pelo metilmercúrio caracteriza-se por ataxia (perda de coordenação dos movimentos voluntários), disartria (problemas na articulação das palavras), parestesia (perda da sensibilidade nas extremidades e em torno da boca), visão em túnel (constricção do campo visual) e perda da audição. Uma contaminação severa pode causar cegueira, coma e morte. O período médio de latência varia entre 16 e 38 dias.

Exposição Pré-Natal, Teratogenicidade e Efeitos sobre a Reprodução

O mercúrio é reconhecidamente um agente teratogénico. O metilmercúrio da mãe é transferido para a placenta e transportado para o feto. No entanto, o mercúrio inorgânico tem uma menor capacidade de atravessar a barreira placentária sendo encontrado em maior quantidade no líquido amniótico. O mercúrio inorgânico é também transportado pelo leite materno. O cérebro fetal é mais susceptível, comparativamente ao cérebro adulto, aos efeitos tóxicos do mercúrio. O metilmercúrio inibe a divisão e migração das células neuronais e interrompe a citoarquitura do desenvolvimento do cérebro (Kjellstrom *et al.*, 1989, Grandjean *et al.*, 1997). Como consequência de estudos realizados nos últimos anos, a EPA reduziu a quantidade de metilmercúrio aceitável de 0.5 para 0.1µg de mercúrio/Kg/dia (2001). Este valor reduz a quantidade de atum (peixe mais consumido nos Estados Unidos da América), para uma quantidade mínima de cerca de 198g peixe por adulto/dia. O consumo de peixe tem benefícios alimentares já cientificamente comprovados, muitas vezes tidos em consideração em detrimento dos possíveis e especulativos riscos da possível

exposição ao mercúrio. Por isso, a FDA (“Food and Drug Administration”) recomendou em 2004 uma especial atenção às mulheres grávidas e crianças no consumo de peixes suspeitos de conterem elevada contaminação de mercúrio, (>1 ppm), tais como o peixe-espada e a cavala (Grandjean *et al.*, 1991). A exposição pré-natal a compostos de mercúrio orgânico, principalmente após desastres industriais levou a defeitos no desenvolvimento cerebral que eram mais intensos à medida que a exposição era mais elevada. Mulheres sem sinais clínicos de contaminação tiveram filhos com paralisia cerebral severa e microcefalia. O mercúrio pode influenciar o estado hormonal (o eixo hipotálamo-hipofisário), podendo ser responsável por ciclos menstruais irregulares e menor número de ovulações (Ramazzini B, 1964). Outros autores referem que o mercúrio afecta as glândulas adrenais, causando um distúrbio no ciclo menstrual por bloqueio das actividades enzimáticas. Estudos epidemiológicos relacionam os efeitos do mercúrio com problemas reprodutivos. Na Polónia, mulheres dentistas e assistentes de odontologia apresentaram uma taxa significativamente maior de abortos em relação a grupos controles (16% e 11% respectivamente), além de distúrbios do ciclo menstrual e malformações congénitas (Sikorski *et al.*, 1987, Trzcinka-Ochocka *et al.*, 2007). Relativamente a alguns estudos, poucos referenciados na bibliografia, referentes à fertilidade masculina, verificou-se que esta não era significativamente afectada por um nível médio de mercúrio de cerca de 50 µg/L. Num outro trabalho, e após longos períodos de exposição ao mercúrio (níveis de 44000 µg/m³ no ar), verificou-se uma perda significativa da libido (Maramba *et al.*, 2006). Existem ainda referenciados bibliograficamente alguns dados contraditórios no que diz respeito à ocorrência de abortos e malformações congénitas após longos períodos de exposição ao mercúrio de pais do sexo masculino (Faria Mde A, 2003).

Efeitos Celulares e Genotoxicidade do Mercúrio

Estudos realizados relativos aos efeitos celulares do mercúrio e seus compostos a nível celular demonstraram que linfócitos e linhagens linfoblásticas celulares humanas, tratadas tanto com mercúrio orgânico e inorgânico, apresentaram um decréscimo significativo em termos de capacidade proliferativa, produção de citocinas e secreção de imunoglobulinas. Experiências com cloreto de mercúrio (HgCl₂) demonstraram que este composto tem afinidade para se ligar à região de interface da molécula de Na-K-ATPase (Brandão *et al.*, 2006), directamente relacionada com a actividade de transporte de iões. O

movimento destes iões (principalmente do K^+) pela membrana plasmática é de vital importância para que se inicie o processo mitogénico. Uma possível associação daquele metal à molécula de Na-K-ATPase levaria à supressão da passagem de iões K^+ e, conseqüentemente, a uma inibição na actividade dos linfócitos B. A redução da função das células linfóides é resultado da citotoxicidade induzida pelo mercúrio. Linfócitos e monócitos tratados com mercúrio (tanto orgânico como inorgânico) exibem sinais funcionais e morfológicos de morte celular (Shenker *et al.*, 1992), como por exemplo um profundo decréscimo na produção de adenina, alteração na síntese de fosfolípidos e um aumento de iões Ca^{2+} . Como estas células evidenciam mudanças nucleares e de membrana que são consideradas características de uma célula em processo de morte celular programada, pode-se concluir que células linfóides tratadas com mercúrio são levadas a apoptose (Kim *et al.*, 2004).

Os testes genotóxicos detectam mutações tanto a nível cromossómico como a nível génico. Tais mutações são responsáveis pelo aparecimento de cancros e doenças hereditárias. Estudos efectuados em plantas e animais de laboratório mostraram que o mercúrio tem a capacidade de inibir a formação do fuso mitótico, originando uma distribuição anormal dos cromossomas e poliploidia. Esta acção resulta da forte afinidade do mercúrio para os grupos sulfidrílo encontrados nas proteínas do fuso e é considerada como a acção mais típica, a nível genético dos compostos de mercúrio. Embora o efeito genotóxico do mercúrio seja a sua ligação ao fuso mitótico, estudos recentes propõem um efeito deste metal na produção de radicais livres, via peroxidação lipídica (Milaeva *et al.*, 2004).

Timerosal, Vacinas

O timerosal tem vindo a ser utilizado como preservante em vacinas desde 1930 (Magos L, 2001, Clarkson TW, 2002). Nas concentrações encontradas nas vacinas, o timerosal satisfaz os requisitos da U.S. Pharmacopeia (1999), ou seja, inactiva organismos específicos e consegue impedir o crescimento de fungos indesejados. Contém o radical etilmercúrio ($CH_3CH_2Hg^+$) que ataca o grupo sulfúrico do tiosalicilato. Estudos iniciais não revelaram efeitos adversos do timerosal. Contudo, numa reavaliação (Ball *et al.*, 2002) dos possíveis efeitos nefastos do timerosal, foram realizados ensaios no sentido de avaliar a quantidade de mercúrio ingerido pelas crianças americanas sujeitas ao programa nacional de vacinação, (0-6 meses). Concluiu-se que recebem mais de 0.1 μ g de

mercúrio/kg/dia. Após obtidos estes resultados procedeu-se imediatamente à remoção do timerosal das vacinas, passando a usar-se doses simples que não requerem a utilização de preservativos.

O etilmercúrio tem algumas semelhanças químicas com o metilmercúrio, ambos têm uma distribuição inicial similar no corpo e causam efeitos muito semelhantes em doses tóxicas para o cérebro. Contudo, apesar do metilmercúrio ser mais potente, o etilmercúrio é mais rapidamente metabolizado em mercúrio inorgânico. Talvez seja esta a razão do etilmercúrio não causar lesões renais nos humanos, contrariamente ao metilmercúrio. A mais recente descoberta foi que o tempo de semi-vida do etilmercúrio no organismo é muito pequena (Pichichero *et al.*, 2002). Em crianças que receberam timerosal em vacinas, o tempo de semi-vida do etilmercúrio no sangue são normalmente assumidos como sendo 7-10 dias. Já o tempo de semi-vida do metilmercúrio é de cerca de 50 dias. A Organização Mundial de Saúde, mesmo tendo em conta estes possíveis riscos da utilização do timerosal, concluiu no seu relatório anual de Janeiro de 2008, que é seguro e que deverá ser utilizado este preservante nas vacinas, principalmente em países em desenvolvimento, uma vez que o risco de contaminação nas multidoses é muito grande, excedendo o hipotético risco do timerosal nas vacinas. Por outro lado, tem sido apontada a possibilidade de o uso deste preservante estar associado a problemas de autismo (Hughes JR, 2008). Apesar de existirem já numerosos estudos sobre este assunto não existem ainda dados conclusivos.

Toxicidade do Mercúrio

Todas as formas de mercúrio têm efeitos adversos na saúde em doses elevadas. Contudo, as consequências da exposição dos humanos a pequenas doses de mercúrio quer a partir do consumo de peixe contaminado, das amálgamas dentárias ou do timerosal das vacinas, estão ainda sujeitas a discussão.

Os vapores deste metal quando inalados, podem facilmente atravessar a membrana alveolar até atingir a circulação sanguínea. No sangue, fígado e rins o mercúrio é oxidado à forma divalente, Hg^{2+} , pelo complexo enzimático designado hidrogénio peróxido catalase. Esta é a forma de mercúrio que representa a maior fonte de toxicidade verificada em laboratórios industriais e de pesquisa.

Embora o nível fatal de mercúrio não seja conhecido, está documentado que uma exposição acima de 1-2 mg/m³ de vapor de mercúrio elementar por algumas horas provoca bronquite química aguda e pneumonia. Duas horas após a exposição é possível a observação de danos no pulmão através da formação de uma membrana hialina e finalmente a ocorrência de fibrose pulmonar (Del Vecchio *et al.*, 2007). A contaminação pelos diversos compostos de mercúrio também está associada a condições clínicas relacionadas com patologias cutâneas (Serrao *et al.*, 2007). Concentrações de metal no sangue $\geq 5 \mu\text{g}/\text{dL}$, são geralmente acompanhadas de sinais e de sintomas de toxicidade.

Mecanismo de Acção

O mercúrio forma rapidamente ligações covalentes com o enxofre na forma sulfidrílo (-SH, designado também por grupo tiol ou grupo mercaptano - do latim *mercurius captans* - pela capacidade que o grupo -SH tem de se ligar fortemente com o mercúrio), alterando a solubilidade, dissociação e afinidade relativa para os receptores, distribuição e excreção das enzimas e compostos que contêm esses grupos sulfidrílo. Como as proteínas que têm grupos tiol existem tanto nas membranas extracelulares, como nas intracelulares e ainda nos organelos, o alvo exacto deste metal não foi ainda determinado. O mecanismo de acção é traduzido por um conjunto de alterações que podem ocorrer individualmente ou em conjunto, traduzindo-se no aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, inibição da polimerização e formação dos microtúbulos, alterações na replicação do DNA e na síntese proteica, desregulação do sistema imunitário e mudança na homeostase do cálcio.

Para além deste mecanismo de acção, o Hg também está associado a mecanismos de peroxidação lipídica, induzindo-a, e a alterações no mecanismo do grupo heme. Como consequência, o Hg origina uma depleção dos níveis de glutathione, superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, conferindo um défice na protecção celular com relação ao stress oxidativo, pela acção deste metal na despolarização da membrana interna mitocondrial, com consequente aumento de H₂O₂, peróxido de hidrogénio, uma das quatro espécies reactivas de oxigénio (oxigénio singleto, radical hidroxilo e radical superóxido).

É a afinidade do metal para os grupos tiois (com enxofre) que permite a utilização do ácido 2,3 dimercapto-1-propano-sulfónico ou DMPS ou da penicilina como agentes quelantes no tratamento de intoxicações por Hg.

O mercúrio também se liga a outros grupos químicos, embora com uma menor afinidade, como o fosforilo (PH_3), carboxilo (COOH), amina (R-NH_2 , amina primária), e amida (R-CO) NH_2 .

O mercúrio é considerado como um poluente ambiental e está classificado em terceiro lugar no Top 20 das substâncias perigosas publicadas na “Agency for Toxic Substances & Disease Registry”, ATSDR, 1999. Os efeitos biológicos deste metal e seus derivados são extremamente variados, englobando desde efeitos citológicos, reprodutivos (teratogênicos) e até mesmo neurológicos. A possível associação ao processo carcinogênico, bem como os seus efeitos genotóxicos não estão ainda completamente esclarecidos, apesar da existência de inúmeras evidências do efeito do Hg ao nível do ADN.

Todos os estudos apresentados servem de indicadores que privilegiam a integridade da saúde das pessoas potencialmente expostas ao metal, evidenciando os efeitos biológicos deste. O painel global dos efeitos biológicos do mercúrio e dos seus compostos derivados demonstra que apesar de inúmeras contradições estes compostos apresentam consequências graves no organismo merecedoras de estudo.

Capítulo



Objetivos

2. Objectivos e estrutura da Tese

O principal objectivo desta dissertação foi o estudo da interacção do Hg com os sistemas biológicos colocando-se algumas questões fundamentais às quais se tentou dar resposta começando para isso por se desenvolver um método, de alta resolução, para investigar a localização e a organização ultraestrutural das micropartículas de Hg em circulação. O método utilizado foi a microscopia electrónica de varrimento acoplada à microanálise por raio-X (SEM-XRM). As questões principais propostas nesta dissertação foram:

1. Qual o papel de diferentes vísceras na sequestração de Hg em circulação?
2. Como se compara a fagocitose de diferentes partículas metálicas pelos macrófagos?
3. Existem diferenças entre granulócitos e macrófagos na ingestão de Hg?
4. Quais as consequências, a nível celular, dos efeitos agudos da imunotoxicidade induzida pela ingestão de Hg?
5. A toxicidade do Hg é aumentada ou diminuída pela inflamação?

A razão inicial de iniciar estas investigações foi o facto da contaminação do meio ambiente e da cadeia alimentar pelo Hg ter vindo a ser uma das maiores preocupações nos nossos dias. O Hg é tóxico e em moderados níveis de exposição pode causar manifestações neurotóxicas, alterações da autoimunidade e diminuição da resistência do hospedeiro a infecções.

Finalmente, deve ser notado que os resultados dos vários trabalhos que constituem esta dissertação serão discutidos de um modo integrado no capítulo 4 e as principais conclusões serão apresentadas no capítulo 5.

Capítulo

3

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Microscopia Electrónica de Varrimento e Microanálise por Raio-X

Os microscópios electrónicos são instrumentos que permitem a observação e caracterização de um material com base nas radiações resultantes da interacção com um feixe de electrões.

O microscópio electrónico de varrimento (MEV) permite obter imagens numa gama de ampliações da ordem de $\times 10$ a $\times 500\,000$ (microscópio do Centro de Materiais da Universidade do Porto, CEMUP, onde foi executado este trabalho). A superfície da amostra é percorrida sequencialmente (varrimento) por um feixe electrónico finamente focado e a respectiva imagem é obtida num monitor, sendo o brilho em cada ponto determinado pela intensidade das radiações emitidas da superfície. Verifica-se assim uma correspondência, ponto por ponto, entre a imagem e a região observada da amostra. A natureza da informação depende das características do material e da interacção que se verifica entre o feixe electrónico e a amostra.

O desenvolvimento recente de microscópios de varrimento que operam com a câmara da amostra a pressão elevada (HPSEM- "high pressure SEM" em que $p > 10^2$ Pa e ESEM- "environmental SEM" com $p > 10^3$ Pa) permite observar, sem qualquer preparação, amostras não condutoras e mesmo amostras hidratadas (ESEM) No entanto, o presente trabalho foi desenvolvido num microscópio convencional, modelo JEOL-6301F SEM acoplado a um sistema de detecção Noran Voyager de microanálise elementar de raio-X com sistema de detecção EDS (Energy Dispersive Spectrometry), onde têm que se verificar três condições fundamentais: (i) estabilidade nas condições de alto vácuo (pressão de 10^4 Pa), exigindo a preparação dos materiais com constituintes voláteis, aplicando-se, para isso, um revestimento condutor, carbono, ou ouro (neste

trabalho foi utilizado o carbono devido à sobreposição nos espectros dos picos de Hg com o Au); (ii) condutividade eléctrica superficial e (iii) estabilidade física e química nas condições de observação/ interacção com o feixe electrónico.

A medição da intensidade da emissão da amostra, que constitui a base para a realização das imagens de MEV, requer a utilização de detectores especializados que estão colocados na vizinhança da amostra. Estes detectores são de dois tipos, detectores de electrões de baixa energia ($E < 50\text{eV}$), designados de electrões secundários, e detectores de energia elevada ou electrões retrodifundidos. A emissão de electrões secundários varia com o número atómico (Z) do material e apresenta forte sensibilidade, obtendo-se imagens com informação da topografia da amostra. Nos electrões retrodifundidos e apesar da intensidade de emissão da energia detectada ser, tal como no caso dos electrões secundários, crescente com o ângulo de incidência na amostra, esta é fortemente direccionada, razão pela qual estas imagens apresentam um forte contraste topográfico. Este facto, acoplado à microanálise, permitirá o estudo da composição elementar do material. Esta informação, quer seja de topografia ou de composição elementar, requer para a sua visualização e interpretação que ao microscópio esteja associado o espectrómetro de raios X. Torna-se assim possível, com as imagens de electrões secundários (imagens que se assemelham às imagens habituais da observação visual), ter uma interpretação intuitiva das superfícies celulares, sendo depois na imagem de electrões retrodifundidos visualizado o contraste topográfico e aplicada a microanálise, para determinar o conteúdo no interior das células. O sistema EDS de detecção acoplado ao microscópio utilizado neste estudo, Noren Voyager X-ray, permite a detecção de elementos químicos presentes numa concentração superior a 0,2-0,3% em massa, conseguindo-se uma microanálise qualitativa e semi-quantitativa dos elementos presentes na amostra.

Para a detecção *in situ* de Hg, o MEV apresenta uma vantagem central relativamente ao microscópio electrónico de transmissão (MET) no que se refere ao facto do processamento de amostras, não requerendo processamentos que iriam originar a extracção do metal.

Conseguiu-se assim aplicar um método relativamente fácil, acessível de observação de grandes superfícies de amostras espessas com informação qualitativa e semi-quantitativa do conteúdo químico, num curto espaço de tempo.

3.2. Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica amplamente utilizada na fenotipagem celular, permitindo uma análise individual de diferentes parâmetros na mesma célula. É possível assim determinar o número de células que expressam uma molécula para a qual foi adicionada uma sonda fluorescente. Estas sondas são normalmente anticorpos, marcados com um fluorocromo, contra a molécula cuja expressão se pretende determinar. Os citómetros são capazes de detectar fluorescência emitida em diferentes comprimentos de onda permitindo a análise simultânea de várias moléculas numa só célula. No presente trabalho foram usados os seguintes anticorpos monoclonais específicos para antígenos de ratinho: anti-imunoglobulina M (IgM) conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA), anti-Mac-1 conjugado com FITC, CD11b/CD18, para fagócitos activados (Pharmingen, San Diego, CA, USA), anti CD3 conjugado com ficoeritrina (PE), anti CD5 conjugado com PE, anti B220 conjugado com PE, anti CD8 conjugado com FITC, anti CD4 conjugado com cy-chrome e anti CD69 conjugado com PE, marcador precoce da activação, todos da Pharmingen. Para a detecção das células apoptóticas foi utilizado o kit TACS™ annexin V-FITC (R&D systems, Minneapolis, MN, USA).

Com esta técnica pretendeu-se caracterizar, a nível celular, os efeitos agudos da imunotoxicidade induzida pela ingestão de mercúrio.

Capítulo



Resultados Experimentais sob a forma de artigos científicos

4.1. High-resolution identification of mercury in particles in mouse kidney after acute lethal exposure

**4.2 Quantification of particles of
lethal mercury in mouse viscera:
high-resolution study of
mercury in cells and tissues**

**4.3. *In Vivo* Ingestion of Heavy Metal
Particles by Murine
Macrophages. A study using
scanning electron microscopy
coupled with X-ray microanalysis**

4.4. Mercury intake by inflammatory phagocytes: in vivo cytology of mouse macrophages and neutrophils by X-ray elemental microanalysis coupled with scanning electron microscopy

4.5. Acute depletion and recovery of peritoneal B-1 lymphocytes in BALB/c mice after a single injection of mercury chloride

Capítulo

5

Discussão geral

5. Discussão

Na elaboração da presente dissertação, optou-se por incluir artigos científicos que resultaram do trabalho experimental realizado, publicados em revistas internacionais. Apesar de todos os artigos apresentarem um capítulo de Discussão, entendeu-se ser de interesse elaborar uma discussão geral dos resultados obtidos.

O objectivo deste trabalho foi estudar a interacção do mercúrio (Hg) com os sistemas biológicos, utilizando como modelo de estudo o ratinho BALB/c. Para a concretização deste objectivo foi aplicada microscopia electrónica de varimento acoplada à microanálise por raio-X (SEM-XRM), que permitiu obter informação original acerca da forma, organização ultraestrutural, cinética da distribuição das micropartículas de Hg *in vivo* e definição da resposta inflamatória aguda produzida pela injeção de um sal de Hg.

A quantificação da sequestração aguda das partículas de Hg pelos diferentes órgãos-alvo do ratinho indicou que é o fígado que captura cerca de 89% do Hg circulante. Estes resultados completam os resultados publicados em 1997 por Griem *et al.* Estes autores usaram a técnica de espectrofotometria de absorção de vapor atómico, em diferentes estirpes ratinhos: C57BL/6, DBA/2, B10.D2, A.SW e B10.S. Estudaram a distribuição e concentração de Hg no fígado, rim e baço de ratinhos após tratamento com HgCl₂ (3 injeções subcutâneas semanais do metal, 0.5mg/Kg de peso corporal durante 12 semanas). Concluíram sobre a acumulação de Hg no sangue, fígado, baço e rim, 8 semanas e 12 semanas após o início do tratamento. Em todas as estirpes estudadas a maior concentração de Hg foi determinada no rim. Foi ainda determinado que em três das estirpes estudadas (C57BL/6, A.SW e B10.S) foi encontrada uma grande quantidade de Hg no baço. Este valor elevado de Hg no baço foi relacionada com o facto do mercúrio induzir autoimunidade em algumas estirpes de ratinhos. A administração de Hg no nosso trabalho foi feita por injeção intraperitoneal. O peritoneu é uma membrana semipermeável que reveste a parede abdominal e cobre os órgãos abdominais. Neste espaço existe um ambiente dinâmico em que o fluxo sanguíneo peritoneal provém das artérias da parede abdominal, drenando para a circulação sistémica. Aquando da injeção intraperitoneal o Hg passa através dos nodos linfáticos associado a macrófagos para a circulação sistémica (Sadauskas, *et al.*, 2007). Este facto corrobora os nossos resultados que demonstraram ser o fígado o órgão a apresentar a maior percentagem na sequestração do metal injectado. O sangue

procedente do baço e do intestino vai em primeiro lugar para o fígado através da veia porta. O facto de ser o fígado o órgão que mais Hg capta é também justificado pelo facto deste órgão estar localizado no hipocôndrio direito, e ter grande parte da superfície externa revestida pelo peritoneu. Para além da anatomia favorável do fígado à deposição de Hg, o “uptake” foi observado nas células de Kupffer, ou seja, nos macrófagos residentes do fígado. As células de Kupffer são macrófagos encontrados na superfície luminal dos sinusóides, que têm como função a modulação de variadas funções, como por exemplo a inflamação, ou de fagocitar substâncias estranhas presentes no sangue. Para cumprirem esta função de células fagocitárias são ricas em lisossomas. As células de Kupffer recobrem, juntamente com as células endoteliais típicas, as placas hepatocelulares, sendo células descontínuas e permitindo a passagem do plasma aos hepatócitos. Os nossos resultados indicam ainda ser o rim o segundo órgão a capturar a maior percentagem de Hg circulante, enquanto o terceiro órgão a capturar o Hg em circulação foi o baço. Hultman e colaboradores em 1985 publicaram um trabalho em que estudaram o efeito na excreção renal, 15 segundos e 30 minutos após uma injeção intravenosa de HgCl_2 (3 mg HgCl_2 /Kg de peso corporal), em ratinhos BALB/c. Pelo método citoquímico “Silver Amplification”, estes autores propuseram que o Hg é excretado na forma de complexos Hg-proteínas, originando o fenómeno de proteinúria, sendo um indicador do dano nas estruturas glomerulares induzido pelo Hg. O facto de, nos nossos resultados, ser o rim o segundo órgão alvo na sequestração do Hg em circulação, é explicado pelo facto de o rim ser o principal órgão do sistema excretor e ter como função a eliminação de substâncias tóxicas, após a destoxificação realizada no fígado, assim como a eliminação de substâncias exógenas. O baço para além de ser um órgão situado na cavidade abdominal, é o maior dos órgãos linfáticos e faz parte do SER (sistema retículo-endotelial), participando dos processos de produção de células vermelhas e de destruição de células velhas. O baço tem ainda uma importante função imunológica de produção de anticorpos e linfócitos, e é um órgão particularmente vascularizado (pela artéria esplénica), o que faz com que se reúnam as condições para ser o baço o terceiro órgão, pelos nossos resultados, a realizar a sequestração do Hg em circulação.

Os nossos resultados mostraram que há diferenças na resposta dos macrófagos ao Hg e a outras duas micropartículas metálicas, o selénio (Se) e o tungsténio (W). As lesões causadas nos sistemas biológicos pela ingestão e armazenamento de partículas metálicas depende de um conjunto de factores tais

como a natureza da partícula metálica em causa, o seu tamanho e a curva de biotransformação entre outros (Burbure, *et al.*, 2003). Por SEM-XRM foi confirmada a presença de Hg, Se e W dentro de macrófagos e neutrófilos peritoneais. O diâmetro médio das partículas de Se é de cerca de $2.37 \pm 1.84 \mu\text{m}$, maior do que o diâmetro das outras duas partículas metálicas, Hg e W. O Hg encontrava-se organizado dentro dos macrófagos como pequenas partículas de forma esférica, em contraste com o que é verificado para o Se e o W, que são detectados como partículas de forma irregular. A ingestão de partículas de grandes dimensões causa alterações significativamente mais suave nas respostas inflamatórias quando comparadas com a resposta que partículas de pequenas dimensões desencadeiam (Becker *et al.*, 2003; Fach *et al.*, 2002 e Lundborg *et al.*, 2001). De facto, após o “uptake” de grandes partículas, os macrófagos entram num estado de dormência uma vez que não são capazes de activar a cascata oxidativa, de fazer a ingestão de agentes estranhos ou de atacar a superfície de células inflamatórias (Becker *et al.*, 2003, Kleinman *et al.*, 2003). Para além disto, partículas de grandes dimensões não são alvos para a digestão da maquinaria enzimática das células dos macrófagos e deste modo permanecem no seu interior sem induzirem a reacção inflamatória. Em contraste, a ingestão de partículas pequenas são alvo das cascatas enzimáticas de oxidação e de numerosas outras enzimas dos macrófagos (Fach *et al.*, 2002) contribuindo para a modificação da composição química das partículas do metal.

Os resultados de um outro estudo demonstraram que são os fagócitos (mais de metade dos fagócitos ingerem Hg) as células que têm um papel primordial na remoção de Hg, existindo diferenças entre granulócitos e macrófagos na capacidade de remoção do Hg *in vivo* (70% de macrófagos e 50% de neutrófilos). Estes resultados estão de acordo com estudos sobre macrófagos sendo estas as principais células fagocíticas (Gordon, 2003). Foi já estudado por Contrino e colaboradores, em 1988 e por Simon em 2003, o efeito protector que o Hg parece ter em relação aos granulócitos, manifestando este efeito na inibição da sua apoptose. Em 1996, Christensen estudou a distribuição de mercúrio no baço, fígado, nódulos linfáticos, timo e medula óssea utilizando as técnicas de autometalografia e de imunofluorescência em ratos expostos intraperitonealmente a cloreto de mercúrio. O Hg foi detectado em macrófagos marcados pelo anticorpo M1/70 mas também em células parecidas com macrófagos (ambos os dois tipos de células foram classificadas como macrófagos por microscopia), A autometalografia marcou macrófagos no baço, nódulos linfáticos, timo, nas células de Kupffer e nas células endotélias. Conner

e Schmid em 2003 fizeram uma revisão sobre os diversos mecanismos pelos quais as células internalizam macromoléculas e partículas diversas, no fenómeno designado genericamente de endocitose. Neste trabalho, os autores englobam no conceito de endocitose diversos mecanismos pelos quais as células internalizam macromoléculas e partículas. Neste trabalho é referida a importância deste fenómeno na resposta imune, na neurotransmissão, na comunicação intracelular, na transdução de sinal assim ou seja na homeostase da célula. Liu e Shapiro em 2003, publicaram um trabalho sobre endocitose em que referem que as diferenças principais de fagocitose e pinocitose residem no tamanho das partículas ingeridas (maiores na fagocitose) e na dependência da cascata de polimerização da actina como passo iniciador na ingestão das partículas. Com a aplicação da técnica de SEM-XRM, utilizada no nosso trabalho, foi possível uma visualização do tamanho e número das partículas de Hg em cada célula, contribuindo assim com nova informação do modo como este metal é capturado e internalizado pelos fagócitos. O presente trabalho permitiu uma visualização directa da diferente cinética de internalização do Hg pelos fagócitos, tanto por macrófagos como por neutrófilos, confirmando o mecanismo de pinocitose como forma de internalização do Hg pelas células. Este facto pode ser verificado pela forma típica como se dá a internalização do metal. Pinocitose é a incorporação de vesículas de fluidos pela célula activa como se estivessem a ser rodeadas e depois englobadas pela membrana citoplasmática, formando-se vacúolos no bordo da célula que podem ser posteriormente transportados para outras áreas da célula. Foram observados pelo SEM-XRM pontos brilhantes em diferentes zonas das células, correspondendo a Hg, confirmados pela microanálise. Este trabalho permitiu a primeira visualização directa da internalização do Hg por fagócitos que sujeitos a uma indução da inflamação aumentam a sua avidéz para a ingestão do metal.

O Hg causa alterações no sistema imune humano que se podem traduzir por autoimunidade, ou por fenómenos de imunossupressão e de desregulação. Segundo Pierluigi EB (2000), o facto de alguns metais terem uma acção no sistema imune não implica que tenham efeito imune e por isso propuseram uma classificação dos metais em três grupos relativamente à indução de fenómenos de autoimunidade. A classificação destes autores foi a seguinte: (i) o arsénio, o berílio, o níquel, o vanádio e o ferro têm uma reconhecida actividade imunotóxica mas existem muito poucas referências documentadas que os associe a respostas ou a doenças autoimunes, (ii) o zinco, crómio, chumbo, cádmio, prata, cobre e platina têm a capacidade de afectar o sistema imune mas só em alguns

casos é que é possível fazer-se a associação destes metais a respostas autoimunes, estes metais de um modo geral, não parecem ser potentes indutores de autoimunidade; (iii) o Hg, assim como lítio e o ouro foram classificados como estando claramente associados a respostas e doenças autoimunes.

A exposição de roedores a Hg provoca linfoproliferação, linfadenopatias, hipergamaglobulinemia, aumento da expressão de marcadores de activação de superfície de células T incluindo CD25, CD71 e CD44 (Pollard *et al.*, 2005). Foi também já referido que o Hg induz a morte celular (Laiosa *et al.*, 2007).

Havarinasab e colaboradores publicaram em 2005 que 10 mg/L de timerosal na água (590 µg Hg/kg de peso corporal/dia), durante 30 dias, administrado a uma estirpe de ratinhos A.SW (H-2s) susceptível à indução de autoimunidade por metais pesados, leva a uma forte imunoestimulação verificada no final do tratamento por um aumento do peso baço, aumento do número de esplenócitos o que se traduziu num aumento de linfócitos, incluindo de células B. Este aumento traduziu-se numa diferenciação das células secretoras de imunoglobulinas. O número de esplenócitos diminuiu após 14 dias de tratamento. Os efeitos do timerosal sobre a resposta imunológica é um dos temas mais estudados nos nossos dias no que diz respeito aos efeitos tóxicos do mercúrio, devido ao facto do timerosal ser largamente utilizado como componente de vacinas utilizadas universalmente na protecção de crianças contra infecções patogénicas. Nos EUA, em particular, têm sido publicados estudos que apontam para a possibilidade da injeção de timerosal estar associada ao posterior desencadeamento de doenças autoimunes e neurológicas, como o autismo, em crianças e jovens.

Num estudo (Griem, 1997) foi utilizada a técnica de espectrofotometria de absorção atómica para medir a concentração de Hg no sangue, no fígado e no baço em diferentes estirpes de animais que foram sujeitos a injeções subcutâneas 3 vezes por semana, durante 12 semanas numa concentração de 0.5 mg/kg de peso corporal de HgCl₂. Foi descrito que a concentração de Hg no sangue e fígado de animais das estirpes A.SW e DBA/2 era cerca de duas vezes superior à das estirpes C57BL/6, B10.D2 e B10.S e que estes animais não demonstraram qualquer sinal de patologia autoimune corroborando que o HgCl₂ pode induzir a autoimunidade em determinadas estirpes de ratinhos (DBA/2, B10.D2) enquanto outras serão resistentes.

Os nossos resultados mostraram que ratinhos tratados com uma única injeção intraperitoneal de Hg, leva a uma depleção de subpopulações

linfocitárias. Esta depleção, que é causada por apoptose, foi mais acentuada nas células B-1. Foi já descrito que pode ocorrer apoptose por uma estimulação incorrecta (falta de co-estimulação) dos linfócitos B ou por um efeito tóxico directo de destruição destas células (Kim *et al.*, 2004).

A diminuição observada nas células B-1 após a injeção de Hg, permite-nos sugerir que este metal pode vir a causar fenómenos de imunossupressão por depleção de subpopulações de linfócitos B.

Decréscimo das células B, em especial de linfócitos B-1, foi já descrito como estando associado a fenómenos de autoimunidade (Popi *et al.*, 2008). Neste aspecto, os resultados deste trabalho são mais um contributo para fundamentar a relação, entre Hg e fenómenos de autoimunidade.

Capítulo

6

Conclusões

6. Conclusões

As conclusões mais importantes do presente estudo são de dois tipos: as que se referem a nova informação científica sobre a distribuição tecidual e intracelular de mercúrio em sistemas biológicos, e a que se refere à caracterização, a nível celular, dos efeitos agudos da imunotoxicidade induzida pela ingestão de Hg. No que diz respeito à morfologia, distribuição, quantificação e sequestração do Hg, chegou-se às seguintes conclusões originais:

1. Com relação à organização ultraestrutural do Hg em circulação: (i) este organiza-se em micropartículas esféricas com um diâmetro de 31.4 ± 14.1 nm; (ii) estas partículas raramente se agregam em circulação; (iii) as microesferas de Hg encontram-se aderentes à superfície de glóbulos sanguíneos ou ligadas a conjuntos intravasculares de proteínas; (iv) a ingestão das partículas de Hg não ocorre imediatamente após a ligação destas partículas à superfície das células.
2. A afinidade do Hg para diferentes vísceras mostrou que: (i) 89% do Hg circulante é captado pelo fígado; (ii) o rim tem um papel significativo, sequestrando cerca de 8% das partículas metálicas; (iii) menos de 2% do Hg foi encontrado no baço; (iv) a deposição do metal nos pulmões foi escassa; (v) nenhum Hg foi encontrado no cérebro.
3. O estudo das diferenças verificadas na resposta de macrófagos a três tipos de partículas metálicas, Hg, Se e W, mostraram que: (i) determinadas partículas não degradáveis, tais como partículas de metais pesados são acumuladas em sistemas vivos, a maioria dentro de macrófagos; (ii) documentou-se que o Hg é organizado dentro de macrófagos sob a forma de pequenas partículas redondas; (iii) em contraste, o Se e W são detectados como partículas de grandes dimensões e de forma irregular.
4. Com relação às diferenças entre granulócitos e macrófagos na ingestão de Hg verificamos que: (i) mais de metade dos fagócitos ingerem Hg (70% de macrófagos e 50% de neutrófilos); (ii) intracelularmente as partículas de Hg aparecem como microesferas de pequeno diâmetro, (<20nm) e em número superior a 20/ 30 microesferas por célula; (iii) a endocitose do Hg aumenta com a

activação dos fagócitos; (iv) as partículas de Hg são internalizadas por pinocitose.

Os resultados referentes à caracterização a nível celular, dos efeitos agudos da imunotoxicidade induzida pela ingestão de Hg permitiram-nos concluir que: (i) uma única injeção intraperitoneal de Hg, leva a uma depleção, causada por apoptose, de subpopulações linfocitárias, mais acentuada nas células B-1.

Este estudo utilizou o método (SEM-XRM) que permite determinar a morfologia de micropartículas de Hg *in vivo*, assim como a sua quantificação em vários órgãos e a sua ingestão pelos dois tipos principais de fagócitos. Foi possível, por esta abordagem, realizar o estudo detalhado da localização subcelular de micropartículas individuais de Hg em tecidos e células.

Capítulo



Bibliografía

7. Bibliografia

Ahlqwist M, Bengtsson C, Lapidus L, Gergdahl IA, Schutz A. 1999. Serum mercury concentration in relation to survival symptoms and disease: results from the prospective population study of women in Gothenburg, Sweden. *Acta Odontologica Scandinavica*, 57, 168-174.

Bakir F, Damluji SF, Amin-Zaki L, Murtadha M, Khalidi A, al-Rawi NY, Tikriti S, Dahahir HI, Clarkson TW, Smith JC, Doherty RA. 1973. Methylmercury poisoning in Iraq. *Science*, 181, 230-241.

Ball LK, Ball R, Pratt RD. 2002. An Assessment of thimerosal use in childhood vaccines, *Pediatrics*, 109, 1153-1159.

Becker S, Soukup JM, Sioutas C, Cassee FR. 2003. Response of human alveolar macrophage to ultrafine, fine, and coarse urban air pollution particles. *Experimental Lung Research*, 29, 29-44.

Bjorkman L, Pedersen NL, Lichtenstein P. 1996. Physical and mental health related to dental amalgam fillings in Swedish twins. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 24, 260-267.

Brandão R, Santos FW, Zeni G, Rocha JB, Nogueira CW. 2006. DMPS and N-acetylcysteine induced renal toxicity in mice exposed to mercury. *Biometals*, 19, 389-398.

Burbure C, Buchet JP, Bernard A, Leroyer A, Niss C, Haguenoer JM, Bergamaschi E, Mutti A. 2003. Biomarkers of renal effects in children and adults with low environmental exposure to heavy metals. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 66, 783-798.

Carvalho CM, Matos AI, Mateus ML, Santos AP, Batoreu MC. 2008. High-fish consumption and risk prevention: assessment of exposure to methylmercury in Portugal. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A*, 71, 1279-1288.

Clarkson TW. 2002. The three modern faces of mercury. *Environmental Health Perspectives*, 110, 11-23.

Clarkson TW, Magos L, Myers GJ. 2003. The toxicology of mercury. Current Exposures and clinical manifestations. *The New England Journal of Medicine*, 349, 1731-1737.

Conner SD, Schmid SL. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422, 37-44.

Contrino J, Marucha P, Ribaldo R, Ference R, Bigazzi PE, Kreutzer DL. 1988. Effects of mercury polymorphonuclear leucocyte function *in vitro*. *American Journal of Pathology*, 132, 110-118.

Christensen MM. 1996. Histochemical localization of autometallographically detectable mercury in tissues of the immune system from mice exposed to mercuric chloride. *Histochemical Journal*, 28, 217-225.

Del Vecchio FB, Corrente JE, Gonçalves A, Faria MM, Padovani CR, Vilarta R. 2007. Multivaried analysis of the interaction between quality of life and physical capacities for people occupationally intoxicated by mercury. *Acta Médica Portuguesa*, 20, 131-137.

Environmental Protection Agency. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration (FDA) (EPA/ USA). 2001/ 2004. Reference dose for chronic oral exposure to methylmercury/ Water quality criterion for the protection of human health: methylmercury/ What you need to know about mercury in fish and shellfish. (EPA-823-R-01-001- F-04-009).

Eto K, Oyanagi S, Itai Y, Tokunaga H, Takizawa Y, Suda I. 1992. A fetal type of minamata disease: an autopsy case report with special reference to the nervous system. *Molecular and Chemical Neuropathology*, 16, 171-186.

Evaluation of certain food additives and contaminants: twenty-second report of the Joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives. 1978. World Health Organization Technical Report Services, 631, 1-39.

Fach E, Waldman WJ, Williams M, Long J, Meister RK, Dutta PK. 2002. Analysis of the biological and chemical reactivity of zeolite-based aluminosilicate fibers and particulates. *Environmental Health Perspectives*, 110, 1087-1096.

Faria Mde A. 2003. Chronic occupational metallic mercurialism. *Revista de Saude Publica*, 37, 116-127.

Gioda A, Hanke G, Elias-Boneta A, Jiménez-Velez B. 2007. A pilot study to determine mercury exposure through vapor and bound to PM10 in a dental school environment. *Toxicology and Industrial health*, 23, 103-113.

Goldwater LJ. 1972. *Mercury: a history of quicksilver*. Baltimore: York Press.

Gordon S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*, 3, 23-35.

Gossel TA, Bricker JD. 1990. *Principles of Clinical Toxicology*. 2nd ed. New York: Raven Press.

Grandjean P, Weihe P, Jorgensen PJ, Clarkson T, Cernichiari E, Videro T. 1991. Impact of maternal seafood diet on fetal exposure to mercury, selenium and lead. *Archives of Environmental Health*, 47, 185-195.

Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K, Murata K, Sorensen N, Dahl R, Jorgensen PJ. 1997. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicology and Teratology*, 19, 417-428.

Griem P, Scholz E, Turfeld M, Zander D, Wiesner U, Dunemann L, Gleichmann E. 1997. Strain differences in tissues concentrations of mercury in inbred mice treated with mercuric chloride. *Toxicology Applied Pharmacology*, 144, 163-170.

Guallar E, Sanz-Gallardo MI, van't Veer P, Aro A, Gómes-Aracena J, Kark JD, Riemersma RA, Martín-Moreno JM, Kok FJ. 2002. Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*, 347, 1747-1754.

Hacon S, Barrocas PR, Vasconcellos AC, Barcellos C, Wasserman JC, Campos RC, Ribeiro C, Azevedo-Carlioni FB. 2008. Na overview of mercury contamination research in the Amazon basin with na emphasis on Brazil. *Cadernos de Saude Publica*, 24, 1479-1492.

Havarinasab S, Häggqvist B, Björn E, Pollard KM, Hultman P. 2005. Immunosuppressive and autoimmune effects of thimerosal in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204, 109-121.

Hughes JR. 2008. A review of recent reports in autism: 1000 studies published in 2007. *Epilepsy & Behavior*, Jul 30 (*in press*).

Hultman P, Eneström S, von Schenck H. 1985. Renal handling of inorganic mercury in mice. The early excretion phase following a single intravenous injection of mercuric chloride studied by the Silver Amplification method. *Virchows Archives B, Cell Pathology Including Molecular Pathology*, 49, 209-224.

Hunter D. 1969. *The disease of occupations*. 4th ed. London: English Universities Press, 221-241.

Kingman A, Albertini T, Brown LJ. 1998. Mercury concentrations in urine and whole blood associated with amalgam exposure in a military population. *Journal of Dental Research*, 77, 461-471.

Kleinman MT, Sioutas C, Chang MC, Boere AJ, Cassee FR. 2003. Ambient fine and coarse particle suppression of alveolar macrophage functions. *Toxicology Letters*. 137, 151-158.

Kim SH, Sharma RP. 2004. Mercury-induced apoptosis and necrosis in murine macrophages: role of calcium-induced reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase signaling. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196, 47-57.

Kjellstrom T, Kennedy P, Wallis S. 1989. Physical and mental development of children with prenatal exposure to mercury from fish. Stage 2. Interviews and

psychological tests at age 6. Report n. 3642. Solna, Sweden: Solna national Swedish Environmental Board.

Laiosa MD, Eckles KG, Langdon M, Rosenspire AJ, McCabe MJ Jr. 2007. Exposure to inorganic mercury *in vivo* attenuates extrinsic apoptotic signaling in Staphylococcal aureus enterotoxin B stimulated T-cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 225, 238-250.

Lange TR, Royals HE, Connor LL. 1994. Mercury accumulation in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in a Florida lake. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 27, 466-471.

Leong CC, Syed NI, Lorscheider FL. 2001. Retrograde degeneration of neurite membrane structural integrity of nerve growth cones following *in vitro* exposure to mercury. *Neuroreport*, 12, 733-737.

Liu J, Shapiro JI. 2003. Endocytosis and signal transduction: basic science update. *Biological Research for Nursing*, 5, 117-128.

Lundborg M, Johard U, Lastbom L, Gerde P, Camner P. 2001. Human alveolar macrophage phagocytic function is impaired by aggregates of ultrafine carbon particles. *Environmental Research*, 86, 244-253.

Magos L. 2001. Review on the toxicity of ethylmercury, including its presence as a preservative in biological and pharmaceutical preparations. *Journal of Applied Toxicology*, 21, 1-5.

Maramba NP, Reyes JP, Francisco-Rivera AT, Panganiban LC, Dioquino C, Dando N, Timbang R, Akagi H, Castillo MT, Quitariano C, Afuang M, Matsuyama A, Eguchi T, Fuchigami. 2006. Environmental and human exposure assessment monitoring of communities near an abandoned mercury mine in the Philippines: A toxic legacy. *Journal of Environmental Management*, 81, 135-145

Milaeva E, Petrosvan V, Berberova N, Pimenov Y, Pellerito L. 2004. Organic derivatives of mercury and tin as promoters of membrane lipid peroxidation. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 69-91 (PubMed *in process*).

Pierluigi EB. 2000. Autoimmunity induced by metals. Textbook of the Autoimmune Diseases. Edited by Lahita RG, Chiorazzi N e Reeves WH. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, capítulo 41, 753-782.

Pharmacopeia and National Formulary. 1999. USP 24-Nf 19: U.S. 24th ed. Rockville, Md. United States Pharmacopeia Convention.

Pichichero ME, Cernichiari E, Lopricato J, Treanor J. 2002. Mercury concentrations and metabolism in infants receiving vaccines containing thimerosal: a descriptive study. *Lancet*, 360, 1737-1741.

Pinheiro MC, Guimarães GA, Nakanishi J, Oikawa T, Vieira JL, Quaresma M, Cardoso B, Amoras W. 2000. Total mercury in hair samples of inhabitants of Tapajós River, Para State, Brasil. *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical*, 33, 181-184.

Pollard KM, Hultman P, Kono DH. 2005. Immunology and genetics of induced systemic autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 4, 282-288.

Popi AF, Godoy LC, Xander P, Lopes JD, Mariano M. 2008. B-1 cells facilitate *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice via IL-10 secretion. *Microbes and Infection*, 10, 817-824.

Ramazzini B. 1964. Disease of workers. Wright WC, trans. New York: Hafner Publishing.

Riley DM, Newby CA, Leal-Almeraz TO, Thomas VM. 2001. Assessing elemental mercury vapour exposure from cultural and religious practices. *Environmental Health Perspectives*, 109, 770-784.

Sadauskas E, Wallin H, Stoltenberg M, Vogel U, Doering P, Larsen A, Danscher G. 2007. Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. *Particle and Fibre Toxicology*, 19, 4-10.

Santos EO, Jesus IM, Câmara Vde M, Brabo Eda S, Jesus MI, Fayal KF, Asmus CI. 2007. Correlation between blood mercury levels in mothers and newborns in Itaituba, Pará State, Brazil. *Cadernos Saúde Pública*, 23, 622-629.

Serrao R, Zirwas M, English JC. 2007. Palmar erythema. *American Journal of Clinical Dermatology*, 8, 347-356.

Shenker BJ, Berthold P, Decker S, Mayro J, Rooney C, Vitale L, Shapiro IM. 1992. Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. II. Alterations in cell viability. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 14, 555-577.

Sigeyuki A, Eto K, Kurisaki E, Gunji H, Hiraiwa K, Sato M, Hasuike M, Hagiwara N, Wakasi H. 2000. Acute inorganic mercury vapor inhalation poisoning. *Pathology International*, 50, 169-174.

Sikorski R, Juskiewicz T, Paszkowski T, Szprengier-Juskiewicz T. 1987. Women in dental surgeries: reproductive hazards in occupational exposure to metallic mercury. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 59, 551-557.

Simon HU. 2003. Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunological Reviews*, 193, 101-110.

Tsugane S, Kondo H. 1987. The mercury content of hair of Japanese immigrants in various locations in South America. *Science of the Total Environment*, 63, 69-76.

Trzcinka-Ochocka M, Gazewski A, Brodzka R. 2007. Exposure to mercury vapors in dental workers in Poland. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 20, 147-153.

Yoshizawa K, Rimm EB, Morris JS, Spate VL, Hsieh CC, Spiegelman D, Stampfer MJ, Willett WC. 2002. Mercury and the risk of coronary heart disease in men. *The New England Journal of Medicine*, 347, 1755-1760.