



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

**SINTIA SILVA DE ALMEIDA**

**MARCADORES IMUNOSOROLÓGICOS NA EXPOSIÇÃO  
MERCURIAL NA REGIÃO AMAZÔNICA.**

**BELÉM  
2007**

**SINTIA SILVA DE ALMEIDA**

**MARCADORES IMUNOSOROLÓGICOS NA EXPOSIÇÃO  
MERCURIAL NA REGIÃO AMAZÔNICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, área de concentração em Patologia, do Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará, como requisito à obtenção do grau de Mestre em Patologia das Doenças Tropicais.

Orientadora: Dra. Tereza Cristina de O. Corvelo.

**BELÉM  
2007**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA**

---

Almeida, Sintia Silva de.

Marcadores Imunossorológicos na exposição mercurial na Região Amazônica / Sintia Silva de Almeida; orientadora, Tereza Cristina de Oliveira Corvelo. — Belém, 2007.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Belém, 2007.

1. Mercúrio. 2. Exposição. 3. Amazônia. I. Corvelo, Tereza Cristina de Oliveira, orient. II. Título.

CDD - 22. ed 615.925663098115

SINTIA SILVA DE ALMEIDA

**MARCADORES IMUNOSOROLÓGICOS NA EXPOSIÇÃO  
MERCURIAL NA REGIÃO AMAZÔNICA.**

Dissertação apresentada à aprovação como requisito à obtenção do Grau de Mestre, em Patologia das Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará, mediante a Comissão formada pelos professores:

Orientadora:

Dra. Tereza Cristina de Oliveira Corvelo  
Departamento de Genética / CCB / UFPA

Dra. Maria da Conceição Nascimento Pinheiro  
Núcleo de Medicina Tropical / UFPA

Dra. Maria Elena Crespo López  
Núcleo de Medicina Tropical / UFPA

Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva  
Departamento de Fisiologia / CCB / UFPA

Belém – PA

2007

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho, aos meus pais, José Maria de Almeida e Albertina Silva de Almeida, por todo amor, compreensão, apoio, dedicação e estímulo durante minha jornada acadêmica, na realização deste e com certeza de outros futuros trabalhos, às minhas irmãs Márcia Cristina Silva de Almeida e Lílian de Almeida Kuroishi, que sempre me apoiaram durante toda a vida estudantil, e às comunidades ribeirinhas, as quais tornaram a realização desta pesquisa possível.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, antes de tudo, a Deus, porque Ele é o criador.

Agradeço aos meus pais José Maria de Almeida e Albertina Silva de Almeida, pois eles me criaram, educaram e me guiaram pelos caminhos certos, e graças a eles cheguei onde estou e às minhas irmãs Márcia Cristina Silva de Almeida e Lílian Silva de Almeida, pelo apoio que me deram desde a infância.

Ao meu companheiro e amigo Vinícius Augusto Carvalho de Abreu, que sempre apoiou e incentivou minhas decisões.

A minha orientadora e amiga Prof<sup>ª</sup>. Dra. Tereza Cristina de Oliveira Corvelo, que me aceitou como mestrande, que iniciou e contribuiu na minha vida acadêmico/científica, e por todo o apoio e incentivo dados para a realização deste trabalho.

A Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria da Conceição Nascimento Pinheiro, amiga, fundamental para o meu desenvolvimento acadêmico-científico, e nunca se negou a me ajudar nos momentos difíceis.

A todos os colegas do laboratório de imunogenética que de alguma maneira contribuíram para o meu crescimento pessoal, científico, e que me apoiaram nos momentos difíceis, e ao técnico de laboratório Lenor Mandú.

Aos funcionários e professores do NMT/UFPA, CCB/UFPA e por último e não menos importante gostaria de agradecer aos funcionários do laboratório de bacteriologia/IEC que foram indispensáveis para a leitura das lâminas de imunofluorescência, e a todos aqueles, que contribuíram de alguma forma na minha trajetória acadêmica.

E, finalmente eu gostaria de agradecer a CAPES pelo financiamento da bolsa durante o período do curso.

*Quidquid agas, prudenter agas, et respice finem –*  
*O que quer que você faça, seja cauteloso e olhe no fim.*

**GESTA ROMANORUM (CAP.103)**

## RESUMO

Disfunções imunes podem surgir pela combinação entre susceptibilidade genética e fatores ambientais. Existem evidências, em humanos expostos ao mercúrio (Hg), de alterações da resposta imunológica por auto-anticorpos induzidos por Hg. Este trabalho investigou a ocorrência de auto-imunidade induzida por Hgtotal entre indivíduos ribeirinhos da região do Tapajós (Brasília Legal, São Luiz do Tapajós e Barreiras), expostos ao Hgtotal, e da comunidade ribeirinha da região do Tocantins (Panacauera) não exposta ao Hgtotal. No período de junho de 2004 a dezembro de 2006 foram coletadas 236 pares de amostras de cabelo e sangue, nas quais a concentração de Hgtotal no cabelo foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica, e no soro, os auto-anticorpos foram analisados por microscopia de imunofluorescência (IF) usando substrato de células epiteliais humanas (Hep-2). Os mais altos níveis de Hgtotal no cabelo foram os de São Luiz do Tapajós ( $11,24 \pm 2,23$   $\mu\text{g/g}$ ), seguido por Brasília Legal ( $10,00 \pm 0,99$ ) e Barreiras ( $8,64 \pm 1,13$ ), e os mais baixos foram os de Panacauera ( $2,98 \pm 0,20$ ). Em relação à variável sexo, foi observada associação somente em Brasília Legal, com níveis de Hgtotal mais altos no cabelo dos homens. Cerca de 79,65% ribeirinhos do Tapajós e 31,25% da região do Tocantins apresentaram no soro auto-anticorpos induzidos por Hg. Os padrões de auto-anticorpos identificados por IF foram: misto (50,96%), nuclear (31,21%), nucleolar (14,65%) e aparelho mitótico/citoplasmático (3,18%), observando-se maior prevalência dos padrões misto e nuclear nas comunidades expostas ( $p < 0,01$ ). Os auto-anticorpos mais frequentes foram, por ordem de prevalência: NuMa1, PM/Scl, Ssa-Ro, rRNP/Sm, golgi/Ssa/Ro, PCNA, rRNP, Ku, além de outros auto-anticorpos com especificidade ainda não definida. A intensidade de IF ( $p < 0,0001$ ) foi mais reativa nos ribeirinhos do Tapajós. Análise por regressão logística múltipla indicou que o risco de apresentar auto-anticorpos foi aproximadamente duas vezes maior nos expostos ao mercúrio com faixa etária acima de 50 anos ( $p > 0,01$ ). Finalmente, estudos adicionais são indispensáveis para confirmar a especificidade destes auto-anticorpos induzidos pela exposição mercurial, bem como elucidar os mecanismos imunotoxicológicos da ação do mercúrio sobre o sistema imune humano.



## ABSTRACT

Immune dysfunctions can appear by combination between genetic susceptibility and environmental factors. There are evidences, in humans exposed to total mercury (Hgt), of alterations in immune response, by Hgt induced autoantibodies. This work investigated the occurrence of Hgt-induced autoimmunity (HgtIA) among human being exposed to Hgt in the Tapajós region (Barreiras, Brasília Legal, São Luís do Tapajós), as well as in the riverines from Tocantins region (Panacauera) without exposition to Hgt. The of hair and blood samples were collected from 236 individuals during June of 2004 to December of 2006, in which the total mercury in hair was determined by atomic absorption spectrophotometer, and in the serum, autoantibodies were analyzed by indirect immunofluorescence microscopy, using human epithelial cells (HEp-2) as substrate. The highest Hgt<sub>total</sub> levels was found in São Luís do Tapajós ( $11.24 \pm 2.23 \mu\text{g/g}$ ), following for Brasília Legal ( $10.00 \pm 0.99$ ) and Barreiras ( $8.64 \pm 1.13$ ), and the lowest were found in Panacauera ( $2.98 \pm 0.20$ ). When considering the variable sex, association with the levels of Hgt<sub>total</sub> in hair was observed only in Brasília Legal. Regarding mercury exposure, the autoantibodies in serum was more frequent in riverine of the Tapajós (79.65%) than in the control group (31.25%). Most of the autoantibodies patterns identified by immunofluorescence were: mixed (50.96%), nuclear (31.21%), nucleolar (14.65%) and mitotic apparatus/cytoplasmatic (3.18%). The mixed and nuclear autoantibodies patterns were observed in exposed communities ( $p < 0.01$ ). In addition, various widely recognized autoimmune disease specific autoantibodies were also found, which occurred more frequently as following: NuMa1, PM/Scl, Ssa-Ro, rRNP/Sm, golgi/Ssa/Ro, PCNA, rRNP, Ku, besides other autoantibodies without defined specificity. The intensity of immunofluorescence was more reactive in riverine of the Tapajós ( $p < 0.0001$ ). Analysis by regression logistics multiple indicated that the risk of autoantibodies present in serum was twice higher in riverines exposed to mercury ( $\geq 10 \mu\text{g/g}$ ) with age group above 50 years ( $p > 0.01$ ). Finally, additional studies are indispensable to confirm the specificity of these autoantibodies associated with the mercurial exposure, as well as to elucidate the mechanisms immunotoxicologicals of action of the mercury on the human immune system.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - Mapa do estado do Pará, destacando as cidades de Itaituba e Igarapé-Miri .....	37
<b>FIGURA 2</b> - Distribuição de auto-anticorpos em comunidades ribeirinhas da Amazônia, 2004-2006.....	43
<b>FIGURA 3</b> - Distribuição de mercúrio por gênero em comunidades ribeirinhas da Amazônia, 2004-2006.....	46
<b>FIGURA 4</b> – Distribuição de padrão de auto-anticorpo entre indivíduos expostos ao HgTotal em comunidade ribeirinhas da Amazônia, 2004-2006.....	49
<b>FIGURA 5</b> - Distribuição de padrão de auto-anticorpo entre indivíduos não-expostos ao HgTotal em comunidade ribeirinhas da Amazônia, 2004-2006.....	49
<b>FIGURA 6</b> - Distribuição do grau de reação de imunofluorescência de auto-anticorpos entre indivíduos expostos e não expostos ao MeHg em comunidade ribeirinhas da Amazônia, $\chi^2=43,71$ ; gl=2; $p < 0,0001$ , 2004-2006.....	50
<b>FIGURA 7</b> - Distribuição de padrões de auto-anticorpos entre indivíduos expostos e não expostos ao MeHg em comunidade ribeirinhas da Amazônia, 2004-2006.....	53
<b>FIGURA 8</b> – Padrão de coloração de anticorpo (diluição do soro igual 1:40). Magnificação de 400 vezes.....	54
<b>FIGURA 9</b> - Padrão de anticorpo (diluição do soro igual 1:40). Magnificação de 400 vezes. ....	55
<b>FIGURA 10</b> - Padrão de anticorpo (diluição do soro igual 1:40). Magnificação de 400 vezes. ....	56

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> - Níveis de exposição mercurial em comunidades ribeirinhas da Amazônia, 2004-2006. ....	44
<b>TABELA 2</b> – Características demográficas de indivíduos expostos e não expostos ao MeHg em comunidade ribeirinhas da Amazônia, 2004-2006. ....	45
<b>TABELA 3</b> – Distribuição de auto-anticorpos em comunidades ribeirinhas da Amazônia, 2004-2006. ....	48
<b>TABELA 4</b> – Distribuição de padrões de auto-anticorpo entre indivíduos expostos (n=172) e não expostos (n=64) ao MeHg em comunidade ribeirinhas da Amazônia, 2004-2006. ....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
-SH	Radical sulfidrina
AFA	Antifibrilarina
ANA	Anticorpo antinuclear
ANoA	Anticorpo antinucleolar
BN	Brown Norway
CNS	Sistema nervoso central
GFAP	Proteína ácida glial fibrilar
HEp-2	Células epiteliais humanas
Hg	Mercúrio
HgCl <sub>2</sub>	Cloreto de mercúrio
HgIA	Auto-imunidade induzida
IC	Imuno-complexo
IFN-γ	Interferon-gama
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
Anti-Ku	Anticorpo contra uma subunidade de proteína-cromatina
MBP	Proteína básica da mielina
MeHg	Metilmercúrio
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NFs	Neurofilamentos
NuMa1	Anticorpo anticentrofulina
PBS	Tampão fosfato-salina
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PM/ScI	Polimiosite com Esclerose Sistêmica
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucléico mensageiro
Anti-rRNP	Anticorpos antiproteína P ribossomal
Anti-Sm	Anti-Smith
snoRNP	Pequeno RNA nucleolar
Anti-Ssa-Ro	Ribonucleoproteínas que fazem parte da composição do RNA

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>1</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1 MERCÚRIO E COMPOSTOS MERCURIAIS .....	15
1.2 HISTÓRICO.....	16
1.3 CICLO DO MERCÚRIO NO AMBIENTE.....	17
1.3.1 <i>Toxicocinética</i> .....	18
1.3.2 <i>Efeitos à Saúde</i> .....	19
1.3.3 <i>Poluição mercurial na Amazônia</i> .....	21
1.4 SISTEMA IMUNE E MERCÚRIO .....	22
1.4.1 <i>Sistema imune</i> .....	22
1.4.2 <i>Auto-imunidade</i> .....	23
1.4.3 <i>Fatores de risco</i> .....	24
1.4.4 <i>Doenças auto-imunes</i> .....	25
1.4.5 <i>Etiologia da doença auto-imune</i> .....	26
1.4.6 <i>Efeitos do mercúrio sobre o sistema imune</i> .....	27
<b>2 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>34</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
3.1 CASUÍSTICA .....	36
3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO .....	38
3.3 COLHEITA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS .....	38
3.3.1 <i>Análise ética</i> .....	39
3.4 DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS LABORATORIAIS .....	39
3.4.1 <i>Determinação das concentrações de Hg total em amostras de cabelo</i> .....	39
3.4.2 <i>Determinação qualitativa e/ou semi-quantitativa de anticorpos anti-nucleares em soro humano</i> .....	39
3.4.3 <i>Interpretação dos resultados</i> .....	41
3.4.4 <i>Análise estatística</i> .....	41
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>
4.1 DISTRIBUIÇÕES DE AUTO-ANTICORPOS E NÍVEIS DE CONCENTRAÇÕES DE MERCÚRIO ENTRE AS COMUNIDADES RIBEIRINHAS DO TAPAJÓS E PANACAUERA (TOCANTINS). .....	43
4.2 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E DO ESTADO DE SAÚDE DAS COMUNIDADES RIBEIRINHAS DO TAPAJÓS E PANACAUERA (TOCANTINS). .....	45
4.3 OS TIPOS DE PADRÕES DE AUTO-ANTICORPOS E INTENSIDADE DAS REAÇÕES DE IMUNOFLORESCÊNCIA EM COMUNIDADES RIBEIRINHAS DO TAPAJÓS E PANACAUERA (TOCANTINS). .....	47
4.4 OS TIPOS DE PADRÕES DE AUTO-ANTICORPOS E CATEGORIAS EM COMUNIDADES RIBEIRINHAS DO TAPAJÓS E PANACAUERA (TOCANTINS). .....	51
<b>NUCLEAR</b> .....	<b>52</b>
4.5 IDENTIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS HEP-2 RECONHECIDOS POR AUTO-ANTICORPO DE SORO HUMANO EM COMUNIDADES RIBEIRINHAS DO TAPAJÓS E PANACAUERA (TOCANTINS).....	53
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>

**6 CONCLUSÕES.....67**  
**7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....68**  
**ANEXOS .....81**

# **INTRODUÇÃO**

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 MERCÚRIO E COMPOSTOS MERCURIAIS

O mercúrio é um metal pesado encontrado naturalmente no ar, na água e solo, e existe em três estados de valência:  $\text{Hg}^0$  (mercúrio elementar), íon mercuroso ( $\text{Hg}_2^{+2}$ ) ou íon mercúrico ( $\text{Hg}^{+2}$ ) (US EPA, 1997). Além disso, ocorre no meio ambiente associado a outros elementos químicos, formando diferentes espécies orgânicas (alquilmercuriais, alcóximercuriais e fenilmercuriais) sendo os de maior interesse toxicológico os alquilmercuriais de cadeia curta, particularmente o monometilmercúrio ( $\text{MeHg}$ )  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  e o dimetilmercúrio ( $\text{Me}_2\text{Hg}$ )  $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ . Cada um destes compostos apresenta diferentes propriedades físico-químicas e toxicológicas (BERLIN, 2007, BOENING, 2000).

O mercúrio na forma elementar é o único metal líquido nas condições normais de temperatura e pressão existente. Seu ponto de fusão é de  $38,9^\circ\text{C}$  e de ebulição é  $356,6^\circ\text{C}$ . Tem cor prateada brilhante no estado elementar, mas oxida-se lentamente no ar úmido, adquirindo uma cobertura opaca e manchas escuras. O número atômico é 80, massa atômica 200,59, densidade  $13,6\text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ , pertence ao Grupo IIB da tabela periódica. O peso específico é  $13,6\text{g}/\text{cm}^3$  ( $0^\circ\text{C}$ ) (BERLIN, 2007, RODRIGUES, 2005, WHO, 1990).

O mercúrio é considerado um poluente de alto risco, tendo um grande espectro de efeitos tóxicos dependendo da forma química e característica da exposição (CLARKSON, 2002). A respeito dos efeitos à saúde decorrentes da exposição ao mercúrio, a população pode estar exposta através da inalação, do consumo de alimento contaminado, água ou solo e/ou absorção através da pele, entretanto a preocupação a respeito da poluição mercurial é decorrente dos efeitos à saúde causados tanto pela exposição ao mercúrio metilado quanto ao vapor de mercúrio, que são extremamente tóxicos (WHO, 1990, 2000).

Entre as várias formas químicas, o metilmercúrio é conhecido por ser agente neurotóxico, teratogênico, pois atravessa a barreira placentária humana, imunotóxico, mutagênico e carcinogênico (GLINA et al., 1997), além de causar desenvolvimento anormal, debilitação generalizada e morte prematura (CLARKSON, 1987, KAKITA et al., 2000, SASS et al., 2001, SATOH, 2003, WHO, 1990).

Com relação à toxicidade do mercúrio, é freqüente acontecer em doses muito mais baixas que aquelas requeridas para produzir efeitos tóxicos em outros órgãos e tecidos (HAMADA & OSAME, 1996), as formas inorgânicas e orgânicas de mercúrio são imunotóxicas, embora elas difiram quantitativamente e qualitativamente nos seus efeitos



sobre o sistema imune; (SILVA et al., 2004). Entretanto, em estudo experimental, mercúrio orgânico demonstrou ser mais imunossupressivo que o inorgânico (HAVARINASAB & HULTMAN, 2005).

Um outro estudo sobre toxicidade encontrou que o cloreto de mercúrio e o biiodeto de mercúrio são altamente tóxicos, em mamíferos a dose tóxica é de 8g a 4g e O mercúrio orgânico ingerido regularmente na dieta, na dose de 1 mg/kg, causa intoxicação crônica em suínos. Na dose de 6 mg/kg, provoca morte em suínos em um período de cinco dias (RADOSTITIS, 2002).

## 1.2 HISTÓRICO

O mercúrio é um metal conhecido desde a era primitiva e juntamente com o ouro, prata, cobre, ferro, cromo e estanho constituíram o grupo dos sete metais conhecidos pelas civilizações deste período. Na antiguidade, os chineses e indianos (3000 a.C.) utilizavam o cinábrio na pintura (BATTIGELLI, 1983), bem como os egípcios, os assírios e os incas, que e o denominavam de *llampt* (PICAZO-SANCHEZ & FERNANDEZ-VOZMEDIANO, 2005).

O primeiro documento sobre o metal foi escrito por Teofrasto (321 a.C.) em seu “*Tratado de las piedras*”, na qual denominava o mercúrio de Chitos Argyros, ele descreveu o método que se utilizava para obter o mercúrio a partir do cinábrio, por meio da interação deste com o cobre e vinagre (BATTIGELLI, 1983).

A toxicidade do mercúrio é conhecida há séculos. O primeiro registro de toxicidade deste metal é provavelmente nos trabalhos de Plênio (23-79 a.D.). Durante o Império Romano, a escravidão nas minas de cinábrio foi usada como uma terrível punição para cidadãos “rebeldes”. Isto resultou na morte lenta e dolorosa de alguns prisioneiros (PAVLOGEORGATOS & KIKILIAS, 2002).

Os compostos orgânicos de Hg foram usados pela primeira vez na pesquisa química em 1863, na terapêutica em 1887 e na manufatura de sementes em 1914. Antes da 2ª Guerra Mundial, investigações sobre as propriedades químicas do Hg foram conduzidas usando dimetilmercúrio, tendo resultado em profundos distúrbios neurológicos em quatro trabalhadores, um dos quais evoluiu a óbito. Como esses pacientes foram vítimas de um acidente industrial, o incidente foi uma advertência para a ciência médica da possibilidade da exposição ao Hg ser também um perigo ocupacional (CLARKSON, 2002).

No Japão uma fábrica, durante quarenta anos (1920-1960), usou mercúrio

como catalisador na produção de plástico, e os resíduos industriais eram descarregados na baía de Minamata, (HARADA, 1995). Parte do metal era metilado antes de ser lançado nas águas da baía (LAZO et al., 1991), assim o metal era seqüestrado pelo plâncton e outros microorganismos, iniciando a contaminação da cadeia alimentar aquática (HARADA, 1995).

Os efeitos tóxicos do metilmercúrio sobre o organismo humano começaram a ser mais evidenciados em 1953 (OPAS/OMS, 1972, WHO, 1989), com a identificação dos primeiros casos de lesão do sistema nervoso central, a chamada doença de Minamata, em moradores de vilas próximas à cidade de Minamata, Japão (HARADA, 1995). A maioria dos doentes eram pescadores ou compradores de peixes capturados na baía, que abastecia a cidade (HARADA, 1995), este episódio culminou com o óbito de mais de 1300 pessoas. Em 1965, residentes ao longo do rio Agano na cidade de Niigata, Japão, também apresentaram a doença de Minamata (HARADA, 1994, HARADA et al., 1998).

Iraque, Guatemala, Gana e Paquistão, também tiveram casos graves de intoxicação mercurial, pela ingestão de grãos tratados com compostos mercuriais usados na agricultura como praguicidas (BAKIR et al., 1973, OPAS/OMS, 1972, WHO, 1991). Pessoas foram intoxicadas e muitas morreram em consequência da ingestão de mercúrio orgânico presente nas sementes contaminadas, utilizadas na fabricação do pão caseiro.

### 1.3 CICLO DO MERCÚRIO NO AMBIENTE

O ciclo e a distribuição do mercúrio no meio ambiente envolvem a emissão de  $Hg_{total}$  da superfície da terra e da água para a atmosfera, onde aproximadamente 95% do  $Hg_{total}$  estão no estado elementar ( $Hg^0$ ), o qual é lentamente oxidado ao estado de íon mercurioso ( $Hg_2^{2+}$ ) e íon mercúrico ( $Hg^{+2}$ ) (BERLIN, 2007, MOREL et al., 1998). A maior parte desta oxidação tem o ozônio como principal oxidante, sendo, também significante  $HClO$ ,  $HSO_3$ , e  $OH^{\cdot}$ . Uma vez oxidado 60% do mercúrio atmosférico é depositado na terra e 40% na água (MOREL et al., 1998).

No ciclo aquático a espécie química predominante é a de  $Hg^{+2}$ , que sofre transformação orgânica através de processo fotoquímico ou catalisado por bactérias redutoras de sulfato (MOREL et al., 1998), originando duas espécies orgânicas, o dimetilmercúrio volátil, e o metilmercúrio que se bioacumula nos peixes, portanto sendo incorporado nas cadeias tróficas, assim a captação microbiológica é a etapa chave para metilação (GILMOUR & HENRY, 1991, MOREL et al., 1998).

Uma vez liberado dos microorganismos, o metilmercúrio rapidamente se difunde, ligando-se às proteínas da biota aquática, quando alcança a cadeia alimentar, na qual sofre biomagnificação (GILMOUR & HENRY, 1991). Assim, atinge elevadas concentrações, no tecido muscular dos peixes, situados no topo da cadeia alimentar aquática, chegando ao homem pelo consumo de peixes, principalmente os carnívoros (NUNES, 1998). Por outro lado, seres invertebrados, particularmente insetos aquáticos também bioacumulam o metal (GUIMARÃES, 2002).

### **1.3.1 Toxicocinética**

As formas orgânicas têm maior solubilidade em lipídios do que as inorgânicas, isso permite então, atravessar mais facilmente a membrana celular e ser absorvido. Uma pequena quantidade de mercúrio orgânico pode ser absorvida por inalação e pela pele, mas altas taxas de absorção ocorrem pelo sistema gastrointestinal (PAVLOGEORGATOS & KIKILIAS, 2002).

O metilmercúrio é absorvido quase completamente (cerca de 90 a 95%) pelo trato gastrointestinal (BERLIN, 2007, CLARKSON, 2002, US/EPA, 1997). No corpo ele é depositado principalmente nos tecidos, ligado a grupos de proteínas, aminoácidos ou peptídeos contendo grupamentos sulfidrilas ( $-SH$ ), como cisteína e glutatona (CAMARA et al., 1996). Assim o MeHg se distribui através da corrente sanguínea, se acumula nas hemácias onde permanece durante um tempo (BERLIN, 2007, CLARKSON, 2002, CRAIG, 1986).

Por sua solubilidade lipídica, o MeHg também atravessa a barreira sangue e cérebro e a placentária com facilidade (MOREL et al., 1998), no feto, MeHg é acumulado e concentrado principalmente no cérebro podendo provocar sérios danos ao sistema nervoso central (CRAIG, 1986). Outros órgãos que também concentram MeHg são o fígado e os rins (BERLIN, 2007). No cabelo o MeHg se acumula no processo de formação dos fios (WHO, 2000).

A excreção do MeHg ocorre principalmente pela rota fecal (BERLIN, 2007), quantidades significativas também são eliminadas através dos rins, da saliva, lágrimas, suor e bÍlis. Metilmercúrio também é excretado no leite materno (BJORNBERG et al., 2005) e no cabelo humano, o qual é usado como indicador biológico para a exposição ao MeHg presente na dieta, já que a relação entre a concentração do Hg em cabelo e no sangue é cerca de 250:1 (BERLIN, 2007, CAMARA et al., 1996, WHO, 1990).

### 1.3.2 Efeitos à Saúde

De acordo com a concentração, tempo de exposição, duração e frequência da espécie química de mercúrio absorvida pelo homem, podem surgir intoxicações, agudas e crônicas (SILVA et al., 2004). Os distúrbios neurológicos são os que predominam dentre as manifestações clínicas na exposição crônica ao metilmercúrio (ASCHNER et al., 1987), causando danos quase exclusivamente ao sistema nervoso central que está associado à sua alta afinidade pelo tecido nervoso particularmente com os sítios moleculares ricos em grupamentos sulfidril (CASTOLDI et al., 2001, NAGANUMA et al., 2002).

Todas as moléculas endógenas contendo grupos – SH (glutathiona, cisteína, homocisteína, metalotioneína, e albumina) se ligam a íon mercuriais (PATRICK, 2002). O complexo de metilmercúrio e cisteína pode agir como uma “molécula mímica”, já que imita a metionina e ganha entrada no sistema nervoso central pelo mesmo mecanismo que a metionina usa para atravessar a barreira sangue-cérebro (ASCHNER & ASCHNER, 1990).

De forma que o metilmercúrio exerce função supressora sobre o crescimento celular ao inibir as atividades das proteínas pela saturação dos seus grupos sulfidrilas (NAGANUMA et al., 2002, OMATA et al., 1986). Outros danos bioquímicos às células e genes que são causados pelo mercúrio ocorrem por diversos mecanismos, como interrupção da homeostase do cálcio intracelular, alteração do potencial de membrana alterando síntese de proteínas, dano mitocondrial, apoptose, estresse oxidativo e rompimento de microtúbulos (CASTOLDI et al., 2001, PATRICK, 2002).

Em adultos humanos, o dano é seletivo a certas áreas do cérebro associada às funções sensoriais e de coordenação. Efeitos tais como constrição do campo visual e ataxia parecem ter um período latente de semana a meses, e tais efeitos são geralmente irreversíveis (SWARTOUT, 1998).

O estágio do desenvolvimento mais sensível aos efeitos do MeHg é o fetal, em particular a citoarquitetura e o funcionamento do córtex cerebelar são altamente afetados (SASS et al., 2001), a neurotoxicidade é cumulativa e se evidencia de 2 – 5 anos depois do nascimento, causando desenvolvimento anormal, debilitação generalizada e morte prematura (CLARKSON, 1987, KAKITA et al., 2000, SATOH, 2003, SWARTOUT, 1998, WHO, 1990).

Apesar da tolerância a baixos índices mercuriais, a OMS estabelece limites de

segurança. Assim, para a exposição ao mercúrio o limite de segurança corresponde a 10 a 30  $\mu\text{g/l}$  de urina, 100  $\mu\text{g/l}$  no sangue e 10  $\mu\text{g/g}$  no cabelo. Na exposição ao metilmercúrio via consumo de peixes contaminados é considerado o valor de 10  $\mu\text{g/g}$  de MeHg em amostras de cabelo (WHO, 1990).

Com relação à imunotoxicidade a exposição a baixas concentrações de mercúrio, em suas várias formas químicas, pode deprimir ou estimular o sistema imunológico dependendo da susceptibilidade do indivíduo e dos parâmetros de exposição como a via, dose e duração (BIGAZZI, 1998).

Um aspecto relevante de imunotoxicidade induzida pelo mercúrio no desenvolvimento de auto-imunidade é a presença de anticorpos aos auto-antígenos celulares dos seres humanos expostos a contaminação ambiental ou ocupacional. Nos indivíduos com doenças neurodegenerativas foi encontrada uma correlação significativa entre os títulos dos anticorpos, predominantemente imunoglobulina G, contra NFs (neurofilamentos), MBP (proteína básica da mielina) e GFAP (proteína ácida fibrilar glial) com os índices de exposição mercurial e também com as deficiências senso-motoras (EL-FAWAL et al., 1999).

De forma similar, a auto-imunidade induzida por injeções de  $\text{HgCl}_2$ , em ratos geneticamente susceptíveis ( $\text{H-2}^s$ ) resultou na perda de tolerância caracterizada pela síntese de anticorpos aos antígenos nucleolar, especificamente anti-fibrilarina; depósitos sistêmicos de imunocomplexos; intensa proliferação linfocitária com hipergamaglobulinemia, particularmente dos isotipos IgG1 e IgE (BAGENSTOSE et al., 2002, HAGGQVIST & HULTMAN, 2003).

Basicamente, uma reação antígeno-específica causaria a indução destes anticorpos (anti-fibrilarina) pela modificação deste antígeno devido a sua ligação com o mercúrio (KUBICKA-MURANYI et al., 1995, POLLARD et al., 1997) e/ou degradação proteolítica (POLLARD et al., 2000).

Mesmo que, ainda não seja conhecido o exato mecanismo de ação do mercúrio na indução de auto-imunidade, acredita-se que este poluente pode modificar os antígenos do próprio ou seu processamento transformando-os em imunogênicos (KUBICKA-MURANYI et al., 1995), e assim, determinando a ativação e produção de citocinas pelas células do sistema imune.

### 1.3.3 Poluição mercurial na Amazônia

No Brasil, o Hg é muito empregado nas áreas de garimpo de ouro, onde é usado para separar o ouro das impurezas, pois este forma um amálgama com o ouro. Após a queima do amálgama, o Hg evapora-se, restando somente o ouro (VASSALO et al., 1996), constituindo um dos fatores da poluição ambiental pelo mercúrio, na Amazônia (CÂMARA et al., 1997). A exposição de ouro na Amazônia é anterior ao século XVIII, e surgiu com a garimpagem de ouro, que se espalhou na década de 1970 (SANTOS et al., 1992).

Na Região do Tapajós a corrida para o ouro começou em 1958, nesta região há uma grande concentração de garimpos, que estão localizados nos municípios de Itaituba e Jacareacanga, estes garimpos, na década de 1980 foram responsáveis por aproximadamente 50% do ouro produzido no Brasil (SANTOS et al., 2003), sendo suplantados somente pelo garimpo de Serra Pelada, que foi descoberto em 1980, e cuja produção de ouro diminuiu sistematicamente desde 1983 (SILVA, 2001).

O ouro ocorre em partículas muito finas e raramente em pepitas. Nos garimpos para concentrar o ouro, o mercúrio é usado para a separação destas partículas finas através de amalgamação. A seguir, a mistura Au-Hg em geral, é queimada em retortas, essa operação é feita freqüentemente ao ar livre e, portanto, emite vapor de mercúrio para a atmosfera. Durante o processo de amalgamação, uma quantidade variável de mercúrio metálico também se perde nos rios e solos pelo seu manuseio, em condições de campo precárias e, devido à vaporização. Além disso, descartam-se rejeitos ricos em mercúrio, na maioria das áreas de garimpos (LACERDA & SALOMONS, 1991).

Os dados epidemiológicos e toxicológicos das populações ribeirinhas do Tapajós (HARADA et al., 2001), revelaram, em mais de 50% dos casos, um conteúdo médio de mercúrio total, nas amostras de cabelo humano, superior aos 10µg/g (limite dos níveis de tolerância permitidos pela organização mundial de saúde, (WHO, 1990), e diversas espécies de peixe freqüentemente consumidas por residentes em comunidades ribeirinhas apresentaram concentrações acima do nível recomendado para consumo humano, que é de 0,5 ppm, de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 1975).

## 1.4 SISTEMA IMUNE E MERCÚRIO

### 1.4.1 Sistema imune

O sistema imune é um conjunto de componentes celulares, químicos e proteínas solúveis, com a função de proteger o organismo de substâncias estranhas (antígenos) como, por exemplo, vírus, bactérias, células tumorais. Entretanto mesmo substâncias estranhas não infecciosas podem provocar respostas imunes. Além disso, em alguns casos, os próprios mecanismos que normalmente protegem contra a infecção e eliminam substâncias estranhas são capazes de causar lesão tecidual e doença (ABBAS et al., 2002, POLLARD, 2006, SMITH & GERMOLEC, 1999).

Evolutivamente a resposta imune é representada por dois sistemas: o inato e o adaptativo, e que envolve três etapas essenciais: reconhecimento, ativação e eliminação (SNUSTAD & SIMONS, 2001). A resposta imune ou inata é a defesa inicial, não específica contra patógenos e consiste de mecanismos que são capazes de rápidas respostas aos microorganismos e que reagem do mesmo modo as infecções repetidas (SMITH & GERMOLEC, 1999).

A imunidade adquirida ou adaptativa é caracterizada por possuir especificidade, memória e habilidade de distinguir entre o “próprio” e o “não-próprio” (ABBAS et al., 2002, KIMBER & DEARMAN, 2002). Existem dois tipos de respostas imunes adquiridas, a imunidade humoral e a mediada por células, as quais diferem em relação à via em que elas reconhecem e respondem a antígenos e nas células efetoras em que elas se diferenciam (ABBAS et al., 2002, KIMBER & DEARMAN, 2002).

A imunidade humoral é mediada por anticorpos (produzidos pelos linfócitos B) que reconhecem antígenos especificamente e neutralizam a infecciosidade (ABBAS et al., 2002). Em contraste, a imunidade celular é mediada pelos linfócitos T. Em ambas, a interação entre linfócitos e antígeno que ocorre via receptores<sup>1</sup> de membrana resulta em ativação, divisão e diferenciação celular do linfócito, o qual se torna uma célula efetora específica que facilita a eliminação do antígeno (GOODNOW et al., 2005, KIMBER & DEARMAN, 2002).

Os linfócitos T e B apresentam enorme repertório dos domínios ligantes de antígeno, tal diversidade nos receptores de linfócitos, é considerada uma vantagem na

---

<sup>1</sup> No caso dos linfócitos T, o antígeno está em associação com o Major Histocompatibility Complex (MHC).

resistência do hospedeiro contra patógenos, e resulta de extensa recombinação somática dos genes que codificam para estas regiões, podendo propiciar como conseqüência, que receptores<sup>2</sup> de membrana sejam gerados e reativos ao próprio. Assim, a manutenção dessa diversidade sem comprometimento do próprio pode ser alcançada por várias vias (KIMBER & DEARMAN, 2002, ZEHN & BEVAN, 2007).

### 1.4.2 Auto-imunidade

O sistema imune de pessoas saudáveis é “tolerante” às próprias moléculas (ao “próprio”), mas ataca constituintes estranhos (“não próprios”) (DIGHIERO & ROSE, 1999, GONZALEZ-BUITRAGO & GONZALEZ, 2006, POLLARD, 2006). Entretanto, a falha dos mecanismos responsáveis pela autotolerância e indução de uma resposta imune contra componentes do próprio, é denominada de auto-imunidade (figura 1) (ALBRIGHT & GOLDSTEIN, 1996, BIGAZZI, 1997, GONZALEZ-BUITRAGO & GONZALEZ, 2006, POLLARD, 2006, SMITH & GERMOLEC, 1999, TAN, 2001).

A tolerância imunológica é um fenômeno do sistema imune que ao discriminar entre o próprio e o não-próprio, atenua ou interrompe a resposta imune ativa a estruturas reconhecidas como inerentes ao organismo (RUBIN & KRETZ-ROMMEL, 1999). A auto-imunidade causada pela falha da autotolerância pode resultar de anormalidades primárias de células B, T ou ambas (ABBAS et al., 2002, ROITT et al., 2001).

A tolerância pode ocorrer na forma inata (natural) e adquirida (induzida). A tolerância inata é a tolerância aos próprios antígenos e proteínas do corpo. A falha da tolerância natural, ou o não reconhecimento do próprio, resulta em doença auto-imune. A tolerância adquirida ou induzida é a tolerância do sistema imune a antígenos externos (como em animais experimentais, exposição a raio-X, tratamentos com algumas drogas e por exposição à reação cruzada de antígenos) (ROITT et al., 2001, TROWSDALE & BETZ, 2006).

A auto-imunidade pode resultar em dano ao hospedeiro, então qualquer doença resultante da resposta imunológica conseqüente do aparecimento de clones interditados, e que por um processo de mutação somática escapam ao controle normal é classificada como doença auto-imune (DIGHIERO et al., 1986, DIGHIERO et al., 1985).

---

<sup>2</sup> BCR – receptor de células B, e TCR – receptor de células T.



A causa da maioria das doenças imunes é desconhecida, mas parecem surgir pela combinação entre susceptibilidade genética e fatores ambientais, ambos contribuem para a interrupção ou desregulação de tolerância central ou periférica, permitindo surgimento da patogênese de clones auto-reativos de células B e T (RIZZI et al., 2006).

Os mecanismos da indução de tolerância e a sua manutenção ainda são indefinidos, e alguns destes mecanismos, como os a seguir, vêm sendo propostas para explicar sua origem, (ROITT et al., 2001): deleção clonal (BURNET, 1960, FORSDYKE, 1995, ROITT et al., 2001), anergia clonal (LECHLER et al., 2001, NOSSAL & PIKE, 1980, PIKE et al., 1982, SCHWARTZ, 2003), rede idiotípica (JERNE, 1974, ROITT et al., 2001), ignorância clonal (MERINO-PÉREZ & LÓPEZ-HOYOS, 2000, PUJOL-BORREL et al., 2005, THEOFILOPOULOS, 1995a, b), células supressoras e edição de receptor (GOODNOW et al., 2005, ROITT et al., 2001).

### **1.4.3 Fatores de risco**

Os principais fatores de efeitos tóxicos do mercúrio, além da dose, são fatores de susceptibilidade, os quais podem desempenhar um papel maior nos efeitos em uma população com uma significativa exposição ao mercúrio e em níveis extremamente baixos de exposição. No que diz respeito a fatores ambientais, a melhor evidência vem da imunidade induzida por drogas e químicos, a qual tem sido descrita tanto em modelos animais quanto em humanos (HAGGQVIST et al., 2005, HULTMAN & HANSSON-GEORGIADIS, 1999, POLLARD, 2006).

Metais tóxicos como alumínio e chumbo foram documentados ter efeitos sinérgicos com o mercúrio, aumentando significativamente os efeitos do mercúrio. O alumínio tem seus próprios efeitos tóxicos aumentando os efeitos do mercúrio esgotando glutatona. Entretanto indução por estes agentes pode levar de semanas a muitos meses, podendo ser causada por um grande número de substâncias químicas (POLLARD, 2006, RUBIN & KRETZ-ROMMEL, 1999).

Entre os fatores genéticos de susceptibilidade, o mais freqüentemente observado envolve o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II (HLA em humanos), (POLLARD, 2006), e mutações e polimorfismos em genes envolvidos em estabelecer autotolerância e regulação imune, como o gene regulatório auto-imune (AIRE), família de domínios de mucina e imunoglobulina das células T (TIM), ou antígeno 4

associado ao linfócito T citolítico (CTLA- 4), que também têm sido identificadas estar relacionadas com manifestações auto-imunes (CHRISTEN & VON HERRATH, 2004, RIZZI et al., 2006).

Mulheres têm significativamente maior risco que homens de desenvolver doença auto-imune, e é provável que isto seja em função das diferenças hormonais entre os sexos, e algumas desordens parecem ser afetadas, para melhor ou pior, por mudanças hormonais tais como: gravidez, parto e menopausa (FARINE, 1997, KELLER et al., 2006, OLIVEIRA et al., 2001).

Algumas doenças parecem ser ativadas ou pioram devido à ocorrência de infecções (BIGAZZI, 1997, PRELOG, 2006).

#### **1.4.4 Doenças auto-imunes**

As doenças auto-imunes são condições patológicas nas quais a resposta imune contra auto-antígenos produz danos estruturais, como dano celular, inflamação, e/ou funcionais, com estimulação ou inibição de células alvo por auto-anticorpos para receptores celulares (BIGAZZI, 1997). Auto-anticorpos são anticorpos contra componentes intracelulares de células humanas, onde ambas as reações nucleares e citoplasmáticas já foram registradas (KARIM, 2007, VOGT et al., 2006). Muitos auto-anticorpos já são conhecidos e apresentam importância clínica, como discriminados no Consenso Brasileiro de Fator Antinuclear em Células HEp-2 (DELLAVANCE et al., 2003, DELLAVANCE et al., 2002).

As doenças auto-imunes são classificadas na clínica como sistêmicas, apresentando reatividade contra antígenos distribuídos por vários tecidos do corpo, por exemplo, antígenos nucleares, as lesões são características e amplamente disseminadas, ou órgão ou tecido-específicas, com reação de anticorpos e células T contra os próprios antígenos localizados em um tecido específico (BIGAZZI, 1997, POLLARD, 2006).

As doenças auto-imunes sistêmicas mostram auto-anticorpos dirigidos contra moléculas nucleares ou citoplasmáticas que participam na replicação e transcrição de DNA, e a tradução de RNAm e as órgão-específica exibem auto-anticorpos dirigidos contra um ou vários órgãos relacionados (GONZALEZ-BUITRAGO & GONZALEZ, 2006, POLLARD, 2006). Assim, os auto-anticorpos podem ser divididos em duas classes: 1) contra órgão-específico ou antígeno celular específico, por exemplo: anticorpos, anti-tireóideglobulina, antiplaqueta e antieritrócito, 2) contra órgão-não específico ou proteínas ubíquas, por

exemplo: anticorpos, anti-DNA-fita dupla e simples, antihistona, anti-citoesqueleto, etc. (VERDIER et al., 1997).

A presença de auto-anticorpos na circulação em várias doenças auto-imunes sistêmicas é uma marca característica. Anticorpo antinuclear (ANA) é uma população heterogênea de auto-anticorpos dirigidos contra vários antígenos nucleares, com reatividades específicas bem definidas, em diferentes doenças auto-imunes de humanos, e estão incluídos entre os critérios de classificação tanto de lupus eritematoso sistêmico como de síndrome de Sjogren (SS) (GONZALEZ-BUITRAGO & GONZALEZ, 2006, HANSSON, 1999).

Em doenças auto-imunes órgãos-específicas, a detecção de auto-anticorpos é um dado importante para diagnosticá-las. Auto-anticorpos de baixa afinidade também são encontrados comumente em indivíduos normais na ausência de qualquer doença definível e com aumento da prevalência em populações que estão envelhecendo. Portanto, sua presença pode ser detectada vários anos antes do início da doença, e neste contexto eles são marcadores de doenças futuras em indivíduos atualmente saudáveis (VERDIER et al., 1997).

Tal identificação pode permitir o tratamento imunológico para prevenir a doença, e quando esta não pode ser prevenida, acarretaria risco a vida, mas em condições tratáveis, pode ser evitada (GONZALEZ-BUITRAGO & GONZALEZ, 2006, HANSSON, 1999).

#### **1.4.5 Etiologia da doença auto-imune**

Teoricamente é possível quebrar a tolerância imunológica por uma variedade de mecanismos. O primeiro destes é a liberação de antígenos crípticos que não passaram pela seleção negativa de linfócitos T auto-reativos durante o desenvolvimento. Outra possibilidade é baseada em imitação molecular, a evidência é que autotolerância pode ser quebrada através de exposição a uma proteína que compartilha homologia com determinantes antigênicos do hospedeiro (KIMBER & DEARMAN, 2002).

Um terceiro mecanismo é fornecido por circunstâncias em que autopeptídeos ou determinantes de MHC são modificados quimicamente. Por exemplo, acredita-se que alguns metais induzem reações auto-imune secundárias à criação de novo sítio de afinidade para determinantes de MHC em autopeptídeos. Finalmente, também há um papel para ativação policlonal na gênese de respostas auto-imunes, que pode diretamente ou

indiretamente estimular populações de linfócitos B para elaborar anticorpo policlonal, inclusive anticorpo autoreativo (KIMBER & DEARMAN, 2002).

Considerando estes possíveis mecanismos é aparente que em indivíduos suscetíveis, a auto-imunidade pode ser provocada por uma ou mais variedade de estímulos, inclusive, trauma em tecido, terapia com droga ou exposição inadvertida a xenobióticos (KIMBER & DEARMAN, 2002).

#### **1.4.6 Efeitos do mercúrio sobre o sistema imune**

Como já citado, as doenças auto-imunes podem apresentar diversas causas, como infecções, que desencadeiam eventos na quebra da auto-tolerância ou, adicionalmente xenobióticos, que são substâncias estranhas ao organismo de origem sintética, natural ou biológica, compreendendo compostos químicos industriais, drogas entre outras, as quais a exposição é devido a sua presença no ambiente ou por razões terapêuticas (BIGAZZI, 1997).

Alguns efeitos dos xenobióticos sobre as células têm sido descritos como imunotóxicos. A imunotoxicidade pode causar imunossupressão, aumentando a susceptibilidade à infecção ou desenvolvimento de neoplasias, ou estimulação da resposta imune com indução de reações alérgicas de auto-imunidade (BIGAZZI, 1997).

Existem muitas evidencias, obtidas através de modelos experimentais, de que vários metais pesados como, por exemplo, o mercúrio, a prata e o ouro são capazes de provocar alterações e doença no sistema imune humano (ROWLEY & MONESTIER, 2005). No entanto, o mercúrio, devido à ubiquidade e aos seus efeitos biológicos tem sido mais estudado (ALBRIGHT & GOLDSTEIN, 1996, ROWLEY & MONESTIER, 2005).

Algo interessante nas características da auto-imunidade induzida pelo mercúrio é que há uma predisposição determinada geneticamente na auto-reatividade do metal (ALBRIGHT & GOLDSTEIN, 1996). Portanto, isto demonstra que o genótipo também tem importância para o potencial efeito imunológico em humanos. Alguns estudos em humanos expostos ocupacionalmente a níveis moderados de mercúrio elementar relataram mudanças na bioquímica da resposta do sistema imune (GMA/UNEP, 2006).

Embora os níveis de exposição ao mercúrio orgânico e inorgânico variem entre os indivíduos, seus efeitos imunotóxicos são virtualmente universais por causa de sua ocorrência natural no ambiente, pela abundância como poluente, pela presença em amálgamas dentais, cosméticos, preservativos, fumífugo e preparação de vacinas. A imunotoxicidade aos

compostos mercuriais pode resultar em níveis elevados de IgE e aumento do número de linfócitos T em humanos (ROWLEY & MONESTIER, 2005, SILVA et al., 2004).

Em estudo experimental realizado por Havarinasab & Hultman (2005), metilmercúrio foi visto ser mais potente imunossupressor do que mercúrio inorgânico, o que não é surpresa, visto que metilmercúrio é mais membranopemeável que  $\text{Hg}^{+2}$ , sendo assim mais tóxico aos linfócitos (HAVARINASAB & HULTMAN, 2005, WHITEKUS et al., 1999). É desconhecido, no entanto, a extensão em que MeHg contribui à reação auto-imune (HAVARINASAB & HULTMAN, 2005).

Foram observados em vários modelos animais de roedores, que o cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ) pode induzir auto-imunidade (HgIA) em ratos Brown Norway (BN). Os camundongos compartilham muitas similaridades da (HgIA) com os ratos BN, como: produção de auto-anticorpos, particularmente contra a proteína nucleolar fibrilarina (AFA), aumento de imunoglobulinas no soro, incluindo IgE, ativação policlonal de linfócitos B e T e deposição de complexo imune renal com glomerulonefrite (HAVARINASAB et al., 2007, HAVARINASAB & HULTMAN, 2005, ROWLEY & MONESTIER, 2005).

A fibrilarina é uma ribonucleoproteína altamente conservada (34k-Da) que está associada com vários pequenos RNAs nucleolares. O auto-anticorpo formado contra este antígeno, o anti-fibrilarina ou anti-U3-RNP (AFA), geralmente ocorre com padrão nucleolar agrupado. Suas propriedades físico-químicas são modificadas pela ligação ao mercúrio, contudo, na auto-imunidade, os anticorpos induzidos pelo mercúrio reagem muito melhor com a fibrilarina intacta (HANSSON & ABEDI-VALUGERDI, 2003, ROWLEY & MONESTIER, 2005, TORMEY et al., 2001).

Estudos experimentais com metilmercúrio em ratos são menos freqüentes, provavelmente por causa da associação de mercúrio orgânico com imunossupressão (HAVARINASAB et al., 2004). Contudo, depósitos de imuno-complexo (IC) sistêmico em ratos BN geneticamente suscetíveis após exposição ao metilmercúrio foram semelhantes às reações após exposição ao ( $\text{HgCl}_2$ ) (BERNAUDIN et al., 1981).

Foi encontrado também que MeHg (HAGGQVIST et al., 2005, HULTMAN & HANSSON-GEORGIADIS, 1999) e EtHg (HAVARINASAB et al., 2004) induziu AFA em ratos H-2<sup>S</sup>. No entanto o efeito auto-imunógeno destas espécies de Hg orgânicas poderia teoricamente ser devido somente ou em parte ao  $\text{Hg}^{2+}$  produzido pelo metabolismo de ambos MeHg (HAGGQVIST et al., 2005, WHO, 1991) e EtHg (HAVARINASAB et al., 2005) os quais são convertido a  $\text{Hg}^{2+}$  no corpo.

Silva et al., 2004 conduziram um estudo na Amazônia em 3 populações, das quais duas são comunidades ribeirinhas: Jacareacanga onde os indivíduos se alimentam regularmente de peixe contaminado com metilmercúrio, e Tabatinga, escolhida como grupo controle, por ser uma comunidade sem exposição ocupacional ao mercúrio inorgânico, e onde o peixe consumido apresenta baixas concentrações de metilmercúrio. A terceira comunidade é Rio Rato, uma típica comunidade garimpeira em que os indivíduos se contaminam tanto pela ingestão de peixe quanto pela atividade ocupacional (SILVA et al., 2004).

Neste estudo, os indivíduos das comunidades de Jacareacanga e Tabatinga apresentaram concentrações médias de mercúrio em cabelo igual a  $8\mu\text{g/g}$  e  $5\mu\text{g/g}$  respectivamente, e as concentrações de ANA e ANoA encontradas foram mais altas nos indivíduos de Jacareacanga do que de Tabatinga. Entretanto nenhum indivíduo apresentou simultaneamente ANA e ANoA (SILVA et al., 2004).

Com relação ainda aos dados descritos por Silva et al., (2004), na comunidade Rio Rato, o mercúrio analisado na urina mostrou níveis menores do que em outras populações garimpeiras, e as concentrações de ANA e ANoA foram bem mais altas do que as de Jacareacanga e Tabatinga, e diferente destas comunidades, a maioria dos indivíduos de Rio Rato apresentaram os dois tipos de auto-anticorpos, ANA e ANoA (SILVA et al., 2004).

Outro estudo em Rio Rato e Tabatinga, para verificar doença auto-imune corroboram com os resultados de Silva et al., (2004), no qual os indivíduos de Rio Rato apresentaram níveis de ANoA maiores do que os de Tabatinga, cujos níveis foram similares aos observados para outras populações brasileiras e norte-americanas sem doenças auto-imunes. Este estudo mencionou não ter informações disponíveis acerca de possíveis doenças auto-imunes nos sujeitos pesquisados (SILBERGELD et al., 2005, SILVA et al., 2004)

Os autores do estudo acima mencionado, analisaram também os soros destes pacientes para o antifibrilarina, que raramente foi detectado em garimpeiros com altas concentrações de Hg, ANA e ANoA. Entretanto, eles relataram a presença de outros anticorpos, não identificados para proteínas nucleares, evidenciando que a fibrilarina apesar de sensível e relativamente específica, não é o único biomarcador de imunotoxicidade induzida por mercúrio (SILBERGELD et al., 2005).

Alves et al., 2006, também estudou exposição mercurial em populações ribeirinhas, o estudo contou com seis comunidades localizadas ao longo do rio Negro e uma no rio Cuiuni, que se alimentavam diariamente de peixe contaminados com mercúrio (ALVES et al., 2006). O grupo controle deste estudo foi escolhido randomicamente entre doadores de

sangue voluntários de um hemocentro na zona urbana de Manaus-Amazonas. Neste estudo, casos positivos de auto-anticorpo apresentaram diferenças significativas entre ribeirinhos e grupo controle, tendo sido os auto-anticorpos, mais frequentemente observados entre a população ribeirinha, entretanto não houve associação significativa entre mercúrio no cabelo e anticorpo antinuclear.

Rowley & Monestier, 2005 já haviam relatado resultados semelhantes aos de Silbergeld et al., 2005, em modelos experimentais, onde vários outros anticorpos anti-nucleolares são produzidos na auto-imunidade induzida por mercúrio, porém continuam tendo sua identidade desconhecida (ROWLEY & MONESTIER, 2005, SILBERGELD et al., 2005). Outros estudos já descreveram esses mecanismos pouco conhecidos, *in vitro* e *in vivo* mostrando que o mercúrio age direta ou indiretamente sobre linfócitos T e B, macrófagos, polimorfonucleares e mastócitos, como exemplo, existem muitas vias pela qual o mercúrio pode interagir com linfócitos T (KOSUDA et al., 1998).

A primeira delas é independente de antígeno e pode ser semelhante a atividade de mitógenos convencionais, estudos anteriores mostraram que a oxidação ou redução de tiol ou grupos dissulfeto modulam a proliferação de células T. Adicionalmente à sua atividade como mitógeno, o mercúrio pode modificar auto-antígenos ou formar complexos de metal-proteínas levando à resposta imune para epítomos novos ou crípticos (KOSUDA et al., 1998).

O metal pode também se comportar como hapteno e sensibilizar células T quando ligadas a proteínas. Portanto, o mercúrio pode atuar sobre uma variedade de células T e B, células apresentadoras de antígenos e seus produtos (KOSUDA et al., 1998).

Em camundongos a auto-imunidade induzida por mercúrio, parece alvejar seletivamente antígenos nucleolares, mas anticorpos para antígenos de cromatina também foram relatados. Por essa razão, como visto nesse modelo, os auto-anticorpos podem ter sua especificidade modificada e uma amplificação espontaneamente acelerada, quando há administração de mercúrio. Estes estudos sugerem que em humanos a exposição à baixa dose do metal pode desencadear ou agravar doença em indivíduos que são susceptíveis a auto-imunidade sistêmica (KOSUDA et al., 1998).

Outra característica desta auto-imunidade relaciona-se à desregulação de redes de citocinas pelo metal e seu envolvimento no processo de doença auto-imune. Em trabalhos experimentais com camundongos Brown Norway (BN) expostos ao Hg, foi demonstrado que a nefrite induzida pelo Hg estava diretamente relacionada à imunidade tipo Th2, que é caracterizada como células produzindo citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. A elevação

dos níveis de IgE, um isotipo de imunoglobulina largamente regulada pelas citocinas IL-4 e IL-5, no processo de nefrite induzida por Hg pareceu promover um desvio em direção a imunidade Th2 (LAWRENCE & MCCABE, 2002).

Pollard et al., (2005), estudando camundongos susceptíveis encontrou que auto-imunidade induzida por mercúrio é caracterizada por imunoestimulação com fenótipo Th2 dominante, tendo anticorpo antinucleolar (ANoA) alvejando principalmente a proteína nucleolar fibrilarina e depósitos de complexo imune (IC) sistêmico, houve ainda perda de tolerância com síntese de anticorpos para antígenos nucleolares (especificamente anti-fibrilarina), intensa proliferação linfocitária e hipergamaglobulinemia principalmente dos isotipos IgG1 e IgE (HAVARINASAB & HULTMAN, 2006, POLLARD et al., 2005).

O desequilíbrio na imunorregulação Th1 e Th2 é um conceito que foi imediatamente adotado para muitos outros metais. Entretanto, existem evidências que sugerem um cenário mais complicado, em que a citocina tipo 1 interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) também está associada com a nefrite, especialmente nos modelo de ratos com auto-imunidade induzida pelo Hg (LAWRENCE & MCCABE, 2002).

Portanto, as evidências são de que o mercúrio é capaz de induzir alterações no sistema imune em vários modelos animais experimentais e com intrigantes similaridades, entre estes modelos e o resultado da exposição humana a este metal pesado. De modo que, todos os estudos indicam a participação do sistema imune na evolução dos processos neurodegenerativos e revelam a possibilidade de monitorar a partir de auto-anticorpos contra proteínas neurotípicas e gliotípicas detectadas no sangue, os potenciais efeitos neuroimunotóxicos do mercúrio.

Apesar das sérias conseqüências para a saúde humana, atualmente não existem critérios diagnósticos *in vivo* que sejam objetivos, aceitáveis e confiáveis para a toxicidade crônica do mercúrio; a diagnose é baseada predominantemente no histórico do doente e em sintomatologia clínica. A diagnose da exposição crônica ao mercúrio tem sido controvertida devido não só a natureza não específica dos sintomas, mas ao longo período de latência, e particularmente em decorrência da carência de biomarcadores confiáveis *in vitro* (GODFREY et al., 2003).

Neste sentido, torna-se relevante incluir comunidades da Amazônia brasileira com variáveis graus de exposição ao mercúrio para testar seus efeitos neuroimunotóxicos, que possam refletir a susceptibilidade genética dentro dessas populações, verificando se esta contaminação pode estar associada com a indução de auto-imunidade, a partir da detecção de



um significativo aumento na prevalência de níveis elevados de auto-anticorpos.

# **OBJETIVOS**

## 2 OBJETIVO GERAL

Investigar a ocorrência de auto-imunidade induzida por mercúrio entre os habitantes das comunidades ribeirinhas da região do Tapajós, que estão expostas ao metilmercúrio através do consumo do pescado.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar mercúrio total no cabelo dos indivíduos da amostra;
- Determinar a presença de auto-anticorpo antinuclear (ANA) e antinucleolar (ANoA);
- Relacionar a presença destes marcadores com a concentração de mercúrio total, detectada nas amostras biológicas;
- Testar a confiabilidade dos marcadores pela comparação entre os valores destes em populações expostas e não expostas ao mercúrio.

# **MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

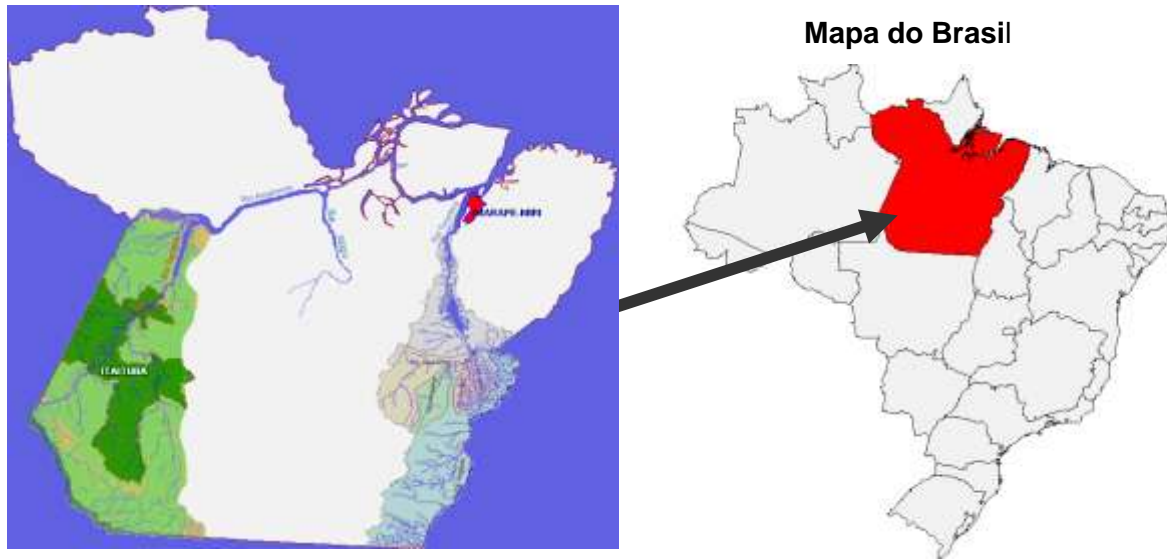
#### 3.1 CASUÍSTICA

A população deste estudo consistiu de 236 pares de amostras de sangue e cabelo de indivíduos residentes em comunidades ribeirinhas do Tapajós, coletadas no período compreendido entre 2004 a 2006, sendo duas localizadas no município de Itaituba (São Luiz do Tapajós e Barreiras), uma no Município de Aveiro (Brasília Legal), todas na região do rio Tapajós e, uma no município de Igarapé-Miri (Vila Cacau-Panacauera), na região do rio Tocantins (Figura 1).

A cidade de Itaituba, sede do município, está distante de Belém cerca de 891 km em linha reta, sendo hoje a quinta sede municipal mais afastada da capital do Estado (PRIMAZ, 1996). A comunidade de Barreiras está localizada à margem esquerda do rio Tapajós, cerca de 80 Km à jusante de Itaituba. A população em jan/2001 era aproximadamente 745 habitantes (PINHEIRO et al., 2001).

O povoado de São Luiz do Tapajós está localizado à margem direita do Rio Tapajós, à montante de Itaituba. Possui uma população observada, em jan/2001, de 490 habitantes (PINHEIRO et al., 2003). A comunidade de Brasília Legal situa-se às margens do rio Tapajós, no Oeste Estado do Pará, se encontra, aproximadamente, a 4 horas de barco de Aveiro, o Município ao qual se integra e a 12 horas de Santarém, a maior cidade das proximidades (DEMEDA et al., 2006).

O grupo controle consistiu de indivíduos residentes em uma comunidade ribeirinha do município de Igarapé-Miri (Vila Cacau-Panacauera), na região do rio Tocantins, esta vila possui cerca de 280 habitantes. O município de Igarapé-Miri localiza-se na micro-região de Cametá, a oeste do Rio Tocantins. A sede do Município posiciona-se às margens do Rio Igarapé-Miri, distanciando-se em linha reta 78 Km da capital do Estado do Pará.



**FIGURA 1** - Mapa do estado do Pará, destacando as cidades de Itaituba e Igarapé-Miri  
(Fonte: Carlos Costa, 2005).

Cada indivíduo foi examinado clinicamente por um médico inclusive com exame neurológico. Uma completa história ocupacional foi anotada e incluiu a ocorrência de sintomas precedentes há seis meses e que estavam relacionados à exposição ao mercúrio, bem como observações sobre a incidência de infecções e ingestão de álcool e drogas.

O estudo é do tipo corte seccional, conduzido através de cada comunidade, onde as pessoas foram contatadas pelas lideranças locais, e convidadas a participar do estudo. Um questionário epidemiológico foi respondido pelo sujeito da pesquisa, com questões dirigidas a informações demográficas (idade, gênero e escolaridade), etnia, dieta, ocupação (prévia e atual), local de nascimento, condição socioeconômica de saneamento, tempo de residência, uso de álcool e drogas e avaliação clínica e de saúde.

### 3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram selecionados para a pesquisa todos os indivíduos com tempo de residência na comunidade maior que 1 ano e consumo regular de pescado (iguais ou maiores que 6 refeições semanais) e, que consentiram participar do estudo. Foram excluídos, doentes mentais, indivíduos em trânsito na comunidade e pessoas que não concordaram em ser investigadas.

### 3.3 COLHEITA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

O sangue foi colhido em jejum, através de venipunção de 5mL por paciente e acondicionado em tubos sem anticoagulante. A seguir, sedimentou-se por aproximadamente 3 horas sendo centrifugado a 3000rpm durante 5 minutos para separação do soro, que foi armazenado em alíquotas e estocado em freezer  $-8^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise.

Foi colhido aproximadamente 0,1 a 1g de cabelo retirado de 3 áreas diferentes do couro cabeludo, cortados com tesoura de aço inoxidável, cerca de 1 cm de distância de sua inserção, de cada voluntário participante do estudo. Cada uma das amostras coletadas foi armazenada em envelope de papel devidamente identificado, e, analisadas no Laboratório de Ecotoxicologia do Núcleo de Medicina Tropical-UFPA.

### 3.3.1 Análise ética

O protocolo deste estudo foi avaliado de acordo com as normas da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Núcleo de Medicina Tropical (Anexo).

## 3.4 DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS LABORATORIAIS

### 3.4.1 Determinação das concentrações de Hg total em amostras de cabelo

Para determinação de mercúrio total, as amostras de cabelo foram lavadas com detergente neutro, e enxaguadas intensamente com água deionizada para retirada do detergente. Por fim, foram lavadas duas vezes com 3 mL de acetona e secos à temperatura ambiente. A seguir, transferidos para frascos de vidro previamente lavados com solução de permanganato de potássio a 5% e picotados intensamente (cortes menores que 2 mm) com auxílio de uma tesoura de aço inoxidável.

Para análise das concentrações de Hg total foi utilizado o método da combustão, seguida da amalgamação em lâminas de ouro usando um espectrofotômetro de absorção atômica sem chamas SP3D da Nippon Corporation-Japão. Neste método, as amostras de cabelo são mineralizadas a 800°C em forno fechado, e o vapor de mercúrio liberado é amalgamado em lâminas de ouro, lavado e posteriormente transferido para um detector com comprimento de onda fixo em 254,7 nm. A precisão e acurácia serão medidas através de padrão certificado de cálculo, IAE 085.

### 3.4.2 Determinação qualitativa e/ou semi-quantitativa de anticorpos anti-nucleares em soro humano

O procedimento foi realizado em duas etapas básicas:

**Etapa 1:** O soro humano reage com o substrato antigênico. Se houver presença de anticorpos, eles se ligarão ao antígeno formando um complexo antígeno-anticorpo estável. Se não houver anticorpos presentes, o complexo não será formado e o soro e os componentes serão eliminados por lavagem.



**Etapa 2:** Anticorpos anti-humano, marcados com fluoresceína são adicionados no local da reação e irão se ligar aos complexos formados na etapa 1. O resultado é uma reação positiva de fluorescência verde-maça brilhante quando observada em um microscópio de fluorescência. Se o complexo não tiver sido formado na etapa 1, o anticorpo marcado com fluoresceína será eliminado por lavagem, exibindo um resultado negativo.

O kit utilizado para detecção destes auto-anticorpos foi o ANA HEp-2 Test System (Anticorpo anti-Nuclear). O substrato antigênico deste kit provém de uma linhagem de células epiteliais humanas (HEp-2) estabelecidas por (MOORE et al., 1955).

O kit ANA HEp-2 Test System foi armazenado em geladeira a 8°C, e para sua utilização permaneceu por cinco minutos à temperatura ambiente. Para cada amostra de soro, preparou-se uma diluição 1:40, adicionando 0,01 ml (10 µl) do soro do paciente mais 0,39 ml (390µl) de PBS. Em seguida com uma pipeta Pasteur aplicou-se 1 gota de cada controle e 1 gota de cada soro diluído. Durante a aplicação, não tocar a superfície contendo o antígeno com pipeta e não deixar que as gotas se misturem para evitar reação cruzada.

Incubou-se por 30 minutos em câmara úmida, tomando cuidado para não deixar a cavidade secar. Passado esse período de tempo, as lâminas foram removidas da câmara úmida (uma de cada vez) e rinsadas cuidadosamente, utilizando um pissete com PBS, sem dirigir o jato de PBS diretamente sobre as cavidades. Para tanto primeiro a lâmina foi inclinada na direção das cavidades 1-6 para receber o jato de PBS que escorreu para fora pela borda de cima da lâmina e só então a lâmina foi inclinada na direção às cavidades 7-12 para repetição do procedimento.

Após a risagem, as lâminas foram lavadas, em jarras de Coplin ou placas, por 2 vezes com PBS de 5-6 minutos agitando cuidadosamente na colocação e antes da retirada das mesmas. Ao final da lavagem as lâminas foram retiradas do PBS (uma de cada vez), e secas com papel de filtro pelo lado de fora das bordas, quando necessário, em seguida foram devolvidas para câmara úmida. Aplicou-se uma gota do conjugado (30-50ml) em cada cavidade, tendo cuidado de cobri-la completamente. Incubou-se por 30 minutos fora do alcance da luz.

Terminada a incubação, repetiram-se mais 1 vez as etapas de rinsagem e lavagem no PBS como feito anteriormente. Então se procedeu a etapa de colocação das lamínulas, para isto adicionou-se 2 gotas do meio de montagem sobre a lâmina. Em seguida inclinou-se a lâmina apoiando a borda da lamínula sobre a parte inferior da mesma, permitindo que o meio de montagem formasse uma gota entre a lamínula e a lâmina.

Cuidadosamente empurrou-se a lamínula da parte inferior para a parte superior da lâmina, não deixando formarem bolhas. Secou-se o excesso do meio de montagem pressionando a parte superior da lâmina contra papel absorvente. Limpou-se a parte de trás da lâmina. A leitura foi feita o mais breve possível (recomenda-se que no mesmo dia) em um microscópio de fluorescência Zeiss, equipado com luz de mercúrio ou de halogênio-tungstênio, com filtro de 390-490 nm e barreira de filtro de 515-520 e objetiva de 400x. O comprimento de onda de excitação do FITC é 490 nm e a emissão em 520 nm.

Em caso de contratempo, as lâminas poderiam ser estocadas na geladeira (2-8°C) protegidas da luz direta e lidas no dia seguinte. O meio de montagem não deveria secar entre a lâmina e a lamínula. Se isso ocorresse, deveria ser adicionado mais meio de montagem ou recolocar uma nova lamínula.

### **3.4.3 Interpretação dos resultados**

A presença e o padrão de imunofluorescência foram observados usando um microscópio de fluorescência (Zeiss), sendo consideradas positivas seguindo o critério descrito pelo II Consenso Brasileiro de Fator Antinuclear em Células HEp-2 - Definições para a padronização da pesquisa de auto-anticorpos contra constituintes do núcleo (FAN HEp-2), nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico e suas associações clínicas (DELLAVANCE et al., 2003, DELLAVANCE et al., 2002).

A análise da reação de imunofluorescência, estima a presença de auto-anticorpo, e foi classificada segundo o grau de intensidade em: fraco (+1), moderado (+2), ou forte (+3). Quando a fluorescência detectada era muito fraca ou ausente, o resultado foi registrado como 0 (zero).

### **3.4.4 Análise estatística**

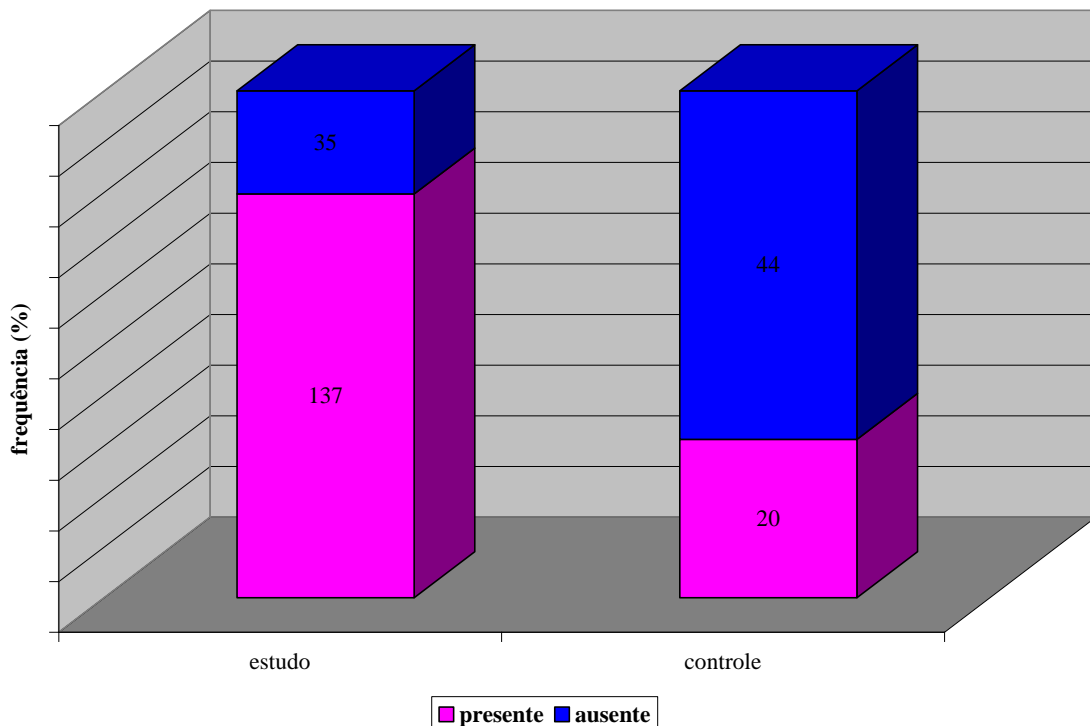
Para comparação das variáveis categóricas serão aplicados testes não-paramétricos, como o qui-quadrado ( $\chi^2$ ) binomial para duas proporções, e das variáveis contínuas o teste *t* de *Student*. Para avaliar os efeitos do mercúrio sobre a prevalência de ANA e ANoA foi aplicado teste de regressão logística. Todos os dados foram analisados usando o Bioestat 4.0 (AYRES et al., 2005).

# **RESULTADOS**

## 4 RESULTADOS

### 4.1 DISTRIBUIÇÕES DE AUTO-ANTICORPOS E NÍVEIS DE CONCENTRAÇÕES DE MERCÚRIO ENTRE AS COMUNIDADES RIBEIRINHAS DO TAPAJÓS E PANACAUERA (TOCANTINS).

Nas 236 amostras estudadas, 157 apresentaram auto-anticorpo positivo, sendo que destes 31,25% (20/64) eram do grupo controle e 79,65% (137/172) do grupo estudo (figura 2) Esta distribuição de auto-anticorpos (positivo e negativo) envolvendo todos os grupos de estudo no geral e o controle mostrou associação estatística significativa ( $\chi^2 = 46,9$ ; gl = 1;  $p < 0,0001$ ), entre a presença de auto-anticorpos e os indivíduos expostos ao mercúrio, nas comunidades de Brasília Legal, Barreiras e São Luis do Tapajós, localizadas na região do Tapajós.



**FIGURA 2** - Distribuição de auto-anticorpos em comunidades ribeirinhas da Amazônia, 2004-2006.

Os níveis de concentrações de mercúrio variaram de 0,02-60,3  $\mu\text{g/g}$  nos indivíduos dos grupos de estudo (Brasília Legal, Barreiras e São Luiz do Tapajós) e de 0,9-8,4  $\mu\text{g/g}$  nos do grupo controle (Panacauera). Quando estes dados, dos níveis de exposição ao mercúrio, nas comunidades ribeirinhas dos grupos de estudo e controle, foram comparados

observaram-se diferenças significativas entre as concentrações médias de mercúrio ( $p < 0,05$ ), entre duas comunidades da região do Tapajós (Barreiras e São Luiz do Tapajós) bem como, entre as comunidades do Tapajós e Panacauera, conforme tabela 1.

Entre as diversas comunidades investigadas, apenas os indivíduos dos grupos de estudo (tabela 1), apresentaram níveis de mercúrio acima de  $10 \mu\text{g/g}$ , com uma frequência elevada de 54,07% (93/172) para a região do Tapajós.

**TABELA 1** - Níveis de exposição mercurial em comunidades ribeirinhas da Amazônia, 2004-2006.

COMUNIDADE	GM $\pm$ EP	Hg total ( $\geq 10 \mu\text{g/g}$ ) *
Brasília Legal (Tapajós)	10,00 $\pm$ 0,99	56/95 (58,9)
Barreiras (Tapajós)	8,64 $\pm$ 1,13	18/47 (38,3)
SL do Tapajós (Tapajós)	11,24 $\pm$ 2,23	19/30 (63,3)
Panacauera (Tocantins)	2,98 $\pm$ 0,20	0/64 (0,0)

**Fonte:** Laboratório de Ecotoxicologia do NMT/UFPA

BL x Barreiras  $\rightarrow$  teste  $t = 2,17$ ;  $p < 0,1391$ ; BL x SLT  $\rightarrow$  teste  $t = 1,1673$ ;  $p < 0,2818$ ;

BL x Panacauera  $\rightarrow$  teste  $t_{(\text{Tukey})} = 11,65$ ;  $p < 0,01$ ; Barreiras x SLT  $\rightarrow$  teste  $t_{(\text{Tukey})} = 2,9412$ ;  $p < 0,05$ ;

Barreiras x Panacauera  $\rightarrow$   $t_{(\text{Tukey})} = 10,89$ ;  $p < 0,01$ ; SLT x Panacauera  $\rightarrow$   $t_{(\text{Tukey})} = 11,34$ ;  $p < 0,01$

#### 4.2 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E DO ESTADO DE SAÚDE DAS COMUNIDADES RIBEIRINHAS DO TAPAJÓS E PANACAUERA (TOCANTINS).

Na distribuição dos dados epidemiológicos das comunidades estudadas (tabela 2), constatou-se que a idade dos pacientes incluídos neste estudo variou de 7 a 89 anos com uma média de 37 anos ( $\pm 17,04$ ), posto que pelo teste t-, ANOVA-um critério, a média das idades não diferiu significativamente entre as diversas comunidades investigadas (grupos de estudo e do controle). E quanto às distribuições de idade e níveis de mercúrio total no cabelo nestas comunidades (figura 3) foram analisadas, através da correlação linear de Pearson, e não foi observada nenhuma correlação entre estas variáveis nas diversas populações de estudo e controle ( $p > 0,05$ ).

**TABELA 2** – Características demográficas de indivíduos expostos e não expostos ao MeHg em comunidade ribeirinhas da Amazônia, 2004-2006.

Características	Populações do Tapajós			População do Tocantins
	B. Legal (n= 95)	Barreiras (n= 47)	SL Tapajós (n= 30)	Panacauera (n= 64)
<b>Idade (média)</b>	37,14 $\pm$ 14,71	38,47 $\pm$ 20,05	34,83 $\pm$ 19,00	35,03 $\pm$ 17,12
<b>Gênero (%)</b>				
Masculino	42 (44,21%)	9 (19,15%)	3 (10%)	16 (25%)
Feminino	53 (55,79%)	38 (80,85%)	27 (90%)	48 (75%)

Na comparação entre a frequência dos gêneros (tabela 2) nas comunidades estudadas (dos grupos de estudo e do controle) foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Pode-se atribuir estas diferenças a maior proporção de mulheres nas amostras de Barreiras, de São Luis do Tapajós e Panacauera do que na amostragem de Brasília Legal. Contudo, no que se refere a esta variável e os níveis de mercúrio (figura 3), não houve associação ( $p > 0,05$ ) entre gênero e níveis de mercúrio no grupo controle e nas comunidades de estudo, Barreiras e São Luiz do Tapajós, a exceção de Brasília Legal onde pelos resultados verifica-se diferença estatística significativa (teste coeficiente *phi* de correlação  $\rightarrow r\phi = 0,31$ ;  $\chi^2_{\text{ajustado}} = 8,02$ ;  $gl = 1$ ;  $p < 0,0046$ ) entre os gêneros e níveis de mercúrio, indicando que indivíduos do gênero masculino estão relacionados com a presença de níveis mais elevados de HgT no cabelo.

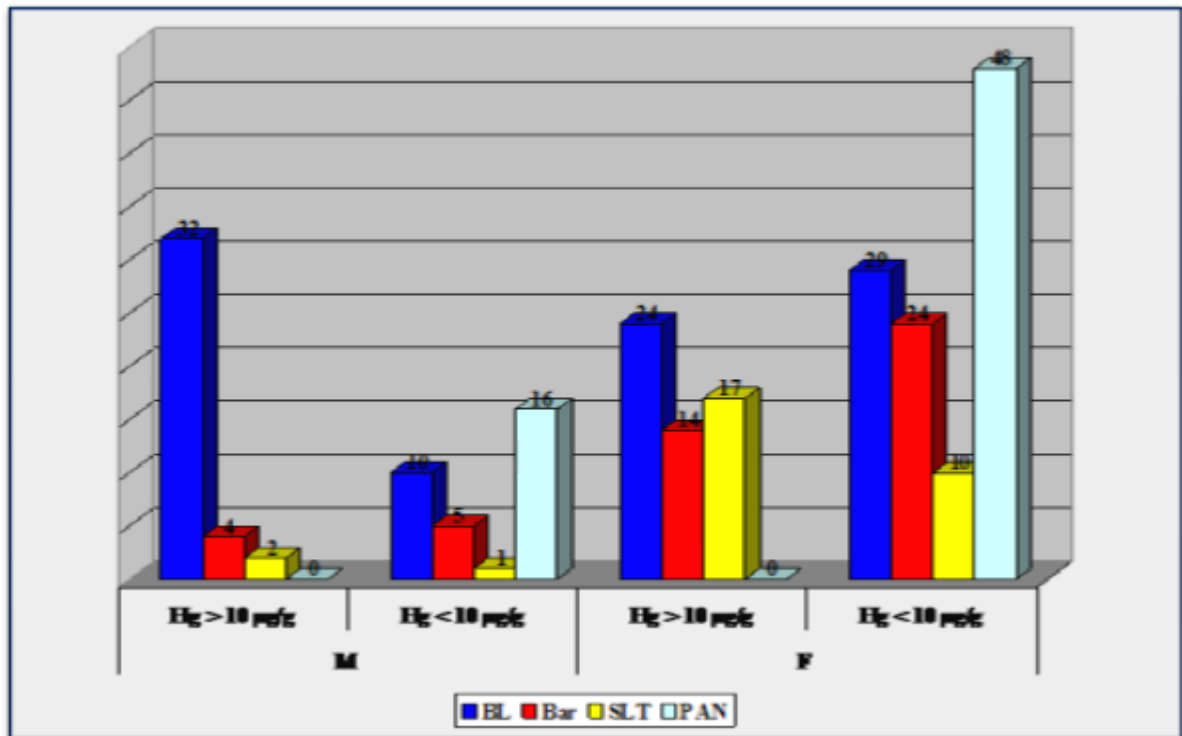


FIGURA 3 - Distribuição de mercúrio por gênero em comunidades ribeirinhas da Amazônia, 2004-2006.

#### 4.3 OS TIPOS DE PADRÕES DE AUTO-ANTICORPOS E INTENSIDADE DAS REAÇÕES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA EM COMUNIDADES RIBEIRINHAS DO TAPAJÓS E PANACAUERA (TOCANTINS).

Os padrões de auto-anticorpos identificados nas reações de imunofluorescência foram a maioria do tipo misto 50,96% (80/157), seguido por nuclear 31,21% (49/157), nucleolar 14,65% (23/157) e aparelho mitótico/citoplasmático 3,18% (4/157).

O teste G de homogeneidade (tabela 3) entre as amostras demonstrou significância estatística quanto à distribuição de padrões de auto-anticorpo, ou seja, as comunidades ribeirinhas do Tapajós são homogêneas entre si, pois não apresentaram diferenças significativas nas frequências em cada padrão de auto-anticorpos, que ocorriam na mesma direção.

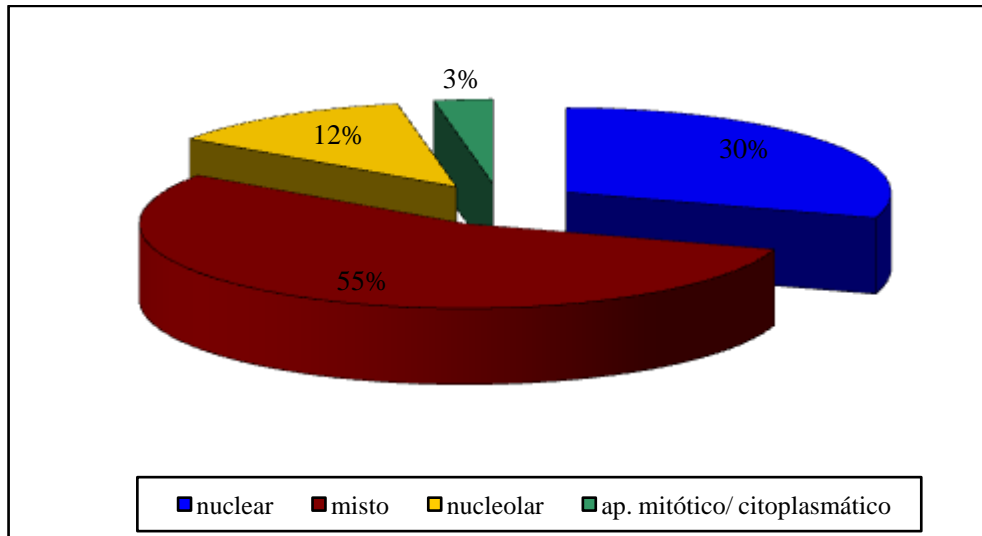
E assim, pôde-se efetuar a comparação entre as frequências dos padrões de auto-anticorpos dos grupos de estudo (79,65%) com as do grupo controle (31,25%), observando-se através do teste diferenças significativas, nos tipos misto ( $p < 0,0001$ ) e nuclear ( $p < 0,0281$ ) (figuras 4 e 5), indicando que a prevalência destes padrões de auto-anticorpos foi maior nas comunidades expostas do que no grupo controle ( $p < 0,01$ ).



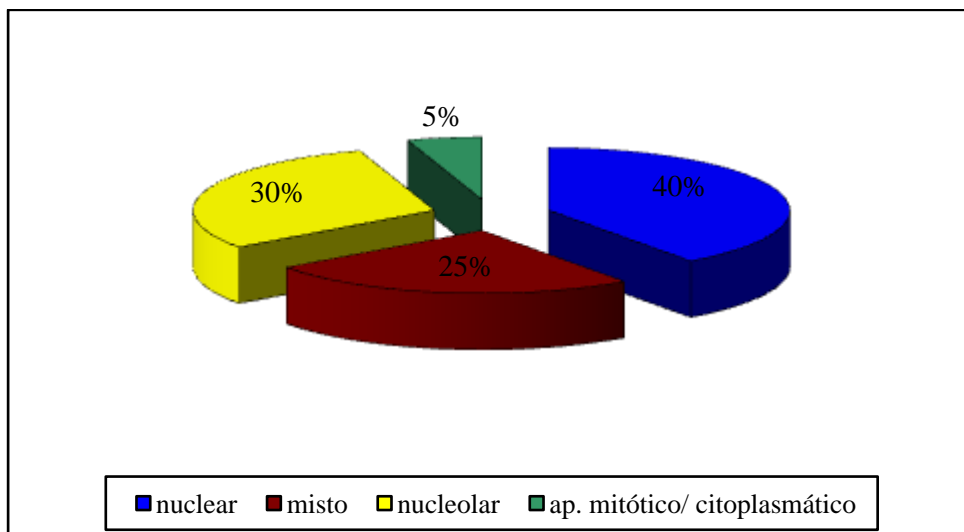
**TABELA 3** – Distribuição de auto-anticorpos em comunidades ribeirinhas da Amazônia, 2004-2006.

COMUNIDADES	PADRÕES DE AUTO-ANTICORPOS					TOTAL
	positivo				negativo	
	misto	nuclear*	nucleolar**	ap. mitótico / citoplasmático***		
Brasília Legal	42	25	13	1	14	95
Barreiras	19	10	2	1	15	47
SL Tapajós	14	6	2	2	06	30
Panacauera	5	8	6	1	44	64
<b>Total</b>	<b>80</b>	<b>49</b>	<b>23</b>	<b>5</b>	<b>79</b>	<b>236</b>

$G_{(\text{homogeneidade})} = 53,7190$ ;  $gl = 3$ ;  $p = < 0,0001$ ;  $G_{(\text{heterogeneidade})} = 12,8438$ ;  $gl = 3$ ;  $p = < 0,1698$ ;

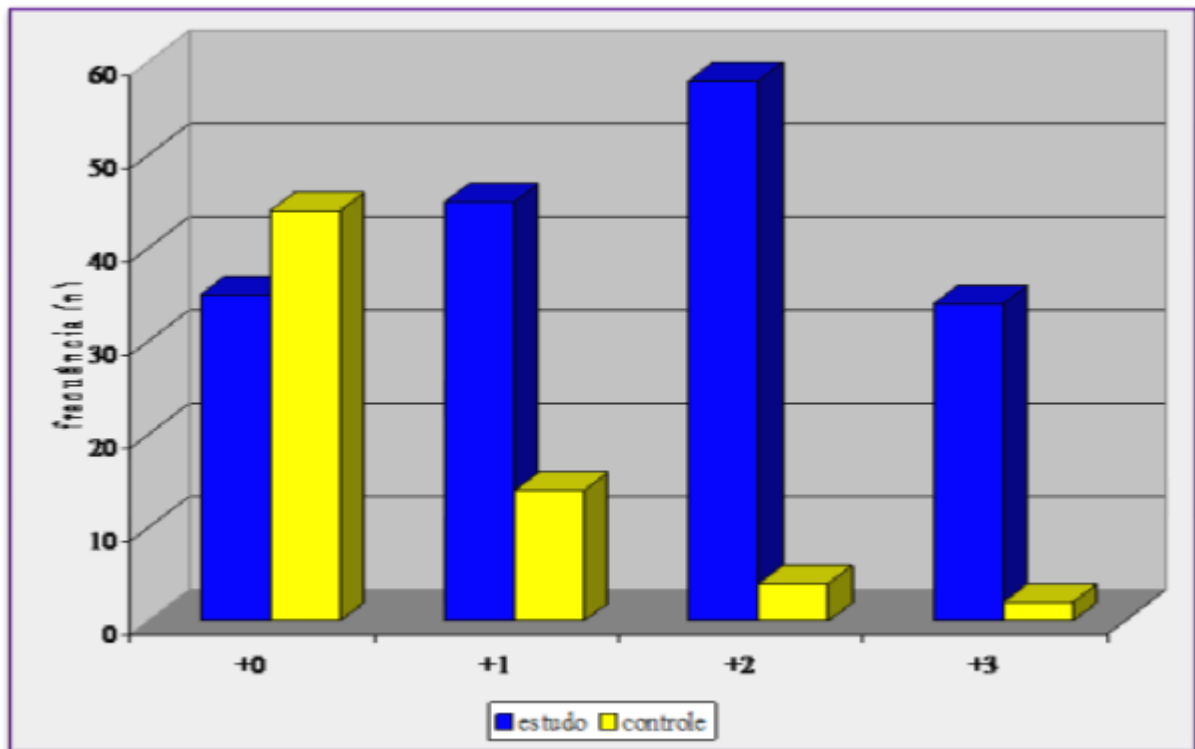


**FIGURA 4** – Distribuição de padrão de auto-anticorpo entre indivíduos expostos ao HgTotal em comunidade ribeirinhas da Amazônia, 2004-2006.



**FIGURA 5** - Distribuição de padrão de auto-anticorpo entre indivíduos não-expostos ao HgTotal em comunidade ribeirinhas da Amazônia, 2004-2006.

O grau de intensidade das reações de imunofluorescência foi avaliado pelo teste Kolmogorov-Sminorv o qual revelou haver diferença altamente significativa entre as duas amostras (grupos de estudo e controle), sendo a intensidade das reações de imunofluorescência maior nas amostras de indivíduos expostos (Brasília Legal, Barreiras e São Luís do Tapajós) que nos não-expostos ao mercúrio total (Paranacauera) isto é, o elevado grau de reatividade dos auto-anticorpos está relacionado com as comunidades ribeirinhas do Tapajós (figura 6).



**FIGURA 6** - Distribuição do grau de reação de imunofluorescência de auto-anticorpos entre indivíduos expostos e não expostos ao MeHg em comunidade ribeirinhas da Amazônia,  $\chi^2=43,71$ ;  $gl=2$ ;  $p < 0,0001$ , 2004-2006.

Por outro lado, vários fatores preditivos foram analisados por regressão logística múltipla com a finalidade de determinar a relação com o aparecimento de auto-anticorpos. Estes fatores incluíram os níveis de concentração de mercúrio total dosados no cabelo, o gênero e a faixa etária. A presença de níveis de mercúrio total no cabelo acima de  $10\mu\text{g/g}$  e a idade foram identificadas como fatores independentes com significância estatística na indução de auto-anticorpos, mas a variável gênero não demonstrou contribuições significativas como fatores de risco no desenvolvimento da auto-imunidade. Deste modo, a probabilidade de apresentar auto-anticorpo é aproximadamente duas vezes maior se o indivíduo está exposto ao metilmercúrio e na faixa etária acima de 50 anos.

#### 4.4 OS TIPOS DE PADRÕES DE AUTO-ANTICORPOS E CATEGORIAS EM COMUNIDADES RIBEIRINHAS DO TAPAJÓS E PANACAUERA (TOCANTINS).

Na tabela 4 está representada a distribuição dos padrões de auto-anticorpos por categorias, as quais são laudos obrigatórios no diagnóstico. A observação dos padrões de auto-anticorpo da amostra estudada mostrou que no padrão nuclear a categoria mais prevalente foi o pontilhado, estando presente em 22,29% (35/157) dos indivíduos dos grupos de estudo e em 5,10% (8/157) daqueles do grupo controle. Paralelamente, 7,64% (12/157) dos indivíduos do grupo estudo e 3,82% (6/157) do controle apresentaram homogêneo, como sendo a categoria mais prevalente no padrão nucleolar.

No padrão misto (tabela 4) a categoria nuclear pontilhado fino/aparelho mitótico foi a mais prevalente para os grupos de estudo, representando 11,46% (18/157) da amostra estudada, enquanto que no grupo controle a categoria nuclear pontilhado fino/citoplasmático polar foi a mais presente, ocorrendo em 2,55% (4/157) dos indivíduos. Contudo, ainda neste padrão, à exceção da categoria nuclear/nucleolar pontilhado, anticorpos antinucleares combinados a outros padrões exibiram elevada representatividade neste grupo, enquanto que os outros tipos de categorias em frequência muito baixa, fora incluídos no grupo, outras especificidades, na qual anticorpos do padrão nuclear mostravam-se associados a outros padrões em 93,94% (31/33) dos casos.

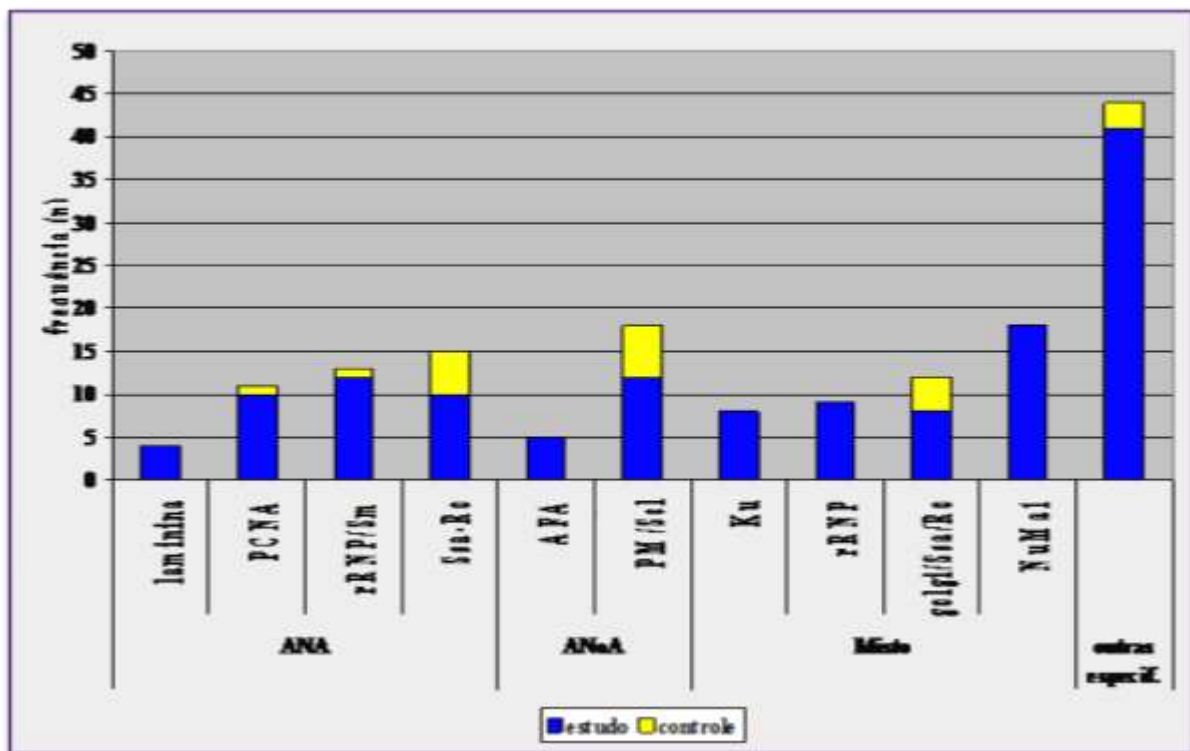
Ao contrário, os padrões dos tipos citoplasmático e aparelho mitótico não foram representativos nos grupos estudo e controle.

**TABELA 4** – Distribuição de padrões de auto-anticorpo entre indivíduos expostos (n=172) e não expostos (n=64) ao MeHg em comunidade ribeirinhas da Amazônia, 2004-2006.

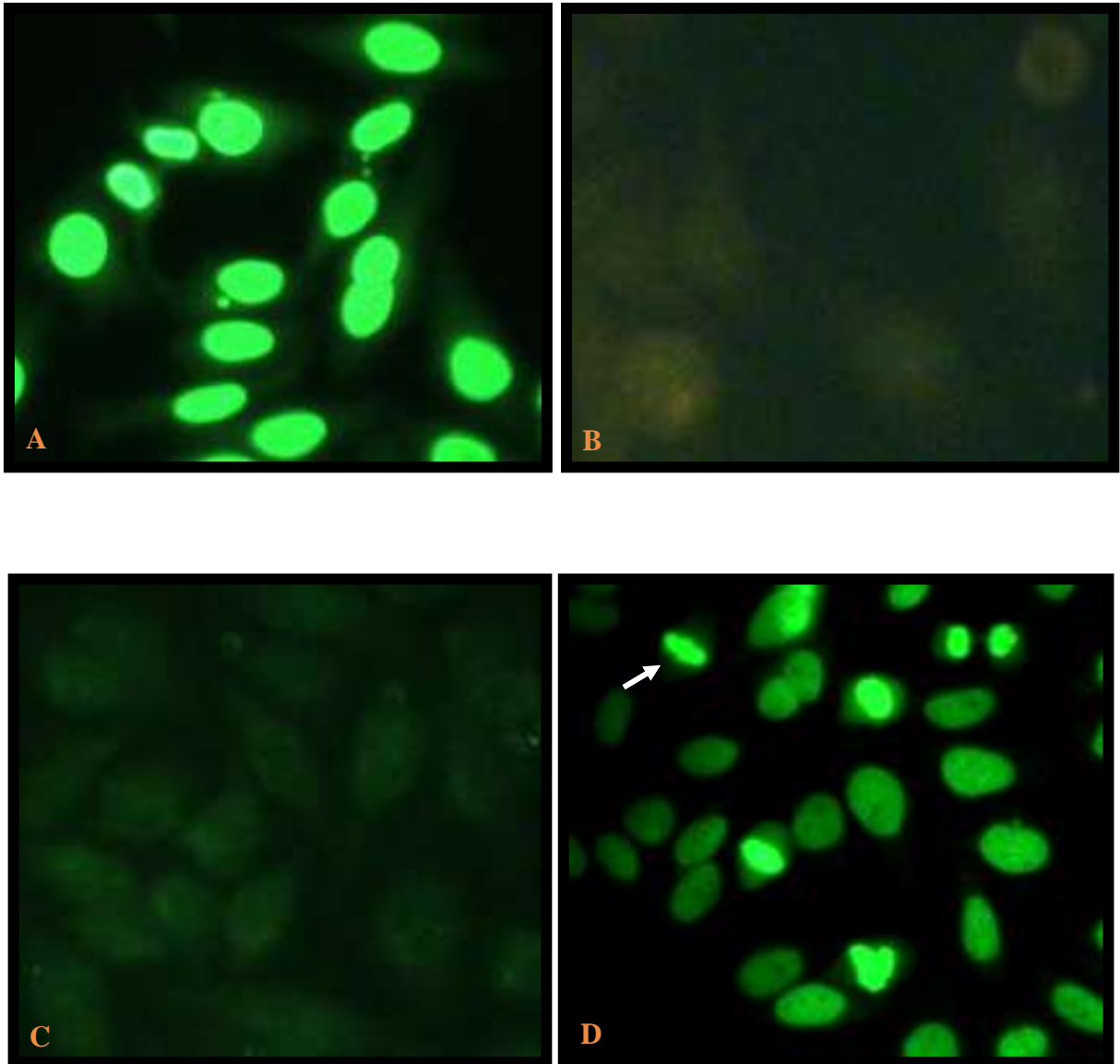
<b>PADRÕES</b>	<b>Estudo n (%)</b>	<b>Controle n(%)</b>	<b>TOTAL</b>
<b>Nuclear</b>			
homogêneo	2 (1,27)	0	2
pontilhado	35 (22,29)	8 (5,10)	43
membrana nuclear	4 (2,55)	0	4
<b>Nucleolar</b>			
homogêneo	12 (7,64)	6 (3,82)	18
aglomerado	5 (3,18)	0	5
<b>Misto</b>			
nucleolar homogêneo + nuclear pontilhado grosso	7 (4,46)	0	7
nuclear + nucleolar pontilhado	0 (0)	1 (0,64)	1
nucleolar homogêneo + citoplasmático fino denso	9 (5,73)	0	9
nuclear pontilhado fino + citoplasmático polar	8 (5,10)	4 (2,55)	12
nuclear pontilhado fino + aparelho mitótico	18 (11,46)	0	18
outras especificidades	33 (21,02)	0	33
<b>Citoplasmáticos</b>			
fibrilar	1 (0,64)	1 (0,64)	2
pontilhado	2 (1,27)	0	2
<b>Aparelho Mitótico</b>			
centríolo	1 (0,64)	0	1
<b>TOTAL</b>	<b>137</b>	<b>20</b>	<b>157</b>

#### 4.5 IDENTIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS HEP-2 RECONHECIDOS POR AUTO-ANTICORPO DE SORO HUMANO EM COMUNIDADES RIBEIRINHAS DO TAPAJÓS E PANACAUERA (TOCANTINS).

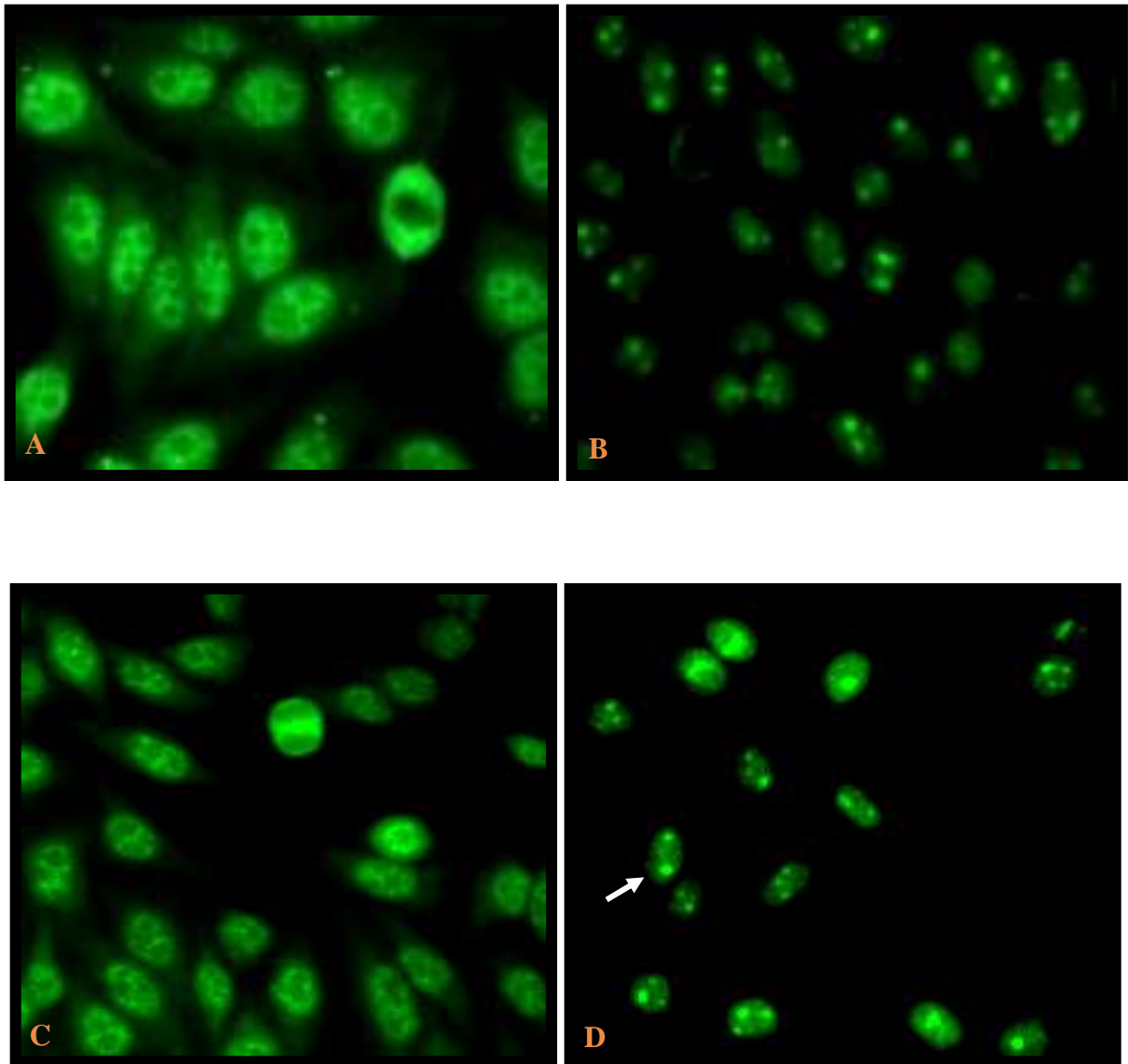
A reação de imunofluorescência indireta em células Hep-2, conforme o local de ligação do auto-anticorpo presente no soro expressou vários padrões, os quais conforme os esquemas de classificação dos padrões do II Consenso Brasileiro de Fan Hep-2 têm correspondência com um antígeno específico. A prevalência destes auto-anticorpos presentes nos soros dos indivíduos dos grupos de estudo e controle, estão representados na figura 7, enquanto que diferentes padrões de imunofluorescência visualizados no soro destes grupos são representados nas figuras 9, 10 e 11.



**FIGURA 7** - Distribuição de padrões de auto-anticorpos entre indivíduos expostos e não expostos ao MeHg em comunidade ribeirinhas da Amazônia, 2004-2006.



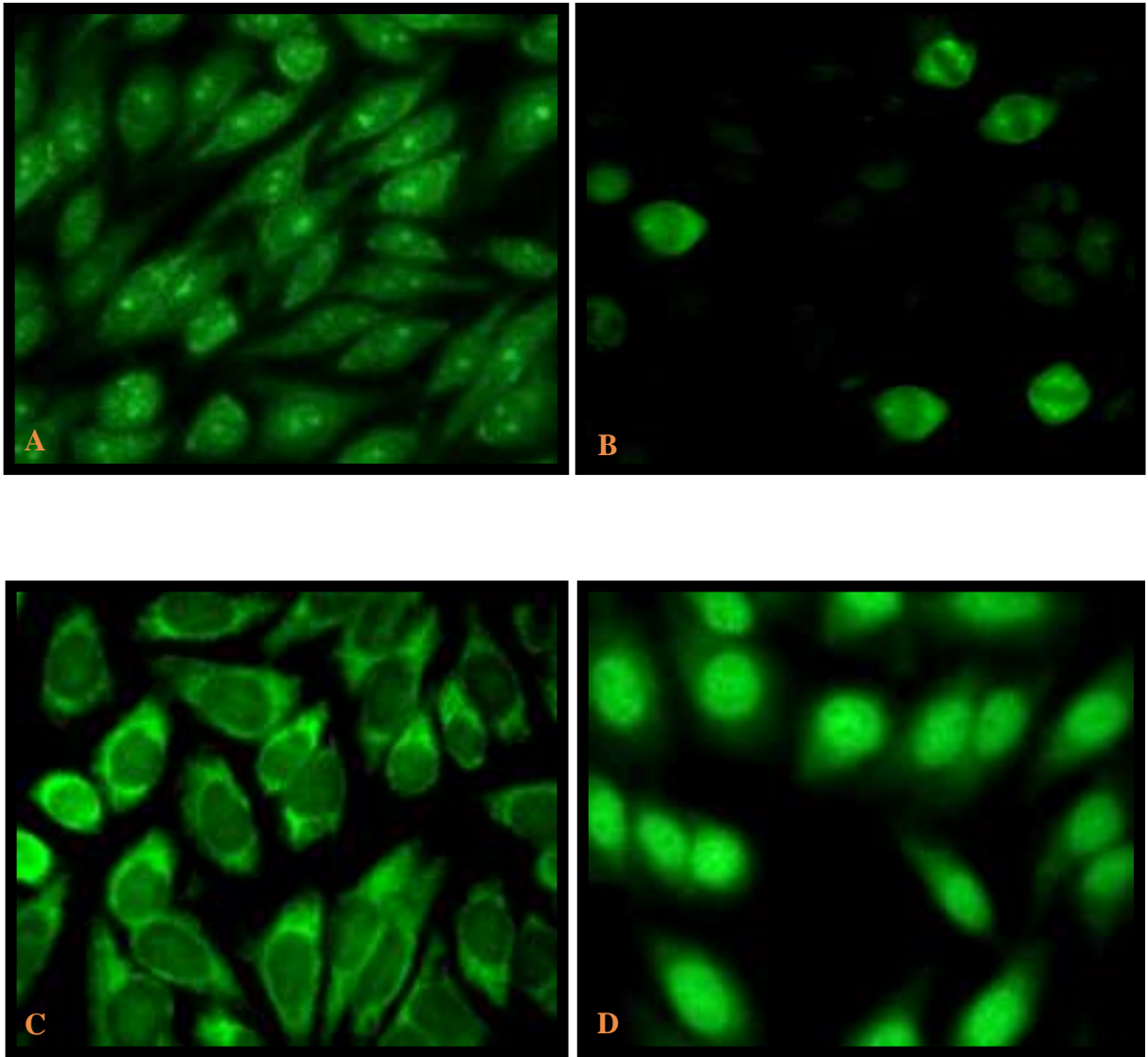
**FIGURA 8** – Padrão de coloração de anticorpo (diluição do soro igual 1:40). Magnificação de 400 vezes. A) controle positivo; B) controle negativo; C) ausência de reatividade (padrao negativo); D) nuclear pontilhado fino denso - corresponde aos anticorpos antiproteína p75 (co-fator de transcrição), a seta aponta a placa cromossômica metafásica corada.



**FIGURA 9** - Padrão de anticorpo (diluição do soro igual 1:40). Magnificação de 400 vezes.

A) nuclear pontilhado fino - corresponde aos anticorpos anti-Ro/SSA e anti-La/SSB; B) nucleolar homogêneo - corresponde aos anticorpos antiPM Scl. C) nuclear pontilhado grosso - corresponde aos anticorpos anti-RNP/Sm; D) nucleolar aglomerado - corresponde aos anticorpos anti-fibrilarina. A seta aponta o nucléolo intensamente corado.





**FIGURA 10** - Padrão de anticorpo (diluição do soro igual 1:40). Magnificação de 400 vezes.

A) misto (citoplasmático fino denso + nucleolar homogêneo) - corresponde aos anticorpos anti-rRNP; B) aparelho mitótico - corresponde aos anticorpos anticentromerina ou NuMa1; C) citoplasmático pontilhado fino denso- corresponde aos anticorpos anti-PL7/PL12; D) nuclear pontilhado fino- corresponde aos anticorpos anti-Ro/SSA.

## 5 DISCUSSÃO

O sistema imunológico, tanto de humanos quanto de animais, é alvo dos efeitos tóxicos produzidos por compostos mercuriais orgânicos e inorgânicos, com efeitos sobre a produção e função de citocinas relacionadas à auto-imunidade e supressão imune (BAGENSTOSE et al., 1999, EL-FAWAL et al., 1999, HULTMAN & HANSSON-GEORGIADIS, 1999, POLLARD et al., 2005, SOLEO et al., 1997).

Nas populações investigadas na região do rio Tapajós, o peixe é uma das fontes mais importantes de MeHg na dieta, constituindo-se em perigo para a saúde dependendo da quantidade e da espécie consumida (SHISHIDO & SUZUKI, 1974), desta forma representam o fator responsável por elevadas concentrações de mercúrio em amostras oriundas de fontes biológicas (HARADA, 1995, HARADA et al., 2001, WHO, 1990).

Metilmercúrio também é excretado no cabelo humano, o qual é usado como indicador biológico para a exposição ao MeHg presente na dieta (BERLIN, 2007, GRANDJEAN et al., 1993, MURATA et al., 1999, WHO, 1990), sendo que o limite de tolerância biológica ao Hg da dieta humana foi estabelecido em 10µg/g de cabelo (WHO, 1990).

No presente estudo, indivíduos das comunidades ribeirinhas do Tapajós (Barreiras, Brasília Legal e São Luiz do Tapajós) apresentaram concentrações médias de Hgtotal em amostras de cabelo maiores do que os indivíduos da comunidade de Panacauera na região do Tocantins. No caso dos indivíduos do grupo estudo aproximadamente 54% apresentavam níveis acima de 10 µg/g. Enquanto no grupo controle (Panacauera), os níveis de exposição ao Hg foram de aproximadamente 0%, pois os teores encontrados foram inferiores a 10 µg/g.

Vários estudos têm demonstrado níveis relativamente altos de exposição humana ao Hg em populações ribeirinhas da Amazônia com alto consumo de peixe na dieta (AKAGI et al., 1994, 1995, BARBOSA et al., 1998, HARADA et al., 2001, LEBEL et al., 1997, MALM et al., 1995, PINHEIRO et al., 2000, PINHEIRO et al., 2003, SANTOS et al., 2000).

Enquanto na região do rio Tocantins, distante da influência de atividade garimpeira de ouro, a exposição humana ao mercúrio nas amostras quantificadas de cabelo de adultos e crianças vem apresentando baixas concentrações de Hgtotal apesar da alta ingestão de peixes (PINHEIRO et al., 2003, PINHEIRO et al., 2006). Estes achados concordam com os

resultados dos níveis de HgTotal detectados no presente estudo, realizados também na comunidade de Panacauera, Tocantins.

Estes resultados revelam que embora a frequência de consumo de peixe tenha sido similar entre as comunidades estudadas, as comunidades do Tapajós estão ingerindo pescado com maiores concentrações de Hg do que as do Tocantins, o que aponta a dieta, como uma importante via de exposição ao MeHg, assim como nos acidentes envolvendo Minamata (HARADA, 1995), Iraque, Guatemala, Gana e Paquistão (BAKIR et al., 1973, OPAS/OMS, 1972, WHO, 1991).

O metilmercúrio é um composto químico ambiental altamente tóxico e reconhecidamente deletério às populações humanas, sua exposição crônica e acumulação de baixos níveis causa danos importantes à saúde, sobretudo associadas a sintomas que geralmente aparecem após alguns anos de intoxicação, particularmente efeitos neurotóxicos (QUIG, 1998), e embora o sistema nervoso central (CNS) seja considerado o órgão crítico para o efeito tóxico de MeHg, acredita-se que o sistema imunológico pode ser pelo menos tão sensível quanto ele (DOURSON et al., 2001).

De fato, o mercúrio tem demonstrado ser uma das poucas substâncias químicas capazes de afetar o sistema imunológico de animais e seres humanos expostos, podendo deprimir ou estimular o sistema imunológico (BIGAZZI, 1998).

Em estudos realizados em seres humanos, não foi encontrada associação significativa entre auto-anticorpo e exposição mercurial (BARREGARD et al., 1997, QUEIROZ & DANTAS, 1997a, b, SOLEO et al., 1997). Entretanto foi verificado nestes estudos que entre os indivíduos expostos, ocorreu aumento de expressão de CD4+ e CD8+, diminuição IL-8 (SOLEO et al., 2002), TNF- $\alpha$  (SOLEO et al., 1997) e linfócitos B no soro (QUEIROZ & DANTAS, 1997a).

Nos modelos experimentais exposição a mercúrio orgânico e inorgânico também variou em seus efeitos imunotóxicos. Metilmercúrio pareceu mais imunossupressor que o mercúrio inorgânico, contudo a extensão dos seus efeitos à reação auto-imune ainda é desconhecida. (HAVARINASAB et al., 2005).

Estudos conduzidos por Häggqvist et al., (2005) e Descotes (1986) em camundongos de haplótipo H-2<sup>S</sup> encontraram que MeHg é agente imunossupressivo, entretanto isso ocorria apenas nos primeiros dias de tratamento, após esse período MeHg apresentou fraca resposta auto-imune quando comparada a HgCl, a qual pode estar relacionada à imunossupressão inicial, já que HgCl não causa redução de células T e B (DESCOTES, 2004, HAGGQVIST et al., 2005).

Hultman & Hansson-Georgiadis (1999), encontraram mercúrio orgânico e inorgânico diferem nos seus efeitos sobre o sistema imunológico, e que a resposta imune Th1 foi encontrada em tratamento posterior a MeHg (HULTMAN & HANSSON-GEORGIADIS, 1999), contrariando outros estudos que consideraram ser o MeHg imunossupressor, e observaram que a possível demetilação de MeHg pode ter causado imunoestimulação (HAVARINASAB et al., 2005, HAVARINASAB & HULTMAN, 2005, HAVARINASAB et al., 2004, WHITEKUS et al., 1999).

Outros estudos dos efeitos adversos do mercúrio orgânico e inorgânico sobre o sistema imunológico em roedores demonstraram que alguns animais desenvolveram auto-imunidade quando expostos a baixas doses do metal, enquanto outros não foram afetados (BAGENSTOSE et al., 1999, BIGAZZI, 1998, HAVARINASAB et al., 2007, HULTMAN & HANSSON-GEORGIADIS, 1999, NIELSEN & HULTMAN, 1999). No entanto, estes estudos demonstraram dependência da dose, forma química do metal ou espécie do animal, levando a disfunção no sistema imunológico e indução de auto-imunidade (BARREGARD et al., 1991, BIGAZZI, 1998, PELLETIER et al., 1987).

Estes achados constituem elementos chave no entendimento da toxicidade do mercúrio e do sistema imunológico, já que os resultados de estudos epidemiológicos a respeito da exposição ao MeHg pela dieta são conflitantes nas populações humanas, em consequência das dificuldades inerentes ao desenvolvimento do próprio estudo e/ou na escolha de testes que permitam identificar e quantificar o risco associado ao potencial toxicológico do metal, e ao mesmo tempo, uma associação entre a dose de exposição e a resposta biológica, que freqüentemente consiste de múltiplos processos, inviabilizam compreender os eventos que causam mudanças na estrutura e função celular e conseqüentemente a doença. Além disto, a constituição genética, os hormônios sexuais e fatores sociais e ambientais, junto a subseqüentes e múltiplas infecções e/ou exposições químicas em longo prazo e até outras variáveis, podem contribuir na alteração da resposta imunológica.

Em nosso estudo, com relação à exposição mercurial e auto-anticorpo a diferença estatística foi altamente significativa ( $p < 0,0001$ ), entre os indivíduos do grupo estudo e do grupo controle, havendo maior prevalência de auto-anticorpos no grupo estudo, o qual está exposto cronicamente ao metilmercúrio através da dieta. Observando-se que um elevado número de indivíduos com auto-anticorpo apresentaram níveis de mercúrio acima de 10  $\mu\text{g/g}$  no cabelo, ultrapassando os limites de tolerância biológica ao Hg na dieta humana estabelecidos pela OMS (1990). Na regressão logística, de todas as variáveis analisadas,

níveis de HgTotal em cabelo e idade, foram significativamente associadas com presença de auto-anticorpo no soro.

A associação evidenciada neste estudo, entre a presença de auto-anticorpo e HgTotal em cabelo, concorda com os achados de Silva et al., 2004 e Silbergeld et al., 2005, que estudaram outras comunidades na região do Tapajós, expostas a mercúrio orgânico e inorgânico, e contraria os resultados de estudo realizado com comunidades ribeirinhas dos rios Negro e Cuiuni, que embora apresentassem níveis de mercúrio acima do permitido pela OMS não tiveram associação significativa com presença de auto-anticorpo e mercúrio no cabelo (ALVES et al., 2006, SILBERGELD et al., 2005, SILVA et al., 2004).

Nos estudos de Silva et al., 2004, antifibrilarina foi encontrado raramente nos garimpeiros com altos níveis de mercúrio em cabelo, por outro lado foi relatada a presença de auto-anticorpos não identificados para proteínas nucleares (SILVA et al., 2004). Já outro estudo realizado em camudongos SJL/J (YANG et al., 2001) sugeriu que o mercúrio, além de antifibrilarina, induz anticorpo antinucleolar contra partículas snoRNP (pequeno RNA nucleolar).

Em nosso estudo, antifibrilarina também foi encontrado, no entanto foi menos freqüente que outros auto-anticorpos identificados por ordem de prevalência, como NuMa1, NuMa1, PM/Scl, Ssa-Ro, rRNP/Sm, golgi/Ssa/Ro, PCNA, rRNP, Ku, AFA, além de outros auto-anticorpos menos específicos para proteínas nucleares. Interessantemente, a alta prevalência do anti-NuMa1 entre os achados, é consistente com as alterações celulares induzidas pelo MeHg, entre as quais estão aquelas alvo destes anticorpos, as proteínas implicadas na reorganização do fuso mitótico.

A prevalência de auto-anticorpos reativos nos indivíduos de Panacauera, grupo controle, foi relativamente mais baixa do que no grupo estudo. Corroborando com os dados de Silva et al., (2004), para populações controle.

Em estudos experimentais realizados em camundongos de haplótipo H-2<sup>S</sup> (suscetíveis), mercúrio inorgânico induziu forte e ampla ativação policlonal do sistema imunológico (ALBALAGHI et al., 1996, HULTMAN & ENESTROM, 1987, HULTMAN & HANSSON-GEORGIADIS, 1999, JOHANSSON et al., 1997, PIETSCH et al., 1989, VAN VLIET et al., 1993), entretanto a indução de anticorpo antinucleolar (antifibrilarina) não parece ser de natureza T-independente.

Ao invés, estudos de Griem & Gleichmann, (1995) e Pollard et al., (1997) demonstraram que mercúrio causa alterações na estrutura e processamento da fibrilarina,

determinando o surgimento de epítomos crípticos em fragmento peptídicos de fibrilarina, que estimulam a ativação e produção de antifibrilarina por mecanismos antígeno específicos T-dependentes e não em consequência de uma ativação policlonal (DIGHIERO & ROSE, 1999, GRIEM & GLEICHMANN, 1995, HULTMAN & HANSSON-GEORGIADIS, 1999, POLLARD et al., 1997). O metilmercúrio também induziu anticorpo antinucleolar específico para fibrilarina (HULTMAN & HANSSON-GEORGIADIS, 1999).

Numerosos mecanismos, baseados em evidências *in vitro* e em modelos animais, têm sido propostos para explicar como mercúrio induz ou acelera a auto-imunidade (HANSSON & ABEDI-VALUGERDI, 2003, HULTMAN & HANSSON-GEORGIADIS, 1999, KOSUDA et al., 1998), estes mecanismos podem ser arbitrariamente classificados em três amplas etapas. A primeira é o processo que envolve a deleção da tolerância pelo desprendimento e formação de clones de células auto-reativas na circulação periférica (RAO & RICHARDSON, 1999).

A segunda etapa é a modificação da expressão gênica nas células que participam da resposta imune, levando os linfócitos a responder a sinais normalmente insuficientes para estimular a resposta imune, determinando quebra de tolerância mediada por supressão ou anergia e ativação de células auto-reativas. A terceira é a modificação das próprias moléculas, levando à exposição de novos epítomos ou surgimento de epítomos crípticos, de modo que elas são reconhecidas pelo sistema imunológico como estranhas (RAO & RICHARDSON, 1999).

Entretanto parece que esses fenômenos não são suficientes para produzir uma quebra na tolerância e outros mecanismos sinérgicos, tal como a eliminação insuficiente de material apoptótico, são necessários para induzir auto-imunidade (CASTOLDI et al., 2003, OPPEZZO & DIGHIERO, 2003, RAMIREZ-SANDOVAL et al., 2003, RAO & RICHARDSON, 1999, SHENKER et al., 1998).

Considerando estes possíveis mecanismos é aparente que em indivíduos susceptíveis, auto-imunidade pode ser provocada por um ou mais tipos de estímulos. Em geral, a exposição a baixas concentrações de MeHg e sua alta afinidade por grupos tiol em resíduos de cisteína torna as proteínas susceptíveis a alterações estruturais e funcionais em todos os compartimentos celulares (CASTOLDI et al., 2003, MIURA et al., 1999, QUIG, 1998).

Estas modificações parecem atingir preferencialmente componentes do citoesqueleto especialmente os microtúbulos, impedindo sua formação e sua ligação aos cromossomos, influenciando na parada do ciclo celular, com alteração na sinalização celular e

modificação da expressão gênica, que ativa a via da cascata das caspases e pode induzir apoptose (CASTOLDI et al., 2003, MIURA et al., 1999, SHENKER et al., 1998, 2000).

Em adição, o mercúrio interage também com mitocôndrias, com perda funcional, por diminuir o potencial transmembrana, elevar os níveis de stress oxidativo e desprender citocromo *c* da mitocôndria para o citosol, que por outro lado vem contribuir na ativação da via das caspases, envolvendo o aparecimento de muitas características morfológicas e degradativas que constituem a apoptose (FOULKES, 2000, SHENKER et al., 1998, 2000).

Essa anormal morte celular com desprendimento de antígenos normalmente seqüestrados pode contribuir à auto-imunidade. O sistema imunológico é normalmente tolerante aos seus próprios peptídeos, entretanto se os peptídeos são clivados diferentemente então, novos epítomos (crípticos) podem ser revelados e apresentados na resposta imune, e assim esses determinantes, em condições não apoptóticas são excepcionalmente antigênicos, ou seja, a apoptose induz a imunogenicidade dos auto-antígenos (DIGHIERO & ROSE, 1999, RAMIREZ-SANDOVAL et al., 2003). Neste contexto um grande número de alvos moleculares pode ser atingido como as células do sistema imunológico, com alterações da sinalização celular dependente de citocinas relacionadas tanto a auto-imunidade como a supressão imune (POLLARD et al., 2005, SASS et al., 2001, SHENKER et al., 2000).

Em relação à idade dos pacientes, as médias não diferiram significativamente entre as diversas comunidades investigadas (grupos de estudo e do controle), e quando foram analisados em relação a variável nível de mercúrio total no cabelo, não foi observada correlação significativa entre as duas variáveis nos diferentes grupos estudados. Estes resultados concordam com os dados obtidos em outros estudos em populações ribeirinhas da região Amazônica expostas ao mercúrio (BARBOSA et al., 2001, MALM et al., 1995, PINHEIRO et al., 2006).

Contudo, o risco da ocorrência de auto-anticorpo induzido por mercúrio é duas vezes maior se o indivíduo está na faixa etária acima de 50 anos. De fato, os estudos populacionais consideram que a incidência de doenças auto-imunes é mais elevada em indivíduos mais velhos, provavelmente em consequência de um declínio e perda das funções fisiológicas do sistema imunológico à medida que o organismo envelhece (PRELOG, 2006).

Quando testadas as frequências dos gêneros, nas comunidades estudadas (dos grupos de estudo e do controle) foi observada diferença estatisticamente significativa. Entretanto não se pode descartar a possibilidade de ter ocorrido um viés de amostragem e que seja em decorrência do pequeno tamanho amostral, e ainda particularmente por uma demanda

preferencial por parte das mulheres, na participação do estudo, de modo que pode não ser representativo de todos os indivíduos expostos ao mercúrio. Em relação à variável mercúrio, a associação com o gênero foi significativa somente na comunidade de Brasília Legal, onde indivíduos do gênero masculino apresentaram níveis mais elevados de HgT no cabelo do que mulheres.

Na literatura, têm sido relatados resultados divergentes relacionados ao gênero e mercúrio em cabelo. Na doença de Minamata foi registrada uma taxa entre machos e fêmeas de 1,2:1, e a taxa de morte foi de 1,8:1 (TAMASHIRO et al., 1984). Nas populações ribeirinhas Amazônicas também os achados são controversos, enquanto nos estudos de Harada et al., (1998) e Malm et al., (1995) mercúrio em cabelo foi mais baixo em mulheres, Lebel et al. (1998) e Barbosa et al., (2001) não encontraram diferenças significativas entre nível de mercúrio em cabelo e o gênero. Em geral, os estudos (CORDIER et al., 2002, GRANDJEAN et al., 1992, WAKISAKA et al., 1990), relatam diferenças significativas entre gênero e metilmercúrio em cabelo.

No que se refere à indução de auto-anticorpos, o gênero não demonstrou significância como fator de risco no desenvolvimento da auto-imunidade em nenhuma das comunidades expostas a metilmercúrio. Entretanto, a literatura relata associação entre um espectro de doenças auto-imunes em que mais de 80% da população afetada são mulheres (BEESON, 1994, EIDINGER & GARRETT, 1972, WIZEMANN & PARDUE, 2001). Por outro lado, para entender a diferença entre os gêneros na auto-imunidade, é necessário primeiro compreender completamente as diferenças envolvidas nos mecanismos das respostas imunes inata e adaptativa (WHITACRE, 2001).

No presente estudo a comparação entre as frequências dos padrões de auto-anticorpos entre os grupos de estudo com os do controle indicou maior proporção dos tipos nucleares e mistos nas comunidades ribeirinhas do Tapajós, sendo que no padrão misto havia também uma predominância de associação com os anticorpos para antígenos nucleares. Esta evidência nos permite sugerir uma origem para os auto-anticorpos de natureza nuclear, como devem ter sido induzidos por auto-antígenos derivados por fragmentação proteolítica dependente de caspases, em condições apoptóticas, exibindo epítomos críticos que em condições fisiológicas não são acessíveis às células apresentadoras de antígenos (APC) (SHENKER et al., 1998, YOLE et al., 2007).

Estes mecanismos podem justificar a diferença significativa desses tipos de auto-anticorpos nos indivíduos expostos em relação aos não expostos, contudo este fato não



está claro em relação à presença dos anticorpos antinucleolares, porque sua detecção não diferiu entre os indivíduos expostos e não expostos neste estudo.

E ainda, com relação à intensidade de fluorescência de auto-anticorpos, em uma escala de 1-3, os grupos de estudo exibiram graus de intensidade de fluorescência mais altos ( $X = 1.5291 + 1.0284$ ) comparados com as amostras do grupo controle ( $X = 0.4375 + 0.7533$ ), e a distribuição dos escores de intensidade de imunofluorescência nos indivíduos mostrou diferir significativamente entre os grupos estudo e controle. Os escores de intensidade de imunofluorescência são diretamente proporcionais à concentração de imunocomplexo antígeno-anticorpo formado na reação (PFAU et al., 2005).

Por outro lado, certos tipos de padrões de reação de auto-anticorpo tendem a ser detectados mediante reações com forte intensidade de fluorescência (PEENE et al., 2001), mediante testes específicos para identificar auto-anticorpos, relatou que anti-ENA (anti-SSA, anti-SSB, anti-RNP, anti-Sm e anti-Jo) se distribuem aleatoriamente com distintos padrões de classificação, e que provavelmente estes padrões ocorrem frequentemente em amostras com forte intensidade de fluorescência, a exceção de anticorpos anti-SSA/SSB que ocorreram em 5,6% das amostras com intensidade de fluorescência igual a +1. O anti-Jo também foi reativo a baixas intensidades (3/4 da amostra mostraram intensidade +2, e 1/4 foram +3). Este estudo também observou que anticorpos anti-dsDNA são encontrados quase exclusivamente em padrão nuclear homogêneo e com escore de intensidade de fluorescência +3 (3,1%) a +5 (36,6%).

No que se refere à intensidade de fluorescência e o tipo de reação, nossos resultados demonstraram ter um perfil de reatividade similar àquele descrito no estudo de Peene et al., (2001) (PEENE et al., 2001). Do mesmo modo, a forte intensidade de fluorescência encontrada entre os indivíduos do grupo estudo, na bacia do rio Tapajós, sugere elevados títulos de auto-anticorpos, os quais parecem ser decorrentes da severidade dos efeitos tóxicos do MeHg, via consumo da dieta de peixes, o qual estaria induzindo alterações celulares, em nível bioquímico.

Diversos anticorpos têm sido identificados que reagem com os constituintes do núcleo, nucléolo, aparelho mitótico e citoplasma da célula. A caracterização dos auto-anticorpos é realizada por imunofluorescência indireta em células Hep-2. E o padrão de distribuição da marcação por esta técnica e seus aspectos pode ser suficientemente específico para permitir uma orientação diagnóstica do tipo de auto-anticorpo. Mas um problema pode se apresentar, visto que para uma parte dos auto-anticorpos, o padrão é insuficiente, havendo

necessidade de outros testes específicos para identificação do auto-anticorpo em questão, por esse motivo, como em nosso estudo não foram realizados testes específicos para confirmar os tipos de auto-anticorpos, sua possível especificação foi realizada indiretamente através dos esquemas de classificação dos padrões formulados durante o II Consenso Brasileiro de Fator Antinuclear em Células HEp-2 (DELLAVANCE et al., 2003, DELLAVANCE et al., 2002).

Assim, os dados em geral indicam a necessidade de estudos adicionais para confirmar a especificidade destes auto-anticorpos associados com a exposição mercurial bem como elucidar os mecanismos imunotoxicológicos da ação do mercúrio sobre o sistema imunológico humano.

## **CONCLUSÕES**

## 6 CONCLUSÕES

- As médias de mercúrio total em cabelo nos indivíduos dos grupos de estudo exibiram níveis mais elevados do que aquelas do grupo controle. Do mesmo modo, na comunidade de São Luiz do Tapajós foi detectada maior exposição mercurial do que na comunidade de Barreiras.
- Em relação à variável sexo, foi observada associação somente em Brasília Legal, com níveis de Hgtotal mais altos no cabelo dos homens.
- Quanto à faixa etária e níveis de mercúrio total no cabelo não foi observada correlação significativa entre as comunidades investigadas.
- A prevalência de auto-anticorpos nos grupos de estudo foi maior do que no grupo controle.
- Os padrões de auto-anticorpos do tipo misto e nuclear foram mais prevalentes nos indivíduos expostos ao mercúrio, enquanto que a proporção do padrão nucleolar foi similar em ambos os grupos estudo e controle.
- A intensidade de imunofluorescência apresentou maior reatividade nos indivíduos expostos ao mercúrio.
- Os auto-anticorpos mais frequentemente observados foram, por ordem de prevalência: NuMa1, PM/Scl, Ssa-Ro, rRNP/Sm, golgi/Ssa/Ro, PCNA, rRNP, Ku, AFA, além de outros auto-anticorpos para antígenos nucleares com especificidade não definidas.
- Nos indivíduos investigados, o risco de apresentar auto-anticorpo foi aproximadamente duas vezes maior nos expostos ao metilmercúrio e na faixa etária acima de 50 anos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K., POBER, J. S. & LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. 4. Revinter, 2002. 486.
- AKAGI, H., MALM, O., KINJO, Y., HARADA, M., BRANCHES, F. J. P., PFEIFFER, W. C. & KATO, H. Methylmercury Pollution in Tapajos River Basin, Amazon. **Environmental Sciences**, v. 3, n., p. 25-32, 1994.
- \_\_\_\_\_. Methylmercury pollution in the Amazon, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 175, n. 2, p. 85-95, Dec 11 1995.
- ALBALAGHI, S., MOLLER, E., MOLLER, G. & ABEDIVALUGERDI, M. Mercury induces polyclonal B cell activation, autoantibody production and renal immune complex deposits in young (NZBxNZW)F1 hybrids. **European Journal of Immunology**, v. 26, n. 7, p. 1519-1526, Jul 1996.
- ALBRIGHT, J. F. & GOLDSTEIN, R. A. Airborne pollutants and the immune system. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 114, n. 2, p. 232-8, Feb 1996.
- ALVES, M. F., FRAIJI, N. A., BARBOSA, A. C., DE LIMA, D. S., SOUZA, J. R., DOREA, J. G. & CORDEIRO, G. W. Fish consumption, mercury exposure and serum antinuclear antibody in Amazonians. **Int J Environ Health Res**, v. 16, n. 4, p. 255-62, Aug 2006.
- ASCHNER, M. & ASCHNER, J. L. Mercury neurotoxicity: mechanisms of blood-brain barrier transport. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 14, n. 2, p. 169-76, Summer 1990.
- ASCHNER, M., RODIER, P. M. & FINKELSTEIN, J. N. Increased axonal transport in the rat optic system after systemic exposure to methylmercury: differential effects in local vs systemic exposure conditions. **Brain Res**, v. 401, n. 1, p. 132-41, Jan 13 1987.
- AYRES, M., AYRES, J. R., AYRES, D. L. & SANTOS, A. S. **Bioestat 4.0**. 1. Belém: 2005. 334.
- BAGENSTOSE, L. M., CLASS, R., SALGAME, P. & MONESTIER, M. B7-1 and B7-2 co-stimulatory molecules are required for mercury-induced autoimmunity. **Clin Exp Immunol**, v. 127, n. 1, p. 12-9, Jan 2002.
- BAGENSTOSE, L. M., SALGAME, P. & MONESTIER, M. Murine mercury-induced autoimmunity: a model of chemically related autoimmunity in humans. **Immunol Res**, v. 20, n. 1, p. 67-78, 1999.
- BAKIR, F., DAMLUJI, S. F., AMIN-ZAKI, L., MURTADHA, M., KHALIDI, A., AL-RAWI, N. Y., TIKRITI, S., DAHAHIR, H. I., CLARKSON, T. W., SMITH, J. C. & DOHERTY, R. A. Methylmercury poisoning in Iraq. **Science**, v. 181, n. 96, p. 230-41, Jul 20 1973.
- BARBOSA, A. C., JARDIM, W., DOREA, J. G., FOSBERG, B. & SOUZA, J. Hair mercury speciation as a function of gender, age, and body mass index in inhabitants of the Negro River basin, Amazon, Brazil. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 40, n. 3, p. 439-44, Apr 2001.

- BARBOSA, A. C., SILVA, S. R. & DOREA, J. G. Concentration of mercury in hair of indigenous mothers and infants from the Amazon basin. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 34, n. 1, p. 100-5, Jan 1998.
- BARREGARD, L., ENESTROM, S., LJUNGHUSEN, O., WIESLANDER, J. & HULTMAN, P. A study of autoantibodies and circulating immune complexes in mercury-exposed chloralkali workers. **Int Arch Occup Environ Health**, v. 70, n. 2, p. 101-6, 1997.
- BARREGARD, L., HOGSTEDT, B., SCHUTZ, A., KARLSSON, A., SALLSTEN, G. & THIRINGER, G. Effects of occupational exposure to mercury vapor on lymphocyte micronuclei. **Scand J Work Environ Health**, v. 17, n. 4, p. 263-8, Aug 1991.
- BATTIGELLI, M. C. Mercury. In: ROM, W. N. (Ed.). **Environmental and occupational medicine**. Boston: Little Brown, 1983. cap., p.1904.
- BEESON, P. B. Age and sex associations of 40 autoimmune diseases. **Am J Med**, v. 96, n. 5, p. 457-62, May 1994.
- BERLIN, M. Mercury. In: NORDBERG, G. & NORDBERG, M. (Ed.). **Handbook on the Toxicology of Metals**. 2. Elsevier Science BV, 2007. cap., p.1024.
- BERNAUDIN, J. F., DRUET, E., DRUET, P. & MASSE, R. Inhalation or ingestion of organic or inorganic mercurials produces auto-immune disease in rats. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 20, n. 1, p. 129-35, Jul 1981.
- BIGAZZI, P. E. Autoimmunity caused by xenobiotics. **Toxicology**, v. 119, n. 1, p. 1-21, Apr 11 1997.
- \_\_\_\_\_. Mercury. In: ZELIKOFF, J. T. & THOMAS, P. T. (Ed.). **Immunotoxicology of Environmental and Occupational Metals**. London: Taylor Francis Ltd, 1998. cap., p.374.
- BJORNBERG, K. A., VAHTER, M., BERGLUND, B., NIKLASSON, B., BLENNOW, M. & SANDBORGH-ENGLUND, G. Transport of methylmercury and inorganic mercury to the fetus and breast-fed infant. **Environ Health Perspect**, v. 113, n. 10, p. 1381-5, Oct 2005.
- BOENING, D. W. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. **Chemosphere**, v. 40, n. 12, p. 1335-51, Jun 2000.
- BRASIL (1975) Ministério da Saúde. Resolução nº 18/75 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Brasília, Diário Oficial da União.
- BURNET, F. M. Immunological recognition of self. **Nobel Lecture**, 1960. Disponível em: < [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1960/burnet-lecture.pdf](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1960/burnet-lecture.pdf) >. Acesso em: 16 de junho de 2006.
- CAMARA, V., FILHOTE, M. I., LIMA, M. I., ALHEIRA, F. V., MARTINS, M. S., DANTAS, T. O. & LUIZ, R. R. [Methodology to prevent mercury exposure among adolescents from goldmine areas in Mariana, state of Minas Gerais, Brazil]. **Cad Saude Publica**, v. 12, n. 2, p. 149-158, Apr 1996.

- CÂMARA, V. M., FILHOTE, M. I., LIMA, M. I., ALHEIRA, F. V., MARTINS, M. S., DANTAS, T. O. & LUIZ, R. R. Strategies for preventing adolescent mercury exposure in Brazilian gold mining areas. **Toxicol Ind Health**, v. 13, n. 2-3, p. 285-97, Mar-Jun 1997.
- CASTOLDI, A. F., COCCINI, T., CECCATELLI, S. & MANZO, L. Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. **Brain Res Bull**, v. 55, n. 2, p. 197-203, May 15 2001.
- CASTOLDI, A. F., COCCINI, T. & MANZO, L. Neurotoxic and molecular effects of methylmercury in humans. **Rev Environ Health**, v. 18, n. 1, p. 19-31, Jan-Mar 2003.
- CHRISTEN, U. & VON HERRATH, M. G. Initiation of autoimmunity. **Curr Opin Immunol**, v. 16, n. 6, p. 759-67, Dec 2004.
- CLARKSON, T. W. The role of biomarkers in reproductive and developmental toxicology. **Environ Health Perspect**, v. 74, n., p. 103-7, Oct 1987.
- \_\_\_\_\_. The three modern faces of mercury. **Environ Health Perspect**, v. 110 Suppl 1, n., p. 11-23, Feb 2002.
- CORDIER, S., GAREL, M., MANDEREAU, L., MORCEL, H., DOINEAU, P., GOSME-SEGURET, S., JOSSE, D., WHITE, R. & AMIEL-TISON, C. Neurodevelopmental investigations among methylmercury-exposed children in French Guiana. **Environ Res**, v. 89, n. 1, p. 1-11, May 2002.
- CRAIG, P. J. **Organometallic compounds in the environment principles and reactions**. Leicester: Longman Group Limited, 1986. 326.
- DELLAVANCE, A., GABRIEL JÚNIOR, A., CINTRA, A. F. U., XIMENES, A. C., NUCCITELLI, B., TALIBERTI, B. H., MOREIRA, C., VON MÜHLEN, C. A., BICHARA, C. D., SANTOS, C. H. R., YANO, C. M., MANGUEIRA, C. L. P., CARVALHO, D. G., BONFÁ, E. S. D. O., DOI, E. M., GUIMARÃES, F. N. C., ARAÚJO, F. I., MUNDIM, H. M., REGO, J., VIEIRA, L. E. A., POLI, L., ANDRADE, L. E. C., CALLADO, M. R., MESQUITA, M. M., SUGIYAMA, M., SLHESSARENKO, N., SILVA, N. A., CARBALLO, O. G., LESER, P. G., FRANCESCANTONIO, P. L. C., JARACH, R., XAVIER, R. M., LEVY, R. A., NEVES, S. P. F., CRUVINEL, W. M. & SANTOS, W. S. II Brazilian Consensus on Antinuclear Antibodies in HEP-2 Cells. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 43, n. 3, p. 129-140, 2003.
- DELLAVANCE, A., GABRIEL JÚNIOR, A., CINTRA, A. F. U., XIMENES, A. C., NUCCITELLI, B., VON MÜHLEN, C. A., BICHARA, C. D., YANO, C. M., CARVALHO, D. G., BONFÁ, E. S. D. O., GUIMARÃES, F. N. C., MUNDIM, H. M., PFRIMER, I. A. H., REGO, J., ANDRADE, L. E. C., MESQUITA, M. M., SANTIAGO, M. B., SILVA, N. A., MIRANDA, P. J., LESER, P. G., FRANCESCANTONIO, P. L. C., JARACH, R., LEVY, R. A., NEVES, S. P. F., CRUVINEL, W. M. & SANTOS, W. S. I Consenso Nacional para Padronização dos Laudos de FAN HEP-2. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 38, n. 3, p. 207-216, 2002.

- DEMEDA, K., MERTENS, F., SAINT-CHARLES, J., CASTRO, M. & MERGLER, D. (2006) Relações de poder e poluição pelo mercúrio em uma comunidade do Tapajós. *III Encontro da ANPPAS*. Brasília-DF.
- DESCOTES, J. Clinical immunotoxicology. In: DESCOTES, J. (Ed.). **Immunotoxicology of Drugs and Chemicals: an Experimental and Clinical Approach Volume I: Principles and Methods of Immunotoxicology**. Amsterdam: Elsevier, v.1, 2004. cap. 11, p.398.
- DIGHIERO, G., LYMBERI, P., GUILBERT, B., TERNYNCK, T. & AVRAMEAS, S. Natural autoantibodies constitute a substantial part of normal circulating immunoglobulins. **Ann N Y Acad Sci**, v. 475, n., p. 135-45, 1986.
- DIGHIERO, G., LYMBERI, P., HOLMBERG, D., LUNDQUIST, I., COUTINHO, A. & AVRAMEAS, S. High frequency of natural autoantibodies in normal newborn mice. **J Immunol**, v. 134, n. 2, p. 765-71, Feb 1985.
- DIGHIERO, G. & ROSE, N. R. Critical self-epitopes are key to the understanding of self-tolerance and autoimmunity. **Immunol Today**, v. 20, n. 9, p. 423-8, Sep 1999.
- DOURSON, M. L., WULLENWEBER, A. E. & POIRIER, K. A. Uncertainties in the reference dose for methylmercury. **Neurotoxicology**, v. 22, n. 5, p. 677-89, Oct 2001.
- EIDINGER, D. & GARRETT, T. J. Studies of the regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation. **J Exp Med**, v. 136, n. 5, p. 1098-116, Nov 1 1972.
- EL-FAWAL, H. A., WATERMAN, S. J., DE FEO, A. & SHAMY, M. Y. Neuroimmunotoxicology: humoral assessment of neurotoxicity and autoimmune mechanisms. **Environ Health Perspect**, v. 107 Suppl 5, n., p. 767-75, Oct 1999.
- FARINE, J. C. Animal models in autoimmune disease in immunotoxicity assessment. **Toxicology**, v. 119, n. 1, p. 29-35, Apr 11 1997.
- FORSDYKE, D. R. The origins of the clonal selection theory of immunity as a case study for evaluation in science. **FASEB J**, v. 9, n. 2, p. 164-6, Feb 1995.
- FOULKES, E. C. Transport of toxic heavy metals across cell membranes. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 223, n. 3, p. 234-40, Mar 2000.
- GILMOUR, C. C. & HENRY, E. A. Mercury methylation in aquatic systems affected by acid deposition. **Environ Pollut**, v. 71, n. 2-4, p. 131-69, 1991.
- GLINA, D. M., SATUT, B. T. & ANDRADE, E. M. [Occupational exposure to metallic mercury in the dentist's office of a public primary health care clinic in the city of Sao Paulo]. **Cad Saude Publica**, v. 13, n. 2, p. 257-267, Apr 1997.
- GMA/UNEP. Chemicals. **Global Mercury Assessment. United Nations Environment Programme – UNEP**, Geneva 2006. Disponível em: < <http://www.chem.unep.ch> >. Acesso em: 15 de novembro de 2006.



- GODFREY, M. E., WOJCIK, D. P. & KRONE, C. A. Apolipoprotein E genotyping as a potential biomarker for mercury neurotoxicity. **J Alzheimers Dis**, v. 5, n. 3, p. 189-95, Jun 2003.
- GONZALEZ-BUITRAGO, J. M. & GONZALEZ, C. Present and future of the autoimmunity laboratory. **Clin Chim Acta**, v. 365, n. 1-2, p. 50-7, Mar 2006.
- GOODNOW, C. C., SPRENT, J., FAZEKAS DE ST GROTH, B. & VINUESA, C. G. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. **Nature**, v. 435, n. 7042, p. 590-7, Jun 2 2005.
- GRANDJEAN, P., CARDOSO, B. & GUIMARAES, G. Mercury poisoning. **Lancet**, v. 342, n. 8877, p. 991, Oct 16 1993.
- GRANDJEAN, P., NIELSEN, G. D., JORGENSEN, P. J. & HORDER, M. Reference intervals for trace elements in blood: significance of risk factors. **Scand J Clin Lab Invest**, v. 52, n. 4, p. 321-37, Jun 1992.
- GRIEM, P. & GLEICHMANN, E. Metal ion induced autoimmunity. **Curr Opin Immunol**, v. 7, n. 6, p. 831-8, Dec 1995.
- GUIMARÃES, G. A. (2002) Estudo preliminar dos mecanismos de ação tóxica do mercúrio no meio ambiente. Belém, Faculdade Ideal/CREA-PA.
- HAGGQVIST, B., HAVARINASAB, S., BJORN, E. & HULTMAN, P. The immunosuppressive effect of methylmercury does not preclude development of autoimmunity in genetically susceptible mice. **Toxicology**, v. 208, n. 1, p. 149-64, Mar 1 2005.
- HAGGQVIST, B. & HULTMAN, P. Effects of deviating the Th2-response in murine mercury-induced autoimmunity towards a Th1-response. **Clin Exp Immunol**, v. 134, n. 2, p. 202-9, Nov 2003.
- HAMADA, R. & OSAME, M. Minamata Disease and Other Mercury Syndromes. In: CHANG, L. W. (Ed.). **Toxicology of Metals**. Little Rock: CRC Press, v.1, 1996. cap., p.1232.
- HANSSON, H. Antinuclear antibodies: presence and specificity in autoimmune connective tissue disease in the dog. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 69, n. 2-4, p. 225-8, Aug 2 1999.
- HANSSON, M. & ABEDI-VALUGERDI, M. Xenobiotic metal-induced autoimmunity: mercury and silver differentially induce antinucleolar autoantibody production in susceptible H-2s, H-2q and H-2f mice. **Clin Exp Immunol**, v. 131, n. 3, p. 405-14, Mar 2003.
- HARADA, M. Environmental Contamination and Human Rights — Case of Minamata Disease. **Organization Environment**, v. 8, n. 2, p. 141-154, 1994.
- \_\_\_\_\_. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. **Crit Rev Toxicol**, v. 25, n. 1, p. 1-24, 1995.

- HARADA, M., NAKANISHI, J., KONUMA, S., OHNO, K., KIMURA, T., YAMAGUCHI, H., TSURUTA, K., KIZAKI, T., OOKAWARA, T. & OHNO, H. The present mercury contents of scalp hair and clinical symptoms in inhabitants of the Minamata area. **Environ Res**, v. 77, n. 2, p. 160-4, May 1998.
- HARADA, M., NAKANISHI, J., YASODA, E., PINHEIRO, M. C., OIKAWA, T., DE ASSIS GUIMARAES, G., DA SILVA CARDOSO, B., KIZAKI, T. & OHNO, H. Mercury pollution in the Tapajos River basin, Amazon: mercury level of head hair and health effects. **Environ Int**, v. 27, n. 4, p. 285-90, Oct 2001.
- HAVARINASAB, S., BJORN, E., EKSTRAND, J. & HULTMAN, P. Dose and Hg species determine the T-helper cell activation in murine autoimmunity. **Toxicology**, v. 229, n. 1-2, p. 23-32, Jan 5 2007.
- HAVARINASAB, S., HAGGQVIST, B., BJORN, E., POLLARD, K. M. & HULTMAN, P. Immunosuppressive and autoimmune effects of thimerosal in mice. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 204, n. 2, p. 109-21, Apr 15 2005.
- HAVARINASAB, S. & HULTMAN, P. Organic mercury compounds and autoimmunity. **Autoimmun Rev**, v. 4, n. 5, p. 270-5, Jun 2005.
- \_\_\_\_\_. Alteration of the spontaneous systemic autoimmune disease in (NZB x NZW)F1 mice by treatment with thimerosal (ethyl mercury). **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 214, n. 1, p. 43-54, Jul 1 2006.
- HAVARINASAB, S., LAMBERTSSON, L., QVARNSTROM, J. & HULTMAN, P. Dose-response study of thimerosal-induced murine systemic autoimmunity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 194, n. 2, p. 169-79, Jan 15 2004.
- HULTMAN, P. & ENESTROM, S. The induction of immune complex deposits in mice by peroral and parenteral administration of mercuric chloride: strain dependent susceptibility. **Clin Exp Immunol**, v. 67, n. 2, p. 283-92, Feb 1987.
- HULTMAN, P. & HANSSON-GEORGIADIS, H. Methyl mercury-induced autoimmunity in mice. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 154, n. 3, p. 203-11, Feb 1 1999.
- JERNE, N. K. Towards a network theory of the immune system. **Ann Immunol (Paris)**, v. 125C, n. 1-2, p. 373-89, Jan 1974.
- JOHANSSON, U., HANSSON-GEORGIADIS, H. & HULTMAN, P. Murine silver-induced autoimmunity: silver shares induction of antinucleolar antibodies with mercury, but causes less activation of the immune system. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 113, n. 4, p. 432-43, Aug 1997.
- KAKITA, A., WAKABAYASHI, K., SU, M., YONEOKA, Y., SAKAMOTO, M., IKUTA, F. & TAKAHASHI, H. Intrauterine methylmercury intoxication. Consequence of the inherent brain lesions and cognitive dysfunction in maturity. **Brain Res**, v. 877, n. 2, p. 322-30, Sep 22 2000.
- KARIM, A. R. Antinuclear antibodies pattern. 2007. Disponível em: < <http://www.ii.bham.ac.uk/clinicalimmunology/CISimagelibrary/ANA.htm> >. Acesso em: 17 de abril de 2007.

- KELLER, J. M., MCCLELLAN-GREEN, P. D., KUCKLICK, J. R., KEIL, D. E. & PEDEN-ADAMS, M. M. Effects of organochlorine contaminants on loggerhead sea turtle immunity: comparison of a correlative field study and in vitro exposure experiments. **Environ Health Perspect**, v. 114, n. 1, p. 70-76, Jan 2006.
- KIMBER, I. & DEARMAN, R. J. Immunologic basis for autoimmunity and the potential influences of xenobiotics. **Toxicol Lett**, v. 127, n. 1-3, p. 77-81, Feb 28 2002.
- KOSUDA, L. L., WHALEN, B., GREINER, D. L. & BIGAZZI, P. E. Mercury-induced autoimmunity in Brown Norway rats: kinetics of changes in RT6+ T lymphocytes correlated with IgG isotypes of circulating autoantibodies to laminin 1. **Toxicology**, v. 125, n. 2-3, p. 215-31, Feb 6 1998.
- KUBICKA-MURANYI, M., GRIEM, P., LUBBEN, B., ROTTMANN, N., LUHRMANN, R. & GLEICHMANN, E. Mercuric-chloride-induced autoimmunity in mice involves up-regulated presentation by spleen cells of altered and unaltered nucleolar self antigen. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 108, n. 1, p. 1-10, Sep 1995.
- LACERDA, L. D. & SALOMONS, W. **Mercury in the Amazon: A Chemical Time Bomb?** : Netherlands. Ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer, 1991.
- LAWRENCE, D. A. & MCCABE, M. J., JR. Immunomodulation by metals. **Int Immunopharmacol**, v. 2, n. 2-3, p. 293-302, Feb 2002.
- LAZO, J. S., BRUNTON, L. L. & PARKER, K. L. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 8. Guanabara Koogan, 1991. 1232.
- LEBEL, J., ROULET, M., MERGLER, D., LUCOTTE, M. & LARRIBE, F. Fish diet and mercury exposure in a riparian Amazonian population. **Water Air Soil Pollution**, v. 97, n., p. 31-44, 1997.
- LECHLER, R., CHAI, J. G., MARELLI-BERG, F. & LOMBARDI, G. T-cell anergy and peripheral T-cell tolerance. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 356, n. 1409, p. 625-37, May 29 2001.
- MALM, O., BRANCHES, F. J., AKAGI, H., CASTRO, M. B., PFEIFFER, W. C., HARADA, M., BASTOS, W. R. & KATO, H. Mercury and methylmercury in fish and human hair from the Tapajos river basin, Brazil. **Sci Total Environ**, v. 175, n. 2, p. 141-50, Dec 11 1995.
- MERINO-PÉREZ, J. & LÓPEZ-HOYOS, M. De los mecanismos de tolerancia a la autoinmunidad. **Ediciones Doyma-Medicine**, v. 8, n. 26, p. 1331-1341, 2000.
- MIURA, K., KOIDE, N., HIMENO, S., NAKAGAWA, I. & IMURA, N. The involvement of microtubular disruption in methylmercury-induced apoptosis in neuronal and nonneuronal cell lines. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 160, n. 3, p. 279-88, Nov 1 1999.
- MOREL, F. M. M., KRAEPIEL, A. M. L. & AMYOT, M. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, n., p. 543-566, 1998.

- MURATA, K., WEIHE, P., RENZONI, A., DEBES, F., VASCONCELOS, R., ZINO, F., ARAKI, S., JORGENSEN, P. J., WHITE, R. F. & GRANDJEAN, P. Delayed evoked potentials in children exposed to methylmercury from seafood. **Neurotoxicol Teratol**, v. 21, n. 4, p. 343-8, Jul-Aug 1999.
- NAGANUMA, A., FURUCHI, T., MIURA, N., HWANG, G. W. & KUGE, S. Investigation of intracellular factors involved in methylmercury toxicity. **Tohoku J Exp Med**, v. 196, n. 2, p. 65-70, Feb 2002.
- NIELSEN, J. B. & HULTMAN, P. Experimental studies on genetically determined susceptibility to mercury-induced autoimmune response. **Ren Fail**, v. 21, n. 3-4, p. 343-8, May-Jul 1999.
- NOSSAL, G. J. & PIKE, B. L. Clonal anergy: persistence in tolerant mice of antigen-binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 77, n. 3, p. 1602-6, Mar 1980.
- NUNES, A. C. M. Contaminação mercurial na Amazônia Brasileira. In, Proceeding: Simpósio Internacional de Avaliação da Contaminação Mercurial na Amazônia, 1998. p.97-101.
- OLIVEIRA, R. B., MALM, O. & GUIMARAES, J. R. Distribution of methylmercury and inorganic mercury in neonate hamsters dosed with methylmercury during fetal life. **Environ Res**, v. 86, n. 1, p. 73-9, May 2001.
- OMATA, S., KASAMA, H., HASEGAWA, H., HASEGAWA, K., OZAKI, K. & SUGANO, H. Species difference between rat and hamster in tissue accumulation of mercury after administration of methylmercury. **Arch Toxicol**, v. 59, n. 4, p. 249-54, Dec 1986.
- OPAS/OMS (1972) Riesgos del ambiente humano para la salud.
- OPPEZZO, P. & DIGHIERO, G. [Autoantibodies, tolerance and autoimmunity]. **Pathol Biol (Paris)**, v. 51, n. 5, p. 297-304, Jul 2003.
- PATRICK, L. Mercury toxicity and antioxidants: Part 1: role of glutathione and alpha-lipoic acid in the treatment of mercury toxicity. **Altern Med Rev**, v. 7, n. 6, p. 456-71, Dec 2002.
- PAVLOGEORGATOS, G. & KIKILIAS, V. The importance of mercury determination and speciation to the health of the general population. **Global NEST: The International Journal**, v. 4, n. 2/3, p. 107-125, 2002.
- PEENE, I., MEHEUS, L., VEYS, E. M. & DE KEYSER, F. Detection and identification of antinuclear antibodies (ANA) in a large and consecutive cohort of serum samples referred for ANA testing. **Ann Rheum Dis**, v. 60, n. 12, p. 1131-6, Dec 2001.
- PELLETIER, L., HIRSCH, F., ROSSERT, J., DRUET, E. & DRUET, P. Experimental mercury-induced glomerulonephritis. **Springer Semin Immunopathol**, v. 9, n. 4, p. 359-69, 1987.

- PFAU, J. C., SENTISSI, J. J., WELLER, G. & PUTNAM, E. A. Assessment of autoimmune responses associated with asbestos exposure in Libby, Montana, USA. **Environ Health Perspect**, v. 113, n. 1, p. 25-30, Jan 2005.
- PICAZO-SANCHEZ, J. E. & FERNANDEZ-VOZMEDIANO, J. M. Los mercuriales: Historia, Toxicología, Toxicocinética y Fisiopatología. **Actualidad Dermatológica**, 2005. Disponível em: < [www.actualidaddermatol.com/art31094.pdf](http://www.actualidaddermatol.com/art31094.pdf) >. Acesso em: 24 de maio de 2005.
- PIETSCH, P., VOHR, H. W., DEGITZ, K. & GLEICHMANN, E. Immunological alterations inducible by mercury compounds. II. HgCl<sub>2</sub> and gold sodium thiomalate enhance serum IgE and IgG concentrations in susceptible mouse strains. **Int Arch Allergy Appl Immunol**, v. 90, n. 1, p. 47-53, 1989.
- PIKE, B. L., BOYD, A. W. & NOSSAL, G. J. Clonal anergy: the universally anergic B lymphocyte. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 79, n. 6, p. 2013-7, Mar 1982.
- PINHEIRO, M. C., GUIMARAES, G. A., NAKANISHI, J., OIKAWA, T., VIEIRA, J. L., QUARESMA, M., CARDOSO, B. & AMORAS, W. [Total mercury in hair samples of inhabitants of Tapajós River, Para State, Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 33, n. 2, p. 181-4, Mar-Apr 2000.
- PINHEIRO, M. C. N., GUIMARÃES, G. A., BACELAR, M. D. R., MULLER, R. C. S., OIKAWA, T., SANTOS, W. R., GOMES, M. P. S. V., SANTANA, A., XAVIER, F. B. & ALMEIDA, S. A. Comunidades ribeirinhas do tapajós. Condições de vida e saúde. In: VILLAS BÔAS, R. C., BEINHOFF, C. & SILVA, A. R. (Ed.). **Mercury in the Tapajós Basin**. Rio de Janeiro: CNPq/CYTED, 2001. cap., p.198.
- PINHEIRO, M. C. N., HARADA, M., YASODA, E., NAKANISHI, J., OIKAWA, T., VIEIRA, J. L., COSTA, S. M., GUIMARÃES, G. A., BACELAR, M. D. R., ALMEIDA, S. S. & SILVEIRA, L. C. L. Toxicological and epidemiological data on human exposure to mercury in the Tapajós river basin: 1994-1998. **Environmental Sciences**, v. 10, n. 2, p. 99-105, 2003.
- PINHEIRO, M. C. N., OIKAWA, T., VIEIRA, J. L. F., GOMES, M. S. V., GUIMARAES, G. A., CRESPO-LOPEZ, M. E., MULLER, R. C. S., AMORAS, W. W., RIBEIRO, D. R. G., RODRIGUES, A. R., CORTES, M. I. T. & SILVEIRA, L. C. L. Comparative study of human exposure to mercury in riverside communities in the Amazon region. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 3, p. 411-414, Mar 2006.
- POLLARD, K. M. **Autoantibodies and Autoimmunity: Molecular Mechanisms in Health and Disease**. WILEY-VCH 2006. 640p.
- POLLARD, K. M., HULTMAN, P. & KONO, D. H. Immunology and genetics of induced systemic autoimmunity. **Autoimmun Rev**, v. 4, n. 5, p. 282-8, Jun 2005.
- POLLARD, K. M., LEE, D. K., CASIANO, C. A., BLUTHNER, M., JOHNSTON, M. M. & TAN, E. M. The autoimmunity-inducing xenobiotic mercury interacts with the autoantigen fibrillar and modifies its molecular and antigenic properties. **J Immunol**, v. 158, n. 7, p. 3521-8, Apr 1 1997.

- POLLARD, K. M., PEARSON, D. L., BLUTHNER, M. & TAN, E. M. Proteolytic cleavage of a self-antigen following xenobiotic-induced cell death produces a fragment with novel immunogenic properties. **J Immunol**, v. 165, n. 4, p. 2263-70, Aug 15 2000.
- PRELOG, M. Aging of the immune system: a risk factor for autoimmunity? **Autoimmun Rev**, v. 5, n. 2, p. 136-9, Feb 2006.
- PUJOL-BORREL, R., GARCÍA-COZAR, F., PEÑA, J. & SANTAMARÍA, Y. M. Tolerancia Inmunologica. 2005. Disponível em: < [http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/temas\\_nuevos\\_pdf/tema15.pdf](http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/temas_nuevos_pdf/tema15.pdf) >. Acesso em: 24 de maio de 2005.
- QUEIROZ, M. L. & DANTAS, D. C. B lymphocytes in mercury-exposed workers. **Pharmacol Toxicol**, v. 81, n. 3, p. 130-3, Sep 1997a.
- \_\_\_\_\_. T lymphocytes in mercury-exposed workers. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 19, n. 4, p. 499-510, Nov 1997b.
- QUIG, D. Cysteine metabolism and metal toxicity. **Altern Med Rev**, v. 3, n. 4, p. 262-70, Aug 1998.
- RADOSTITIS, O. M. **Medicina veterinária**. 9. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 737.
- RAMIREZ-SANDOVAL, R., SANCHEZ-RODRIGUEZ, S. H., HERRERA-VAN OOSTDAM, D., AVALOS-DIAZ, E. & HERRERA-ESPARZA, R. Antinuclear antibodies recognize cellular autoantigens driven by apoptosis. **Joint Bone Spine**, v. 70, n. 3, p. 187-94, Jun 2003.
- RAO, T. & RICHARDSON, B. Environmentally induced autoimmune diseases: potential mechanisms. **Environ Health Perspect**, v. 107 Suppl 5, n., p. 737-42, Oct 1999.
- RIZZI, M., FERRERA, F., FILACI, G. & INDIVERI, F. Disruption of immunological tolerance: role of AIRE gene in autoimmunity. **Autoimmun Rev**, v. 5, n. 2, p. 145-7, Feb 2006.
- RODRIGUES, M. Química antiga e moderna - Tabela Periódica - Mercúrio, o único metal líquido., 2005. Disponível em: < [http://www.moderna.com.br/quimica/quimica\\_am/tperiodica/0001](http://www.moderna.com.br/quimica/quimica_am/tperiodica/0001) >. Acesso em: 24 de maio de 2005.
- ROITT, I., BROSTOFF, J. & MALE, D. **Immunology**. 6. London, UK: Mosby, 2001.
- ROWLEY, B. & MONESTIER, M. Mechanisms of heavy metal-induced autoimmunity. **Mol Immunol**, v. 42, n. 7, p. 833-8, May 2005.
- RUBIN, R. L. & KRETZ-ROMMEL, A. Initiation of autoimmunity by a reactive metabolite of a lupus-inducing drug in the thymus. **Environ Health Perspect**, v. 107 Suppl 5, n., p. 803-6, Oct 1999.
- SANTOS, E. C., JESUS, I. M., BRABO, E. S., LOUREIRO, E. C., MASCARENHAS, A. F., WEIRICH, J., CAMARA, V. M. & CLEARY, D. Mercury exposures in riverside Amazon communities in Para, Brazil. **Environ Res**, v. 84, n. 2, p. 100-7, Oct 2000.

- SANTOS, E. C. O., TRAVASSOS DA ROSA, J. F., JESUS, I. M. & LOUREIRO, E. C. B. A saúde das populações da Amazônia Brasileira. In: YARZABEL, L., ESPINAL, C. & ARAGÓN, L. E. (Ed.). **Enfoque integral de la salud humana en la Amazonia**. Belém: UNAMAZ, 1992. cap., p.560.
- SANTOS, E. C. O., VOLNEY, M. C., BRABO, E. S., LOUREIRO, E. C. B., JESUS, I. M., FAYAL, K. & SAGICA, F. Mercury exposure among Pakaanóva Indians, Amazon Region, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 199-206, 2003.
- SASS, J. B., HASELOW, D. T. & SILBERGELD, E. K. Methylmercury-induced decrement in neuronal migration may involve cytokine-dependent mechanisms: a novel method to assess neuronal movement in vitro. **Toxicol Sci**, v. 63, n. 1, p. 74-81, Sep 2001.
- SATOH, H. Behavioral teratology of mercury and its compounds. **Tohoku J Exp Med**, v. 201, n. 1, p. 1-9, Sep 2003.
- SCHWARTZ, R. H. T cell anergy. **Annu Rev Immunol**, v. 21, n., p. 305-34, 2003.
- SHENKER, B. J., GUO, T. L. & SHAPIRO, I. M. Low-level methylmercury exposure causes human T-cells to undergo apoptosis: evidence of mitochondrial dysfunction. **Environ Res**, v. 77, n. 2, p. 149-59, May 1998.
- \_\_\_\_\_. Mercury-induced apoptosis in human lymphoid cells: evidence that the apoptotic pathway is mercurial species dependent. **Environ Res**, v. 84, n. 2, p. 89-99, Oct 2000.
- SHISHIDO, S. & SUZUKI, T. Estimation of daily intake of inorganic or organic mercury via diet. **Tohoku J Exp Med**, v. 114, n. 4, p. 369-77, Dec 1974.
- SILBERGELD, E. K., SILVA, I. A. & NYLAND, J. F. Mercury and autoimmunity: implications for occupational and environmental health. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 207, n. 2 Suppl, p. 282-92, Sep 1 2005.
- SILVA, A. P. As diversas formas de garimpo de ouro, suas emissões de mercúrio e mecanismos de dispersão nos diversos compartimentos ambientais. In: MATHIS, A. & REHAAG (Ed.). **Conseqüências da Garimpagem no Âmbito Social e Ambiental da Amazônia**. Belém: Cejup, 2001. cap., p.197.
- SILVA, I. A., NYLAND, J. F., GORMAN, A., PERISSE, A., VENTURA, A. M., SANTOS, E. C., SOUZA, J. M., BUREK, C. L., ROSE, N. R. & SILBERGELD, E. K. Mercury exposure, malaria, and serum antinuclear/antinucleolar antibodies in Amazon populations in Brazil: a cross-sectional study. **Environ Health**, v. 3, n. 1, p. 11, 2004.
- SMITH, D. A. & GERMOLEC, D. R. Introduction to immunology and autoimmunity. **Environ Health Perspect**, v. 107 Suppl 5, n., p. 661-5, Oct 1999.
- SNUSTAD, D. P. & SIMONS, M. J. **Fundamentos de Genética**. 2. Guanabara Koogan, 2001.
- SOLEO, L., COLOSIO, C., ALINOVI, R., GUARNERI, D., RUSSO, A., LOVREGGIO, P., VIMERCATI, L., BIRINDELLI, S., CORTESI, I., FLORE, C., CARTA, P., COLOMBI, A., PARRINELLO, G. & AMBROSI, L. [Immunologic effects of

- exposure to low levels of inorganic mercury]. **Med Lav**, v. 93, n. 3, p. 225-32, May-Jun 2002.
- SOLEO, L., VACCA, A., VIMERCATI, L., BRUNO, S., DI LORETO, M., ZOCCHETTI, C., DI STEFANO, R., CANDILIO, G., LASORSA, G., FRANCO, G. & FOA, V. Minimal immunological effects on workers with prolonged low exposure to inorganic mercury. **Occup Environ Med**, v. 54, n. 6, p. 437-42, Jun 1997.
- SWARTOUT, J. Indicador quantitativo de risco de exposição para o mercúrio no meio ambiente. In, *Proceeding-Simpósio Internacional de Avaliação da Contaminação Mercurial na Amazônia*, 1998. Belém. p.37-41.
- TAMASHIRO, H., AKAGI, H., ARAKAKI, M., FUTATSUKA, M. & ROHT, L. H. Causes of death in Minamata disease: analysis of death certificates. **Int Arch Occup Environ Health**, v. 54, n. 2, p. 135-46, 1984.
- TAN, E. M. Autoantibodies as reporters identifying aberrant cellular mechanisms in tumorigenesis. **J Clin Invest**, v. 108, n. 10, p. 1411-5, Nov 2001.
- THEOFILOPOULOS, A. N. The basis of autoimmunity: Part I. Mechanisms of aberrant self-recognition. **Immunol Today**, v. 16, n. 2, p. 90-8, Feb 1995a.
- \_\_\_\_\_. The basis of autoimmunity: Part II. Genetic predisposition. **Immunol Today**, v. 16, n. 3, p. 150-9, Mar 1995b.
- TORMEY, V. J., BUNN, C. C., DENTON, C. P. & BLACK, C. M. Anti-fibrillar antibodies in systemic sclerosis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 40, n. 10, p. 1157-62, Oct 2001.
- TROWSDALE, J. & BETZ, A. G. Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. **Nat Immunol**, v. 7, n. 3, p. 241-6, Mar 2006.
- US/EPA (1997) Mercury Study Report to Congress. Environmental Protection Agency. Washington DC, USA, US/EPA.
- VAN VLIET, E., UHRBERG, M., STEIN, C. & GLEICHMANN, E. MHC control of IL-4-dependent enhancement of B cell Ia expression and Ig class switching in mice treated with mercuric chloride. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 101, n. 4, p. 392-401, 1993.
- VASSALO, D. V., MASSARONI, L., OLIVEIRA, E. M., ROSSONI, L. V., AMARAL, S. M. C. & VASSALO, P. F. Ações tóxicas agudas do mercúrio sobre o aparelho cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 67, n. 1, p. 39-45, 1996.
- VERDIER, F., PATRIARCA, C. & DESCOTES, J. Autoantibodies in conventional toxicity testing. **Toxicology**, v. 119, n. 1, p. 51-8, Apr 11 1997.
- VOGT, T., REGENASS, S., SCHLUMPF, A. & TYNDALL, A. Autoanticorps en rhumatologie. **Forum Médical Suisse**, v. 6, n., p. 977-980, 2006.
- WAKISAKA, I., YANAGIHASHI, T., SATO, M. & NAKANO, A. [Factors contributing to the difference of hair mercury concentrations between the sexes]. **Nihon Eiseigaku Zasshi**, v. 45, n. 2, p. 654-64, Jun 1990.



- WHITACRE, C. C. Sex differences in autoimmune disease. **Nat Immunol**, v. 2, n. 9, p. 777-80, Sep 2001.
- WHITEKUS, M. J., SANTINI, R. P., ROSENSPIRE, A. J. & MCCABE, M. J., JR. Protection against CD95-mediated apoptosis by inorganic mercury in Jurkat T cells. **J Immunol**, v. 162, n. 12, p. 7162-70, Jun 15 1999.
- WHO (1989) Mercury – environmental aspects. Geneva, World Health Organization - Environmental Health Criteria 86.
- \_\_\_\_\_ (1990) Methylmercury. Geneva, World Health Organization - International Program in Chemical Safety.
- \_\_\_\_\_ (1991) Environmental Health Criteria 118: Inorganic Mercury. Geneva, World Health Organization - International Program in Chemical Safety.
- \_\_\_\_\_ (2000) Mercury. Air Quality Guidelines. 2 ed. Copenhagen, World Health Organization - Regional Office for Europe.
- WIZEMANN, T. M. & PARDUE, M. L. **Exploring the Biological Contributions to Human Health: Does Sex Matter?** : The National Academies Press, 2001.
- YANG, J. M., BASERGA, S. J., TURLEY, S. J. & POLLARD, K. M. Fibrillarin and other snoRNP proteins are targets of autoantibodies in xenobiotic-induced autoimmunity. **Clin Immunol**, v. 101, n. 1, p. 38-50, Oct 2001.
- YOLE, M., WICKSTROM, M. & BLAKLEY, B. Cell death and cytotoxic effects in YAC-1 lymphoma cells following exposure to various forms of mercury. **Toxicology**, v. 231, n. 1, p. 40-57, Feb 28 2007.
- ZEHN, D. & BEVAN, M. J. More promiscuity resulting in more tolerance. **Nat Immunol**, v. 8, n. 2, p. 120-2, Feb 2007.

## **ANEXOS**