



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOLOGIA CELULAR

ANDRÉA DO SOCORRO CAMPOS DE ARAÚJO SOUSA

**ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DOS RINS DE MACACOS PREGO,
Cebusapella (Linnaeus 1758) APÓS EXPOSIÇÃO CRÔNICA A BAIXAS
DOSES DE METILMERCÚRIO.**

Belém
2014

ANDRÉA DO SOCORRO CAMPOS DE ARAÚJO SOUSA

**ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DOS RINS DE MACACOS PREGO,
Cebusapella (Linnaeus 1758) APÓS EXPOSIÇÃO CRÔNICA A BAIXAS
DOSES DE METILMERCÚRIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Área de Concentração: Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de L. da Silveira.

Belém 2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação Internacional (CIP)

SOUSA, Andréa do Socorro Campos de Araújo, 1969

Alterações Histopatológicas dos rins de macacos prego, *Cebus apella* (Linnaeus 1758) após exposição crônica a baixas doses de metilmercúrio / Andréa do Socorro Campos de Araújo Sousa. – 2014.

Orientador: Luiz Carlos de Lima da Silveira.

Tese (Doutorado) Universidade Federal do Pará, Pós-Graduação. Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2014

1. Metilmercúrio Toxicologia. 2. Rins Doenças. 3. *Cebus apella*. 4, Modelos animais em pesquisa. I. Título.

CDD 22. Ed. 615. 925663

ANDRÉA DO SOCORRO CAMPOS DE ARAÚJO SOUSA

**ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS DOS RINS DE MACACOS PREGO,
Cebusapella (Linnaeus 1758) APÓS EXPOSIÇÃO CRÔNICA A BAIXAS DOSES
DE METILMERCÚRIO.**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito obrigatório para obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima da Silveira – Orientador
Instituto de Ciências Biológicas – ICB-UFPA

Prof. Dr. Leonidas Dias Braga Júnior - Examinador
Instituto de Ciências da Saúde – ICS-UEPA

Profa. Dra. Setsuko Noro dos Santos - Examinadora
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNB - Examinadora

Profa. Dra. Maria da Conceição Nascimento Pinheiro
Núcleo de Medicina Tropical – NMT-UFPA

Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima - Examinador
Instituto de Ciências Biológicas – ICB-UFPA

Dr. Anderson Raiol Rodrigues - Examinador
Núcleo de Medicina Tropical – NMT-UFPA

Belém
2014

Ao meu Adorado Deus, dirijo a minha maior gratidão. “Porque d’Ele e por Ele e para Ele são todas as coisas; glória pois, a Ele eternamente. Amém.”

Romanos 11:36

Aos meus pais, Francisco e Oneide, por terem sabiamente me conduzido pelo caminhado conhecimento.

Aos meus irmãos queridos Eugênio, Ana Patrícia, Francisco Júnior e André Felipe por sempre acreditarem na realização deste sonho.

“Ainda que eu falasse a língua dos anjos, sem amor de nada seria, pois o amor, tudo sofre, tudo crê, tudo espera e tudo suporta, passarão todas as coisas, mas permanecerão: a fé, a esperança e o amor, sendo o mais importante o Amor.”

Coríntios 13

Ao meu Amado esposo Homero Sousa, ao Homero Augusto e a Nilce, que representam minha segurança em todos os aspectos, meus companheiros e incentivadores incondicionais, obrigada por me fazerem sentir tão amada em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima da Silveira, pela oportunidade concedida, pelo suporte técnico, pelo aprimoramento científico e por ter contribuído na minha formação acadêmica, muito obrigada.

Ao Dr. Leonidas Braga Dias Júnior, pelo desprendimento ao escolher me apoiar, por suas orientações sempre pertinentes, por todo o conhecimento tão gentilmente disponibilizado e por ter aberto as portas do seu Laboratório de Patologia para que eu pudesse desenvolver grande parte deste trabalho, meus eternos agradecimentos.

À Profa. Dra. Setsuko Noro dos Santos, pela amizade firmada durante esta empreitada e pela força que sempre me deu afim de eu levar ao termo esse projeto, muito obrigada.

À Profa. Dra. Maria Conceição Nascimento Pinheiro por ter nos oportunizado as análises do mercúrio no Laboratório de Toxicologia Ambiental e saúde Humana do Núcleo de medicina Tropical da Universidade Federal do Pará e por todas as contribuições necessárias ao bom desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário João de Barros Barreto pelo suporte dado durante as análises bioquímicas realizadas no sangue dos animais do experimento.

À Dra. Leila Cristina dos Santos Tembra, pela amizade, carinho e atenção dada durante a realização deste estudo e toda a sua equipe do Laboratório Paulo Azevedo que sempre estiveram disponíveis a nos ajudar e em especial à Bióloga Bruna pela ajuda na realização das reações imunohistoquímicas, meus sinceros agradecimentos.

À Profa. Dra. Rossineide Martins da Rocha por seus préstimos na liberação do fotomicroscópio usado na obtenção das fotos desta tese.

Ao Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima, pela amizade, pelas correções textuais e pela ajuda valiosa e colaboração na documentação fotográfica deste trabalho.

Ao Dr. José Augusto Carneiro Muniz, do Centro Nacional de Primatas, por ter nos disponibilizado todo o seu acervo pessoal dos dados da espécie ***Cebusapella***, e por ter sido um grande colaborador na manipulação dos animais usados neste experimento, obrigada.

Ao Prof. MsC. Éder Martins da Rocha, pelo empenho e primor das análises estatísticas, meus agradecimentos.

Ao Programa de Pós Graduação em Neurociências e Biologia Celular na pessoa do Dr. Rommel Burbano e da Sra. Socorro Andrade por toda a ajuda oferecida e pela dedicação com a qual sempre me atenderam.

Aos Professores Ademir Júnior, Márcia Freitas e Fabrícia Sizo, meus amigos de perto e de longe pelos cuidados demonstrados através da ajuda, apoio e orações, durante todo o percurso da realização deste projeto, não há palavras que possam expressar o meu agradecimento.

Ao Bioterista Sr. Amarildo Melo que sempre nos atendeu com humildade e atenção durante a contenção dos animais no Biotério do ICB da UFPA.

Muito Obrigada nunca será suficiente para demonstrar a magnitude do que eu recebi de todos os colaboradores que direta ou indiretamente têm participação neste trabalho. Peço a Deus que os recompense à altura.

"Mesmo quando na trajetória de nossas vidas tudo parece tão estranho ao nosso redor, persistir, confiar e prosseguir sempre é o melhor caminho."

Andréa Sousa

SUMÁRIO**RESUMO****ABSTRACT****LISTA DE FIGURAS****LISTA DE TABELAS****LISTA DE ABREVIATURAS**

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O MERCÚRIO	17
1.2 HISTÓRICO DO MERCÚRIO	20
1.3 O MERCÚRIO E SEUS COMPOSTOS	22
1.4 AS GRANDES EXPOSIÇÕES MERCURIAIS NO MUNDO	27
1.5 A EXPOSIÇÃO MERCURIAL NA AMAZÔNIA BRASILEIRA	30
1.6 TOXICOCINÉTICA DO MERCÚRIO	32
1.6.1 Absorção	33
1.6.2 Distribuição e armazenamento	34
1.6.3 Excreção	38
1.7 TOXICODINÂMICA DO MERCÚRIO	39
1.8 OS EFEITOS DO MERCÚRIO SOBRE O PARÊNQUIMA RENAL	40
1.9 VALORES LIMITES NO ORGANISMO DE HUMANOS E DE PRIMATAS NÃO HUMANOS	42
1.10 OS PRIMATAS NÃO HUMANOS COMO MODELOS EXPERIMENTAIS	43
2.0 OBJETIVOS	47
2.1 OBJETIVO GERAL	47
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS	48

3.1 CARACTERÍSTICAS DO ESTUDO	48
3.2 MODELO ANIMAL	48
3.3 EXPOSIÇÃO DOS ANIMAIS AO METILMERCÚRIO	50
3.4 PROCEDIMENTOS ANESTÉSICOS, CIRÚRGICOS E PERFUSÃO INTRACARDÍACA	51
3.5 COLETA DE SANGUE E ANÁLISE BIOQUÍMICA	52
3.5.1 Coleta de sangue	52
3.5.2 Análise bioquímica da Creatinina	53
3.5.3 Análise bioquímica da Ureia	53
3.5.4 Análise de mercúrio total no sangue	54
3.6 PROCEDIMENTOS PRÉ-ANALÍTICOS	54
3.6.1 Descontaminação das vidrarias	54
3.6.2 Processamento da amostra	55
3.6.3 Preparação das soluções para a curva de calibração	56
3.6.4 Características e fundamento do equipamento	56
3.6.5 Procedimentos de análise no equipamento	57
3.7 PROCEDIMENTOS DE CONTROLE DE QUALIDADE ANALÍTICA	58
3.8 PROCEDIMENTOS HISTOPATOLÓGICOS	59
3.8.1 Processamento para inclusão em parafina.....	59
3.8.2 Coloração pela Hematoxilina e Eosina (HE)	59
3.8.3 Coloração pelo ChromotropAniline Blue (CAB)	60
3.8.4 Reação do PeriodicAcidSchiff (PAS)	61
3.9 PROCEDIMENTOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS	62
3.9.1 Preparo das amostras	62
3.9.2 Recuperação antigênica	62
3.9.3 Incubação com anticorpos primário e secundário	63
3.9.4 Tratamento com a diaminobenzidina (DAB)	64
3.9.5 Coloração nuclear e montagem	64
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	65
3.11 ANÁLISE QUALITATIVA	65

4 RESULTADOS	67
4.1 AVALIAÇÃO DA PERDA DE MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS	67
4.2 DOSAGEM DO MERCÚRIO TOTAL EM AMOSTRAS DE SANGUE	68
4.3 EFEITOS BIOQUÍMICOS DA EXPOSIÇÃO MERCURIAL	69
4.4 MORFOLOGIA DO MACACO-PREGO (<i>Cebusapella</i>)	71
4.4.1 Descrição macroscópica dos rins	71
4.4.2 Descrição histológica dos rins	72
4.4.3 Efeitos histopatológico da exposição do metilHg nos rins	76
5 DISCUSSÃO	84
5.1 CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS	84
5.2 O MODELO ANIMAL	85
5.3 EFEITO NO PESO DOS ANIMAIS	85
5.4 ANÁLISE NO MERCÚRIO TOTAL	87
5.5 INTERAÇÕES ENTRE O MERCÚRIO E A FUNÇÃO RENAL	88
5.6 ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS	91
6 CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
ANEXOS	115

RESUMO

O mercúrio representa um grande risco ambiental e ocupacional constituindo um problema para a saúde humana na região Amazônica. Muito embora estudos tenham demonstrado que o mercúrio compromete vários tecidos e órgãos, os rins constituem-se órgãos-alvo para a toxicidade do metal. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos de uma exposição crônica a baixas doses de metilmercúrio sobre o parênquima renal de macacos *Cebus apella*, machos, adultos, expostos durante 120 dias consecutivos com doses diárias via oral, de 1,5 µg na dieta. As concentrações de mercúrio total no sangue dos animais foram monitoradas a cada 30 dias usando espectrofotômetro de absorção atômica a vapor frio (Hg 201), comparando ao grupo controle. O método utilizado para análise histopatológica foi a inclusão em parafina com coloração pela Hematoxilina e Eosina, Tricrômico de CAB e PAS. As investigações imuno-histoquímicas compreenderam as reações para a detecção de actina para músculo liso (IA4), actina muscular (HHF35) e pancitoqueratina (AE1 e AE2). Os resultados obtidos demonstraram que o tratamento com mercúrio causou diferença significativa ($P < 0,001$) entre os grupos exposto e controle. Quanto aos níveis de Hg total, foram observadas alterações histopatológicas com características de hidropsia nos Túbulos Proximais, um achado comum na exposição ao metilmercúrio em outras espécies, sem alterações significativas nas concentrações de creatinina e ureia. O teste de correlação de Person demonstrou uma forte relação negativa entre a concentração de mercúrio e a perda de massa corporal dos animais ($P < 0,0001$). Outro achado importante foi a diminuição do número de células mesangiais, o que sugere que o metilmercúrio executou a sua nefrotoxicidade atingindo não somente o sistema tubular renal, como também as células do mesângio glomerular, fazendo-se necessário um maior aporte de estudos experimentais para esclarecer qual o nível de alerta da concentração de mercúrio é capaz de desencadear mecanismos de agressão e injúria renal em indivíduos expostos ao metilmercúrio.

Palavras chave: metilmercúrio, nefrotoxicidade, macacos, hidropsia, mesângio.

ABSTRACT

Mercury has been a major environmental and occupational risk and it still remains a problem for human health in the Amazon region. Although studies have shown that mercury affects various tissues and organs, kidneys are the target organs to the metal toxicity. Thus, the aim of this study was to investigate the effects of chronic exposure to low doses of methylmercury on renal parenchyma of *Cebusapella*, adult males exposed during 120 consecutive days with daily oral doses of 1.5 µg in the diet. The concentrations of total mercury in the animals' blood were monitored every 30 days using a cold vapor atomic spectrophotometer (201 Hg), compared to the control group. The method used for histopathological analysis was the immersion in paraffin for staining with hematoxylin and Eosin, Masson's CAB and PAS. The immunohistochemical investigations included reactions for detection of smooth muscle actin (IA4), muscle actin (HHF35) and cytokeratin (AE1 and AE2). The results showed that treatment with mercury caused significant differences ($P < 0.001$) between the exposed and control groups. As for total Hg levels, histopathological changes just like hydrops in Proximal tubules were observed, a common finding in methylmercury exposure in other species, with no significant changes in creatinine and urea concentrations. The Person correlation test showed a strong negative relationship between mercury concentration and animal body weight loss ($P < 0.0001$). Another important finding was the decrease in mesangial cells number, which suggests that methylmercury executed its nephrotoxicity, affecting not only the renal tubular system, as well as the glomerular mesangium cells, making necessary a greater amount of experimental studies to clarify which mercury concentration alert level is capable of triggering aggression mechanisms and kidney injury in subjects exposed to methylmercury.

Key -words :methylmercury , nephrotoxicity , monkeys , hydrops , mesangium

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mercúrio Elementar	19
Figura 2. Diferentes formas de intoxicação por mercúrio	26
Figura 3. Resíduos da indústria química de acetaldeído no Japão	27
Figura 4. <i>Cebusapella</i>	45
Figura 5. Digestão ácida em placa aquecedora	55
Figura 6. Equipamento Hg 201	56
Figura 7. Registradora com os picos de concentração de mercúrio	58
Figura 8. EPT LINK modelo 1027 da DAKO S/A	63
Figura 9. Efeitos da exposição crônica de metilHg, sobre a perda de massa corporal em <i>Cebusapella</i> , administrado por via oral durante 120 dias consecutivos	67
Figura 10. Efeitos da exposição crônica de metilHg, sobre a correlação de perda de massa corporal e níveis de HgT em <i>Cebusapella</i> , administrado por via oral durante 120 dias consecutivos	69
Figura 11. Estrutura anatômica dos rins de macaco <i>Cebusapella</i>	72
Figura 12. Fotomicrografias de rins de macaco prego	73
Figura 13. Fotomicrografias de glomérulos renais	74
Figura 14. Fotomicrografias dos Túbulos Proximais e Distais do parênquima renal de <i>Cebusapella</i> (HE)	75
Figura 15. Fotomicrografia das alças de Henle espessas e delgadas coradas pelo PAS	76
Figura 16. Fotomicrografias de glomérulos renais coradas pelo CAB	77
Figura 17. Fotomicrografias de parênquima renal de <i>Cebusapella</i> com degeneração hidrópica	78

Figura 18. Fotomicrografias de lamínas de rins de macaco coradas pelo PAS evidenciando a Borda em Escova	79
Figura 19. Fotomicrografias de Glomérulos renais de <i>Cebusapella</i> , evidenciando as células mesangiais, coradas pelo PAS.	80
Figura 20. Fotomicrografias de reações imuno-histoquímicas para detecção de actina de músculo liso (IA4).....	81
Figura 21. Fotomicrografias de reações imuno-histoquímicas para detecção de actina muscular (HHF35),	82
Figura 22. Fotomicrografia de rins de <i>Cebusapella</i> após reação imuno-histoquímica para pancitoqueratina (Ae1 e AE2).....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Níveis de Mercúrio total em *Cebusapella* controle e expostos ao metilHg 68

Tabela 2. Valores médios de creatinina sérica em macacos *Cebusapella* controle e expostos ao metilHg no período de 0, 30, 60, 90 e 120 dias 70

Tabela 3. Valores médios de ureia sérica em macacos *Cebusapella* controle e expostos ao metilHg no período de 0, 30, 60, 90 e 120 dias 70

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	micrograma
AgII	Angiotensina II
Ca^{2+}	íon Cácio
CAB	Chromotrop Aniline Blue
Cl^-	íonCloro
CoA	Co enzima A
DAB	Diamino Benzydina
dL	decilitro
EDTA	Etileno Diamino Tetra Acetato
ERTO	Espécie Reativa Tóxica do Oxigênio
H_2SO_4	Ácido Sulfúrico
HClO_4	Ácido Perclórico
HE	Hematoxilina e Eosina
Hg0	Mercúrio metálico
$\text{Hg}^{1+}, \text{Hg}^{2+}$	Sais inorgânicos do mercúrio
HgCl_2	Cloreto de Mercúrio
HgS	Sulfeto de Mercúrio
HgT	Mercúrio Total
HN_2OH	Hidroxilamina
HNO_3	Ácido Nítrico
ICA	Insuficiência Renal Crônica
IRA	Insuficiência Renal Aguda
K^+	íon Potássio
KmnO_4	Permanganato de Potássio
M	Molaridade
mcg	micrograma
metilHg	Metilmercúrio
Na^+	íon Sódio
ng	nanograma
nm	nanômetro
O_2	Oxigênio
O_3	Ozônio
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan Americana da Saúde
PAS	PeriodicAcidSchiff
PFA	Para Formaldeído
ppb	Parte Por Bilhão
ppm	Parte Por Milhão
rpm	rotações por minuto
RS	Retículo Sarcoplasmático
S^{2-}	Enxofre
SH	Sulfidril
SnCl_2	Cloreto Estanhoso
SO_4^{2-}	Sulfato
TD	Túbulo Distal
TP	Túbulo Proximal

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O MERCÚRIO

A toxicidade mercurial desponta como um objeto de crescente interesse e controvérsias para as áreas das ciências médicas (ROONEY, 2007). Tem representado ao longo dos anos um problema para o meio ambiente devido o uso frequente de compostos e pela sua característica volátil, que lhe permite interagir com os ciclos biogeoquímicos e ser incorporado às cadeias tróficas elevando as concentrações na sua forma metilada ou orgânica, o metilHg, que lhe possibilita permanecer nos ambientes por muitos anos (AZEVEDO; NASCIMENTO e CHASIN, 2003), englobando um amplo campo de pesquisa, não somente na área médica como na biológica (MEINERTZ *et al.*, 2011; ROCHA *et al.*, 2011).

Segundo Li e colaboradores, (2010) o mercúrio tem um vasto uso nas diferentes esferas da atividade humana. É empregado na medicina moderna como conservante de vacinas ou medicamentos (BARREGARD *et al.*, 2011); Também é utilizado em cosméticos bem como nas indústrias no mundo inteiro, principalmente na metalurgia, petroquímica, na produção de papel, além do seu amplo uso na agricultura como pesticidas e adubos. De acordo com os estudos de Torres *et al.* (2011) o uso mais frequente do mercúrio em países do terceiro mundo deve-se principalmente a exploração de ouro e todas as atividades envolvidas na confecção da liga.

Outra forma de contato direto do homem com subprodutos do mercúrio, é o seu emprego em amálgamas nas restaurações dentárias e ao longo dos

anos tem sido objeto de estudos de intoxicação de profissionais que manipulam estes materiais (STEHLING, LIMA e LIMA, 2011; THYGESEN *et al.*, 2011).

O vasto emprego ocupacional causa a emissão natural deste metal, conferindo ao mercúrio grande importância na toxicologia ocupacional e ambiental (FARIA, 2003; BARKAY e DOBLER, 2005; DRUM, 2009).

O mercúrio, de símbolo Hg é um metal pesado, líquido à temperatura ambiente. Apresenta cor prateada, (derivado do latim *Hydrargirus* – prata líquida), capacidade de oxidação lenta quando exposto a umidade. Possui densidade treze vezes superior a da água. É volátil e apresenta grande afinidade pelos metais, inclusive o ouro, formando compostos sólidos denominados amálgamas (BERLIN *et al.*, 1986; SALGADO, LARINI e LEPERA, 1987), sendo que todas as formas do mercúrio são tóxicas, não se conhecendo nenhuma função fisiológica benéfica para o homem ou qualquer outro ser vivo (RODRIGUES *et al.*, 1994).

O mercúrio pode apresentar-se em três formas, o mercúrio inorgânico, metálico ou elementar (Hg^0); sais inorgânicos (Hg^{1+} e Hg^{2+}) e compostos orgânicos como o etilmercúrio, o fenilmercúrio e o metilmercúrio (metilHg) (MICARONI; BUENO e JARDIM, 2000).

O mercúrio pode ser encontrado naturalmente no ambiente, originado da evaporação da água, desgaseificação da crosta terrestre e erupções vulcânicas. A solubilidade, reatividade e toxicidade deste metal variam entre as formas que se apresenta (GOLDMAN e SHANNON, 2001).

A toxicidade mercurial desponta então, como um objeto de crescente interesse e controvérsias (ROONEY, 2007), englobando um amplo campo de

pesquisa, nas áreas, biomédicas, biológicas e ambientais (MEINERTZ *et al.*, 2011; ROCHA *et al.*, 2011).

As estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam que no Brasil, no auge da exploração do ouro nos garimpos amazônicos, foram lançadas mais de 100 toneladas/ano do metal no ambiente (CÂMARA; SILVA e GALVÃO,2000).

O mercúrio elementar, comumente conhecido como mercúrio metálico (Figura 1), é utilizado na fabricação de termômetros, amálgamas dentários, termostatos, relógios, barômetros, baterias, dentre outros (SALGADO, 1988; SAQUAY, 1997).



Figura 1. Mercúrio elementar
Fonte:<http://www.cq.ufam.edu.br>.
Acesso em 25.01.2012

Outras formas como o cloreto mercurioso foi empregado na produção de cremes antissépticos, diurético e catártico e o citrato mercúrico foi utilizado na fabricação do chapéu de feltro há mais de quatrocentos anos (MICARONI; BUENO e JARDIM, 2000).

1.2 HISTÓRICO DO MERCÚRIO

O mercúrio é um dos elementos químicos mais conhecidos no mundo desde a antiguidade (BATTIGELLI, 1994). O termo mercúrio é uma homenagem ao planeta que recebe o mesmo nome. Também era usado na mitologia romana designando Mercúrio como o deus dos trabalhadores e do comércio. Ele era o mensageiro dos deuses Júpiter e Maia, a filha do titã Atlante.

O mercúrio foi grandemente utilizado por longos anos para tratar diversas doenças, como o principal componente de medicamentos diuréticos, bactericidas, antissépticos, laxantes e unguentos (CLARCKSON, 1972; WALDRON, 1983; KLAASEN, 1990).

Galvão e Corey (1987) descreveram que o mercúrio era utilizado na medicina antiga pelo filósofo grego Hipócrates, há pelo menos 400 a.C. Na idade média, a crença nos poderes mágicos do elemento se expandiu para medicina como uma nova tentativa de cura para doenças sendo que, até as primeiras décadas do século XX, o mercúrio ainda era usado no tratamento da sífilis (MALM *et al.*, 1991).

O mercúrio foi bastante utilizado como pigmento em pintura pelos gregos e índios americanos. No entanto, foram os gregos os pioneiros a dominarem a técnica de separação do mercúrio metálico a partir do cinábrio (HgS), por condensação após aquecimento (MARQUES, 2002).

Os chineses acreditavam que medicamentos contendo cinábrio poderiam prolongar a vida, indicando a possibilidade de que várias pessoas

incluindo alguns imperadores tenham sofrido intoxicação pelo mercúrio (BATTIGELLI, 1994).

Os efeitos tóxicos do mercúrio eram conhecidos desde o século XVI e o primeiro estudioso a descrever os mais importantes sinais e sintomas da intoxicação humana por mercúrio metálico foi Paracelsus (BEUTER e EDWARDS, 1998).

Meados do século XVIII, Ramazzini, o pai da medicina ocupacional, fez uma investigação criteriosa e relacionou a indisposição física de pessoas nos seus locais de trabalho, ao uso de metais, incluindo o mercúrio metálico (AZEVEDO, 1989; JONES, 1999).

Diversas manifestações psiquiátricas, tais como timidez excessiva, irritabilidade e acessos de raiva, foram atribuídas à intoxicação pelo mercúrio metálico, o que originou a expressão “*tão maluco quanto um chapeleiro*”, fazendo alusão ao personagem da fábula “Alice no país das maravilhas” onde o personagem “o chapeleiro maluco” foi baseado nos danos cerebrais que acometiam os fabricantes de chapéus que usavam o mercúrio no seu ofício (SHRADER e HOBBS, 1983; GOLDMAN e SHANNON, 2001).

O mercúrio foi tão amplamente usado, que lhe foram atribuídas várias propriedades (MALM *et al.*, 1991), como na utilização deste metal e seus compostos pelas indústrias, em especial na agricultura em pesticidas e fungicidas, o que ocasionou ao longo dos anos sérios problemas de contaminação de solos, águas e sedimentos, afetando assim os seres vivos (CLARKSON, 1993, 1997; HEAVEN e ILYSHCHENKO, 2000).

1.3 O MERCÚRIO E SEUS COMPOSTOS

Segundo Berlin et al.,(1975), o mercúrio metálico (Hg^0) apresenta-se líquido a temperatura ambiente com pouca capacidade de se dissolver na água e a precipitação da atmosfera para a superfície terrestre ocorre após oxidação do Hg^0 a íon mercúrico (Hg^{2+}). Após sofrer oxidação, parte deste mercúrio, cerca de 60%, é depositada no solo e o restante nos leitos fluviais, oceanos e gelo, originando três estados de oxidação, que dependendo do potencial de *redox* da solução e dos tipos de compostos envolvidos, podem formar diferentes complexos com o íon mercúrio, principalmente aqueles que apresentam grupamentos sulfidrilas (MOREL, KRAEPIEL e AMYOT 1998).

A transformação ambiental do mercúrio ocorre por reações de oxirredução biótica e abiótica e também pela fotólise dos organomercuriais. Quando liberado no ar, o vapor de mercúrio metálico (Hg^0) é oxidado pelo ozônio (O_3), sob ação da luz solar, a outras formas, como o mercúrio bivalente (Hg^{2+}) que é removido da atmosfera por precipitação (MAGOS *et al.*, 1987; SWARTOUT, 1998).

A permanência do Hg^0 na atmosfera varia de seis dias a dois anos, dependendo das condições locais. Em virtude da grande variação de tempo de permanência do metal na atmosfera, a probabilidade da contaminação ambiental estende-se às áreas distantes do foco da contaminação (SWARTOUT, 1998; SILVA, 2000). Desta feita mesmo estando afastadas das indústrias que seriam o foco da concentração do mercúrio, estas áreas podem ser atingidas, tornando o metal e seus compostos responsáveis por contaminações em níveis globais. (MOREL, KRAEPIEL e AMYOT, 1998).

O mercúrio é catalisado por bactérias redutoras de íons sulfatos (SO_4^{2-}), este processo é conhecido como metilação. Esta ação ocorre primeiramente através da membrana lipídica dos procariotos (MOREL, KRAEPIEL e AMYOT, 1998; DAVID *et al.*, 2009). Uma vez transportados, os grupamentos metila ligam-se ao Hg, formando o metilHg que se acumula no interior destes procariotos. Posteriormente, o composto é liberado, difundindo-se e ligando-se às proteínas da biota aquática, alcançando, então, a cadeia alimentar com consequente biomagnificação (GILMOUR e HENRY, 1991). Assim a captação do metal via procariotos é a etapa fundamental para o processo de metilação e posterior bioacumulação do Hg (MOREL, KRAEPIEL e AMYOT, 1998).

Bactérias redutoras de enxofre são as principais responsáveis pela metilação de qualquer forma de Hg que entra em contato com águas de superfície, especialmente em condições anaeróbias. Leveduras, como *Cândida sp* e *Saccharomyces cerevisiae*, que crescem em condições de baixo pH são capazes de metilar o mercúrio e reduzir o íon mercúrico a forma elementar (GARCIA, ORTA e SUAREZ, 1998).

Os compostos de metilcobalamina produzidos pela síntese bacteriana parecem estar envolvidos na metilação não enzimática dos íons inorgânicos, porém a taxa de formação de metilHg por este processo é limitada pela concentração de íons mercuriais inorgânicos e concentração de oxigênio (O_2) dissolvido no meio (GARCIA, ORTA e SUAREZ, 1998).

No intervalo de pH de 4 a 9 e na presença de enxofre (S^{2-}) forma-se o sulfeto de mercúrio (HgS), que é pouco solúvel em água e, por isso, precipita, reduzindo, assim, sua disponibilidade. No entanto, em pH abaixo de 4, a

disponibilidade do íon sulfeto diminui, uma vez que ele se liga a outros compostos formando novos complexos, inibindo a formação do HgS, favorecendo o aparecimento do metilHg e aumentando, assim, a biodisponibilidade potencial para organismos aquáticos (JARDIM, 1999; ZEIDEMANN *et al.*, 1999).

Os peixes menores absorvem metilHg da água e dos alimentos da flora e da fauna. A seguir, eles servem de alimento aos peixes maiores, os quais vão concentrando maior quantidade, à medida que alcançam o topo da cadeia alimentar aquática, desta forma, grandes espécies predadoras como o atum contêm mais metilHg em seus tecidos do que os peixes menores, não predadores. Ressalta-se que os peixes mais velhos tem um tempo maior para acumular metilHg (GILMOUR e HENRY, 1991; BIDONE *et al.*, 1997).

Na Amazônia, vários estudos demonstraram concentrações variáveis de metilHg em diferentes espécies de peixes, sendo as concentrações mais elevadas nas espécies predadoras (PINHEIRO *et al.*, 2007). Muitas espécies consumidas frequentemente pelas comunidades ribeirinhas da região do Tapajós apresentaram concentrações de metilHg acima do nível permitido para o consumo humano, que é de 0,5 ppm, de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2010).

No solo, os compostos de mercúrio podem apresentar as mesmas transformações biológicas e químicas semelhantes as que ocorrem nas águas. Sabe-se que os solos com níveis elevados de íons cloro (Cl⁻) reduzem o processo de metilação do mercúrio. Entretanto, em ecossistemas de água doce e estuários, a presença deste íon pode acelerar a liberação do mercúrio nos

sedimentos provenientes do solo (UNAMAZ, 1994; IKINAGURA e AKAGI, 1999; CÂMARA, SILVA e GALVÃO, 2000).

Devido a sua elevada densidade, o excesso de Hg, nas áreas de garimpos, é precipitado no fundo dos cursos d'água, armazenando-se inicialmente nos sedimentos. Nesta etapa do ciclo, por ação de bactérias aeróbias e anaeróbias, há conversão a metilHg, atingindo, então, a cadeia alimentar e por consequência, o homem (BIDONE *et al.*, 1997).

Segundo Gilmour e Henry (1991), nos sedimentos, o metilHg é consideravelmente mais tóxico que o mercúrio inorgânico, apesar de representar, em média, apenas cerca de 1,5% do mercúrio total. Sólidos em suspensão, ricos em Hg^{2+} , são transportados para o sedimento com posterior metilação. As bactérias presentes nos sedimentos podem também desmetilar o metilHg, via reação inversa. O balanço das reações de metilação e desmetilação, em função das condições químicas ambientais, determina se um ambiente atuará como fonte ou sumidouro de metilHg.

Na região amazônica, estudos realizados na reserva de ouro em Cachoeira do Piriá, no Pará, o solo e sedimento do rio ainda mostram elevadas concentrações de Hg total, mesmo estando a atividade garimpeira em declínio há algumas décadas (LIMA *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2003). Outras localidades como a Serra Pelada, também no estado do Pará, na cratera resultante da atividade garimpeira, Corbett *et al.* (2003), detectaram elevadas concentrações de mercúrio total no solo e também no sedimento do lago.

Desta forma, todos os seres vivos, inclusive o homem, constantemente entram em contato com pequenas doses de mercúrio ou alguma de suas formas químicas (CLARKSON, 1993, 1997; TORRES *et al.*, 2011).

As pessoas podem ser expostas ao mercúrio através da água e alimentos contaminados, entretanto diferentes formas de Hg (vapor, mercúrio inorgânico e o metilmercúrio) têm sido associadas à contaminação humana em áreas de extração de ouro (TORRES *et al.*, 2011).(Figura 2).

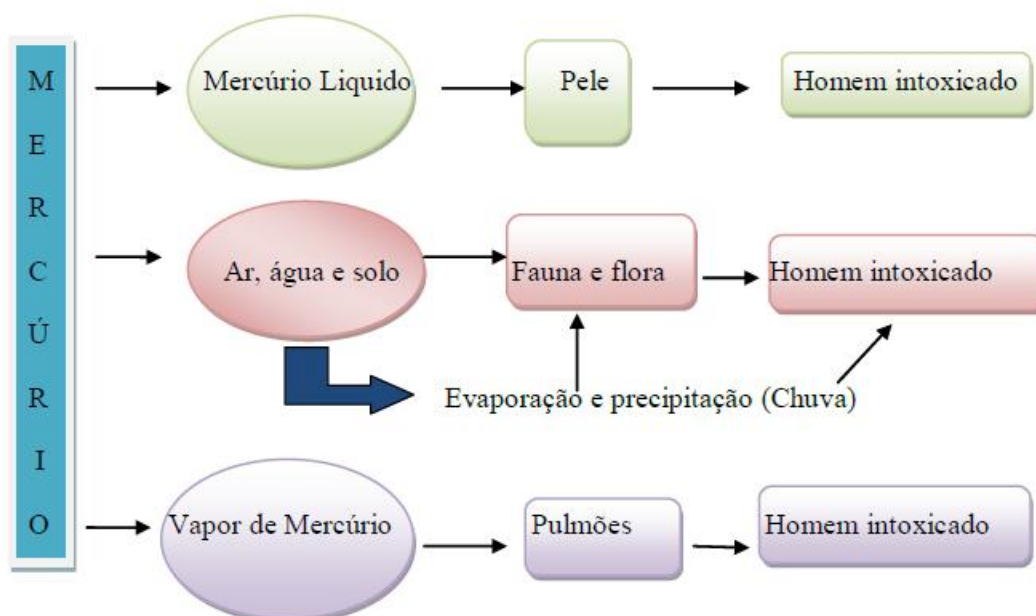


Figura 2. Diferentes formas de intoxicação por mercúrio.

Fonte: <http://www.areaseq.com/toxicos/mercurio>. Acesso em 13.11.2011

De acordo com Souza *et al.*, (2003), o mercúrio pode intoxicar o homem, através da atividade ocupacional, cuja exposição ocorre pela inalação do vapor de Hg e/ou absorção cutânea ou através do consumo de grãos e peixes contaminados.

1.4 AS GRANDES EXPOSIÇÕES MERCURIAIS NO MUNDO

No mundo foram relatados diversos acidentes ocasionados pelo uso indiscriminado do mercúrio, sendo os mais graves os que ocorreram no Japão, nas províncias de Minamata (1953) e posteriormente em Niigata (1965) (HARADA, 1998). Nestas cidades, a causa de intoxicação, com danos diretos a saúde humana, foi relacionada à produção industrial de aldeído acético, onde o mercúrio era utilizado como catalisador. Na província de Minamata, o mercúrio foi metilado a metilHg nos esgotos das fábricas e lançado diretamente nas águas da baía de Minamata, acumulando-se no sedimento, a partir daí, atingiu a cadeia alimentar, concentrando-se nos peixes, que foram ingeridos por humanos, causando um quadro de sinais e sintomas denominado de doença de Minamata (HARADA *et al.*, 1999).

Este acidente ambiental ocorreu porque a Chisso Fertilizer Co. Ltda (uma das maiores indústrias do Japão, que produzia fertilizantes químicos, resinas sintéticas, plásticos e compostos químicos) utilizava o mercúrio como um subproduto na planta Chisso Minamata (HARADA, 1995). (Figura 03).



Figura 3 - Resíduos da indústria química de acetaldeído no Japão

Fonte: www.Blogsempauta.com.br. Acesso em 14.03.2013

Segundo Harada (1982), o aumento de casos de crianças com paralisia cerebral chamou atenção das autoridades da saúde do Japão no início da catástrofe em Minamata. As mães eram assintomáticas ou no máximo oligossintomáticas, porém abortos, natimortalidade, microcefalia, atraso psicomotor, cegueira, surdez e convulsão foram achados típicos deste quadro.

A doença de Minamata passou, então, a ser, erroneamente considerada, sinônimo de intoxicação por metilHg. No entanto, o primeiro óbito relatado por intoxicação com um composto organomercurial ocorreu em 1863, quando dois químicos tentaram determinar o número de oxidação do dimetilHg. A publicidade em torno deste assunto foi grande, porém a comprovação da causa *mortis* pela classe médica ocorreu somente em 1940 (HUNTER e RUSSELL, 1954).

Foi descrito outro episódio em Niigata, no Japão (1964). Uma indústria que lançava resíduos de Hg diretamente no rio Agano contaminou peixes e a população de pescadores da região, com 64 registros de pessoas intoxicadas, (HARADA, 1995). O mesmo autor cita que em áreas poluídas do Japão, mulheres que apresentavam níveis de Hg em amostras de cabelo, igual ou superior a 50 ppm, foram advertidas a não engravidarem, por medida de prevenção à doença de Minamata, o que foi reconhecido por Fugino (1994) ao realizar estudo epidemiológico nas áreas altamente poluídas por metilHg. Através desses estudos, conseguiu-se relacionar o comprometimento da contaminação mercurial às teratologias nas gravidezes.

Em outros países como no Canadá, a contaminação foi causada por uma fábrica de soda cáustica, que também utilizava o mercúrio como catalisador (OPAS/OMS, 1972; WHO, 1990, 2013).

No Novo México, em 1969, foi registrada intoxicação aguda em uma família, incluindo uma mulher grávida que consumiu carne de porco alimentado com ração tratada com fungicida contendo mercúrio. Os filhos com idade de 20, 13 e 8 anos e também um recém-nascido desenvolveram sinais neurológicos severos da doença. Depois de anos, os dois filhos mais velhos manifestaram cegueira de ordem neurológica, diminuição da propriocepção nas mãos e dificuldade de atenção. O mais jovem desenvolveu quadriplegia, cegueira e atraso neurológico severo, ficando em vida vegetativa até o óbito (DAVIS *et al.*, 1994).

Em 1971, no Iraque, os compostos mercuriais foram usados na agricultura como praguicidas. Pessoas foram intoxicadas e muitas morreram em consequência da ingestão do Hg presente nas sementes contaminadas que foram utilizadas na fabricação de pão caseiro (VASSALO *et al.*, 1996), ocasionando uma hospitalização de 6.530 pessoas com sintomas semelhantes à doença de Minamata e 459 mortes foram registradas, sendo que a mortalidade no grupo de mulheres com idade entre 20 e 30 anos foi em torno de 70%, e 16% naquelas com idade superior a 30 anos (BAKIR *et al.*, 1973). Os mesmos autores relatam que crianças nascidas no Iraque durante ou após a epidemia apresentaram teores de mercúrio no sangue com valores maiores que aqueles do sangue materno, admitindo-se que o Hg foi transferido via placentária e/ou através do leite materno. Ressaltaram também que as

crianças com idade inferior a 2 anos e teor de Hg no sangue superior a 25 mg demonstraram evidências de lesões nos Sistema Nervoso Central.

Cox *et al.*, (1989) realizaram, no Iraque, uma análise de 81 casos de intoxicação fetal por metilHg e estabeleceram uma correlação direta entre a exposição à altas concentrações durante a gravidez e o retardo psicomotor na criança.

A associação entre exposição pré-natal ao metilHg, através do consumo de peixes, e efeitos adversos em crianças foi encontrada em alguns estudos epidemiológicos de populações consumidoras de peixes contaminados por metilHg – a saber: Norte de Quebec, Nova Zelândia, Ilhas Faroe, Ilha da Madeira/Portugal e na Amazônia Brasileira (McKEOWN-EYSSSEN e RUEDY 1983; KJELLSTRON *et al.*, 1986; KJELLSTRON *et al.*, 1989; GRANDJEAN *et al.*, 1997; GRANDJEAN *et al.*, 1999; MURATA *et al.*, 1999).

1.5 A EXPOSIÇÃO MERCURIAL NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

A década de 70 foi um marco inicial à exposição mercurial humana na Amazônia, quando a garimpagem de ouro teve seus primeiros registros com a construção das rodovias Transamazônica e Cuiabá Santarém, que constituíram parte do Plano de Integração Nacional e de Desenvolvimento da Amazônia (SANTOS *et al.*, 1995).

No início, a garimpagem era feita manualmente, nas áreas de planícies de inundação dos cursos d'água. A operacionalização da exploração utilizava

equipamentos rudimentares, e o mercúrio só era utilizado na etapa final de obtenção do minério, na formação do amálgama. Nos anos subsequentes, a garimpagem recebeu auxílio maquinário e o mercúrio passou a ser lançado diretamente e em maior quantidade nos barrancos, provocando assoreamento e contato do metal com a água dos rios, dentre eles o Tapajós (SANTOS *et al.*, 2001; MELAMED e VILLAS BOAS, 2001). Segundo Nriagu *et al.*(1992) foram envolvidas mais de 650.000 pessoas nos garimpos da Amazônia, resultando em uma descarga anual de 90 a 120 toneladas de Hg.

As fontes antropogênicas, provavelmente, foram as principais responsáveis pela contaminação do ambiente amazônico. Outros fatores também favoreceram a disseminação do metal, como as grandes queimadas, desmatamento e erosão do solo (GUIMARÃES, 1989; BRANCHES *et al.*, 1993; VEIGA, MEECH e ONATE, 1994).

A queima do ouro, empregando técnicas rudimentares, levou a exposição de muitos trabalhadores, aos vapores mercuriais, causando doenças respiratórias que foram registradas principalmente nos garimpeiros e trabalhadores de casas de queima de ouro. Passadas três décadas, a exposição ao mercúrio na Amazônia recebeu monitoramento de instituições de pesquisa locais e apoio internacional de agências de fomento à pesquisa (SANTOS *et al.* 2000; PINHEIRO *et al.*, 2002).

Ainda na Amazônia, estudos realizados por Couto *et al.*,(1998), demonstraram teores de mercúrio total no cabelo, de populações ribeirinhas do Cachoeiro variando numa amplitude de 1.97 a 68.98 ppm e no grupo de garimpeiros do Cumarú os resultados compreendiam um intervalo entre 1.50 e 13.68 ppm. Os valores encontrados extrapolaram os teores de mercúrio

estipulados pela OMS, que é de 500µg/g. Apesar disso não foram encontrados sinais e sintomas que permitissem o diagnóstico de doença de Minamata ou da intoxicação crônica dessas populações. Acredita-se que alguns fatores próprios da região, possam estar interferindo diretamente sobre a ação tóxica do Hg, o que aliado à redução da atividade garimpeira, reduzem os riscos de exposição e a manifestação dos efeitos nocivos do metal e seus compostos.

Pesquisadores da região e de órgãos internacionais, preocupados com a questão, alertaram para a necessidade da continuidade do monitoramento das populações de maior risco, devido à toxicidade da forma orgânica do metal e a sua capacidade de atravessar a barreira placentária e alcançar as células e os tecidos fetais em formação (VEIGA, MEECH e ONATE, 1994).

1.6 TOXICOCINÉTICA DO MERCÚRIO

A toxicocinética do mercúrio estuda as vias pelas quais o metal e seus compostos podem ser introduzidos no organismo do homem e de outros animais. Compreende também os processos de absorção, distribuição, biotransformação, armazenamento e eliminação e está diretamente relacionada com a espécie química do metal. Assim, os processos de transporte são influenciados pelo estado de oxidação e pela forma dos compostos de mercúrio (US EPA, 1997; WHO, 1991, 2013).

1.6.1 Absorção

Para ser absorvido o mercúrio deve atravessar várias membranas celulares, como a epiderme, o endotélio dos capilares pulmonares e do trato gastrointestinal. Isto se deve principalmente a sua volatilidade e lipossolubilidade, além disso, suas propriedades físico-químicas (Hg^0 , Hg^+ , Hg^{2+} ou o metilHg) vão determinar o nível de absorção do metal (AZEVEDO, 2003).

O mercúrio metálico (Hg^0) é solúvel em gorduras o que lhe dá acesso às barreiras celulares. Sendo a via respiratória a mais importante via de introdução de vapores de mercúrio elementar que quando inalados chegam ao espaço alveolar atravessam a membrana alvéolo-capilar e passam para o sangue, onde tem afinidade com as células sanguíneas. O organismo humano retém cerca de 80% dos vapores de mercúrio inalados. Em relação aos sais inorgânicos de mercúrio, como aerossol de HgCl_2 a absorção pulmonar é determinada pelo diâmetro das partículas inaladas que são depositadas e posteriormente removidas ou absorvidas dependendo do seu tamanho e solubilidade (WHO, 1991).

O mercúrio orgânico representa uma das formas de fácil introdução e absorção graças a sua grande solubilidade em lipídios, podendo chegar ao patamar de 80% de absorção pela via inalatória.

A via oral não representa uma via importante de absorção de mercúrio metálico, sendo provavelmente inferior a 0,01% com eliminação total pelas fezes. Os compostos inorgânicos presentes nos alimentos e na água de beber são absorvidos em até 15% e para que sejam absorvidos pela via digestiva é necessário que se tornem sais ou complexos solúveis.

Os compostos orgânicos são bem absorvidos pelo trato gastrointestinal, o metil mercúrio pode atingir taxas de até 95% de absorção em adultos e podem aumentar consideravelmente os percentuais de mercúrio total encontrados como mercúrio inorgânico, no sangue total, plasma, leite materno, fígado e urina.

Os níveis de absorção do mercúrio através da pele são considerados pequenos, podendo haver alguma absorção de todas as formas do metal. A absorção cutânea é considerada moderada quando comparada com aquela referida para os alvéolos pulmonares, mas o contato da pele com o metal pode aumentar significativamente os níveis biológicos de mercúrio no organismo. Sais de mercúrio inorgânicos podem ser absorvidos pelos folículos pilosos e glândulas sebáceas que à medida que vão danificando a pele podem facilitar a sua absorção (AZEVEDO, 2003).

A absorção dos alquilmercuriais através da pele provavelmente é substancial. A diacnamida de metilmercúrio é tóxica ao contato cutâneo. Crianças expostas ao fenilmercúrio exibiram perturbações do desenvolvimento ósseo o que denota a absorção cutânea do agente (US EPA, 1997).

1.6.2 Distribuição e Armazenamento

O transporte de mercúrio iônico é realizado pelo plasma enquanto que o mercúrio elementar e o mercúrio orgânico são transportados através dos eritrócitos, e uma pequena fração é ligada às proteínas plasmáticas (HAYES, 1982). O metal sofre oxidação mediada pelo sistema das catalases que apesar

de ser rápida é capaz durar tempo suficiente para expor outros tecidos e órgãos ao mercúrio como o cérebro, fígado e rins (BERLIN *et al.*, 1975).

Pela ausência de carga elétrica e por sua solubilidade, o mercúrio inalterado tem grande poder de difusão nos tecidos, assim atravessa facilmente as barreiras celulares que ao deixar o sangue é rapidamente oxidado a Hg^{2+} que perde a solubilidade e ligando-se às proteínas celulares impossibilitando a sua saída do interior das células (AZEVEDO, 2003).

O mercúrio derivado de seus sais inorgânicos está quase exclusivamente ligado às proteínas plasmáticas, como a alfa-globulina e a albumina. Do sangue o íon Hg^{2+} atinge os tecidos e é encontrado em maior concentração nos rins, fígado e sangue.

A lipossolubilidade do metilHg, possibilita o acesso através de barreiras como a placentária e hematoencefálica acumulando-se no Sistema Nervoso Central (SNC), tecidos embrionários e fetais (BURBACHER, RODIER e WEISS, 1990), alcançando concentrações no sangue fetal que podem ser 25% superiores àquelas detectadas na mãe (AMIN-ZAKI *et al.*, 1976). No cérebro fetal, os níveis de metilHg alcançam índices 5 a 7 vezes maiores quando comparados ao sangue materno (CERNICHIARI *et al.*, 1995).

A distribuição de metilmercúrio pelos tecidos é mediada pela formação de um complexo cisteína – metilmercúrio que é estruturalmente semelhante à metalotineína. A metalotineína é uma proteína amplamente distribuída pelo corpo e é conhecida como a proteína transportadora de metais pelo organismo (US EPA, 1997). A exposição das células humanas aos compostos mercuriais estimula a síntese dessa proteína.

Nos hepatócitos, o metilHg forma complexos solúveis com a cisteína e com a glutatona, que são segregados na bile e reabsorvidos no trato gastrointestinal (CASARETT, 2001).

Vassallo *et al.* (1996) descreveram a redução da hidrólise do ATP em tecido neuronal, onde foi demonstrado que o metilHg inibe a atividade dos íons Na^+ e K^+ e da enzima ATPase, observado também no miocárdico e nos rins, sendo que no último, a inibição estava relacionada à ação diurética do metal. Os referidos autores afirmam que também, o metilHg deprime a atividade da enzima Ca^{2+} ATPase, o que interfere na captação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS).

Apostoli e colaboradores(2003) investigaram outros mecanismos dependentes da atividade de radicais sulfidrilas (SH) que também são afetados pelo metilHg, mostrando que os canais de Ca^{2+} do RS, que se abrem na dependência de radicais SH, aumentam a liberação de Ca^{2+} quando afetados pelo metal. Este resultado mostra que o Hg teria, então, um duplo efeito sobre o RS, aumentando a velocidade de liberação de Ca^{2+} e reduzindo a captação de Ca^{2+} pela inibição da Ca^{2+} ATPase.

Lebel, Ali e Bondy, (1992) estudaram a neurotoxicidade do metilHg em ratos, utilizando como parâmetro de avaliação a via oxidativa mediada pelo ferro. Após sete dias de exposição intraperitoneal de metilHg, foi encontrado um aumento significativo na formação de Espécies Reativas Tóxicas de Oxigênio (ERTO) sugerindo que os radicais livres exerceram influência na neurotoxicidade deste composto.

O efeito neurotóxico do metilHg associa-se ao acúmulo na membrana mitocondrial interna com consequente disfunção na cadeia respiratória e diminuição na produção de ATP, o que pode levar à morte celular (HIRAYAMA e YASUTAKE, 2001).

A exposição intrauterina de humanos a elevados níveis de mercúrio resulta na migração anormal dos neurônios, desorganização dos núcleos cerebrais e disposição em camadas de neurônios no córtex. Além de comprometer a camada granular do cerebelo e o córtex visual. O metilmercúrio interage com o DNA e com o RNA, resultando em alterações da estrutura secundária das proteínas e da síntese de novas moléculas de DNA e RNA (CASTOLDI, COCCINI e MANZO, 2003; COSTA *et al.*, 2004).

O metilHg também afeta linfócitos humanos diminuindo consideravelmente a capacidade de proliferação destas células, produção de citocinas e secreção de imunoglobulinas. (GALLAGHER, NOELLE e McCANN, 1995). Foram demonstradas alterações significativas na imunidade mediada por células e um prejuízo da atividade quimiotática de leucócitos polimorfonucleares em trabalhadores expostos a baixas doses de mercúrio metálico (VIMERCATI *et al.*, 2001).

Estudos realizados com cloreto de mercúrio (HgCl_2), demonstraram que este composto tem afinidade à região de interface da molécula de $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ que está profundamente implicada na atividade de transporte de íons. Como nos linfócitos B humanos o movimento destes íons (principalmente íons potássio) pela membrana plasmática é de vital importância para que se inicie o processo mitogênico, uma possível associação deste metal à molécula de $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ levaria a supressão da passagem de íons potássio e,

conseqüentemente, uma inibição na atividade dos linfócitos B (POLLARD e HULTMAN, 1997).

O principal local de armazenamento do mercúrio são os rins, quando submetidos a vapores de mercúrio metálico eles podem conter cerca de 50 a 90% de toda a carga corporal. Compostos mercuriais podem acumular em outros órgãos como o cérebro, fígado, mucosas do trato gastrointestinal, pele, baço, testículos, glândulas entre outros (BERLIN *et al.*, 1986).

1.6.3 Excreção

Os compostos mercuriais são excretados pelas fezes, cabelo, urina, glândulas salivares, glândulas lacrimais e glândulas sudoríparas. A velocidade de excreção é dose-dependente está associada à espécie química do metal (BERLIN, ZALUPS e FOWLER, 2007).

A conversão do metilHg para mercúrio inorgânico, permite explicar o processo de excreção do metilHg, tanto em animais de experimentação como no homem, onde observa-se que 90% do composto ingerido é eliminado nas fezes na forma inorgânica (US EPA, 1997). Neste processo, o metilHg e o mercúrio inorgânico (Hg^{2+}), por meio da secreção biliar, são complexados com a glutatona, além de compostos sulfidrilas (SH), (WHO, 1991), desta forma parte do metilHg, eliminado pela bile no intestino, sofre ciclo enterohepático, sendo reabsorvido para a corrente sanguínea e outra parte servirá de substrato à microflora intestinal que o converte em mercúrio inorgânico. Este mecanismo foi apenas observado em animais, necessitando de comprovação em humanos

(WHO, 1990; BJORKNAN, SANDBOGH-ENGLUND e EKSTRAD, 1997; SILVA, 2011).

1.7 TOXICODINÂMICA DO MERCÚRIO

Em níveis celulares, o mercúrio e seus compostos são capazes de causar lesões, cujo sítio e intensidade dependem da espécie química do metal envolvida e das características da exposição, quer sejam dose, duração e frequência (CLARKSON, 1997).

A maioria dos efeitos celulares do mercúrio pode ser explicada pela grande afinidade deste metal pelos radicais SH presentes em proteínas, enzimas e substâncias de menor peso molecular como a coenzima A (CoA) e a cisteína. A ligação com os radicais SH se faz facilmente por ligação covalente simples (AZEVEDO, 1989).

No interior das células, o mercúrio pode se ligar a uma série de enzimas, inclusive, mitocondriais e microssomais, produzindo lesões celulares não específicas e até mesmo morte celular (VASSALO *et al.*, 1996). Para Amorim *et al.* (2000), o metilHg também interage com DNA e RNA, resultando na redução da síntese de proteínas e desarranjo na estrutura dos microtúbulos, além de produzir estresse oxidativo nas células.

Segundo Lebel *et al.* (1998), o metilHg e o mercúrio bivalente (Hg^{2+}) exercem seus efeitos tóxicos provocando alterações na homeostase celular. Os

mesmos autores relatam que nos neurônios o metilHg rompe a homeostase do cálcio (Ca^{2+}) afetando o equilíbrio intracelular.

O mercúrio também pode ligar-se a outras moléculas biológicas importantes como grupos amina, carboxilas e fosforilas. Acredita-se que o mecanismo de ação celular do metal esteja alterando os grupos funcionais das enzimas por meio dos radicais sulfidrilas. Outros estudos descrevem a interação dos íons mercuriais com o DNA e RNA mudando suas estruturas terciárias, interferindo grandemente no metabolismo e função das células (AZEVEDO, 2003).

1.8 OS EFEITOS DO MERCÚRIO SOBRE O PARÊNQUIMA RENAL

O mercúrio compromete a função e a homeostase de vários órgãos e sistemas, no entanto existem órgãos considerados alvo para a intoxicação mercurial, como os rins, particularmente por se tratarem de órgãos de excreção e uma via importante de eliminação do mercúrio (FORD, LOUIS e TIMOTY, 2001).

Os compostos mercuriais cronicamente promovem dois tipos de alterações em nível de células renais. A primeira é a lesão glomerular, causada por uma reação autoimune induzida pelo metilHg, resultando na formação de anticorpos contra o tecido glomerular, levando a proteinúria e síndrome nefrótica. A segunda é a necrose tubular renal, resultando em perda de enzimas tubulares como glutamiltransferase e enzimas lisossomais (TCHOUNWOU *et al.*, 2003).

A parte proximal do túbulo renal apresenta células bastante vulneráveis aos efeitos tóxicos do metilHg. A atividade desse metal, nas células renais, baseia-se em interações moleculares que ocorrem em locais nucleofílicos específicos das células alvo e suas proximidades. As interações moleculares do metilHg com os grupos SH das moléculas de albumina, glutatona e cisteína são responsáveis por mecanismos envolvidos na captação, acumulação, transporte e toxicidade do metal a nível do túbulo proximal (ZALUPS, 2000).

A quantidade de mercúrio detectada no sangue e urina correlaciona-se com os sinais e sintomas da intoxicação. Ressalta-se que a forma química do mercúrio influencia a interpretação dos resultados, e que a correlação entre níveis laboratoriais e quadro clínico pode não ser absoluta, principalmente, na presença de lesão renal (FORD, LOUIS e TIMOTY, 2001).

O comprometimento renal na intoxicação por metilHg ocorre sem manifestações clínicas evidentes, as quais podem ser mascaradas pelo quadro de nefropatia ou outras doenças renais que o indivíduo possa a vir desenvolver (BORDA *et al.*, 2000; MAGNO, 2009).

Na intoxicação mercurial humana à medida que a taxa de letalidade decresce com a utilização de recursos da terapêutica toxicológica, viabilizando a redução do comprometimento renal e neurológico, outras causas passam a assumir a responsabilidade pelo óbito, como os fenômenos hemorrágicos agudos, (SILVA, 2011) particularmente digestivos e pulmonares, a morte franca dos cardiomiócitos que pode levar o indivíduo ao choque cardiogênico, às arritmias, à miocardite, dentre outros (MAGNO, 2009).

1.9 VALORES LIMITES DE MERCÚRIO NO ORGANISMO DE HUMANOS E DE PRIMATAS NÃO HUMANOS

Valores de referência de mercúrio no sangue total, em indivíduos não expostos ocupacionalmente, são geralmente inferiores a 1mcg/dL. Entretanto, indivíduos normais, que têm exposição ocupacional leve, podem apresentar rotineiramente níveis acima de 1,5 mcg/dL. Da mesma forma, uma dieta rica em peixes, frutos do mar e outros alimentos contendo mercúrio é causa comum de elevação moderada do metal na ausência de sintomas clínicos (KISHI *et al.*, 1994).

Nas avaliações da intoxicação mercurial, tem sido prática habitual a quantificação do mercúrio total nas amostras de sangue, pois este teste considera as diferentes toxicocinéticas e toxicodinâmicas das várias espécies químicas do metal. A determinação de mercúrio total é o melhor indicador da exposição ao mercúrio orgânico (metilmercúrio), pois esta abordagem analítica tem particular relevância quanto ao tempo de sobrevivência apreciável, admitindo a possibilidade de acontecer um processo de biotransformação com consequente distribuição dos novos compostos formados no organismo por diferentes órgãos alvo (MARTINS, 2007).

Considera-se exposição significativa ao mercúrio orgânico níveis maiores que 5mcg/dL em cabelo. No caso do mercúrio inorgânico adotam-se valores maiores que 20 mcg/dL como indicativos de exposição significativa (BORNSCHEIN e KVANS, 1990).

1.10 OS PRIMATAS NÃO HUMANOS COMO MODELOS EXPERIMENTAIS

Os primatas não humanos têm sido utilizados com maior frequência nas pesquisas que requerem uma comparação mais próxima com a espécie humana por esse motivo, esses animais destacam-se como modelos experimentais, dado seu parentesco evolucionário com o ser humano e sua extraordinária semelhança anatômica e comportamental, bem como, por suas similaridades nos valores bioquímicos e hormonais, (BONCI, 2011; VENTURA, 2012).

Estas razões são suficientes para que esses primatas sejam os animais de eleição como modelos experimentais ideais para estudos que visem avançar nossos conhecimentos sobre as enfermidades que atingem o homem, assim como testar determinados procedimentos que, em virtude de trazerem riscos aos seres humanos, precisam primeiro ser ensaiados em animais experimentais (BRANCO *et al.*, 2010).

Várias espécies de primatas não humanos têm servido a esse objetivo como *Macaca fascicularis*, (RICE e GILBERT, 1982, 1990, 1995; HAHN *et al.*, 1990; BURBACHER *et al.*, 1990), o macaco rhesus (CALSON, SURERUS e HINDS, 1986); macaco de cheiro (BERLIN, 1975; WARFVINE, 2000; BURBACHER *et al.*, 2005), entre outros.

Nas últimas décadas têm aumentado de maneira extraordinária o uso de símios sul-americanos, os chamados platirrinos, nas investigações biomédicas, que alcançam hoje função essencial e estratégica, principalmente nas áreas da etologia, anatomia e fisiologia, além das pesquisas científicas na área das ciências da saúde (BORDA *et al.*, 2000).

Os macacos do novo mundo fazem parte da ordem **Primates**, composta por dois grupos (Infra-Ordens) classificados em primatas do Novo Mundo (**Platyrrhini**) e primatas do Velho Mundo (**Catarrhini**) (BUFFON, 1767, apud FORD, 1986). Os platirríneos representam 35% de todos os primatas existentes e estão distribuídos da América Central, no México Meridional, até a Argentina na América do Sul formando um grupo monofilético (ROSENBERG, 1984). Esta Infra-Ordem divide-se em calitriquídeos (marmosets e tamarins) e os cebídeos (não-marmosets) devido à distinção quanto ao tamanho do corpo, forma dentária e presença ou ausência de garras (ROSENBERG, 1981).

Segundo Rosenberg (1981) a família *Cebidae*, através de características morfológicas (cranianas, dentárias e medidas corporais) foi dividida em duas Subfamílias, *Callitrichinae* e *Cebinae* com sete gêneros. A Subfamília *Cebinae* é composta pelos gêneros *Cebus* e *Saimiri*.

O gênero *Cebus* possui uma longa história evolutiva. Foi um dos que primeiro divergiu durante a diferenciação dos *Platyrrhini*, de acordo com análises morfométricas (KAY, 1990). Possui tamanho médio variando de 70 a 100 cm, em geral apresentam cabeça arredondada e corpo robusto, a pelagem varia na textura e coloração entre as espécies e subespécies. O arranjo dos pêlos da parte superior da cabeça é variável mostrando diferenças constantes entre as espécies reconhecidas e a região da face é desprovida de pelo (HILL, 1960).

O macaco prego (*Cebus apella*), (Figura 04), habita as matas ciliares dos rios, é arbóreo e vive em bandos ou em grupo de 10 indivíduos, normalmente, liderados por um macho dominante. Apresenta pronunciada

destreza manual, cérebro grande e circunvolucionado, alta sociabilidade, terrestrialidade e dieta onívora (SUSSMAN, 2000; DEFLER, 2004).



Figura 4. Macacoprego(*Cebusapella*)

Fonte: <http://www.biophotoassociates.com>. Acesso em 12.08.2011

O estudo utilizando o macaco-prego (*Cebus apella*) tem uma importância extraordinária sobre questões relevantes pertinentes às ciências básicas, como os estudos de aspectos do sistema visual, como uma visão tricromática e de alta acuidade visual, os quais são predicados do homem e dos primatas superiores dentre todos os mamíferos (SILVEIRA *et al.*, 1996; SILVEIRA, VENTURA e PINHEIRO, 2004; BONCI, 2011).

Pesquisas têm sido realizadas manipulando primatas do novo mundo em experimentos de toxicologia ambiental para metais pesados, mais especificamente com o mercúrio e seus compostos, (BERLIN, 1975; WARFVINE, 2000; BURBACHER *et al.*, 2005; ETO *et al.*, 2001; MAGNO, 2009; SILVA, 2011), e levando-se em conta as décadas de exposição mercurial na Amazônia, este estudo se justifica pela carência de informações referentes aos efeitos nocivos dos compostos mercuriais sobre os rins, uma vez que a maioria dos estudos acenam aos danos neurológicos provocados pelo metal. Além

disso, o mercúrio exerce a possibilidade crescente de danos à saúde da população do oeste do Pará exposta aos compostos mercuriais, devido principalmente aos anos de exploração do ouro nos garimpos do estado. E como o mercúrio é considerado um poluente ambiental onipresente, ninguém na região fica isento de entrar em contato com o metal ou seus compostos em algum momento da vida.

Este trabalho, portanto, se propõe a descrever as alterações morfológicas do tecido renal de primatas não humanos (*Cebus apella*) também conhecidos como macacos prego, macaco marrom ou macaco capuchino. Esses animais foram eleitos por predileção por ser uma espécie filogeneticamente próxima ao homem, manifestando alterações similares quando expostos a experimentos que simulem intoxicações e processos patológicos (BORDA *et al.*, 2000).

Acreditamos desta forma, que o referido trabalho possa acrescentar dados ao esclarecimento do comprometimento do parênquima renal, na exposição mercurial que ocorre sem manifestações clínicas evidentes, mas que pode levar a complicações graves e consequente óbito, se não diagnosticado precocemente e tratado adequadamente.

Diante do exposto propomos assim, descrever as alterações histopatológicas dos rins de macacos prego (*Cebus apella*) expostos cronicamente a baixas doses de metilHg, comparando-os ao grupo controle.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

Descrever e avaliar as alterações morfológicas do parênquima renal de primatas platirrinos da espécie *Cebus apella* expostos cronicamente a baixas doses de metilmercúrio.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Determinar a concentração de mercúrio total no sangue dos animais expostos e não expostos;
- Avaliar o comportamento da massa corporal dos animais frente à intoxicação crônica com o metilmercúrio;
- Avaliar a função renal através da análise bioquímica da creatnina e ureia séricas;
- Delinear características histológicas de rins de macaco prego (*Cebus apella*).
- Comparar a morfologia renal de macacos expostos ao metilmercúrio com o grupo controle.
- Investigar as possíveis alterações histopatológicas no tecido renal após a exposição crônica por metilmercúrio;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CARACTERÍSTICAS DO ESTUDO

No presente estudo, foram analisadas as alterações histopatológicas provocadas por mercúrio orgânico (metilmercúrio) no parênquima renal de *Cebus apella*, através da quantificação da concentração de mercúrio total (HgT), relação da intoxicação mercurial frente ao peso corporal dos animais, análise bioquímica do sangue e posterior identificação de alterações teciduais com a utilização de técnicas histológicas convencionais com inclusão em parafina, corados como de rotina pela Hematoxilina e Eosina e técnicas especiais como o Tricrômico de Masson modificado (CAB), Periodic Acid Schiff (PAS) e reações imuno-histoquímicas para células renais.

3.2 MODELO ANIMAL

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizados 06 animais, (2 controle e 4 expostos) da espécie *Cebus apella*, Linnaeus 1758 (macaco prego), machos, adultos, provenientes de criação em cativeiro do Zoológico de Piracicaba (SP), mantidos durante todo o experimento no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará sob o parecer técnico do médico veterinário Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi.

Para garantir aos animais condições de responder de forma adequada aos experimentos, o ambiente foi monitorado quanto à temperatura, umidade

relativa, luminosidade, troca de ar e manutenção da integridade de barreiras sanitárias.

Os animais receberam uma dieta rica em nutrientes composta de água filtrada, ovos (uma vez por semana), ração (duas vezes por semana) e diariamente refeição composta de mistura de frutas, tubérculos, legumes e água *ad libitum* que influenciaram positivamente a resposta ao protocolo experimental.

O condicionamento dos animais começou três meses antes da exposição ao metil Hg e para assegurar que não haveria interferências no protocolo todos os horários e a constituição da dieta dos animais foram monitorados, antes e durante todo o experimento.

Os animais expostos receberam leite condensado (60%) diariamente contendo metilHg em concentração de 1,5 µg/kg do animal (0,1 mg/solução). Para um melhor controle da dose, os animais foram pesados a cada mês e qualquer alteração no peso foi refletida na dose e não na concentração administrada para cada animal.

Neste estudo, utilizamos a dose de 1,5 µg/Kg/dia de Metil Hg via oral em um período de 120 dias segundo, o experimento de Eto e colaboradores (2001).

Todos os procedimentos experimentais ocorreram de acordo com as normas de ética em pesquisa com animais (Lei n.º 6.638) e o referido trabalho foi autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais Experimentais (CEPAE/UFPA) com o código MED 002 2008. (Anexo 1)

3.3 EXPOSIÇÃO DOS ANIMAIS AO METILMERCÚRIO

Os animais foram tratados com doses tóxicas por via oral de metil Hg em pó (Sigma-Aldrich 100 mg), por 120 dias, utilizando-se uma dose de 1,5 µg/kg dissolvidas no leite condensado (60%). Os animais foram divididos em dois grupos, o primeiro com dois animais controle e o segundo grupo com quatro animais administrados com metilHg. Os grupos foram observados quanto às alterações comportamentais e/ou o aparecimento da sintomatologia clássica de intoxicação mercurial. O acompanhamento foi monitorado na adequação da dose e pelo aparecimento de sintomas característicos da intoxicação (perda acentuada de peso, alterações comportamentais), que foi o critério escolhido para o término da exposição. (Anexo 2).

Desta forma a massa corporal dos animais utilizados neste estudo foi cuidadosamente monitorada. Mensalmente os macacos eram anestesiados conforme descrito anteriormente e pesados com o auxílio de balança digital de precisão Shimadzu modelo BL-3200H.

Para o acompanhamento e controle dos indicadores das funções renais, foram coletadas mensalmente 3.0 ml de sangue periférico dos animais e foram utilizados para a análise bioquímica e do mercúrio total.

Ao início do aparecimento dos sinais observados, os animais foram transportados ao Laboratório de Neurofisiologia Eduardo Osvaldo Cruz do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará- ICB/UFPa, onde foram preparados para a perfusão e coleta do material para a histopatologia e imuno-histoquímica.

3.4 PROCEDIMENTOS ANESTÉSICOS, CIRÚRGICOS E PERFUSÃO INTRACARDÍACA.

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados em condições assépticas, no Laboratório de Neurofisiologia Eduardo Oswaldo Cruz, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará – ICB/UFPA. Os animais foram anestesiados com uma mistura de 3 partes de solução de cloridrato de cetamina (Ketalar, König) para uma parte de solução de cloridrato de xilazina (Kenzol, Köng), na dose de 0,4 ml/Kg de peso corporal, por via intramuscular. Após os procedimentos anestésicos, foi realizada a perfusão intracardíaca com solução salina tamponada de pH=7.4 (PBS) e paraformaldeído (PFA) a 4% em tampão fosfato salina 0,1M.

O sistema de perfusão era constituído de dois recipientes colocados a aproximadamente 1,5 metros acima da mesa cirúrgica, os quais continham as soluções salina (PBS) e a fixadora (PFA 4%). Dois manguitos acoplados a estes recipientes unidos na parte distal, terminando em uma cânula de ponta romba que conduziu as soluções. Cada manguito tinha uma válvula em seu trajeto para o controle da direção do fluxo da solução.

Após a dose profunda do anestésico seguiu-se a dissecação abdominal, afastando-se as estruturas sobre os rins, a fim de expô-los para as observações anatômicas e subsequente coleta.

Foi então estabelecido um circuito artificial que disponibilizou um elevado fluxo das soluções para os órgãos do animal. Posteriormente, introduziu-se uma cânula no ventrículo esquerdo no sentido da emergência da aorta, pela qual foram administradas as soluções, seguindo-se uma incisão na aurícula direita. Inicialmente, foram injetados 300-500 ml de PBS, substituindo o sangue existente nos vasos, porém mantendo o pH em níveis fisiológicos. Após essa fase, iniciou-se a passagem da solução fixadora. O êxito da perfusão era evidenciado pelo enrijecimento progressivo dos músculos e dos membros. Após o procedimento de perfusão os rins dos animais foram retirados e processados como de rotina para inclusão em parafina.

3.5 COLETA DE SANGUE E ANÁLISE BIOQUÍMICA

3.5.1 Coleta do sangue

Para a coleta das amostras sanguíneas os animais foram anestesiados com cetamina por via intramuscular na dose de 0,5 ml. O sangue foi coletado por punção venosa na região inguinal com seringa heparinizada e utilizado para a realização dos testes bioquímicos e para a dosagem do mercúrio total.

Em seguida uma parte das amostras foi conduzida ao Laboratório de Toxicologia Ambiental e Saúde Humana do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, para análise do mercúrio total (HgT) e outra parte foi enviada ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB), para análise da creatinina e ureia.

3.5.2 Análise bioquímica da Creatinina

A creatinina e os interferentes presentes na amostra reagiram com o picrato alcalino, formando um complexo colorido que foi medido fotometricamente. A adição de um acidificante baixou o pH para 5,0 e decompôs o picrato de creatinina inalterando a cor derivada dos cromogênios que também foi medida fotometricamente.

O valor de creatinina da amostra foi calculado pela diferença entre as duas leituras fotométricas. Os valores de normalidade variam de 0,6 a 1,3 mg/dL (BASTOS e KIRSTAJN, 2011).

3.5.3 Análise bioquímica da Ureia

Fundamentou-se no fato que a ureia, na presença da urease formou o carbonato de amônio que, posteriormente, reagiu com o salicilato e o hipoclorito de sódio na presença de nitroprussiato de sódio originando o azul de indofenol.

A intensidade da cor formada era diretamente proporcional à concentração de ureia na amostra. Os Valores de normalidade da ureia sérica no soro variaram de 10 a 50 mg/ dL (BASTOS e KIRSTAJN, 2011).

3.5.4 Análise de mercúrio total no sangue

As amostras sanguíneas de cada macaco foram acondicionadas em frasco de polietileno, mantidas sob refrigeração, armazenadas em recipientes com EDTA e congeladas até a análise (WHO, 1990; AKAGI, 2004).

Os procedimentos analíticos para determinação do mercúrio total (HgT) foram realizados segundo protocolo do Laboratório de Toxicologia Ambiental e Saúde Humana no Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará.

3.6 PROCEDIMENTOS PRÉ-ANALÍTICOS

3.6.1 Descontaminação das vidrarias

Previamente aos procedimentos analíticos todas as vidrarias e frascos utilizados foram submersos em uma solução detergente de extran 1% por um período de 24 horas e lavados com água corrente e submetidos em seguida a um leve enxague com solução de permanganato de potássio (KMnO₄), para retirada de qualquer resíduo de Hg presente nas vidrarias; após retirada do KMnO₄ com água corrente, as vidrarias foram então lavadas com solução de hidroxilamina a 1% (NH₂OH), para remoção total do KMnO₄ e finalmente lavadas com água destilada (AKAGI, 2004).

3.6.2 Processamento da amostra

No laboratório, as amostras de sangue foram descongeladas e centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos. Após, a homogeneização amostra

foi pesada (máximo de 0,5 g em peso úmido) em um frasco de digestão de amostra.

Em cada balão foi acrescentado 1 ml de água destilada, 2 ml de ácido nítrico e perclórico ($\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$) na proporção de 1:1 (um para um) e 5 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4). Depois, as amostras foram submetidas ao processo de digestão ácida, que tinha com intuito eliminar elementos interferentes presentes na amostra, como a presença de outros metais.

A digestão ácida foi realizada em uma chapa aquecedora a uma temperatura de 210°C por 30 minutos (Figura 5). Quando as amostras digeridas chegaram à temperatura ambiente estas foram então aferidas com água destilada até o volume final de 50 ml.



Figura 5. Digestão ácida em placa aquecedora
Fonte: SILVA, 2011

3.6.3 Preparação das soluções para a curva de calibração

Foram utilizados quatro pontos para a curva de calibração, 0, 20, 50 e 100. A curva de calibração foi usada para avaliar os resultados das amostras assim como a estabilidade do equipamento (AKAGI, 2004).

Para o preparo das soluções padrões referente à curva de calibração da análise de mercúrio total foi necessário o preparo de uma solução padrão de metilmercúrio (MetilHg) de 100 ppm (parte por milhão), uma solução padrão de MetilHg 1 ppm (1 ml da solução de 100 ppm) , uma Solução de L-Cysteina 0,01% (Anexo 3).

3.6.4 Características e fundamento do equipamento

A análise de HgTl foi realizada com um Espectrofotômetro de Absorção Atômica disponível comercialmente como Analisador Semi-Automático de Mercúrio Modelo Hg 201 (Sanso Seisakusho Co. Ltd. Tokyo, Japan) (Figura 6).



Este método **Figura 6.** Equipamento Hg201
Fonte: SILVA, 2010

...icas como peixe, molusco, sangue humano, urina e tecidos como cordão umbilical (AKAGI, 2004). O equipamento utilizou espectrometria de absorção atômica por vapor frio e um sistema aberto de circulação de ar, no qual, o mercúrio

bivalente (Hg^{2+}) foi convertido em vapor de mercúrio elementar (Hg^0) no evento de redução ocasionado pelo Estanho (Sn^{2+} e Sn^{4+}).

Neste equipamento, o vapor de mercúrio gerado foi circulado em uma bomba de diafragma a uma taxa de 1-1,5 l/min por 30 segundos para homogeneizar. Então, a válvula era acionada e girada cerca de 90° para entrada na célula de foto absorção e realizada a medida de absorbância a 253,7 nm (AKAGI, 2004) (Anexo 4).

O método analítico para mercúrio total utilizou espectrometria de absorção atômica por vapor frio, no qual o mercúrio foi convertido em vapor de mercúrio elementar e introduzido em uma célula de absorção para determinação da quantidade do elemento em partes por bilhão (ppb) ou ng/L e/ou partes por milhão (ppm) ou $\mu\text{g/L}$.

3.6.5 Procedimentos de análise no equipamento

Durante o procedimento da análise foram transferidos suavemente volumes fixos de 5 ml com uma pipeta volumétrica de cada uma das soluções de branco ou padrão ou da amostra no equipamento. Foi adicionado então, 1 ml de solução de SnCl_2 (solução de cloreto estanhoso) 10% para o início do processo analítico.

Ao final da análise de cada elemento da curva de calibração ou de cada amostra os resultados (o pico de concentração de mercúrio total) foram registrados em uma impressora conectada ao equipamento Hg 201, o registro ocorreu na forma de uma reta, medida com régua em cm (Figura 7).



Figura 7. Registradora com os picos de concentração de mercúrio.

Posteriormente, a concentração em valor numérico de HgT foi calculada através de fórmula matemática (Anexo 5) e com o auxílio dos valores obtidos pelos elementos da curva de calibração.

3.7 PROCEDIMENTOS DE CONTROLE DE QUALIDADE ANALÍTICA

O controle de qualidade analítica e a validação da metodologia, quanto à precisão e à exatidão para a determinação de HgT em sangue, foram feitos por meio da análise de material de referência com valor certificado BLOOD (Toxic Metal in Bovine Blood) do National Institute of Standards and Technology.

3.8 PROCEDIMENTOS HISTOPATOLÓGICOS

3.8.1 Processamento para inclusão em parafina.

Após a perfusão os rins foram seccionados em fragmentos de 3 cm e deixados em imersão em solução fixadora de paraformaldeído (PFA) a 4% durante 24 horas. O material biológico sofreu procedimento de desidratação com etanol em concentrações crescentes, diafanizado com xileno e incluído em parafina, conforme protocolo usado no Laboratório de Histotécnica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. (Anexo 6).

Os blocos foram cortados em fatias de 3µm de espessura em micrótomo rotatório Leica 2245. As lâminas contendo os cortes de rins foram depositadas em estufa a 60° por 12 horas, diafanizadas, reidratadas e coradas pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina, Tricrômico de Masson modificado (CAB-Chromotrope Aniline Blue) e pelo PAS (Periodic Acid Schiff).

3.8.2 Coloração pela Hematoxilina e Eosina (HE)

A coloração pela Hematoxilina e Eosina, é empregada para facilitar o estudo dos tecidos sob microscopia, pois se fixa eletiva ou seletivamente em determinadas estruturas celulares facilitando a sua observação (TOLOSA *et al.*, 2003). É uma dupla coloração de uso geral e universalmente usada.

A Hematoxilina liga-se as estruturas ácidas das células como os ácidos nucleicos formando com estes, um precipitado de cor azul identificando o núcleo das células. É considerada uma coloração progressiva que produz células coradas com núcleos claramente definidos, enquanto o fundo permanece completamente incolor. Este método origina resultados consistentes, pois a hematoxilina é altamente seletiva e permanece nos tecidos mesmo depois de alguns anos (MAIA, 1979).

A Eosina por sua vez tem predileção pelas estruturas básicas dos citoplasmas, desta forma com o uso combinado desses dois corantes é possível promover um contraste colorido em todas as células e tecidos dos animais (LUNA, 1967).

Esta técnica é utilizada como dupla coloração onde os núcleos coraram-se fortemente em azul (cor característica da Hematoxilina) enquanto o citoplasma torna-se avermelhado (corado pela Eosina). Por esse fato esta técnica é usada como rotina em todos os laboratórios de histologia (TOLOSA *et al.*, 2003), é referência para a grande maioria das pesquisas histológicas e histopatológicas, por esse fato foi utilizada neste estudo. (Anexo 7).

3.8.3 Coloração pelo Tricrômico de Masson modificado – Chromotrop Aniline Blue (CAB)

Os diversos elementos de um mesmo tecido evidenciam afinidades diferentes a vários corantes e com base nessa possibilidade pode-se usar mais de um corante em um único método de coloração. Essas técnicas utilizam três ou mais corantes diferentes conhecidos como tricrômicos ou policrômicos (TOLOSA *et al.*, 2003).

Os tricrômicos possibilitam a identificação diferenciada de elementos como do citoplasma de células epiteliais, a queratina, fibras musculares, hemácias, fibrina entre outros. Os núcleos coram-se em azul escuro e as estruturas como, o muco, cartilagem, osso e elementos da matriz extra celular e principalmente as fibras colágenas coraram-se fortemente em azul. (TOLOSA

et al., 2003). Por ser um corante muito utilizado para diferenciar componentes teciduais epiteliais e conjuntivos, foi a técnica eleita neste estudo. (Anexo 8).

3.8.4 Reação do Periodic Acid Schiff (PAS)

A reação do ácido periódico de Schiff é importante na identificação histológica de carboidratos, membranas basais, proteoglicanas e componentes glicoproteicos das células.

Reações positivas indicam a presença de glicogênio e outros 1,2-glicóis. É uma reação efetuada em duas etapas: na primeira, grupos vicinais hidroxil são oxidados a aldeídos; na segunda etapa, os dialdeídos formados são demonstrados usando-se o reagente de Schiff, uma leucofucsina básica.

A cor produzida varia entre a púrpura e o magenta, nos sítios onde se localizam carboidratos oxidáveis (mono, oligo e polissacarídeos, glicoproteínas e mucoproteínas) (LUNA, 1967; TOLOSA *et al.*, 2003).

O PAS foi realizado neste estudo para identificação das especializações de membranas das células epiteliais do tecido renal. (Anexo 9).

3.9 PROCEDIMENTOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS

3.9.1 Preparo das amostras

O preparo das amostras biológicas para a realização das reações imuno-histoquímicas, seguiram o mesmo protocolo, para inclusão em parafina.

Os blocos de parafina com o material foram resfriados em placa fria e cortados com micrótomo rotativo onde foram obtidos cortes de 3 μm de espessura e depositados em lâminas silanizadas e levadas a estufa a 60°C por 30 minutos.

3.9.2 Recuperação antigênica

A recuperação antigênica para a identificação dos epítopos foi realizada segundo Gown e colaboradores, (1993), e foi realizada utilizando soluções tampões de pH alto e pH baixo, no aparelho denominado PT LINK modelo 10027 da DAKO Produktionsvj – Denmark S/A. (Figura 8), que forneceu temperatura e pressão adequadas para a reação. A temperatura foi padronizada e programada pelo fabricante em 98° C.



Figura 8. PT LINK modelo 1027da DAKO S/A.
Fonte: [http://www Diamedbd.com](http://www.Diamedbd.com). Acesso 03.09.13

Após a recuperação antigênica as lâminas foram lavadas em água destilada e tampão Wash buffer 20x, DAKO por 5 minutos e transferidas para a câmara escura e úmida demarcadas com caneta DAKO PEN em seguida ocorreu o bloqueio da peroxidase endógena com solução EnVision Flex Peroxidase Block por 5 minutos em seguida os cortes foram novamente lavados em água destilada e tampão Wash buffer 20x, DAKO por 5 minutos.

3.9.3 Incubação com anticorpos primário e secundário

Os cortes foram incubados com anticorpo primário específico (policlonal ou monoclonal) diluído em Antibody Diluent with Background Reducing Components DAKO ou anticorpos FLEX RTU por 20 minutos. Nas reações realizadas neste trabalho fez-se necessário a adição de LINKER Mouse para uma melhor otimização durante 15 minutos.

Posteriormente as lâminas foram lavadas e tratadas com Link HPR, anticorpo secundário, por 20 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas novamente em água destilada e tampão Wash buffer 20x por 10 minutos.

3.9.4 Tratamento com a Diaminobenzidina (DAB)

Após lavagem, as lâminas foram tratadas pela solução substrato-cromogênica de Diaminobenzidina DAB 60 mg% por 5 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Lavadas em água destilada e tampão PBS por 5 minutos.

3.9.5 Coloração nuclear e montagem

Após o tratamento com o DAB, as lâminas foram contracoradas pela Hematoxilina, lavadas em água destilada, desidratadas em álcool etílico, diafanizadas com o xileno e montadas entre laminas e lamínulas com Balsamo do Canadá.

As reações realizadas neste trabalho objetivaram a detecção de Actina muscular (HHNF35), Actina de músculo liso (1A4), e Pancitoqueratina (AE1/AE3) para localização e marcação de células mesangiais e seguem o mesmo roteiro de preparo descrito acima.

Todas as lâminas histológicas produzidas neste trabalho foram submetidas às técnicas descritas segundo os protocolos em anexo, no entanto os registros fotográficos foram obtidos daquelas onde puderam ser melhores visualizadas as estruturas indicadas segundo as especificidades de cada técnica.

3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Neste estudo, as variáveis numéricas foram apresentadas através da estatística descritiva com o auxílio do SoftwareBioEstat versão 5.0 para a aplicação dos testes estatísticos e Software Excel versão 2010 para a formatação das tabelas e gráficos.

No presente estudo, com base na amostra, na variável e tipo de dado, a análise estatística dos resultados obtidos de HgT do grupo exposto e do controle em relação à perda de peso, níveis de HgT nas amostras de sangue, creatinina e ureia sérica foram realizadas através da análise de variância (ANOVA) e o T'Student. Para verificar a associação da perda de peso e os níveis de HgT foi utilizado o teste de correlação linear de Person. O nível de significância adotado neste estudo foi de $p < 0,05$.

3.11 ANÁLISE QUALITATIVA

Para descrever e avaliar as possíveis alterações morfológicas do parênquima renal dos animais controle e expostos ao metilmercúrio, todas as secções foram inspecionadas em microscópio óptico (Axio Star Plus da Zeiss). Imagens de secções contendo os campos mais ilustrativos dos animais controle e expostos ao metilmercúrio foram obtidas com o uso de um microscópio com DS-U3 Câmera Digital Control Unit Nikon – Nikon up right Microscope – Eclipse-Ci-S/Ci-L.

As avaliações morfológicas, histopatológicas e imuno-histoquímicas do material foram feitas por parâmetros discriminados em protocolo específico, sob a responsabilidade do médico patologista Prof. Dr. Leonidas Dias Braga Júnior. (Anexo 10).

4. RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA PERDA DE MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS

A perda de massa corporal dos animais dos grupos controle e exposto ao metilHg é mostrado na Figura 09. Observou-se que o grupo exposto ao MetilHg apresentou perda significativa da massa corporal após o final da exposição ($P < 0.001$).

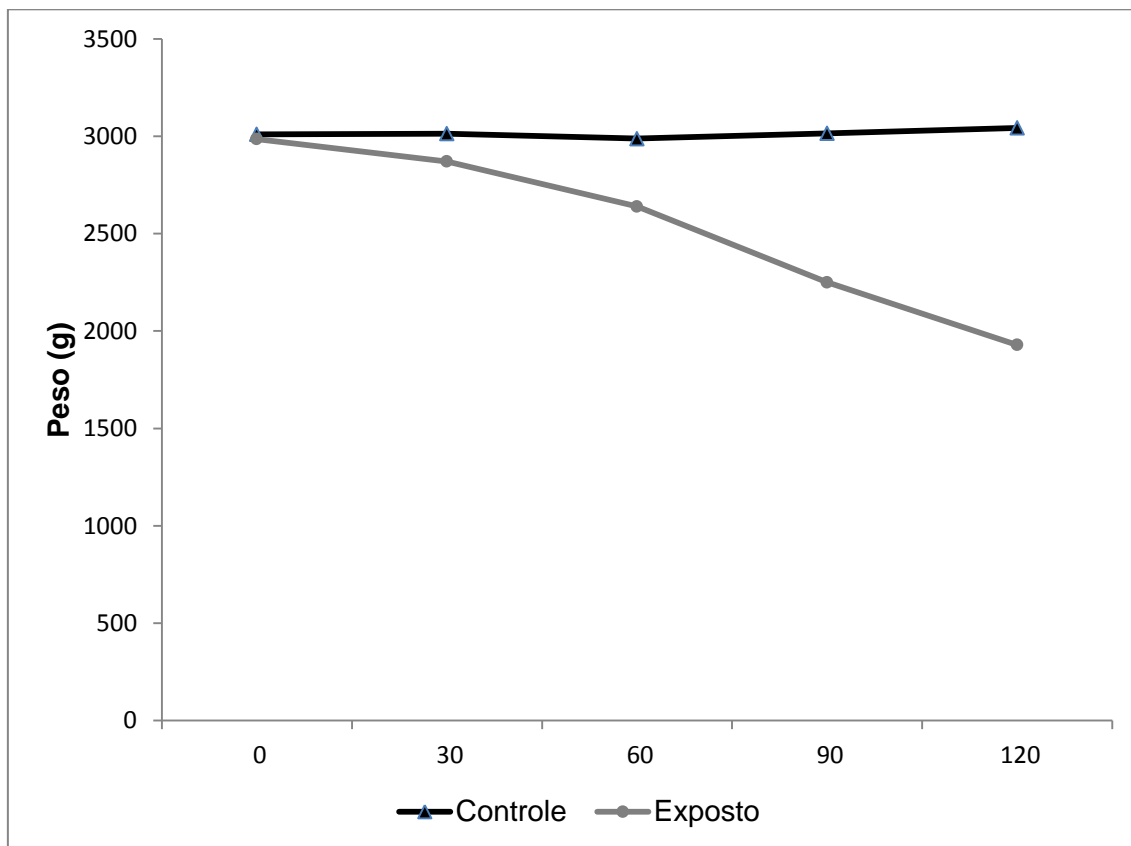


Figura 09. Efeitos da exposição crônica de metilHg, sobre a perda de massa corporal em *Cebusapella*, administrado por via oral durante 120 dias consecutivos. Os valores representam a média \pm e.p.m. (n=2-4/grupo).

expostos em metilHg no período de 0, 30, 60, 90 e 120 dias são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Níveis de mercúrio total em *Cebus apella* controle e expostos ao metilHg.

Grupos	Tratamento				
	0	30	60	90	120
Controle	0.0038	0.0032	0.0029	0.003	0.00355
Mercúrio	0.475	52.8025	740.675	1494.488	2019.603

P-valor < 0.001 < 0.001 < 0.001 < 0.001 < 0.001

O teste T´Student revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e exposto ($P < 0.001$).

O grupo exposto ao metilHg apresentou valores significativos de mercúrio no sangue dos animais analisados em relação aos animais do grupo controle durante todo o tratamento.

No presente estudo, investigamos também a associação entre os níveis de mercúrio e a perda de peso nos animais expostos ao metal. O teste de correlação de Person revelou uma forte correlação negativa entre as variáveis estudadas ($P < 0.0001$), ou seja, quanto maior é a concentração de mercúrio total maior será a perda de peso dos animais, conforme se observa na figura 10.

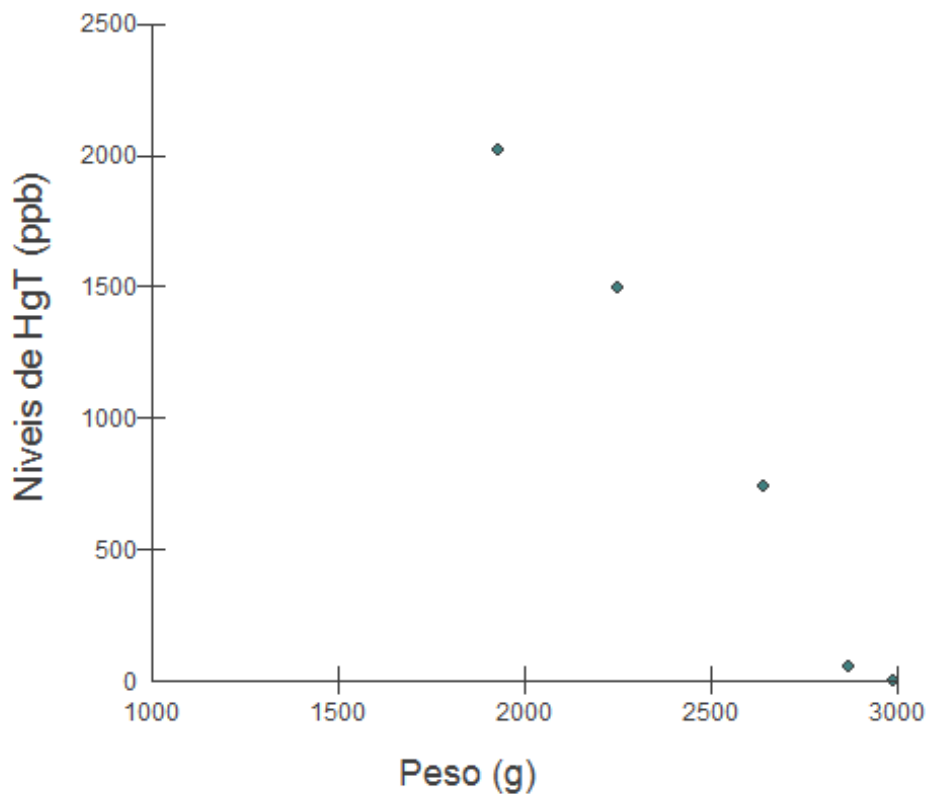


Figura 10. Efeitos da exposição crônica de metilHg, sobre a correlação de perda de massa corporal e níveis de HgT em *Cebusapella*, administrado por via oral durante 120 dias consecutivos. Os valores representam a média \pm e.p.m. (n=2-4/grupo).

4.3 EFEITOS BIOQUÍMICOS DA EXPOSIÇÃO MECURIAL

Na Tabela 2, encontram-se os resultados da avaliação dos parâmetros bioquímicos da creatinina dos grupos controle e exposto ao metilHg durante o período de 0, 30, 60, 90 e 120 dias.

Tabela 2. Valores médios de creatinina sérica em macacos *Cebus apella* controle e expostos ao metilHg no período de 0, 30, 60, 90, 120 dias

Grupos	0	30	60	90	120	Média	D. Padrão
Controle	1.4	1.20	1.06	1.10	1.10	1.09	± 0.073
Mercúrio	0.88	0.73	0.78	0.89	0.70	0.79	± 0.085

O teste T´Student não revelou diferenças significativas entre os animais do grupo controle e os animais do grupo exposto ao metilHg com relação à dosagem de creatinina ($p>0,05$).

Os resultados deste estudo estão dentro dos valores de referência usados atualmente para creatinina que compreende uma faixa de 0,6 a 1,3 mg/dL (BASTOS e KIRSTANAJN, 2011).

Na tabela 3, podemos observar os resultados da avaliação dos parâmetros bioquímicos da ureia dos grupos controle e exposto ao metilHg durante o período de 0, 30, 60, 90 e 120 dias.

Tabela 3. Valores médios de ureia sérica em macacos *Cebus apella* controle e expostos ao metilHg no período de 0, 30, 60, 90, 120 dias

Grupos	0	30	60	90	120	Média	D. Padrão
Controle	20.00	22.00	24.00	25.50	21.50	22.60	± 2.16
Mercúrio	13.25	13.50	16.00	19.25	17.50	15.90	± 2.58

O teste T´Student, revelou diferença significativa entre os teores de ureia dos animais do grupo controle e os animais do grupo exposto ao metilHg ($p<0,05$). As diferenças entre os grupos foram mais observadas nos tempos de 0, 30, 60 e 90 dias. No entanto, estes resultados estão dentro da faixa de

normalidade utilizada atualmente para ureia sérica que é de 10 a 40 mg/dL (BASTOS e KIRSTANAJN, 2011).

Desta forma, constatou-se que a exposição ao metilHg não interferiu nos parâmetros normais da função renal dos animais.

4.4 MORFOLOGIA RENAL DO MACACO-PREGO (*Cebus apella*)

4.3.1 Descrição macroscópica dos rins

Nos animais controle as observações macroscópicas revelaram órgãos parenquimatosos envolvidos por uma cápsula delgada de tecido conjuntivo. Os rins desses animais apresentaram características anatômicas semelhantes às aquelas observadas para os demais mamíferos incluindo o homem. Pode ser observado órgão em forma de grão de feijão, com uma superfície convexa e uma côncava, também conhecida como hilo, coberto por uma delicada cápsula que envolve todo o órgão até a região do hilo. Em corte longitudinal, seu parênquima se mostra dividido em duas porções, cortical e medular compostas por glomérulos renais e seus túbulos. (Figura 11).



Figura 11. Estrutura anatômica dos rins de macaco *Cebusapella*, com sua forma característica e cápsula de tecido conjuntivo em A. Em corte coronário se pode observar a camada cortical periférica mais escura e a camada medular central

4.3.2 Descrição Histológica dos rins

Neste estudo, observamos que os rins do macaco *Cebus apella* do grupo controle apresentaram uma cápsula de tecido conjuntivo denso, com parênquima organizado em camadas cortical e medular onde observamos os glomérulos renais e seus túbulos intimamente associados com um tecido conjuntivo frouxo que formava o interstício renal. (Figura 12).

As características histológicas foram mais claramente observadas nas lâminas coradas pelo Tricrômico de CAB, uma vez que esta técnica foi usada para diferenciar os componentes do epitélio dos conjuntivos, conforme podemos observar na Figura 12.

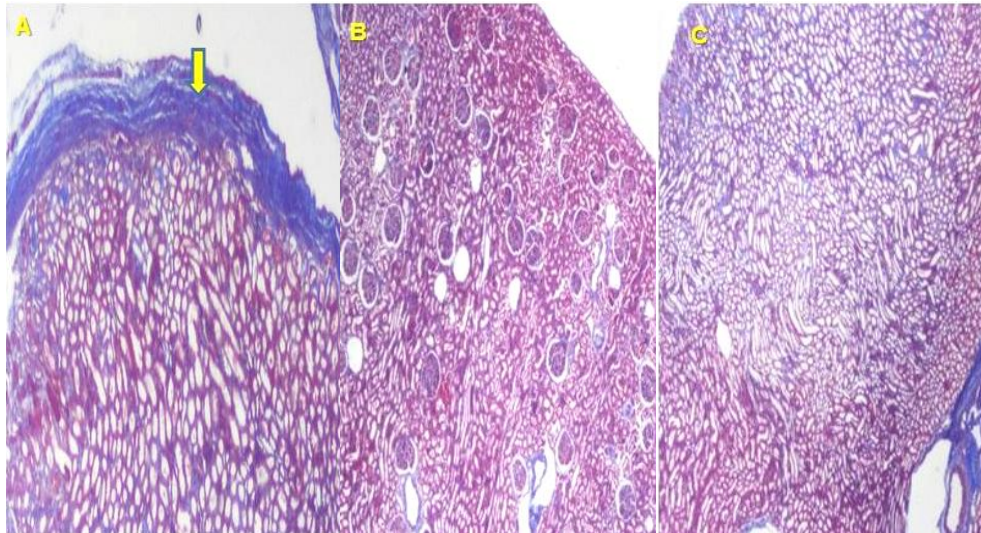


Figura 12. Fotomicrografias de rins de macaco prego evidenciando em A cápsula de tecido conjuntivo (seta), em B camada cortical com os glomérulos renais e em C região medular. Coloração Tricrômico de CAB, aumento original 10x

Os néfrons apresentaram a estrutura histológica clássica representada pelos glomérulos e seus túbulos. Os glomérulos renais dos animais do grupo controle apresentaram cápsula de Bowman formada por tecido epitelial pavimentoso simples dividido em duas camadas, uma visceral e outra parietal delimitando o espaço urinífero, contínuo com a luz do túbulo contorcido proximal conferindo a formação do pólo urinário. A entrada e saída das arteríolas glomerulares aferentes e eferentes formavam o pólo vascular.

No glomérulo foram identificados os componentes capilares, células mesangiais, matriz mesangial e os capilares. A observação histológica mais marcante nos animais controle foi a hiper celularidade glomerular e o reduzido espaço de Bowman quando comparada aos glomérulos humanos conforme o observado na Figura 13 A.

Em maior aumento pôde-se observar, no limite externo do pólo vascular as células mesangiais no interior do glomérulo em contato com as células extraglomerulares (Figura 13 B).

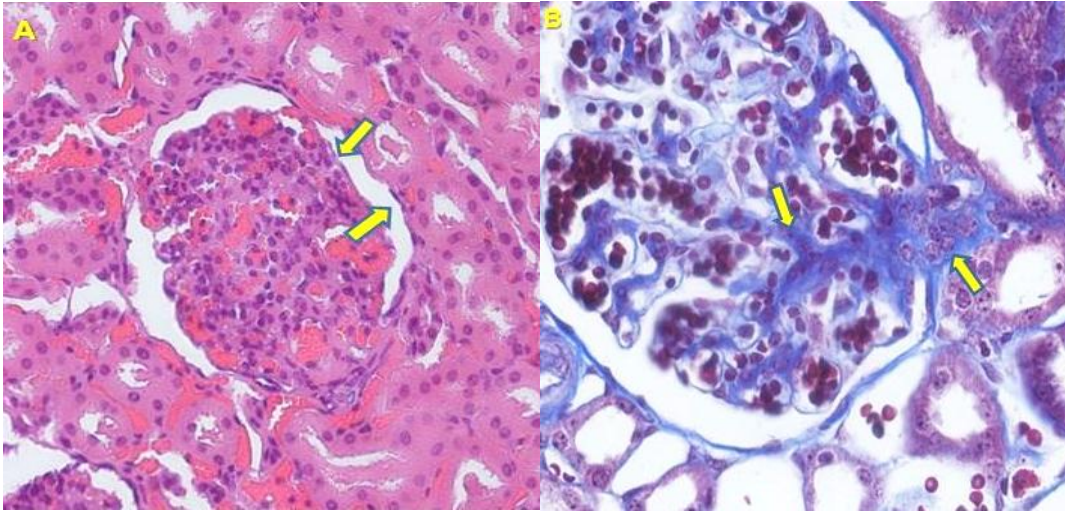


Figura 13. Fotomicrografias de rim de *Cebus apella* onde se observam em A, corado pelo HE com aumento original de 40x um glomérulo renal com cápsula de Bowmam e seus folhetos visceral e parietal que delimitam o espaço de Bowman (setas), em B corado pelo CAB com aumento original de 100x. Observam-se as células mesangiais do interior do glomérulo que estão em contato com as células mesangiais extraglomerulares (setas).

Em relação aos componentes tubulares, o Túbulo Proximal (TP) no macaco prego se apresentou formado por células epiteliais cúbicas altas e exibiam uma borda em escova bem desenvolvidas com microvilosidades retas, longas e compactadas que diminuía a luz do túbulo, citoplasma eosinofílico com núcleos basais, cromatina frouxa e por vezes exibiam um nucléolo bem evidente (Figura 14 A). A técnica do PAS permitiu uma melhor visualização das microvilosidades, uma vez que esta técnica evidencia glicoproteínas da superfície da membrana celular. (Figura 14 B).

Da mesma forma, o Túbulo Distal (TP) apresentou células cúbicas mais baixas do que aquelas exibidas no TP desprovidas de borda em escova

proeminente, citoplasma eosinofílico, mais claro quando comparado com o citoplasma dos túbulos proximais, núcleos volumosos com cromatina frouxa observado na Figura 14 B.

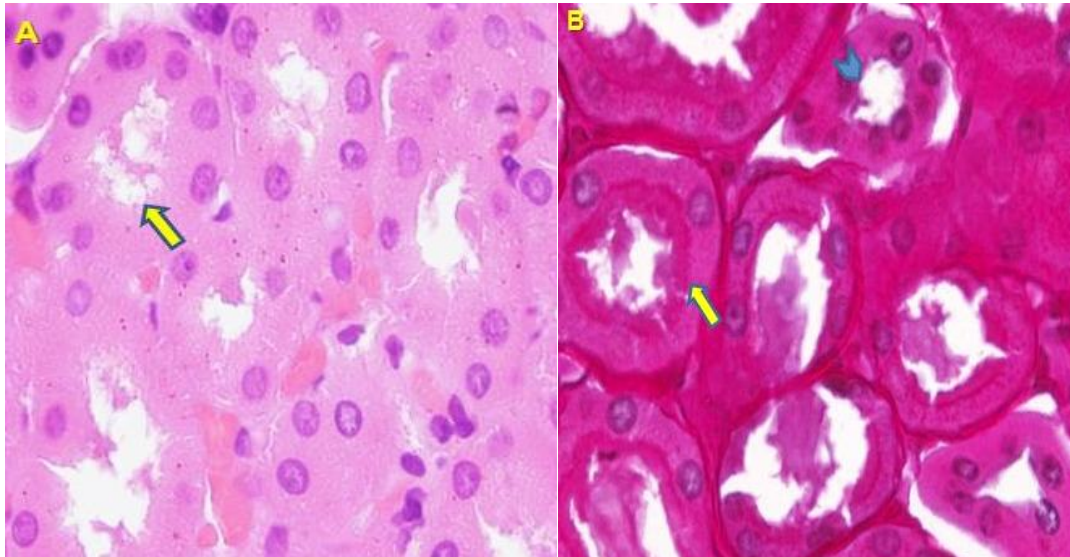


Figura 14. Fotomicrografias evidenciam em A, corados pelo HE, os Túbulos Proximais formados por células cúbicas e luz estreita (seta), em B coradas pelo PAS é possível observar a concentração de microvilosidades formando uma borda em escova bastante desenvolvida nos Túbulos proximais (seta) diferente do observado no Túbulo Distal (cabeça de seta). Aumento original 40x.

Os ramos espessos da alça de Henle eram formados por células cúbicas baixas com citoplasma mais claro, núcleos excêntricos de cromatina frouxa. Os ramos delgados eram formados por células epiteliais pavimentosas, citoplasma escasso e núcleos alongados. (Figura 15).

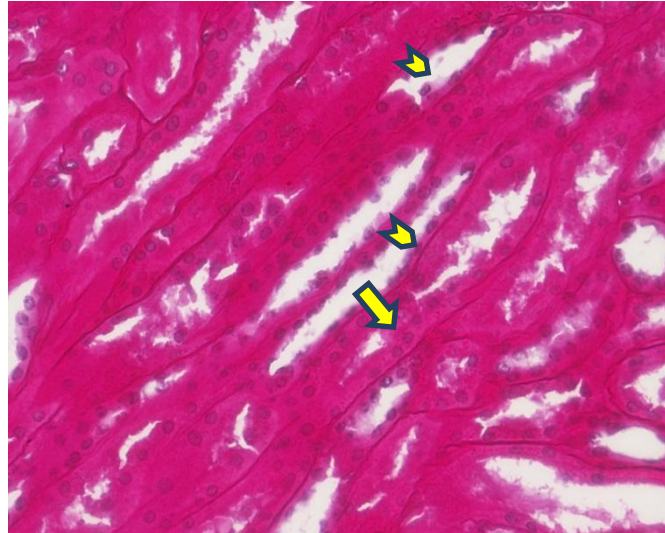


Figura 15 Fotomicrografia onde podem ser observados pela técnica do PAS o ramo espesso (seta) e o ramo delgado (cabeça de seta) da Alça de Henle. Aumento original 40x

4.3.3 Efeitos Histopatológicos da exposição ao metilHg nos rins

No tecido renal dos animais expostos ao metilHg durante 120 dias, corados pela técnica do CAB foi observado alterações histológicas a nível dos glomérulos renais apresentando diminuição do número de células mesangiais e aumento do espaço de Bowman.

As fibras colágenas delgadas de distribuição homogênea puderam ser observadas como os elementos principais do interstício. A figura 16 evidencia essas características em C e D e possibilita a comparação com as respectivas estruturas dos animais controle em A e B.

Os capilares dos animais expostos encontraram-se sem alterações perceptíveis nas técnicas empregadas, com diâmetro semelhante ao grupo controle.

Na cápsula de Bowman, tanto no folheto visceral, quanto no folheto parietal, não foram observadas alterações significativas. Contudo os espaços uriníferos se apresentaram maiores quando comparado com aqueles dos

animais controle. Os infiltrados linfocitários eram focais e discretos (Figuras 16 A e C).

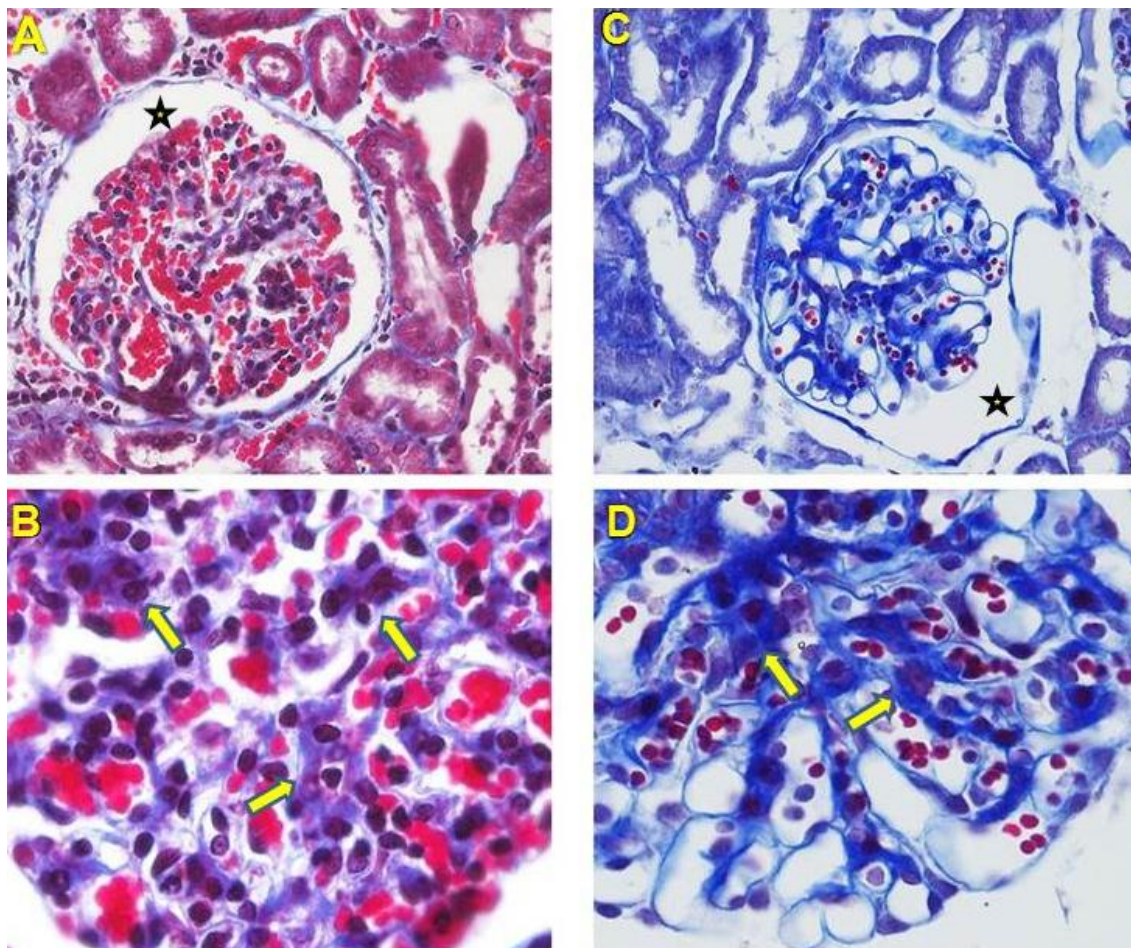


Figura 16. Em A glomérulo renal dos animais do grupo controle, onde se nota a disposição da cápsula de Bowmam e o espaço urinífero menor, quando comparado ao glomérulo dos animais expostos em C (estrelas) aumento original 40x. Através da coloração pelo Tricrômico de CAB, foi possível evidenciar a diminuição do mesângio. No aumento maior se tornou evidente essa diferença entre o mesângio dos animais controle em B (setas) quando comparado com o mesângio dos animais expostos em D (setas). Aumento original 100x.

Com as técnicas de coloração empregadas, também foi possível evidenciar alterações histológicas na região do Túbulo proximal dos animais intoxicados, com células aumentadas de tamanho, citoplasma pouco acidófilo mostrando vacúolos próximos ao núcleo celular com borda em escova sensivelmente diminuída e luz aumentada, porém com limites celulares pouco

precisos (Figura 17 B), diferente dos túbulos proximais dos animais usados como controle (Figura 17 A).

As células dos túbulos proximais mostram características patológicas de degeneração hidrópica difusa e moderada

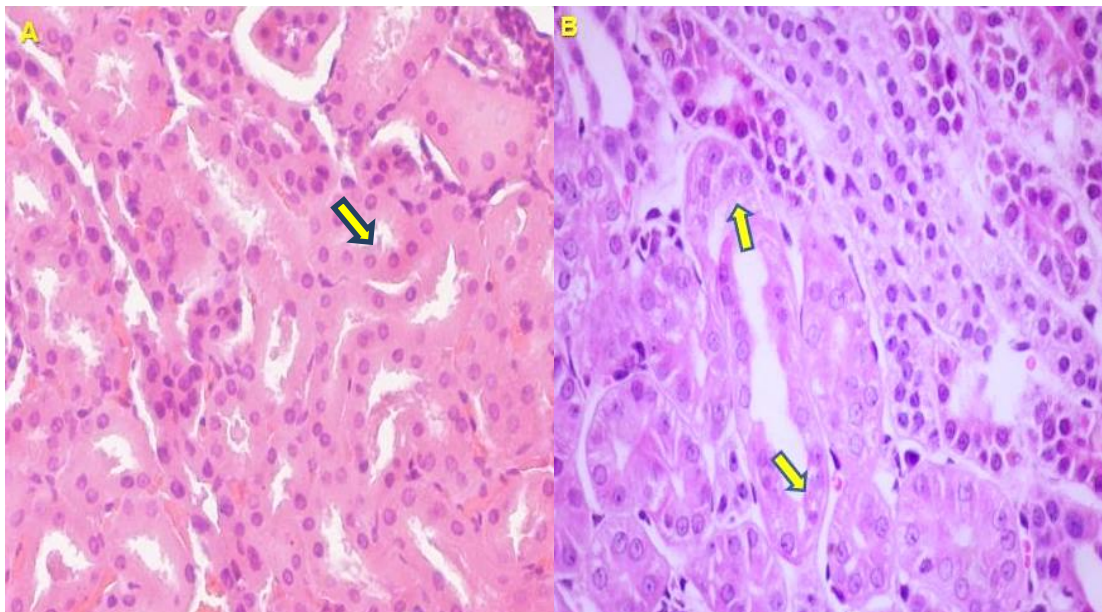


Figura 17. Fotomicrografias de rim de *Cebusa pella* onde foi possível observar em B, células com vacuolização característica de degeneração hidrópica (seta) nos túbulos contorcidos proximais, diferentes daqueles observados nos animais do grupo controle em A (seta). Técnica Hematoxilina e Eosina. Aumento original 40x.

A borda em escova das células dos túbulos proximais dos animais intoxicados (Figura 18 B) sofreu uma sensível diminuição em relação à borda estriada nas das células dos animais do grupo controle (Figura 18 A). Esta diminuição foi mais bem observada quando essas células foram submetidas à reação histoquímica do PAS. Com o auxílio desta técnica foi possível visualizar com mais clareza os microvilos que formaram a borda em escova das células tubulares.

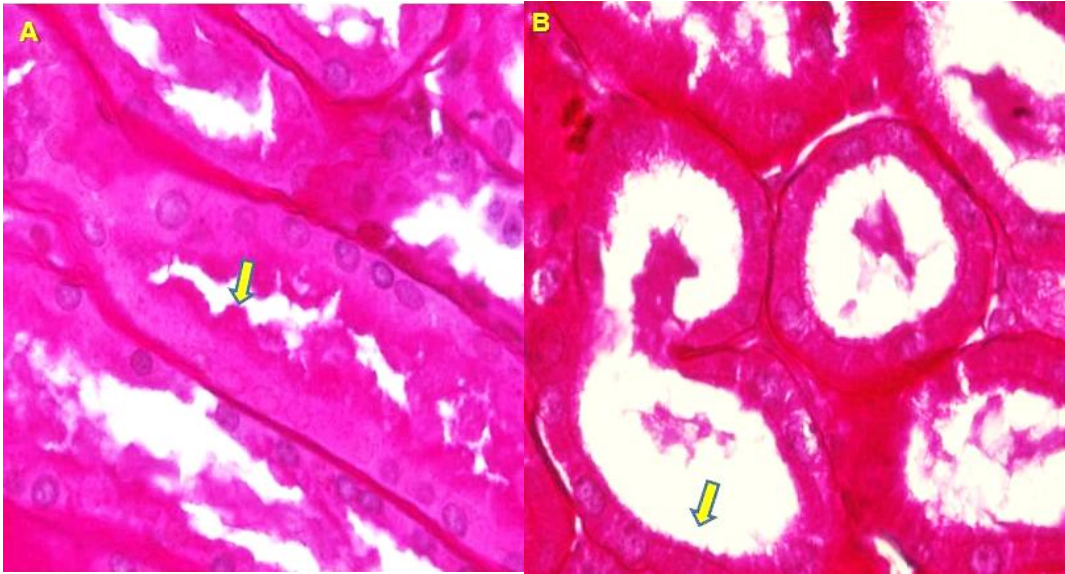


Figura 18. Fotomicrografia de lâminas de rins de macaco coradas pelo PAS onde se pode comparar os túbulos proximais dos animais usados como grupo controle em A (seta) e os túbulos após a exposição ao metilHg em B (seta). Foi notada a diminuição da borda em escova e subsequente aumento do diâmetro lumial. Aumento original 40x.

A técnica do PAS também evidenciou a população das células mesangiais no interior do glomérulo, onde se observou que estas coraram fortemente em magenta nos animais do grupo controle e nos animais expostos. Nos animais expostos ao metilHg notou-se uma diminuição acentuada das células do mesângio intra glomerular (Figura 19 B).

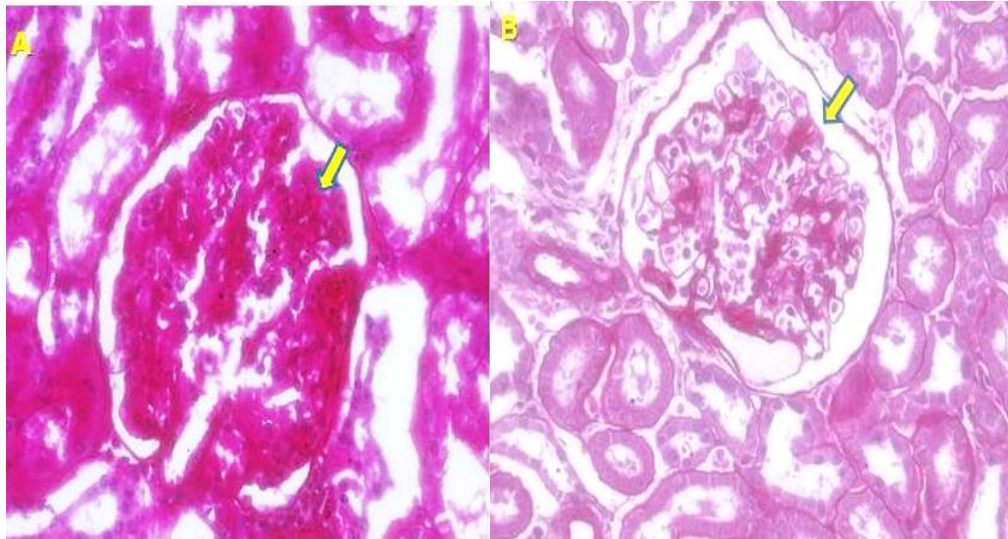


Figura 19. Fotomicrografia de lâminas de rins de macaco coradas pelo PAS onde se pode comparar os glomérulos dos animais usados como grupo controle e sua população de células mesangiais em A (seta) e os glomérulos após a exposição ao metilHg em B, notou-se a diminuição das células mesangiais coradas em magenta pela técnica (seta), Aumento original 40x.

Após o tratamento das lâminas de rins de *Cebus apella* para detecção de Actina de músculo liso (1A4), Actina muscular (HHF35) e Pancitoqueratina (AE1/AE3) foi observada a marcação de células mesangiais. Foi observada a marcação em células musculares lisas dos vasos sanguíneos que funcionou como controle interno da imunomarcação. Evidenciou-se também marcação do polo urinário, e das células mesangiais nos animais controle. Nos animais expostos, ocorreu marcação fraca apenas nos vasos sanguíneos enquanto que nos glomérulos não houve deflagração da resposta imunocelular.

Após a aplicação da reação imuno-histoquímica para a marcação de actina de músculo liso (IA4) nas células do parênquima renal de macacos prego observou-se marcação positiva para as células das paredes dos vasos sanguíneos e com destaque para as células mesangiais dos glomérulos dos

animais do grupo controle. Nos animais expostos houve um bloqueio considerável da reação. (Figura 20).

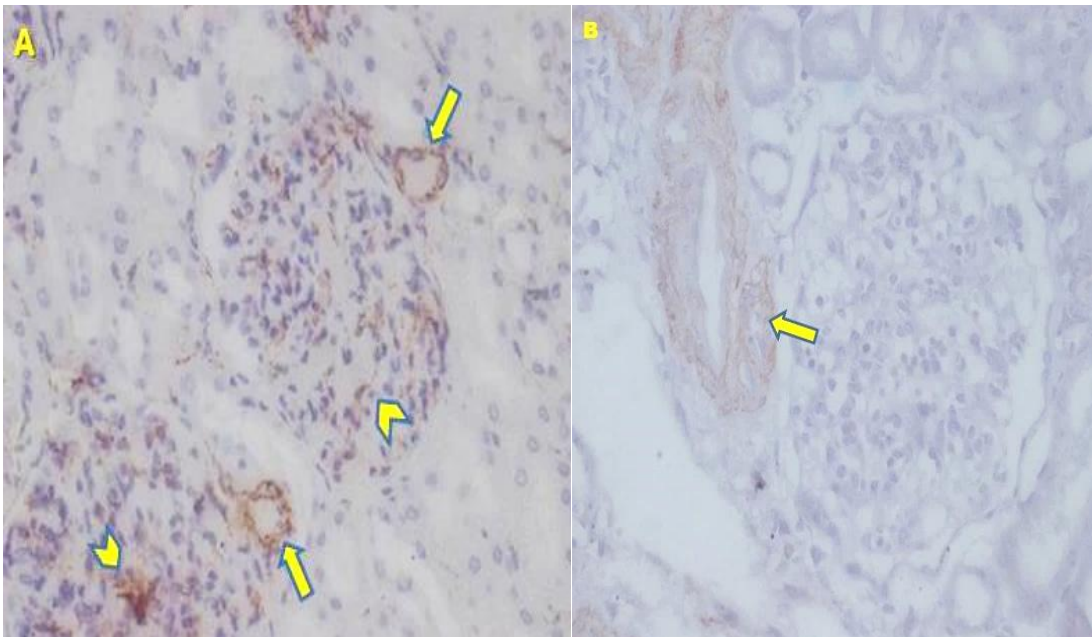


Figura 20 Fotomicrografia de lâminas de rins de macacos submetidas à imuno-histoquímica para marcação de actina de músculo liso (IA4). Nos animais do grupo controle (A) a marcação fortemente positiva indica as células da parede dos vasos (setas) e células mesangiais (cabeça de seta). Nos animais do grupo exposto (B) observa-se um bloqueio parcial da reação para o músculo liso dos vasos (seta) e total para as células mesangiais. Aumento original 40x

A reação imuno-histoquímica para a detecção de Actina muscular (HHF35) em células renais de macacos mostrou positividade intensa nas paredes dos vasos sanguíneos e para as células mesangiais. Quando submetidas ao tratamento com o metilHg houve um bloqueio da reação em todo o parênquima renal.(Figura 21).

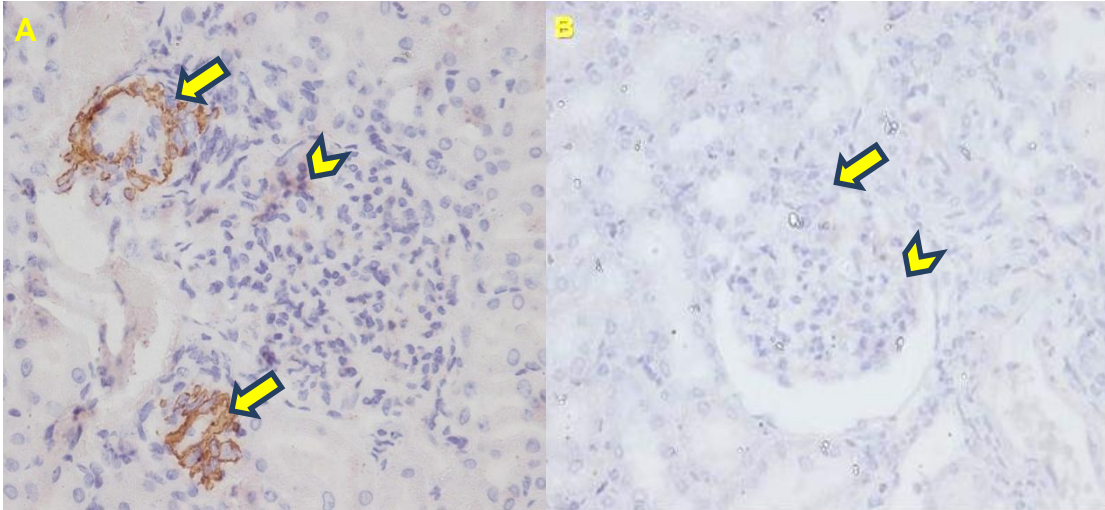


Figura 21. Fotomicrografias de imuno-histoquímica de rins de macaco prego para a detecção de Actina muscular (HHF35). Pode-se observar nos animais controle (A), reação fortemente positiva para a parede dos vasos (setas) e moderada para as células mesangiais (cabeças de seta). No entanto para nos animais expostos ao metilHg (B) houve um bloqueio total da reação, tanto para os vasos (seta) quanto para as células mesangiais (cabeça de seta). Aumento original 20x

A marcação para Pancitoqueratina (AE1/AE3) demonstrou forte positividade nos túbulos distais do controle sem marcação para as células mesangiais enquanto que nos animais expostos embora tenha ocorrido uma reação mais fraca ainda persistiu a marcação para os túbulos distais. (Figura 22).

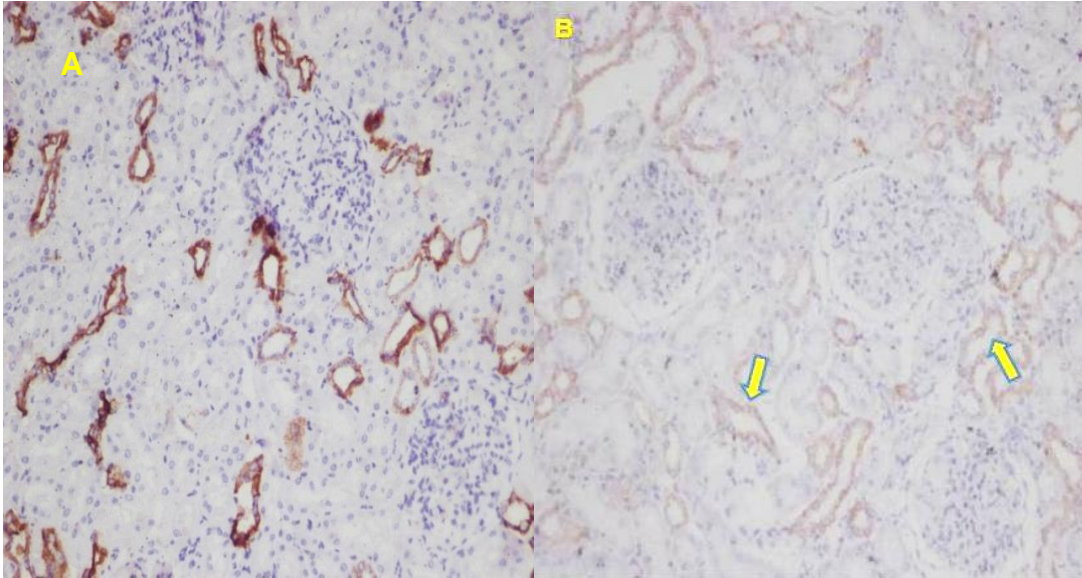


Figura 22: Fotomicrografia de rins de *Cebus apella* após reação imuno-histoquímica para Pancitoqueratina (AE1 e AE3) Observa-se reação fortemente positiva para as lâminas dos animais controle (A) destacando os túbulos distais (seta), enquanto que nos animais expostos ao metal (B), a reação persistiu nos túbulos muito embora tenha sido mais fraca (seta). Aumento original 20x,

5 DISCUSSÃO

5.1 CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS

Os seres humanos podem ser expostos ao mercúrio principalmente através da inalação, absorção dérmica e a via oral e os efeitos de tal exposição dependem tanto do tipo de mercúrio como da magnitude da exposição. Em geral, os efeitos mais danosos da exposição ao metilHg são neurológicos, o que justifica o número considerável de estudos acerca das injúrias do metal sobre o sistema nervoso. Entretanto, há uma série de outros sistemas que podem também estar envolvidos na toxicidade do metal, incluindo urinário, gastrointestinal, respiratório, imunológico assim como o fígado e a pele (ZALUPS, 2000; RISHER, MURRAY e PRINCE, 2002).

Estudos sobre os efeitos lesivos dos organomercuriais nos sistemas biológicos ocorrem há décadas, mas geralmente com doses altas e exposição aguda. Avaliações sobre características histopatológicas de sistemas não neurais e características bioquímicas em exposição crônica com baixas doses de metilHg são relevantes para se observar as alterações primárias causadas pelo metal (MARTINS, 2007).

5.2 O MODELO ANIMAL

O crescente interesse em modelos animais, em particular nos primatas não humanos, tem conduzido a estudos que possam simular condições patológicas ou fisiopatológicas que correspondam ao que pode ocorrer aos tecidos humanos quando expostos a essas condições. Em se tratando de intoxicações de experimentação que levem a formação de nefropatias, os primatas têm sido referência para esses estudos e revelam que a arquitetura celular é similar à descrita para os humanos (CARLSON, SURERUS e HINDS, 1986; MAGNO, 2009; SILVA, 2011).

Os resultados deste trabalho demonstram que a exposição crônica a baixas doses de metilHg promoveu efeitos adversos no parênquima renal de animais de experimentação (*Cebus apella*), indicando que este modelo de intoxicação pôde causar alterações semelhantes às referidas na literatura, quando os sintomas característicos da intoxicação mercurial manifestaram-se tanto em animais como em humanos (DIETZ *et al.*, 1990; HANSEN, ZHANG e HONES, 2006).

5.3 EFEITO NO PESO DOS ANIMAIS

A intoxicação mercurial experimental neste estudo demonstrou uma relação íntima entre a concentração de mercúrio total e a perda de peso corporal dos animais. Estes achados estão de acordo com os descritos na literatura consultada que incluíam, entre os efeitos da sintomatologia clássica

do mercúrio, a perda de peso tanto em animais de experimentos (FIMREIT e KARSTAD, 1971; ZALUPS, 2000; AZEVEDO, 2003; HAZELLHOFF, BULACIO e TORRES, 2012) quanto em humanos intoxicados como resultado de atividades ocupacionais (OLIVEIRA e SILVA, 1996; AZEVEDO, 2003; FARIA, 2003; STEHLING, LIMA e LIMA, 2011; MILLER *et al.*, 2013).

Desde o início dos experimentos a perda de peso foi uma condição eleita como um dos sinais clássicos da intoxicação mercurial (AZEVEDO, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2011); por esse motivo, os animais tiveram seus pesos monitorados a cada manipulação. De acordo com os nossos achados, as perdas variaram significativamente e apresentaram uma relação estreita com a concentração do HgT. Muito embora a concentração do mercúrio relacionada com o acúmulo de Hg no organismo ainda não seja bem conhecida, esses dados se assemelharam aos descritos por Fimreit e Karstad (1971), onde os autores observaram uma perda de 20 a 36% do peso corporal de aves alimentadas com dieta rica em metilHg.

A relação entre a exposição mercurial e a perda de peso também foi relatada por Oliveira e Silva, (1996) em um paciente humano onde foi registrada uma perda de 3 Kg de peso corporal em 2 meses de intoxicação.

Os nossos resultados nos levaram a crer que a intoxicação crônica com baixas doses de metilHg interagiu no metabolismo corporal dos animais do experimento levando a uma perda de peso considerável e apesar desta perda de peso ter sido associada à sintomatologia clássica da intoxicação mercurial, a maioria dos autores não fez essa relação em seus trabalhos, o que dificultou

a comparação de nossos dados com outros obtidos para primatas não humanos.

Nas condições descritas neste estudo, observamos que a intoxicação crônica com metilHg induziu o aumento da concentração de Hg-T no sangue dos animais usados neste experimento, uma vez que, feitas as análises de mercúrio total no sangue de todos os animais envolvidos no estudo, observamos que, à medida que os animais foram sendo expostos ao metilmercúrio, aumentavam progressivamente as concentrações de HgT no sangue dos animais. O aumento relativo dessa concentração variou numa escala crescente até o término do experimento produzindo uma nítida elevação da concentração do mercúrio total no sangue quando comparado com os animais do grupo controle.

5.4 A ANÁLISE DO MERCÚRIO TOTAL

A verificação da toxicidade dos animais pelo metilHg foi realizada através da quantificação do mercúrio total nas amostras de sangue, pois o teste considerou que o metilHg apresentou partição entre o plasma e as células vermelhas. Mediante as biotransformações que podiam ocorrer ao longo do ciclo do metal, acreditamos que, a mensuração do mercúrio total foi um bom indicador dos níveis de toxicidade do metilHg, esse dado corroboram com os observados por Tavares (1992); Akagi (2004) e Martins (2007).

5.5 INTERAÇÕES ENTRE O MERCÚRIO E A FUNÇÃO RENAL

O metilHg se deposita principalmente no fígado e rins, devido aos fenômenos que envolvem sua absorção, acúmulo e excreção. A grande dificuldade na identificação dos sinais da intoxicação por metilHg reside na presença de fatores que possam interagir com as populações expostas e passam a mascarar a intoxicação mercurial simulando sintomas similares aos de outras doenças (WASSERMAN, HACON e WASSERMAN, 2003; JOHNSON, 2004). Desta forma, foi necessário lançar mão de métodos bioquímicos para a avaliação do grau de nefrotoxicidade do metal durante o experimento.

O método rotineiramente usado para avaliar a função renal é a mensuração da concentração plasmática de substâncias normalmente excretadas pelos rins. A avaliação dos níveis de creatinina e ureia são os testes mais comumente utilizados na rotina laboratorial. Para avaliação desses dados, é importante o conhecimento dos fatores que podem afetá-los como as doenças renais (SODRÉ, COSTA e LIMA, 2007).

Essa alteração dos indicadores da função renal ocorre quando cerca de 75% da função renal é perdida e, dessa maneira, o conhecimento e utilização de métodos que permitam o reconhecimento mais precoce da doença renal torna-se muito importante para um melhor prognóstico da insuficiência renal induzida pelo mercúrio (LANIS *et al.*, 2008).

A creatinina e a ureia séricas são indicadores da função renal, pois aumentam progressivamente quando há excesso de componentes nitrogenados no sangue e esse aumento pode ser indício da disfunção renal (STOCKHAM e SCOTT, 2002; MILLER, *et al.*, 2013).

As lesões morfológicas renais de qualquer extensão ou severidade podem levar a anormalidade bioquímica relacionada à função renal (GREGORY, 2003), ou seja, os valores alterados da creatinina e ureia indicam a existência de lesão renal sem qualificar a causa, a gravidade, a distribuição ou estágio da função renal. Devido à extensa reserva funcional do rim, uma doença renal severa pode estar presente mesmo na ausência de sinais clínicos ou alterações laboratoriais que indiquem insuficiência renal (GREGORY, 2003).

A reserva funcional do rim pode ser considerada como um percentual dos néfrons não necessários para manter a função renal. Esta reserva varia de um animal para outro, mas é maior do que 50% em mamíferos como cães e gatos saudáveis (NELSON e COUTO, 2001; KUMAR, 2010).

A insuficiência renal pode ser classificada como aguda (IRA), que resulta de uma redução súbita na função renal e geralmente é causada por uma agressão tóxica ou isquêmica que pode ser reversível, e crônica (IRC), que ocorre em períodos mais prolongados variando de semanas ou até anos (KUMAR, 2010). Segundo Nelson e Couto (2001), a IRC é a principal causa de morte entre os mamíferos não humanos, sendo a lesão do néfron irreversível.

A insuficiência renal é classificada de acordo com o principal local afetado no parênquima do órgão, sendo a causa mais comum àquela relacionada ao dano tubular de origem isquêmica ou tóxica. Estudos posteriores revelaram que os metais pesados causam essa toxicidade tubular direta (NICHOLSON *et al.*, 1985, CONNER e FOWLER, 1993; FINCO, 1999; ZALUPS, 2000; AZEVEDO, 2003; FARIA, 2003; JOHNSON, 2004; MILLER *et al.*, 2013).

Apesar dos nossos resultados terem indicado lesão renal, os valores da creatinina e ureia permaneceram dentro dos patamares de normalidade quando os animais tratados eram comparados com os animais do grupo controle. Esses dados foram concordantes com aqueles encontrados por Zavariz e Glina (1992), ao observar que, dos 61 trabalhadores diagnosticados com sintomas de intoxicação crônica, após exames de função renal verificaram que a ureia estava elevada em apenas 4 casos e creatinina elevada somente em 2 casos.

Muito embora tenha sido observada uma diferença significativa entre os níveis de creatinina e ureia entre os animais do grupo controle e os animais expostos, os valores de ambos permaneceram dentro da faixa de normalidade dos indicadores.

Para Carmignani *et al.*, (1992) as alterações orgânicas que se manifestam em decorrência da exposição ao metilHg envolvem múltiplos órgãos principalmente os rins, porém como descrito acima, no experimento no qual os animais foram expostos durante 120 dias a baixas doses de metilHg, a creatinina e a ureia mantiveram os valores de referência normais, o que pode justificar o acometimento maciço dos órgãos em um tempo maior de exposição ou com uma dose mais elevada.

Os nossos resultados foram semelhantes àqueles encontrados por Chen, Body e Mottet (1983) quando submeteram macacos rehsus à baixas doses de metilHg por um período de 2 a 5 meses de exposição diária. Após um ano da exposição os valores Hg no fígado e intestino diminuíram consideravelmente quando comparados com o início do experimento, enquanto que nos rins a concentração do metal permaneceu grandemente aumentada,

no entanto os dados laboratoriais da função renal não revelaram diferenças significativas entre o grupo exposto e o grupo controle.

5.6 ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS

Todas as formas de mercúrio têm efeitos tóxicos na maioria dos tecidos animais, especialmente nos rins, no entanto, o mercúrio orgânico tem uma ação mais moderada quando comparada com o mercúrio inorgânico, sendo a porção proximal dos túbulos renais a região mais suscetível para os efeitos tóxicos do metilHg (ZALUPS, 2000; FLORA, MITTAL e MEHTA, 2008; HAZELHOFF, BULACIO e TORRES, 2012; MILLER *et al.*, 2013).

Observou-se neste estudo, nos animais expostos ao metilHg, lesões histopatológicas caracterizadas como degeneração hidrópica nos túbulos proximais do tecido renal, sem alterações nos valores de referência dos indicadores da função renal (creatinina e ureia). Esses valores se mantiveram normais tanto nos animais do grupo controle quanto nos animais do grupo exposto.

De uma maneira geral, houve alteração da morfologia celular dos túbulos, com aumento do volume citoplasmático das células epiteliais pela presença de vacúolos citoplasmáticos e diminuição dos microvilos das células de revestimento dos túbulos proximais. No entanto as alterações não se

limitaram somente aos túbulos renais, como descritos pela grande maioria dos autores (NICHOLSON *et al.*, 1985; CONNER e FOWLER, 1993; ZALUPS, 2000; AZEVEDO, 2003; FARIA, 2003; MAGNO, 2009; BRIDGES e ZALUPS, 2010; LI *et al.*, 2010). Pudemos constatar, neste trabalho, considerável redução do número das células mesangiais glomerulares, dado até então não referido na literatura consultada, não permitindo a comparação bioquímica e histopatológica para primatas não humanos expostos ao metilHg, o que torna o presente trabalho inédito.

Segundo Kumar *et al.*, (2010), na degeneração hidrópica ocorre a redução da fosforilação oxidativa, depleção no armazenamento de energia e tumefação celular causada por alterações da concentração de íons e o influxo de água, comprometendo a regulação do volume celular, que é um processo relacionado, basicamente, ao controle das concentrações de sódio (Na^+) e potássio (K^+) no citosol. Portanto, todos os processos agressivos que reduzem a atividade da membrana plasmática, da bomba de Na^+/K^+ e da produção de ATP pela célula, levam a retenção de Na^+ no citoplasma, deixando escapar o K^+ e com isto há um aumento da concentração de água no citoplasma da célula.

A hidropsia surge quando as células se tornam incapazes de manter a homeostasia iônica e líquida, sendo resultante da falha da bomba de íons dependente de energia na membrana. Quantidades residuais de venenos e sais de mercúrio podem levar a esse tipo de degeneração celular e os resultados observados neste experimento conferiram com aqueles descritos por Magno (2009) para túbulos renais de cebus expostos ao metilHg.

A lesão acima descrita, poderia estar diretamente relacionada à vacuolização observada no citoplasma das células tubulares renais dos animais expostos ao metilHg. Segundo Vassaloet *al.* (1996) os compostos mercuriais podem interferir na fosforilação oxidativa por destruírem enzimas de oxidação (ATPase), alterando a homeostase da bomba de Na^+/K^+ , o que segundo Fabris (1999) produzirá degeneração hidrópica celular.

Segundo Green (1998) a redução da síntese do ATP está comumente associada às lesões por hipóxia e a exposição às substâncias químicas tóxicas, com conseqüente edema celular e estresse oxidativo. Este fato explicou as alterações histopatológicas renais encontradas no grupo de animais expostos ao metilHg neste estudo, enquanto que no grupo de animais controle não foram encontradas alterações histopatológicas.

A grande maioria dos autores nas referências consultadas não se referiu às alterações que o metilmercúrio causou especificamente ao glomérulo. No entanto os nossos resultados convergiram para a diminuição do número da população de células mesangiais. E para diferenciá-las das demais submetemos os rins dos animais a várias reações imuno-histoquímicas para constatar qual o tipo de células do interstício glomerular teve seu número reduzido.

As células mesangiais destacam-se pelo seu papel primordial na consonância funcional entre as células do parênquima renal, elas são capazes de assegurar a hierarquia e a efetividade das respostas biológicas integradas a uma sofisticada rede de bioautomação renal. As células mesangiais juntamente

com sua matriz mesangial formam a região glomerular denominada mesângio(SCHLONDORFF, 1996; SANTOS, 2013).

Durante muito tempo as células mesangiais foram consideradas apenas estruturas histológicas de sustentação axial para as alças capilares no interior dos glomérulos. Atualmente elas são vistas como uma forma especial de pericitos microvasculares, que formam uma unidade de integração funcional mesangio-endotélio-epitélio. Localizadas estrategicamente, as células mesangiais estão diretamente envolvidas nos fenômenos biológicos que regem a embriologia e a fisiologia renais (SCHLONDORFF, 1996; MASSUYA, *et al.*, 2003).

Neste circuito triplamente integrado, as alterações que ocorrem em um tipo de célula podem produzir efeitos correspondentes em outras. As interações resultam em vias de sinalização que incluem o contato celular através das junções do tipo Gap, dos hormônios, citocinas e quimiocinas (BRUNSKILL, 2012).

As propriedades contrácteis das células mesangiais permitem que elas participem do controle do fluxo capilar intraglomerular da área de ultrafiltração glomerular e, conseqüentemente, da taxa de filtração glomerular em cada néfron. Além disso, as células mesangiais produzem componentes estruturais dos glomérulos, agentes vasoativos, fatores de crescimento, eritropoetina e elementos do sistema de complemento. Justificando seus efeitos parácrinos, as células mesangiais expressam receptores para diferentes agentes vasoativos, moléculas de adesão entre outros. Este conjunto de fatores insere fisiologicamente as células mesangiais na regulação funcional e no remodelamento do tecido renal (SCHLONDORFF, 1996).

As ferramentas de investigação mais modernas revelam a participação ativa das células mesangiais em diferentes processos fisiopatológicos que acometem o néfron. Dentre eles, se destaca a relação entre proliferação das células mesangiais e o desenvolvimento subsequente da matriz mesangial, verificada nos processos de injúria glomerular de origem imune e não imune com ênfase especial na fisiopatologia da nefropatia diabética, glomerulonefrite e síndrome nefrótica (SCHOR, SANTOS e BOIM, 2000; BRUNSKILL, 2012; MILLER, *et al.*, 2013).

A análise detalhada da intimidade do glomérulo mostra que as células mesangiais não são completamente homogêneas. Até 10% delas apresentam fenótipo diferente das demais e exibem capacidade fagocítica, expressando marcadores de superfície e citocinas somente encontrados nas células do sistema imune, por isso denominadas células dendríticas mieloides. Ainda, as células mesangiais expressam receptores que reconhecem antígenos de superfície bacterianos e RNA viral evidenciando estreita ligação do sistema de imunidade inata com as células mesangiais, tornando-as um gatilho para a resposta inflamatória e sítio de interação com imunocomplexos, no curso de insultos renais e de doenças sistêmicas (SCHLONDORFF, 1996).

No aspecto proliferativo, o controle da celularidade renal também sofre interferência das células mesangiais, que produzem tanto citocina mitogênica como pró apoptótica (JOHNSON, 2004; BAKER *et al.*, 1994). De acordo com o observado no nosso trabalho, o metilHg promoveu a diminuição do número de células mesangiais interferindo de alguma forma a produção de substâncias mitogênicas pelas próprias células mesangiais, uma vez que elas são responsáveis pela reposição de novas células no parênquima renal.

Os instrumentos de pesquisa moleculares foram decisivos no avanço do conhecimento nefrológico. Dentre as moléculas envolvidas na fisiologia e fisiopatologia renal, a Angiotensina II ocupa um papel especial. É um peptídeo cujos efeitos biológicos são doses dependentes e se deflagram através dos receptores teciduais localizados no rim e em tecidos sistêmicos. Desde o final da década de 80, a AgII tem sido diretamente implicada no desenvolvimento da esclerose glomerular, por meio da indução da síntese e da secreção do fator transformador β . No mesângio, além dos efeitos contrácteis, a AgII também induz hipertrofia das células mesangiais e interfere na estrutura arquitetônica dos glomérulos e do rim (MAGNO ,2009).

É comprovado que o mercúrio inibe a atividade da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ nas células do parênquima renal provocando alterações nas membranas celulares e além desses efeitos ainda deprime a atividade da $\text{Ca}^{2+}\text{ATPase}$ o que interfere na captação do Ca^{2+} para o retículo endoplasmático de células musculares. (VASSALO *et al.*, 1996; APOSTOLI, MANGILI e ALESIO, 2003; MAGNO, 2009, SILVA, 2011).

Hirooka *et al.* (2010) observaram que pericitos são marcadamente suscetíveis a citotoxicidade induzida por metilmercúrio. Com base nos achados dos autores, foi possível deduzir que o metilHg interferiu na atividade metabólica das células mesangiais que provavelmente expressavam a função de pericitos na presença do Ca^{2+} , explicando desta forma, a diminuição da população de células mesangiais nos glomérulos renais dos animais expostos ao metal durante o período do experimento.

6 CONCLUSÕES

Face ao exposto acreditamos ser lícito concluir que:

- A intoxicação experimental com metilHg resultou no acúmulo do metal no soro dos animais, elevando gradativamente os níveis de mercúrio total nos animais intoxicados quando comparados ao grupo controle, caracterizando a exposição do grupo experimental ao longo do ensaio;
- O peso dos animais que receberam o metilHg, foi claramente afetado de maneira tal que os animais não puderam manter os pesos observados no início do experimento esse efeito do metilHg pode acarretar implicações diretas no metabolismo renal dos animais tratados;
- Não foi observada associação positiva entre as alterações histopatológicas dos rins com os níveis séricos de creatinina e ureia nos animais expostos e a ausência de correlação entre os níveis de Hg Total e os indicadores da função renal necessitam de novos estudos para elucidar quais os valores de metilHg são capazes de desencadear alterações na creatinina e ureia em *Cebus apella*;
- As alterações histopatológicas no parênquima renal do grupo dos animais expostos foram caracterizadas por degeneração hidrópica das células de revestimento dos túbulos proximais e hipoplasia das células mesangiais, sem processo inflamatório evidente, contudo novos estudos imuno-histopatológicos devem ser realizados para o melhor entendimento do mecanismo de ação do metilHg nos danos causados ao tecido renal;

Em resumo, os nossos resultados demonstraram que o parênquima renal de *Cebus apella*, quando submetido à exposição crônica a baixas doses de metilHg sofreu danos estruturais nos túbulos renais como um dos mecanismos de toxicidade do mercúrio nesse órgão. Este trabalho também nos levou a análise de que eventos celulares que ocorrem na injúria renal deixaram de ser focados apenas no epitélio tubular estendendo-se a todo o néfron. Este conjunto de resultados reforça a hipótese mais consistente de que, as células mesangiais podem despontar como protagonistas da função renal e alvo terapêutico para novas perspectivas no tratamento de perturbações parenquimatosas renais.

De acordo com o que foi exposto deixamos uma sugestão no sentido de estimular novos ensaios clínicos em animais de experimentação e ensejar pesquisas para o melhor entendimento dos mecanismos da intoxicação mercurial nos rins e alertar a comunidade médica do nosso estado, sobretudo nas zonas de risco como locais de garimpo de ouro ou indústrias que utilizam o mercúrio sem os meios de proteção recomendados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAGI, H. Manual de análises de Mercúrio. **Ministério do Meio Ambiente do Japão**. Belém, p119, 2004.

AKAGI, H., MALM, O. KINJO, Y., HARADA, M., BRANCHES, F. P. J., PFEIFFER, W. C., KATO, H. Methylmercury pollution in Amazon, Brazil. **Sci. Total Environ.** 175: 85-95, 1995.

AMIN-ZAKI, L.; ELHASSANI, S.; MAJEED, M.A.; CLARKSON, T.W.; DOHERTY, R.A.; GREENWOOD, M.R.; GIOVANOLI-JAKUBCZAK, T. Perinatal methylmercury poisoning in Iraq. **American Journal of Diseases of Children**, v. 130, p. 1070-1076, 1976.

AMORIM, M. I. M; MERGLER, D.; BAHIA, M. O.; DUBEAL, H.; MIRANDA, D.; LEBEL, J.; BURBANO, R. R.; LUCOTTE, M. Citogenetic damage related to low levels of methylmercury contamination in the Brazilian Amazon. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 72, n. 4, Rio de Janeiro, dez. 2000.

APOSTOLI, P; MANGILI, A; ALESSIO, L. – Significance of biological indicators of mercury exposure. **Neurotoxicity Research**. v. 5, n. 4, p. 283-305, 2003.

AZEVEDO, A. F. Algumas bases bioquímicas da toxicodinâmica do mercúrio. **Revista da Sociedade Brasileira de Toxicologia**. v. 2, n. 1, jan. 1989.

AZEVEDO, A.F. Toxicologia do Mercúrio. **InterTox**. São Paulo p.292, 2003.

AZEVEDO, A.F; NASCIMENTO, S.E. e CHASIN, A.A.M. Mercúrio. In: **Metais Gerenciamento da Toxicidade**. Atheneu, p.299-352, 2003.

BAKER, A.J.; MOONEY, A.; HUGHES, J.; LOMBARDI, R.J.; SAVILL, J. Mesangial cell apoptosis: the major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative nephritis. **J Clin Invest**. 94(5): 2105–2116, 1994.

BAKIR, F.; DAMLUJI, S.F.; AMIN-ZAKI, L.; MURTHADA, M.; KHALIDI, A.; AL-RAWI, N.Y.; AL-TIKRITI, S.; DHAHIR, H.I.; CLARKSON, T.W.; SMITH, J.C.; DOHERTY, R.A. Methylmercury poisoning in Iraq. **Science**, v.181, p. 230-241, 1973.

BARKAY, T.; DOBLER, W.I. Microbial transformations of Mercury: potentials, challenges and achievements in controlling Mercury toxicity in the environment. **Adv. Appl Microbiol**. v57:1-52, 2005.

BARREGARD, L.; REKIÉ, D.; HORVAT, M.; ELMBERG, L.; LUNDH, T.; ZACHRISSON, O.; Toxicokinetics of mercury after long-term repeated exposure

to thimerosal-containing vaccine. **Toxicological Sciences.** 120(2),499-506, 2011.

BASTOS, M.G; KIRSTAJN, G.M. Chronic kidney disease: importance of early diagnosis, immediate referral and structured interdisciplinary approach to improve outcomes in patients not yet on dialysis. **J. Bras. Nefrol.** 33(1): 93-108, jan-mar. 2011.

BATTIGELLI, M.C. Mercury. *In*: PICAZO, J.E.; FERNANDEZ VOZMEDIANO. **Actualidad Dermatologica.** v. 33, p.683-695,1994.

BERLIN, M.; FRIBERG, L.; NORDBERG, G. R.; VOUK, V. B. **Handbook on the Toxicology of Metals.** p. 387-445, Elsevier, New York, 1986.

BERLIN, M.; ZALUPS, .K.; FOWLER,B. Mercury. *In*: **Handbook on the toxicology of metals.** GUNNAR, F.N.; FOWLER, B.; NORDBERG, M.;FRIBERG, L. Thirrd Edtion. American Press on imprint of Elsevier, USA, p.703-713, 2007.

BERLIN, M; GRANT, C.A; HELBERG, J; HELLSTRÖM, J and SCHÜTZ, A: Neurotoxicity of methylmercury in squirrel monkeys. Cerebral cortical pathology, interference with scotopic vision and changes in operant behavior. **Arch. Environ. Health.** 30:340-348, 1975.

BEUTER, A. and EDWARDS, R. Tremor in cree subjects exposed to methylmercury: a preliminary study. **Neurotoxicology Teralogy.** v. 20, n. 6, p. 581-589, 1998.

BIDONE, E.D.; CASTILHOS, Z.C.; SANTOS, T.J.S.; SOUZA, T.M.C.; LACERDA, L.D. Fish contamination and human exposure to mercury in Tartarugalzinho River, Amapá State, Northern Amazon, Brazil: A screening approach. **Water Air Soil Polluttion**,v. 97, p. 9-15, 1997.

BJORKMAN, L.; SANDBORGH-ENGLUND, G.; EKSTRAND, J. Mercury in saliva and faces after removal of amalgam fillings. **Toxicology appl. Pharmacology.** v. 144, n.01, p.156-162, 1997.

BONCI, D.M.O. **Estudo dos pigmentos visuais de macaco prego (Cebus sp.) e da relação psicofísica e a genética da visão em cores em humanos.** Tese de doutorado em Neurociencias e Comportamento, Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, 2011.

BORDA, T.J; BASTOS, V.N; ESCALÁ,S.P.; NEGRETTE, M.S. Histopathological characterization of nephritides in the brown capuchin monkey, *cebus apella* (Primates: Cebidae).**Rev. Biol. Trop.** v48,n1, San José, 2000.

BORNSCHEIN, R.L., KVANS, S.R.A. Biologicals effects of heavy metal exposure. In: Press LRC. **Effects of Heavy Metals**. vol 1, p. 110-214, 1990.

BRANCHES, F. R. Y.; ERICKSON, T. B.; AKS, S. E.; HRY, D. O. He prime of void: mercury exposure in the Amazonian. Rain forest. **Journal of Toxicology**. p. 295-306, 1993.

BRANCO, E. JR; ISHIZAKI, M.N.; PEREIRA, W.L.A.; MENEZES, A.M.C.; MUNIZ, J.A.P.C.; FIORETTO, E.T. Morfologia Macroscópica do aparelho urogenital do macaco de cheiro (*Saimiri sciureus*, Linnaeus, 1758). **Biotemas**, 23(1): 197-202, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância em saúde e saúde do trabalhador. **Coletânea de informações sobre o mercúrio incluindo padrões ambientais no Brasil**. Disponível em : <http://www.mma.gov.br>. Janeiro de 2010.

BRIDGES, C.C; ZALUPS, R.K.; Transport of inorganic mercury and methylmercury in target tissues and organs. **Journal of Toxicology and Environmental Health**. Part B, a critical reviews. Vol13, issue 5, p. 385-410, 2010.

BRUNSKILL, P.S.S. Changes in the gene expression programa of renal mesangial cells during diabetic nephropaty. **B.M.C Nephrol**, 13:70, 2012

BUDTZ-JOEGENSEN, E.; GRANDJEAN, P.; WEINE, P. Separation of risks and benefits os sea food intake. **Environ. Helth. Persperct**. 11593: 323-327, 2005.

BUFFON (1767) apud FORD, S.M. Systematics of the New Word Monkeys. In: **Comparative Primate Biology: Systematics, Evolution and Anatomy**. Vol.1, 1986.

BURBACHER, T,N.; SHEN, D.D.; LIBERATO, N.; GRANT, K.S.; CERNICHIARI, E.; CLARCKSON, T. Comparison of blood and brain mercury levels in infant monkeys exposed to methylmercury vaccines containg thimerosal. **Environmental Health Perspectives**, 113(8): 1015-1021, 2005.

BURBACHER, T. M.; RODIER, P. M.; WEISS, B. Methylmercury developmental neurotoxicity: a comparison of effects in humans and animals. **Neurotoxicology Teratology**. v. 12, n. 3, p. 191-202, 1990.

CALSON, E.C.; SURERUS, K.K. & HINDS. Ultrastructural analisys of major basement membrane types in rhesus monkey macaca mulatta acelular renal cortex. **Acta. Anat. (Basel)**, 125(1): 14-22, 1986.

CÂMARA, V. M.; SILVA, A P.; GALVÃO, L. A. Contaminação ambiental por mercúrio na região Amazônica: subsídios para um programa de vigilância das populações expostas. **Organização Panamericana de Saúde - OPAS/Organização Mundial de Saúde - OMS**. 2000.

CARMIGNANI, M.; BOSCOLO, P.; ARTESE, L.; DEL ROSSO, G.; PONCELLI, G.; FELACO, M.; VOLPE, A.R.; GIULIANO, G. Renal mechanisms in the cardiovascular effects of chronic exposure to inorganic Mercury in rats. **Brit.J.Ind.Med.** 49, 266, 1992.

CASARETT, L. Toxicology, the basic science of poisons. **Curtis D. Klassen**, 6^a Ed.; Mc.Graw Hill, p834–837, 2001.

CASTOLDI, A. F.; COCCINI, T.; MANZO, L. – Neurotoxic and molecular effects of methylmercury in humans. **Med Lav.** v.94, n.2, p 231, 2003.

CERNICHIARI, E.; BREWER, R.; MYERS, G.J.; MARSH, D.O.; LAPHAM, L.W.; COX, C. Monitoring methylmercury during pregnancy: maternal hair predicts fetal brain exposure. **Neurotoxicology**, v. 16, p. 705-710, 1995.

CHEN, W.; BODY, R.L.; MOTTET, N.K; Biochemical and morphological studies of monkeys chronically exposed to methylmercury. **Journal of Toxicology and Environmental Health.** Vol.12, Issue 2-3, 1983.

CLARKSON, T.W. Molecular and ionic mimicry of toxic metals. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**.v. 32, p. 545-571, 1993.

CLARKSON, T.W. Recent advances in the toxicology of mercury with emphasis on the arylmercurials. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 1, p. 203-234, 1972.

CLARKSON, T.W. The toxicology of mercury. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, 34. 369-403, 1997.

CONNER, E.A & FOWLER, B.A. mechanisms of metal induced nephrotoxicity in: **Toxicology of the Kidney.** Cap. 16, p 437. Second edition. Raven press.Ltd New York, 1993.

CORBETT, C.E.P.; COSTA, A.N.; GUYRICZA, J.V.; CORDEIRO, J.R.; FRIZZARINI, R.; ANDRADE, D.C.A.; KHOURI, M.E.; STRAVOGIANNI, A.; CORBETT, J.F.; PINHEIRO, M.C.N. Clinical evaluation of mercury exposure in the population of the Serra Pelada Village, Pará, Brazil. In: **International Workshop on Health and Environmental Effects of Mercury – Impacts of Mercury in South and Central America**, 2003, Belém. Proceedings of the International Workshop on Health and Environmental Effects of Mercury – Impacts of Mercury in South and Central America. Minamata, Japan: National Institute of Minamata Disease (NIMD), p. 182-187, 2003.

COSTA, L. G.; ASCHENER, M.; VITALONE, A.; SYVERSEN, T.; SOLDIN, O. P. Developmental neuropathology of environmental agents. **Annual Review of Pharmacology Toxicology.** v. 44, p. 87-110, 2004.

COUTO, R.C.S.; CÂMARA, V.M.S.; BROSA, A.P.C. Intoxicação mercurial, resultados preliminares em duas áreas garimpeiras – PA. **Caderno de Saúde pública**, 4, p. 301-315, 1998.

COX, C.; CLARKSON, T.W.; MARSH, D.O.; AMIN-ZAKI, L.; TIKRITI, S.; MYERS, G.G. Dose-response analysis of infants prenatally exposed to methyl mercury: an application of a single compartment model to single-strand hair analysis. **Environmental Research**.v. 49, p. 318-332, 1989.

DAVID, N.; MCKEE, L.J.; BLACK, F.J.; FLEGAL, A.R.; CONAWAY, C.H.; SCHOLLHAMER, D.H. and GANJU, N.K. Mercury concentrations and loads in a large river system tributary to San Francisco bay, California, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**, vol. 28, N 10, pp 2091-2100, 2009.

DAVIS, L.E.; KORNFELD, M.; MOONEY, H.S.; FIEDLER, K.J.; HAALAND, K.Y.; ORRISON, W.W.; CERNICHIARI, E.; CLARKSON, T.W. Methylmercury poisoning: long-term clinical, radiological, toxicological, and pathological studies of an affected family. **Annals of Neurology**, v. 35, p. 680-688, 1994.

DEFLER, T.R.. Primates of Colombia - Bogotá, **Conservation International**. p. 550, 2004.

DIETZ, R.; NIELSEN, C.O.; HANSEN, M.M.; HANSEN, C.T. Organic mercury in Greenland birds and mammals. **Science of the total environment**. v 95, p 41-51, 1990.

DRUM, D.A. Are toxic biometals destroying your children's future? **Biometals**. Epub ahead of print, 2009.

ETO K.; YATSUTAKE,A.; KUWANA,T. KOROGI,Y.;AKIMA,M.;SHIMOZEKI,T.; TOKUNAGA,H. and KANEKO, Y. Methylmercury poisoning in common Marmosets – A study of selective vulnerability within the cerebral cortex. **Toxicologic Pathology**. vol 29, nº 5, PP 565-573, 2001.

FABRIS, V. E. Lesões celulares reversíveis e irreversíveis. In: MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia: Processos gerais**. 4 ed. São Paulo: atheneu, p. 41 – 54, 1999.

FARIA, M.A.M.Mercurialismo metálico crônico ocupacional. **Rev. Saúde Pública**, 37 (1): 116-27, 2003.

FARIA, M.S.; MUSCARA M.N.; MORENO, JR. H.;TEIXEIRA A.S.; DIAS HB, DE OLIVEIRA B; GRAEFF, F.G., DE NUCCI, G. Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plusmaze test. Eur. **J. Pharmacol.** 323.37-43,1997.

FIMREIT, N.; KARSTAD, L. Effects of dietary methylmercury in red-tailed hawks. **The Journal of Wild life Management**. Vol 35, No 2, 1971.

FINCO, D.R.; BROWN, S.A.; BROWN, C.A.; CROWELL, A.; COOPER, T.A.; BARSANTI, J.A. progression of chronic renal disease in the dog. **J.Vet.Intern.Med.** 13:516-528, 1999.

FLORA, S.J.S.; MITTAL, M.; MEHTA, A. heavy metals induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. **J.Med.Res.** 128, p 501-23, 2008.

FORD, K. A. D.; LOUIS J. L.; TIMOTHY E. Clinical Toxicology. **The New England Journal of Medicine**. v. 354, n. 22, p.1648 – 1649, 2001.

FOULKES, C.E. Transport of toxic heavy metals across cell membranes. **Soc. Exp. Biol. Med.** V 223, p.234-240, 2000.

FUGINO, T. Clinical and epidemiological studies on chronic minamata disease, part 1: study on Katsurajima Island. **Kumamoto Medical Journal**. v. 44, n. 4, p. 139 – 155, 1994.

GALLAGHER, J.D; NOELLE, R.J e McCANN, F.V – Mercury Suppression of a Potassium Current in Human B Lymphocytes. **CellSignal**. v. 7:p.31-38, 1995.

GALVÃO, A.C.L.; COREY, G. Centro Panamericano de Ecologia Humana y Salud, Organización Panamericana de la salud, Organización mundial de la salud, **Mercúrio. Série Vigilância**. n. 7, p. 1 – 82, 1987.

GARCIA, E. M.; ORTA, M.; SUAREZ, P. Toxicity assays and bioconcentration of mercury in bacteria selected from marine environments. **Bull Environment Contamination Toxicology**. v.62, p. 79-86, 1998.

GILMOUR, C.C.; HENRY, E.A. Mercury methylation in aquatic systems affected by acid deposition. **Environmental Pollutant**, v. 71, p. 131-169, 1991.

GOLDMAN, L.R, SHANNON, M.W. Committee on environmental health. Technical report: Mercury in the environment: implications for pediatricians. **Pediatrics**. 108:197-205, 2001.

GOWN, A.M., DE WEBER, N., BATTIFORA, H. Microwave-based antigen unmasking: a revolutionary new technique for routine immunohistochemistry. **Appl. Immunohistochem.**, v.1, p.256-266, 1993.

GRANDJEAN, P.; WHITE, R.F.; NIELSEN, A.; CLEARY, D.; OLIVEIRA, E.C. Methylmercury neurotoxicity in Amazonian children downstream from gold mining. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, p. 587-591, 1999.

GRANDJEAN, P.G.; WEIHE, P.; WHITE, R.F.; DEBES, F.; ARAKI, S.; YOKOYAMA, K.; MURATA, K.; SORENSEN, N.; DAHL, R.; JORGENSEN P.J. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. **Neurotoxicology and Teratology**. v. 19, p. 417-428, 1997.

GREEN, D.R. Apoptotic pathways. **The roads to ruin**. *Cell*. V.94, p.695-698, 1998.

GREGORY, C.R. Urinary Sistem. In: LATIMER, K.S; MAHAFFEY, E.A.; PRASSE, K.W. Duncan & Prasse's veterinary laboratory medicine: **Clinical Pathology Philadelphia**: Black Well Publishing Company. Cap. 9, p. 231-257, 2003.

GUIMARÃES, G. A. A contaminação do homem e do meio ambiente causada pelo mercúrio nos garimpos de ouro da Amazônia. **IX Ciclo de Estudos de Política e Estratégia promovido pela ADESC/PA**, 1989.

HAHN,L.;KLOIBER,R.; LEININGER,R.W.;VIMY, M.J.; LORSCHIEDERF.L. Whole-body imaging of the distribution of mercury released from dental fillings into monkey tissues. **FASEB J**. 4: 3256-3260, 1990.

HANSEN, J.M; ZHANG, H.; JONES, D.P. Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2 and glutathione by metals ions. **Free Radical Biology and Medicine**. Vol.40, issue 1, pages 138-145, 2006.

HARADA, M. Minamata disease and the mercury pollution of the globe. In: **Simpósio Internacional de avaliação da Contaminação Mercurial na Amazônia JICA-NMT/UFGA**. p. 25-36, 1998.

HARADA, M. Minamata disease. Organic mercury poisoning caused by ingestion of contaminated fish methylmercury. In: Jelliffe, P., Jelliffe, D.B. (eds) **Adverse Effects of Foods**, p. 135-147. Kumamoto: Plenum Publishing, 1982.

HARADA, M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. **Critical reviews in Toxicology**, v. 25, p. 1 – 24, 1995.

HARADA, M.; AKAGI, H.; TSUDA, T.; KIZAKI, T.; OHNO, H. Methylmercury level in umbilical cords from patients with congenital Minamata disease. **The Science of the Total Environment**. p. 59-62, 1999.

HAYES, W. J.: **Pesticides studied in man**. Baltimore/London: Williams and Wilkins, p. 12, 1982.

HAZELHOFF, M.H; BULACIO, R.P.; TORRES, A.M. Gender related differences in kidney injury induced by mercury. **Int.J.Mol.Sci**. 13(8), 10523-10536, 2012

HEAVEN, S.; ILYSHHENKO, M.A et al., Mercury in the river Nura and its

floodplain, central Karakhstan: II. Floodplain soils and river-bank silt deposits. **Science of the total Environmental**. 260:45-55, 2000.

HILL, W.C.H. Comparative Anatomy and Taxonomy, vol. IV – *Cebidae*, part A. **University Press**, Edinburgh, 1960.

HIRAYAMA, K.; YASUTAKE, A. In vivo degradation of methylmercury – Its mechanisms and significance in methylmercury induced neurotoxicity. In: TAKIZAWA, Y., OSAME, M. (eds.) Methylmercury Poisoning in Minamata and Niigata, Japan. **Japan Public Health Association**, p. 103-110, 2001.

HIROOKA, T.; FUJIWARA, Y.; MINAMI, Y.; ISHII, A.; ISHIGOOKA, M.; SHINKAI, Y.; YAMAMOTO, C.; SATOH, M.; YASUKATE, A.; ETO, K.; KAJI, T. Cell-density-dependent methylmercury susceptibility of cultured human brain microvascular pericytes - **Toxicology in Vitro** 24, Issue 3, April, 2010.

HUNTER, D., RUSSELL, E. S. Focal cerebral and cerebellar atrophy in a human subject due to organic mercury compounds. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.** 17: 235, 1954.

IKINAGURA, J. R. & AKAGI, H. Methylmercury production and distribution in aquatic systems. **The Science of the Total Environment**. p. 109-118, 234, 1999.

JARDIM, W. F. The geochemistry of mercury in soils of the Negro River basin (Brazilian Amazon) and its role in the regional mercury cycle. **Mercury as a Global Pollutant – 5 th International Conference**. p. 561, Rio de Janeiro, Brazil, 1999.

JOHNSON, CL. Mercury in the Environment: Sources, toxicities, and prevention of exposure. **Pediat.** 33: 437 – 442, 2004.

JONES, D. W. Exposure or absorption and the crucial question of limits for mercury. **Journal Can Dentist Association**. v. 65, n.1, p. 42-46, 1999.

KAY, R.F. The phylogenetic relationships of extant and fossil Pitheciinae (*Platyrrhini*, *Anthropoidea*), **Journal of Human Evolution**, 19: 175-208, 1990.

KISHI, R., DOI, R., FUKUCHI, Y., SATOH, H., SATOH, T., ONO, A., et al. Residual neurobehavioural effects associated with chronic exposure to mercury vapor. **Occupational and Environmental Med.** 51:35-41, 1994.

KJELLSTROM, T.; KENNEDY, P.; WALLIS, S.; MANTELL, C. Physical and Mental Development of Children with Prenatal Exposure to Mercury from Fish. Stage I: Preliminary Tests at Age 4. Report 3080. Solna, Sweden: **National Swedish Environmental Protection Board**. p.96-986, 1986.

KJELLSTROM, T.; KENNEDY, P.; WALLIS, S.; STEWART, A.; FRIBERG, L.; LIND, B. Physical and Mental Development of Children with Prenatal Exposure to Mercury from Fish. Stage II: Interviews and Psychological Tests at Age 6. Report 3642. Solna, Sweden: **National Swedish Environmental Protection Board**, 1989.

KLAASEN, C. D. Heavy metals and the heavy-metal antagonists. In: Goodman and Gilman's. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 8 th ed. New York: Pergamon Press, p. 1592-1614, 1990.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ASTER, J.C. **Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. Rio de Janeiro. Elsevier, p. 1458, 2010.

LANIS, A.B; FONSECA, L.A.; ROESLER, T.; ALVES,A.;LOPES,B. Avaliação de doenças renais em pequenos animais. **Pubvet**. V.2, n.28,Ed, Art 29, 2008.

LARINI, L.; SALGADO, E.T; LEPERA, J. S. Metais. In: LARINI, L. **Toxicologia**. 3.Ed. São Paulo: Manole. p.131-135, 1997.

LEBEL, C.P; ALI, S.F.; BONDY, S.C. Deferoxamine inhibits methyl mercury induced increases in reactive oxygen species formation in rat brain. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 112, p. 161-165, 1992.

LEBEL, J., MERGLER, D., BRANCHES, F., LUCOTTE, M., AMORIM, M., LARRIBE, F., DOLBEC, J. Neurotoxic effects of low-level methylmercury contamination in the Amazonian basin. **Environ. Res**, 79: 20-32, 1998.

LI, S.; ZHANG, S.; CHEN, H.; ZENG,C.; ZHENG,C.; LI, L. and LIU,Z. Mercury induced membranous nephropathy: clinical and pathological features. **Clin. J.Am. Soc. Nephrol**. 5: 439-444, 2010.

LIMA, A O, SOARES, J B, GRECO, JB , GALIZZI, J, CANÇADO, JR. Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica- Técnica e Interpretação, 8ªed., Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan**, 2001.

LIMA, A.P.S.; SARKIS, J.E.S.; MULLER, R.C.S. Preliminary Study on the impact of gold mining in agricultural soils from Cachoiras do Piria Village, Para State, Brazil. In: **International Workshop on Health and Environmental Effects of Mercury – Impacts of Mercury in South and Central America**, 2003, Belém-Pará-Brasil. Proceedings of the International Workshop on Health and Environmental Effects of Mercury – Impacts of Mercury in South and Central America, Minamata, Japan: National Institute of Minamata Disease (NIMD). p. 84-92, 2003.

LUNA, L.G. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3rd edition. McGraw - Hill Book Company, 1967.

MAGNO, I.M.N. **Avaliação dos marcadores de injúria miocárdica induzida pela exposição ao metilmercúrio em modelos experimentais de primatas do novo mundo (*Cebus apella*)**. 105p. Tese de Doutorado. Doenças tropicais Núcleo de Medicina Tropical- Universidade Federal do Pará (MNT/UFPA). Brasil. Belém, 2009.

MAGOS,L.; CLARKSON, T.W.; SPARROW, S.; HUDSON,A. Comparison of the protection given by selenite, selenomethionine and biological selenium against the reotoxicity of mercury. **Arch. Toxicol.** 6: 422-426, 1987.

MAIA,V. Técnica histológica. 2 ed. São Paulo: Atheneu. 246 p, 1979

MALM, O.; PFEIFFER, W. C.; SOUZA, C. M. M. & RETHER, R.. Mercury pollution due to gold mining in the Madeira river basin, Brazil. **Ambio**, v.19, p.11-15, 1991.

MARQUES, R. C. **Avaliação da exposição ao mercúrio e seus compostos sobre o desenvolvimento neuropsicomotor em crianças de Porto Velho-RO.** 102p. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais), Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Brasil. Belém, 2002.

MARTINS, P.A.A.T.; **Doseamento do mercúrio total e de derivados orgânicos de mercúrio em amostras de cadáveres: Estudo de dois casos.** Porto. 75p. Tese de Mestrado em Ciências Forenses, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Portugal, 2007.

MASSUYA, M,; DRAKE,C.J.; FLENGING, P.A.; REILLY, C.M.; ZENG, H.; HILL, W.D. Hematopoietic origin of glomerular mesangial cells. **Blood**, 101:2215-8, 2003.

McKEOWN-EYSSSEN, G.E.; RUEDY, J. Prevalence of neurological abnormality in Cree Indians exposed to methylmercury in northern Quebec. **Clinical and Investigative Medicine**, v. 6, p. 161-169, 1983.

MEINERTZ, D.F.; DE PAULA, M.T.; COMPARSI, B.; SILVA,M.U.; SCHIMITZ, A.E.; BRAGA, H.C.; TAUBE, P.S.; BRAGA, A.L.; ROCHA J.B.T.; DAFRE, A.L.; FARINA, M.; FRANCO, J.L. and POSSER, T. Preprotective effects of organoselenium compounds against methylmercury-induced oxidative stress in mouse brain mitochondrial-enriched fractions. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** 44: 1156-1163, 2004.

MELAMED, R.; VILLAS BOAS, R. C. Interactions at the solid-liquid interface affecting the mercury geochemical cycle. In: Mercury in the Tapajós Basin. **CETEM/CNPq/CYTED.** Rio de Janeiro, 2001.

MICARONI, R. C. M.; BUENO, M. I. M. S.; JARDIM, W. F. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento de descarte. **Química Nova**. v. 23, n. 4, SP. jul-ago2000.

MILLER, S.; PALLAN,S.; GANJII, A.S.; LUKC, D.; CLASSE, C.M. Mercury associated Nefrotic Syndrome: Case Report ans systematic review of the literature. **Am. J. Kidney Dis.**(6291): 135-138, 2013.

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, p. 543-566, 1998.

MURATA, K.; WEIHE, P.; RENZONI, A.; DEBES, F.; VASCONCELOS, R.; ZINO, F.; ARAKI, S.; JORSENSEN, P.J.; WHITE, R.F.; GRANDJEAN, P. Delayed evoked potentials in children exposed to methylmercury from seafood. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 21, p. 343-348, 1999.

NELSON, R. W. ; COUTO, C. G. Insuficiência renal. In: **Medicina interna de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. cap.44. v.2. p. 487-499, 2001.

NICHOLSON, J.K.; TIMBREL, J.A.; SADLER, P.J.; PROTON, N.M.R. Indicators of renal damage. Mercury induced nephrotoxicity in rats. **Mol, Pharmacol.** 27:644-51, 1985.

NRIAGU, F.; DAMLUJI, S. F.; AMIN-ZAKI, L. Methylmercury pollution in Brasil. **Nature**. v. 356, p. 389-390, 1992.

OLIVEIRA, J.J.; SILVA, A.S. Hipertensão arterial secundária à intoxicação por mercúrio com síndrome clínico-laboratorial. **J. Pediatr.** (Rio de Janeiro); 72(1): 40-43, 1996

OPAS, OMS – Riesgos del ambiente humano para la salud. **Contaminantes Ambientais Seleccionados**. Cap. 12, p. 165-169, 1972.

Pinheiro MCN, Bacelar MDR, De Almeida SS, Silveira, LCL. Endemias e desenvolvimento da Amazônia. In: **Mello AF. O futuro da Amazonia: dilemas, oportunidades e desafios no limiar do século XXI**. Belem: Ed. Universitaria UFPA. p. 131-149, 2002.

PINHEIRO, M.C.N.; CRESPO-LÓPEZ, M.E.; VIEIRA, J.L.F.; OIKAWA, G.A.; ARAÚJO, C.C.; AMORAS, W.W.; RIBEIRO. D.R.; HERCULANO, A.M., NASCIMENTO, J.L.M and SILVEIRA L.C.L. Mercury pollution and childhood in Amazon riverside villages. **Environment International**. Vol. 33, issue 1, p 56-61, 2007.

POLLARD, K.M.; HULTMAN, P. Effects of Mercury on the Immune System. **Metal Ions Biology System**. v.34, p.421-440, 1997.

RICE, D. GILBERT, S.G. Effects of developmental exposure on lifetime lead exposure on vibration, sensitivity function in monkeys. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v134(1), p.161-65, 1995.

RICE, D. GILBERT, S.G. Effects of developmental exposure to methylmercury on spatial and temporal visual function monkeys. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v12(1), p.151-163, 1990.

RICE, D. GILBERT, S.G. Exposure to methylmercury from birth to adulthood impair high frequency hearing in monkey. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v15(1), p.6-10, 1982.

RISHER, J.I.; MURRAY, H.E.; PRINCE, G.R.; Organic Mercury Compounds: Human exposure and its relevance to public health. **Environmental and Occupational Health**. 18: 109-160, 2002.

ROCHA, C.A; CUNHA, L.A.; PINHEIRO, R.H.S.; BAHIA, M.O.; BURBANO, R.M.R. Studies of micronuclei and other nuclear abnormalities in red cells colossoma macropomum exposed to methylmercury. **Genetics and Molecular Biology**, 34, 4, 694-697, 2011.

RODRIGUES, A. M.; MASCARENHAS, A. F. S.; ICHIARA, A. H.; SOUZA, T. M. C.; BIDONE, E. D.; BELLIA, V.; HACON, S.; SILVA, A. R. B.; BRAGA, L. B.; FILHO, B. S. **Estudo dos Impactos Ambientais Decorrentes do Extrativismo Mineral e Poluição Mercurial no Tapajós**. p. 1 – 28, edit. Cetem/CNPq, 1994.

RODRIGUES, E. ; LAVORATO, L.M.O.; NOVAIS, R.C.D; BUSSMANN,L.Z.; MENDES, M.E.; SUMITA, N.M. **J. Bras. Patol. Med. Lab**. V. 47, n3, p. 211-216, 2011.

ROONEY, J.P.K. The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of Mercury. **Toxicology** 234, 145-156, 2007.

ROSENBERG, A.L. Systematics: the higher taxa. In: Ecology and Behaviour of Neotropical Primates. Vol 1 (eds: Coimbra-Filho. A.F.; Mittermeier. R.A.) **Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, p. 9-27, 1981.

ROSENBERG, A.L.; Aspects of the Systematics and evolution of the marmosets. In: A Primatologia no Brasil (ed. M.T. de Mello), **Sociedade Brasileira de Primatologia**, Brasília, pp. 159-180, 1984.

SALGADO, P. E. T. O mercúrio na odontologia. **Revista da Sociedade Brasileira de Toxicologia**, v 1, n. 2, p. 33-34, jan/jun. 1988.

SALGADO, P.E.T.; LEPERA, J.S.; LARINI, G.H. Risco ocupacional ao mercúrio na Odontologia. **RGO** (porto Alegre); 35(3): 183-7, 1987.

SANTOS, E. C. O. ; LOUREIRO, E. C. B.; JESUS, I. M.; BRABO, E.; SILVA, R. S. U.; SOARES, M. C. P.; CAMARA, V. M.; SOUZA, M. R. S. & BRANCHES, F. Diagnóstico das condições de saúde de uma comunidade garimpeira na Região do Rio Tapajós – Itaituba, Pará/Brasil,1992. **Caderno de Saúde Pública**. v.11, n. 2, p. 212 – 225, abr/jun, 1995.

SANTOS, E.C.O.; JESUS, I.M.; BRABO, E.S.; LOUREIRO, E.C.B.; MASCARENHAS, A.F.S.; WEIRICH, J.; CAMARA, V.M.; CLEARY, D. Mercury exposure in riverside Amazon communities in Para, Brazil. **Environmental Research A**, v. 84, p. 100-107, 2000.

SANTOS, E.C.O.; JESUS, I.M.; CAMARA, V.M.; BRABO, E.S.; LOUREIRO, E.C.B.; MASCARENHAS, A.S.; WEIRICH, J.; LUIZ, R.R.; CLEARY, D. Exposição ao Mercúrio em Índios Mundurucus da Comunidade de Sai Cinza, Estado do Pará, Brasil. **Relatório Técnico. Belém, Pará, Brasil: Instituto Evandro Chagas**, Seção de Meio Ambiente, p.46, 2001.

SANTOS, O.R. Células mesangiais: protagonistas ou coadjuvantes da função renal?. **J.Bras. Nefrol.** 35(4), 243-249, 2013.

SAQUAY, C. Apresentação de um modo qualitativo da identificação do vapor de mercúrio. **Revista Paulista de Odontologia**, v 19, n. 2, p. 6-8, 1997.

SCHLONDORFF, D. Roles of the mesangium in glomerular function. **Kidney International**. Vol.49, pp.1583-1585, 1996.

SCHOR, N., SANTOS, O.F.P., BOIM, M.A. Insuficiência renal aguda. In: **Guia Prático de Urologia**. Cap 13, p.65-71, Rio de Janeiro, 2000.

SHRADER, D.E.; HOBBS, W.B. The determination of mercury by cold vapor atomic absorption. **Varian Instruments at Work. Atomic Absorption**. Number AA-32, 1983.

SILVA, A. P. Contaminação ambiental por mercúrio na região Amazônica: subsídios para um programa de vigilância das populações expostas. **Organização Panamericana de Saúde - OPAS/Organização Mundial de Saúde - OMS**. 2000.

SILVA, M.C.F. **Alterações hepáticas por exposição a baixas doses de metilmercúrio em macacos prego, *Cebus apella* (Linnaeus 1758)**. 74p. tese de Doutorado Neurociências. Universidade federal do Pará. Brasil. Belém, 2011

SILVEIRA, L.C.L.; LEE, B. B., YAMADA, E. S., KREMERS, J., HUNT, D. M..Retnal ganglion cells responses in a dichromatic primate, *Cebus apella*. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.37, p. 1056. 1996

SILVEIRA, L.C.L.; VENTURA, D.F.; PINHEIRO, M.C.N. Toxicidade mercurial: avaliação do sistema visual em indivíduos expostos a níveis tóxicos de mercúrio. **Ciência e Cultura**, v. 56, p. 36-38, 2004.

SODRÉ, F.L.; COSTA, J.C.B.; LIMA, J.C. Evaluation of renal function and damage: a laboratorial challenge. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** V43, n5, p.329-337, 2007.

SOUZA, T.M.C.; ANJOS, J.R.; BARROS, F.C.; BASTOS, W.R.; SILVA, G.S.; OLIVEIRA, R.C. Mercury exposure in the gold shops of Itaituba, Amazon, Brazil. In: **International Workshop on Health and Environmental Effects of Mercury – Impacts of Mercury in South and Central America**, 2003. Minamata, Japan. Proceedings of the International Workshop on Health and Environmental Effects of Mercury – Impacts of Mercury in South and Central America. Minamata, Japan: National Institute of Minamata Disease (NIMD), p. 77-83, 2003.

STEHLING, M.; LIMA, S.N.L e LIMA, D.M. A toxicidade do amálgama de mercúrio : revisão de literatura. **Odontol. Clin. Cient.** Recife, Suplemento 413-416, 2011.

STOCKHAN, S.L.; SCOTT, M.A.; Urinary System. In: **Fundamental of veterinary clinical pathology**. Iowa: Iowa State Press, cap.8, p. 279-334, 2002.

SUSSMAN, R.W. Primate ecology and social structure: New World monkey. **Needham Heights, Pearson Custom Publishing**, 207p, 2000.

SWARTOUT, J. Quantitative risk assessment of exposure to mercury in the environment. In: **Simpósio Internacional de avaliação da Contaminação Mercurial na Amazônia JICA-NMT/UFPA**. p. 42-45, 1998.

TAVARES, T.M. Avaliação da exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos do recôncavo baiano. **Química Nova**. 15(2), 1992.

TCHOUNWOU, P. B.; AYENSU, W. K.; NINASHVILI, N.; SUTTON, D. Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic. **Implications for Public Health**. v.133, p.153, 2003.

THYGESEN, L.G.; FLACHS, E.M.; HANEHOJ, K.; KJUUS, H.; JUEL, K. Hospital admissions for neurological and renal diseases among dentists and dental assistants occupationally exposed to Mercury. **Occup Environ Med**. 68: 895-901, 2011..

TOLOSA, E. M. C; JUNQUEIRA, C. R.; BEHMER, O. A.; FREITAS NETO, A. G. Métodos de coloração de células. In: TOLOSA, E. M. C; JUNQUEIRA, C. R.; BEHMER, O. A.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**. 2 ed. São Paulo: Manole, p. 48-50, 2003.

TORRES, A. M.; DNYANMOTE, A. V.; BUSH, K. T.; WU, W.; NIGAM, S.K. Deletion of multispecific organic anion transporter Oat1/Slc22a6 protects against mercury- induced kidney injury. **The Journal of Chemistry**.vol.286, n 30, pp26391-26395, 2011.

UNAMAZ. Contaminação mercurial: homem x meio ambiente nos garimpos de ouro na Amazônia. Belém, 1994.

US EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Mercury Study Report to Congress. Volume V: Health Effects of Mercury and Mercury Compounds**. EPA-4562/R-97-007. Washington, DC, USA: U.S. EPA, 1997.

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, 1996.

VEIGA, M.M.; MEECH, J.A.; ONATE, N. Mercury pollution from deforestation. **Nature**, n. 368, p. 816-817, 1994.

VENTURA, S.F. Cone photopigment variations histology in Cebus apella monkeys evidenced by effects of dietary MeHg on liver and Kidney.**Invest. Ophthal. Visual Sci**. v.37, p. 1056, 2012.

VIMERCATI, L.; SANTARELLI, L.; PESOLA, G.; DRAGO, I.; LASORSA, G.; VALENTINO, M.; VACCA, A. e SOLEO, L. Monocyte-macrophage System and polymorphonuclear Leukocytes in Workers Exposed to Low Levels of Metallic Mercury. **The Science ofthe Total Environment**., v.270, p.157-163, 2001

WALDRON, H. A. Did the mad hatter have mercury poisoning? **Britannic edicine Journal**. v. 287, n. 6409, p. 161, 1983.

WARFVINE, K. Mercury distribution in the neonatal and adults cerebellum after mercury vapor exposure of pregnant squirrel monkeys. **Environmental Research**. 83(2): 93-101, 2000.

WASSERMAN, J.C.; HACON S., WASSERMAN, M.A. Biogeochemistry of Mercury in the Amazonian Environment. **AMBIO: A Journal of the Human Environment**. 32(5): 336-342, 2003

WHO, International Program on Chemical Safety. "Environmental Health Criteria 101: Methylmercury". **World Health Organization**, Geneva, 1990.

WHO, International Program on Chemical Safety. "Environmental Health Criteria: Methylmercury". **World Health Organization**, v. 118, p. 168, Geneva, 1991.

WHO. Mercury exposure and health impacts among individuals in the Artisanal and small Scale Gold Mining (ASGM) Community. The Minamata Convention. **World Health Organization**. January, 2013.

ZALUPS, R. K. Molecular interactions with mercury in the kidney. **Pharmacological Reviews**. V. 52, n.1, 2000.

ZAVARIZ, C; GLINA, D, M, R. Avaliação clínico -neuro -psicológica de trabalhadores expostos a mercúrio metálico em indústria de lâmpadas elétricas. **Revista Saúde Pública**, v.26, n. 5, p. 356 -365,1992.

ZEIDEMANN, V. K.; FORSBERG, B. R.; ROULET, M.; LUCOTTE, M.; LUCOTTE, M. JARDIM, W. F. The geochemistry of mercury in soils of the Negro River basin (Brazilian Amazon) and its role in the regional mercury cycle. **Mercury as a Global Pollutant – 5 th International Conference**. P. 561, rio de Janeiro, Brazil, 1999.

ANEXOS

ANEXO 1

Parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa do ICB/UFPA



PARECER BIO001-09

Projeto: Avaliação dos mecanismos de injúria miocárdica induzida pela exposição ao metilmercúrio em modelos experimentais de primatas do novo mundo (*Cebus apella*)

Coordenador: Prof. Dr. Juarez Antonio Simões Quaresma

Área Temática: Biologia

Vigência: 08/2006 a 08/2009

Nº no CEPAE-UFPA: BIO002-09

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 1568/2005 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 05 de março de 2009

Prof. Dr. Wallace Gomes Leal
Presidente do Comitê de Ética Em Pesquisa
Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará
Federal do Pará



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

Ficha Clínica e laboratorial

IDENTIFICAÇÃO:

Animal:

Procedência:.....

Raça:

Sexo.....

Data da perfusão/...../.....

DADOS TOXICOLÓGICOS

Peso corporal no início da exposição

Peso corporal no final da exposição

Dose inicial de MetilHg data : ____ / ____ / ____

Dose final de MetilHg data : ____ / ____ / ____

Tempo de exposição

QUADRO CLÍNICO

Desconforto respiratório ()

Sinais de caquexia ()

Alterações comportamentais e/ou psicogênicas ()

Alterações da marcha ()

Icterícia conjuntival ()

Edema ()

Outros () _____

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

- AST Normal () Alterado ()
- ALT Normal () Alterado ()
- CK-T Normal () Alterado ()

PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO

Em um balão volumétrico de 100ml acrescenta-se 0,01267mg/g de metilmercúrio dissolvido em uma solução de tolueno até a marca final de 100ml.

PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE 1ppm DE METILMERCÚRIO.

Para preparar a solução padrão de metilmercúrio de 1 ppm, retira-se 1ml da solução padrão de 100ppm e transfere-se para um outro balão volumétrico para aferir com uma solução de tolueno até a marca final de 100ml. Esses padrões serão mantidos acondicionados em embalagens protegidas da luz em ambientes refrigerados, como solução estoque.

PREPARO DA SOLUÇÃO DE L-CYSTEINA DE 0,01%

Com o auxílio de uma balança analítica pesar 0,01g de L-Cysteina monohidratada e dissolve-la em uma solução de NAOH 1N (Hidróxido de sódio 1Normal) em um tubo de vidro de 10 ml, aferindo com a solução de NAOH 1N até a marca de 10 ml.

PREPARO DA SOLUÇÃO FINAL DE USO

Em um tubo de vidro será transferido com uma pipeta volumétrica 5 ml de L-Cysteina 0,01% e 0,5 ml da solução de 1 ppm de padrão de mercúrio, em seguida deve-se agitar manualmente por 3 minutos, (para que a L-Cysteina ligue-se ao mercúrio presente na solução padrão), em seguida centrifugar por 3 minutos a uma rotação de 3.500 rpm, após aspira-se com um sugador o sobrenadante (tolueno).

PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DOS PONTOS DA CURVA A PARTIR DA SOLUÇÃO FINAL DE USO.

Os balões serão identificados com os pontos 0, 20, 50 e 100. Em cada balão será acrescentado 200 µl, 500 µl e 1000 µl da solução final de uso respectivamente e também 1 ml de água destilada, 2 ml de ácido nítrico com perclórico (HNO₃-HClO₄) na proporção de 1:1 e 5 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄). Em seguida as soluções serão digeridas em uma chapa aquecedora a uma temperatura de 21° C, por 30 minutos. Quando as amostras chegarem a temperatura ambiente estas serão aferidas com água destilada até a marca final de 50 ml dos seus respectivos balões (AKAGI, 2004).

ANEXO 4

ITENS E FUNDAMENTO DO EQUIPAMENTO

O equipamento possui uma bomba d ediafragma, recipiente de reação, armadilha de gás ácido, armadilha de umidade (banho de gelo) e uma válvula de 4 estágios. Durante sua operação, o vapor elementar gerado pela adição de cloreto estanhoso é circulado via 4 estágios. Durante sua válvula de 4-estágios para homogeneizar a concentração na fase gasosa. A válvula de 4-estágios

4-estágios. A válvula de 4-estágios é então girada 90° para introduzir a fase gasosa toda de uma só vez na célula de foto-absorção. A medição é completada dentro de um minuto por amostra, podendo medir até mesmo 0,1 ng de mercúrio com alta precisão (AKAGI, 2004)

FÓRMULA PARA O CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE MERCÚRIO TOTAL

Concentração de mercúrio total na amostra ($\mu\text{g/L}$) = $(P_s - P_{bl}) / (P_{std} - P_{bl})$ / peso da amostra (g).

Legenda da fórmula: P_s – padrão da amostra

P_{bl} – padrão branco

P_{std} - padrão dos pontos das curvas

ANEXO 6.

PROTOCOLO DE PROCESSAMENTO E INCLUSÃO EM PARAFINA

**Laboratório de Técnicas Histológicas do Instituto de Ciências Biológicas
da Universidade Federal do Pará.**

Fixação: Paraformaldeído 4% ou Formaldeído a 10%

Mergulhar as peças no fixador durante 24hs

Lavar em água corrente por 30 minutos

Desidratação: álcool etílico

70% - 1 hora (Tempo de Parada)

80% - 1 hora

90% - 1 hora

95% - 1 hora

100% I – 1 hora

100% II – 1 hora

Clarificação ou Diafanização: Xileno em temperatura ambiente, tempo variável de acordo com o tamanho e natureza da peça.

Xileno I – 45 minutos a 1 hora

Xileno II – 45 minutos a 1 hora

Impregnação: Parafina líquida a 60° em estufa

Parafina I – 45 minutos

Parafina II – 45 minutos (Tempo de Parada)

Parafina III – 45 minutos

Inclusão: Parafina líquida a 60° em temperatura ambiente

Microtomia

Estufa por 12 horas.

ANEXO 7.

Coloração pelo Método de Hematoxilina e Eosina

Preparo dos reagentes

Hematoxilina cristais	(5,0g)
Alúmen de potássio	(100g)
Óxido de mercúrio	(2,5g)
Álcool absoluto	(50 ml);
Água deionizada	(1000 ml)
Eosina amarelada	(10g);
Álcool absoluto	(200 ml)
Água deionizada	(800 ml)

Preparo da Hematoxilina:

Dissolve-se a Hematoxilina no álcool e o alúmen na água deionizada em seguida aquecer a solução, porém não ferver a água e o alúmen, após esfriar e misturar as duas soluções. Levar novamente ao fogo até a ebulição; Retirar do fogo e misturar lentamente o óxido de mercúrio; Levar a mistura novamente ao fogo até adquirir uma cor púrpura; após fervura, mergulhar banho de água fria.

Preparo da Eosina

Dissolver a eosina na água deionizada e acrescentar o álcool.

Procedimento de Coloração pela Hematoxilina e Eosina (HE)

1. Desparafinar e hidratar os cortes
2. Lavar em água corrente 3 a 5 minutos.
3. Corar pela Hematoxilina de Harris 3 a 5 minutos.
4. Lavar em água corrente 3 a 5 minutos
5. Mergulhar no Ácido clorídrico até cinco vezes.
6. Lavar em água corrente 3 a 5 minutos
7. Corar pela Eosina 3 a 5 minutos
8. Lavar em água corrente para tirar o excesso de corante.
9. Desidratar
10. Montar entre lâmina e lamínula com balsamo do Canadá ou enthelan.

ANEXO 8

Coloração pelo Tricrômio de Masson modificado – CAB

Preparo dos reagentes:

Solução de Cromotrope

Verde Claro 0,75g
Ácido Fosfotúngstico 0,6g
Cromotrope 2R 0,6g
Ácido acético 1,0 ml
Água destilada..... 99 ml

Solução de Fucsina Ácida

Fucsina Ácida solução aquosa 1%..... 10ml
Escarlate Bierbrich solução aquosa 1%..... 90ml
Ácido acético..... 1ml

Azul da Anilina acética

Azul de anilina 1g
Ácido acético solução aquosa 1% 100ml

Solução aquosa de ácido acético 1%

Ácido acético glacial 1ml
Água destilada 100ml

Procedimento da coloração

- 1-Desparafinar os cortes
- 2-Lavar em água corrente
- 3-Lavar em água destilada por 5 minutos
- 4-Corar pela Hematoxilina por 5 minutos
- 5-Lavar em água corrente por 5 minutos

- 6-Lavar em água destilada por 5 minutos
- 7-Corar pela fucsina ácida por 5 minutos
- 8-Lavar em água destilada por 10 minutos
- 9-Tratar os cortes pela solução de cromotrope por 10 minutos
- 10-Corar imediatamente pelo azul de anilina durante 10 minutos
- 11-Lavara em água destilada, por 5 minutos
- 12-Lavar em solução de ácido acético por 3 minutos
- 13-Lavar em água destilada
- 14-Desidratar, diafanizar e montar entre lâmina e lamínula com bálsamo do Canadá ou enthelan.

Método do PAS (ÁCIDO PERIÓDICO DE SCHIFF) Mc Manus

Preparo dos reagentes:

Solução de Ácido Periódico

ácido periódico..... 1 g

água destilada..... 100 ml

Reativo de Schiff

Água destilada..... 192 ml

Ácido clorídrico concentrado..... 8 ml

Fucsina Básica (Color Index 42510)... 0,5 g

Sulfito de sódio (Na_2SO_3)..... 5 g ou

Metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)..... 3,8 g

Carvão ativado..... 0,5 g

No momento do uso deve-se dissolver a fucsina na água adicionada de ácido clorídrico. Juntar o sulfito ou o metabissulfito. Fechar o frasco. Agitar por 20 a 30 minutos até que a mistura esteja límpida e de cor marrom avermelhado. Adicionar o carvão ativado para descolorir. Agitar por 2 minutos e filtrar. O filtrado deverá ser incolor. O reativo somente poderá ser utilizado, no mínimo, 6 horas após sua preparação. Guardar na geladeira.

Procedimento para a realização do método PAS:

1-Desparafinar e hidratar os cortes.

2-Colocar no ácido periódico, durante 10 a 15 minutos, na geladeira.

3-Lavar em várias trocas de água destilada ou lavar 5 minutos na água

4-corrente e, em seguida, passar pela água destilada.

5-Colocar no reativo de Schiff durante 1 hora, no escuro, na geladeira ou durante 15 minutos, no escuro, à temperatura ambiente.

6-Lavar em água corrente por 5 a 10 minutos.

8-Corar pela Hematoxilina de Harris (opcional)

9-Desidratar, Diafanizar e Montar entre Lamina e lamínula com bálsamo do Canadá ou enthelan.

DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO

Amostra (Animal) nº _____

Lâmina nº _____

Técnica: _____

Órgão: _____

Procedência: _____

Lesão: _____

Alterações histopatológicas:

Tradução clínica da lesão:

Data ____/____/____

Responsável: _____