

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**Efeitos do Cloreto Mercurioso Sobre o Desenvolvimento do Tecido
Ósseo: Propriedades Físicas, Químicas e Biomecânicas do Fêmur
de Ratos**

FERNANDO VIDAL D'ÁVILA

**São Carlos
2007**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**Efeitos do Cloreto Mercurioso Sobre o Desenvolvimento do Tecido
Ósseo: Propriedades Físicas, Químicas e Biomecânicas do Fêmur
de Ratos**

FERNANDO VIDAL D'ÁVILA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte do requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof.Dra. Keico Okino Nonaka

São Carlos
2007

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

D259ec

D'Ávila, Fernando Vidal.

Efeitos do cloreto mercurioso sobre o desenvolvimento do tecido ósseo : propriedades físicas, químicas e biomecânicas do fêmur de ratos / Fernando Vidal D'Ávila. -- São Carlos : UFSCar, 2007.

54 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

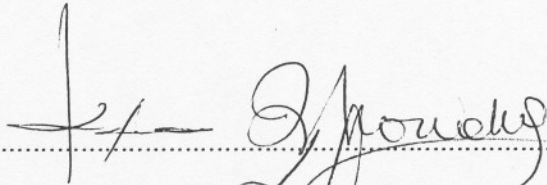
1. Ossos. 2. Biomecânica óssea. 3. Cloreto mercurioso. 4. Densidade óssea. I. Título.

CDD: 619.93 (20^a)

Universidade Federal de São Carlos
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Defesa de Dissertação de Fernando Vidal D'Ávila

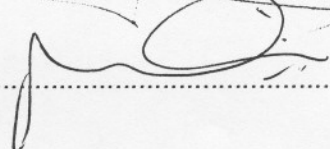
Profa. Dra. Keico Okino Nonaka



Prof. Dr. João César Bedran de Castro



Prof. Dr. Mario Jefferson Quirino Louzada



Prof.Dra. Keico Okino Nonaka
(Orientadora)

Esse trabalho recebeu apoio financeiro à
pesquisa da CNPq.

"A felicidade não depende do que nos falta, mas do bom uso que fazemos do que temos."

Thomas Hardy

Aos meus pais que sempre me incentivaram a estudar, aos quais devo, em grande parte, o que sou hoje. A toda minha família e em especial aos meus Tios Rogério e José Maria pela força, ajuda e palavras positivas. A minha noiva pelo eterno companheirismo e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Deus por guiar meus passos e por ter me dado força e perseverança para seguir em frente.

Aos meus pais, pela sólida formação dada até minha juventude, que me proporcionou a continuidade nos estudos até a chegada a este mestrado, meus eternos agradecimentos

Às minhas irmãs e à minha sobrinha pelo apoio e compreensão da minha ausência nesses anos.

À minha noiva, Fernanda Guzzo Gomes, fonte de amor, dedicação e inspiração.

Aos meus tios, Rogério e José Maria, pelos conselhos e orientação na vida, pontos importantes para meu ingresso no mestrado e qualidade de vida.

À minha família que sempre me incentivou pela busca dos meus sonhos, mesmo quando estes pareciam distantes e impossíveis de serem alcançados.

Aos Professores do PPG/UFSCar pelos ensinamentos importantes para minha formação acadêmica.

Ao amigo Victor Ribeiro pela fundamental companhia no início dessa jornada.

Aos (ex e atuais) amigos de laboratório André Luis da Cruz, Cléo Leite, Lyandra Zanatta, Fernanda Sampaio, Juciléia Barbosa, Daniel Mochiutt, Charles Wang, Valéria Mattos, José Aparecido Ferreira, Fabio Alexandre, Dernival Bertoncelo, Lucélia Maria, Edvanina de Souza, Adriana Adler e companheiros desta jornada pela amizade.

Ao Técnico de Laboratório Sr. Sergio Dias.

Várias pessoas contribuíram para que este trabalho chegasse a bom termo. A todas elas registro minha gratidão.

Muito obrigado!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Prof. Dra. Keico pela orientação, exemplo de profissionalismo, pelo apoio e incentivo.

À sua disponibilidade irrestrita, sua forma exigente, crítica e criativa de argüir as idéias apresentadas, creio que deram norte a este trabalho, facilitando o alcance de seus objetivos.

Obrigado pela oportunidade!

RESUMO

Devido à carência de dados sobre o envolvimento do mercúrio sobre alterações do metabolismo ósseo, torna-se importante investigar a influência do seu efeito sobre os parâmetros ósseos. Avaliou-se as possíveis alterações físicas e biomecânicas ósseas em ratos adultos intoxicados com cloreto mercurioso durante seu desenvolvimento. Os animais foram divididos em grupo experimental e controle, sendo 09 ratos tratados com salina 9% (0,1 ml/100g PC) e 16 tratados com cloreto mercurioso (1,25mg/kg PC) durante 5 dias/semana, por 60 dias pelo método de gavagem gástrica. Posteriormente os animais foram sacrificados e foi realizada dissecação femoral direita para coleta do material ósseo. O peso corporal, comprimento femoral e espessura das diáfises femorais foram mensurados. As propriedades mecânicas (força máxima e de ruptura, rigidez e resiliência) dos fêmures foram mensuradas através do teste de flexão a três pontos realizado em uma máquina universal Instron modelo 4444. Através do Princípio de Arquimedes, calculou-se o volume ósseo e a densidade mineral, utilizando as propriedades físicas: peso imerso, úmido e das cinzas. O peso, comprimento e diâmetros femorais, não foram diferentes entre os grupos, porém o comprimento e diâmetro maior apresentaram tendência à diminuição. Houve aumento ($p=0,0460$) da densidade óssea dos animais contaminados. A densidade mineral e as propriedades mecânicas não foram diferentes entre os dois grupos. O Cloreto mercurioso na dose utilizada teve pouco efeito sobre o desenvolvimento ósseo. Observou-se tendência ao aumento dos valores das propriedades biomecânicas e redução das variáveis biométricas do grupo contaminado, o que caracterizaria como um tecido ósseo mais resistente, porém com menor conteúdo mineral.

Palavra chave: Osso, Rato, Cloreto Mercurioso, Densidade Óssea, Densidade Mineral, Força Máxima Rigidez e Resiliência.

ABSTRACT

Because of the lack of data about the mercury influence on bone metabolism it is important to investigate the bone parameters that can be affected by its effects. The aim of this study was to evaluate the physical and biomechanical bone alterations in adult rats contaminated with mercurous chloride during their development. The animals were separated in experimental and control groups: 9 male rats treated with saline 0.9% (0.1 ml/100g BW) and 16 male rats treated with mercurous chloride (1.25mg/kg BW) during 60 days, 5 days/week, by the stomacal gavage. After that, the animals were sacrificed and the right femur was dissected. The body weight, femoral length and thickness of femoral diaphysis were measured. The mechanical properties (maximum and failure forces, stiffness and yield) of femurs were evaluated by the three-point bending test using the universal machine *Instron* model 4444. The bone volume was estimated by the Archimedes Principle. The wet and ash weight were also determined. The weight, length and major and minor diameters of the femurs were not different between the groups; however the length and the major diameter showed tendency to decrease. There was an increase ($p=0,0460$) of bone density of the contaminated animals. The mineral density and the mechanical properties were not different between the both groups. The dose of mercurous chloride used had little effect on bone development. It was observed a tendency of higher values of bone biomechanical properties and a decrease of the biometric values of the contaminated group. This would characterize a more resistant bone in spite of a lower mineral content.

Keywords: Bone, Rat, Mercury, Bone Density, Maximum Force, Stiffness and resilience.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Máquina universal instron (modelo 4444) utilizado para o ensaio de flexão a três pontos em fêmur de rato. A: painel de controle; B: haste cilíndrica para a aplicação de carga (força); C: osso; D: suporte; E: célula de carga ligada à ponte de extensimetria. 23
- FIGURA 2. Peso corporal dos animais dos grupos controle e contaminado durante os 60 dias de tratamento. 26
- FIGURA 3. Média \pm EPM dos pesos corporais (PC) inicial, final e ganho de peso dos ratos dos grupos controle e contaminado. 27
- FIGURA 4. Parâmetros biométricos do fêmur dos ratos dos grupos experimentais controle e contaminado. Média \pm EPM. 28
- FIGURA 5. Parâmetros físicos do fêmur dos ratos dos grupos experimentais controle e contaminado. Média \pm EPM. $p < 0,05$: * vs controle. () = nº animais 30
- FIGURA 6. Força máxima e de ruptura, rigidez e resiliência dos fêmures dos animais dos grupos controle e contaminado. Média \pm Erro Padrão Média (EPM). 31
- FIGURA 7. Concentrações de Cálcio e Fósforo dos fêmures dos animais dos grupos controle e contaminado. Média \pm Erro Padrão Média (EPM). $p < 0,05$ 32
- FIGURA 8. Concentrações de Cálcio e Fósforo do plasma dos animais dos grupos controle e contaminado. Média \pm Erro Padrão Média (EPM). 33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Peso corporal (PC) inicial e final, e ganho de peso dos animais dos grupos controle e contaminado	27
TABELA 2.	Comprimento, diâmetros maior e menor e peso úmido do fêmur dos animais dos grupos controle e contaminado	28
TABELA 3.	Volume Ósseo, Densidade Óssea e Mineral, porcentual ósseo de água e porcentual material orgânico e mineral do fêmur dos animais dos grupos controle e contaminado.	29
TABELA 4.	Força máxima e de ruptura, rigidez e resiliência dos fêmures dos animais dos grupos controle e contaminado	31
TABELA 5.	Concentrações de Cálcio e Fósforo dos fêmures dos animais dos grupos controle e contaminado.	32
TABELA 6.	Concentrações plasmáticas de Cálcio e Fósforo dos animais dos grupos controle e contaminado	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ca ⁺⁺	Cálcio
DCF	Departamento de Ciências Fisiológicas
DP	Desvio padrão
EPM	Erro padrão da média
F	Força
Hg	Mercúrio
Hg ₂ Cl ₂	Cloreto mercurioso
MEC	Matriz extracelular
MED	Média
MMPs	Metalopeptidases de matriz
N	Número de animais
OAT1	Transportador de Ânion Orgânico 1
OAT3	Transportador de Ânion Orgânico 3
ρ	Rô
P	Fósforo
pH	Potencial hidrogênio iônico
P _i	Peso imerso
P _m	Peso do material mineral (cinzas)
P _s	Peso seco
PTH	Hormônio da paratireóide
P _u	Peso úmido
TRAP	<i>Tartrate-resistant acid phosphatase</i>
vs	Versus
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	OBJETIVOS	20
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	21
	3.1 Modelos de Estudo	21
	3.2 Animais	21
	3.3 Protocolo Experimental	21
	3.4 Sacrifício	22
	3.5 Parâmetros Analisados	22
	3.5.1 Biométricos	22
	3.5.2 Biomecânica	22
	3.5.3 Biofísicas	24
	3.5.4 Bioquímicos	25
	3.6 Análises Estatísticas	25
	3.7 Normas metodológicas	26
4.	RESULTADOS	26
	4.1 Propriedades Biométricas	26
	4.1.1 Peso Corporal	26
	4.1.2 Análise do Fêmur Direito	27
	4.2 Propriedades Físicas	29
	4.3 Propriedades Mecânicas	30
	4.4 Propriedades Bioquímicas	32
5.	DISCURSÃO	34
6.	CONCLUSÃO	34
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	39
	APENDICE	44

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é o constituinte principal do esqueleto, constituído de uma matriz extracelular que contém componentes orgânicos (35%) e inorgânicos (65%). Apresenta funções importantes ao organismo como de suporte para as partes moles e protege os órgãos vitais, como os que estão contidos na caixa torácica e craniana. Os ossos funcionam como um sistema de alavancas que amplia as forças geradas pela contração da musculatura esquelética para realização do movimento. Os ossos ainda são grandes armazenadores de substâncias, sobretudo íons de cálcio e fosfato. O esqueleto ósseo também serve como uma segunda linha de defesa contra acidose e sua vasta área de superfície mineral pode adsorver toxinas e metais pesados e minimizar seus efeitos adversos sobre outros tecidos (MARCUS, FELDMAN & KELSEY, 1996; RAISZ, 1999; MUNDY & GUISE, 1999).

Os ossos são formados essencialmente pelo tecido ósseo cujo aspecto é compacto ou esponjoso: no osso compacto o tecido ósseo é constituído de delgadas lâminas ósseas que se sobrepõem umas às outras, unindo-se intimamente em torno de um centro; no osso esponjoso, essas delgadas lâminas se dispõem de modo a formar pequenas cavidades sendo responsáveis por 70% do volume ósseo. O osso esponjoso consiste em barras paralelas verticais e transversais, que são chamadas de trabéculas e preenchidas por partes da medula óssea e gordura. O tecido ósseo compacto praticamente não apresenta espaços medulares, existindo, no entanto, além dos canaliculos, um conjunto de canais que são percorridos por nervos e vasos sanguíneos: canais de Volkmann e canais de Havers. Por ser uma estrutura innervada e irrigada, os ossos apresentam grande sensibilidade e capacidade de regeneração. O osso compacto predomina em ossos longos; já o esponjoso está mais presente nas vértebras, pelve e extremidades dos ossos longos. Há três espécies de ossos: os ossos longos, os ossos curtos e os ossos chatos. O seu nome nos diz qual a sua característica (CARTER & SPLENGER, 1978; MARCUS, FELDMAN & KELSEY, 1996).

Ao contrário do que se imagina, o tecido ósseo é uma estrutura que sofre constantes modificações ao longo da vida, podendo estas serem fisiológicas ou patológicas (PARFITT, 1993). As alterações fisiológicas ocorrem através de uma relação entre formação e reabsorção do tecido ósseo, que tem seu pico máximo de desenvolvimento até os 30 anos de idade, prevalecendo a formação. Entre os 35 e 40 anos ocorre uma estabilização entre esses dois mecanismos, e após esse período a reabsorção prevalece, levando à diminuição progressiva da massa óssea, o que pode ser classificado como osteopenia. No período de

predominância da reabsorção óssea, tanto o homem quanto a mulher perde cerca de até 0,3% de massa óssea ao ano. Na mulher, a perda de massa óssea é maior nos 10 primeiros anos pós-menopausa, podendo chegar a 3% ao ano, e é maior na mulher sedentária. A constante formação e reabsorção em estado fisiológico são importantes, pois contribuem para a preservação de um tecido sempre novo e de boa qualidade funcional o que preserva a integridade mecânica (VAANANEN, 1991; YAMAMOTO, JEE & MA, 1995; MARCUS, FELDMAN & KELSEY, 1996).

No tecido ósseo, destacam-se os seguintes tipos celulares: osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Os osteoblastos são as células formadoras do tecido e surgem a partir de células primitivas, as osteoprogenitoras. Diversos fatores, como proteínas e fatores de crescimento, estimulam a diferenciação das células osteoprogenitoras em osteoblastos. Quando ativos, os osteoblastos depositam colágeno, principalmente do tipo I, na matriz extracelular adjacente em arranjos regulares que futuramente serão calcificados pela deposição de cristais de hidroxiapatita e passarão a ser denominados de osteócitos. São os osteócitos que manterão o equilíbrio e manutenção do tecido através de comunicações entre prolongamentos com os osteócitos adjacentes em canaliculos presentes no interior do osso. Outra função importante do osteócito e que vem sendo amplamente estudada é a sua participação como célula responsável por traduzir a força mecânica imposta ao osso em sinais bioquímicos que regulam o turnover ósseo (MARCUS, FELDMAN & KELSEY, 1996; NOMURA & YAMAMOTO, 2000; PALUMBO *et al.*, 2001; CILLINAME, 2002).

Já os osteoclastos, são células reabsorvedoras do tecido e originam-se de células mononucleadas hematopoiéticas. Sua ativação se dá principalmente através da ação do hormônio da paratireóide (PTH) que tem seu receptor nos osteoblastos, e uma ação parácrina sobre os osteoclastos. Nessas células, o PTH ativa a reabsorção do tecido mineralizado com finalidade da manutenção das concentrações dos íons de cálcio no sangue. Os osteoclastos atacam a superfície óssea mineralizada e inicia a absorção pela secreção de íons de hidrogênio e enzimas lisossomais, os quais podem degradar todos os componentes da matriz óssea, incluindo colágeno, em baixo pH (MARCUS, FELDMAN & KELSEY, 1996; RAISZ, 1999; PALUMBO *et al.*, 2001).

Nas últimas décadas tem havido um crescente interesse no estudo de hormônios relacionados à regulação do metabolismo mineral com a finalidade de controlar sua perda no desenvolvimento do tecido ósseo. O PTH, a vitamina D e a calcitonina são os principais hormônios envolvidos na regulação do metabolismo ósseo (MUNDY & GUISE, 1999).

O PTH é sintetizado pelas células principais das quatro glândulas paratireóides e é secretado quando os níveis plasmáticos de cálcio baixam a menos de 7 mg/dl, ocorrendo o inverso quando os níveis de cálcio estejam em torno ou acima de 11 mg/dl. Este hormônio possui mecanismo de controle rápido e trabalha somente com as variações plasmáticas dos íons cálcio livres. O PTH regula a concentração plasmática de cálcio e fósforo. Seu efeito global é o de elevar os níveis plasmáticos de cálcio, enquanto diminui os de fósforo. O cálcio, principal mineral que compõe o tecido ósseo, tem papel importante na formação de macro moléculas ou fosfolípidios localizados nas membranas celulares e tecidos conectivos, na secreção e modulação de atividades enzimáticas, manutenção de potencial de ação e divisão celular (MUNDY & GUISE, 1999; BRACCO, KAYATH & VIEIRA, 2003).

O processo de remodelação óssea é caracterizado por variedade de enzimas liberadas pelos osteoblastos e osteoclastos, tendo o papel de desempenhar o *turnover* da matriz extracelular (MEC). A remodelação inclui funções metabólicas integrais para o *turnover* do colágeno fibrilar e a deposição e reabsorção de tecido. O sistema apresentado é de essencial importância para os tecidos, e a estas enzimas proteolíticas extracelulares atuam no remodelamento tecidual (STERNLICHT & WERB, 2001). Uma classe destas proteínas responsáveis pelo remodelamento da MEC é a das metalopeptidases de matriz (MMPs). As MMPs são enzimas responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção da MEC, desempenhando papel importante na remodelação da mesma em vários processos fisiológicos e patológicos (VU & WERB, 2000). Em tecidos ricos em colágeno como tecido ósseo, a organização da MEC envolve vários fatores inibidores e estimuladores.

McCAW, EWALD & WERB, 2007 em um trabalho de revisão relataram 28 genes de MMPs, a maioria com potencial para atuar sobre a MEC rica em colágeno assim como a encontrada no tecido ósseo. Através da deficiência da expressão (*genetic knockouts*) das MMPs em células mutantes foi descrito dois tipos de MMPs (tipos 9 e 13) relacionadas ao tecido ósseo.

Em casos patológicos, a reabsorção do tecido ósseo acontece em um grau mais elevado e pode levar à ocorrência da perda de massa óssea e até mesmo à osteoporose. A osteoporose é uma doença que pode ser definida pela diminuição de massa óssea e deterioração da microarquitetura desse tecido, que leva ao aumento da fragilidade e maiores riscos de fraturas. O fato do tecido ósseo ser uma estrutura sólida faz com que ele esteja vulnerável a fraturas, principalmente na osteoporose. A fratura conseqüente da diminuição da massa óssea torna-se preocupante, visto que a mesma pode ocasionar problemas como infecções, pneumonias, entre outros, e até levar a mortalidade. Dentre todas as patologias

envolvidas com o enfraquecimento ósseo, a osteoporose é a de maior ocorrência na população mundial e a mais freqüente das doenças osteometabólicas, sendo, portanto, a que tem recebido maior atenção da literatura científica (NETO *et al.*, 2002). Devido a sua importância, várias são as preocupações e cuidados especiais com o que possa causar alterações ósseas ao longo da vida (CARTER & SPLENGER, 1978; BARON, TROSS & VIGNERY, 1984; CUMMINGS, 1995).

A formação do tecido ósseo pode ser influenciada por diversos fatores tais como alimentação, genética, sexo, idade e fatores ambientais. Dentre os fatores ambientais, existem alguns relatos sobre a influência de metais pesados, como o mercúrio, sobre as alterações do desenvolvimento ósseo em ratos durante a fase de crescimento (MARCUS, FIELDMAN & KELSEY, 1996; ESCRIBANO *et al.*, 1997, SCHIRRMACHER *et al.*, 1998; AKHTER *et al.*, 2003; NGUYEN *et al.*, 2003).

O mercúrio é um poluente ambiental encontrado em toda biosfera. O homem usa o mercúrio e depois o libera para o ambiente, causando um aumento de até quatro vezes da sua concentração. Os principais poluidores são as indústrias, garimpeiros, desmatamentos, agriculturas, tintas e uso laboratorial (ZAVARIZ & GLINA, 1993; SANTOS *et al.*, 1995; VIEIRA & PASSARELLI, 1996; SANTOS *et al.*, 2003). O mercúrio é um metal líquido altamente volátil e sua concentração altera-se de acordo com a temperatura, sendo que quanto mais elevada, maior será sua evaporação. O mercúrio é um irritante de pele e trato gastrointestinal e possui uma rápida absorção através desses. A absorção do vapor de mercúrio se dá principalmente pelos pulmões, através da inalação e retenção pulmonar (GRAEME & POLLACK, 1998). ZAVARIZ & GLINA (1993) realizaram uma pesquisa com objetivo de verificar a intoxicação por mercúrio metálico em trabalhadores de uma indústria de lâmpadas elétricas localizada na cidade de São Paulo, e concluíram que 84,62% dos trabalhadores estavam intoxicados. Relataram sobre a gravidade do problema em virtude da natureza da doença, que acomete áreas nobres do organismo e da ineficácia dos tratamentos diante da intoxicação. Os danos causados pelo mercúrio são graves, e em grande parte dos casos, permanentes. O mercúrio pode ser encontrado em três formas básicas: mercúrio elemento, orgânico e inorgânico. Vários sais e compostos são achados conjugados ao mercúrio orgânico e inorgânico tornando-os amplamente mais tóxicos. Um estudo realizado pela U.S Department of Health and Human services (ALDEN *et al.*, 1993) relata as possíveis mudanças que podem ocorrer devido a algumas atividades microbianas que são capazes de converter mercúrio inorgânico em metil mercúrio orgânico, mercúrio orgânico em inorgânico, ou ainda, em condições apropriadas, formar mercúrio metálico.

Para analisar as possíveis variações da toxicidade do mercúrio, a discussão se limita às suas diferentes características: é ligeiramente volátil em temperatura ambiental, corrosivo, solúvel em água, etanol, éter, glicerol, ácido acético e vários solventes orgânicos.

As pesquisas sobre a influência da contaminação por metais pesados em tecidos biológicos se destacaram quando se buscou compreender melhor as modificações orgânicas em humanos, principalmente em tecido nervoso central, cardíaco, gastrointestinal, hepático e renal. O cloreto mercurioso é muito insolúvel em água e pouco absorvido no trato gastrointestinal, entretanto no intestino pequenas quantidades são convertidas a sais de mercúrio mais solúveis, o que facilita sua absorção e expressão de suas características tóxicas. A medida que o mercúrio passa ao sangue, liga-se as proteínas do plasma e nos eritrócitos, distribuindo-se pelos tecidos concentrando-se nos rins, fígado e sangue, medula óssea, parede intestinal, parte superior do aparelhos respiratório, mucosa bucal, glândulas salivares, cérebro, ossos e pulmões. (FARRIS, *et al.*, 1993; GRAEME & POLLACK, 1997; GRIEM *et al.*, 1997).

O mercúrio é um tóxico celular geral, provocando desintegração de tecidos com formação de proteínas mercuriais solúveis e por bloqueio dos grupamentos –SH provoca inibição de sistemas enzimáticos, como das metaloproteinases, fundamentais à oxidação celular (GRAEME & POLLACK, 1997; KARIMI *et al.*, 2002; DAY, REED & NEWLAND, 2005; ROTHSCHILD & DUFFY, 2005).

Na literatura há relatos da influência de metais pesados como o mercúrio (Hg) e seus derivados sobre alterações no tecido ósseo, capazes de prejudicar o funcionamento das células. No tecido ósseo sabe-se que o chumbo muda o ritmo de formação óssea, o qual depende da concentração intracelular de cálcio livre. Já que os metais pesados competem com o cálcio em múltiplos sítios de ligação, o Hg intracelular reduz o estoque de cálcio, o que afeta canais de junção do tipo “gap” (SCHIRRMACHER *et al.*, 1998). SUZUKI *et al.*, 2004 examinaram o efeito dos metais pesados como chumbo e cádmio sobre a homeostasia do cálcio, analisando as concentrações de cálcio e calcitonina plasmática em peixe. Os autores avaliaram também a ação sobre osteoblastos e osteoclastos através da mensuração da atividade das enzimas fosfatase ácida resistente ao tartarato (*tartrate-resistant acid phosphatase* – TRAP) e fosfatase alcalina (*Alkaline phosphatase* – ALP) como respectivos indicadores da atividade de ambos os tipos celulares. Os resultados mostraram que o mercúrio agiu diretamente sobre o tecido ósseo, influenciando a homeostasia do cálcio e a atividade osteoclástica em curto tempo de exposição, porém, a longo prazo, inibiu a atividade osteoblástica.

Muitos autores estudaram alterações do tecido ósseo em ratos durante seu desenvolvimento, demonstrando que o desenvolvimento ósseo nesses animais possui as mesmas características fisiológicas dos humanos nas possíveis alterações, além da formação e reabsorção durante seu desenvolvimento normal. (BERG & HARMISSON, 1957; KALU, 1989; FROST & JEE 1992; THOMPSON *et al.*, 1995).

Pouco se sabe sobre envolvimento do Hg_2Cl_2 sobre as alterações do metabolismo mineral ósseo. Devido à carência de dados e a partir do conhecimento de sua alta gravidade da sua contaminação em virtude do acometimento dos órgãos alvos, e o efeito maléfico sobre o metabolismo mineral ósseo, torna-se importante investigar os parâmetros ósseos influenciados pelo seu efeito nesse tecido.

2 OBJETIVOS

Geral:

Avaliar as possíveis alterações ósseas em ratos adultos intoxicados com Hg_2Cl_2 durante a fase de desenvolvimento.

Específicos:

- Analisar as propriedades químicas ósseas através da análise das concentrações plasmáticas e ósseas de cálcio e fósforo;
- Analisar as propriedades físicas ósseas;
- Analisar as propriedades mecânicas ósseas através do teste de flexão a 3 pontos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelos do Estudo

Estudo experimental com modelo animal.

3.2 Animais

Utilizou-se 25 ratos Wistar intactos com peso corporal inicial médio de 72g, com um mês de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar. Os animais foram mantidos no laboratório de Neuroendocrinologia/DCF em condições de temperatura (25 ± 2 °C) e regime de luz (10 horas claro e 14 horas escuro) controlados e tratados com ração comercial e água à vontade.

3.3 Protocolo Experimental

Os animais foram divididos em grupo contaminado e controle, e mantidos em gaiolas diferentes devido à contaminação tóxica.

Os grupos foram divididos em:

Grupo1 = 09 ratos intactos tratados com salina 9% (0,1 ml/100g PC)

Grupo2 = 16 ratos intactos tratados com cloreto mercurioso (1,25mg/kg PC)

A dose escolhida está de acordo com o trabalho de Gutiérrez *et al.* Administração do cloreto mercurioso e salina foram realizadas durante cinco (5) dias/semana, por um período de 60 dias utilizando o método de gavagem gástrica.

3.4 Sacrifício

Após 60 dias da administração de cloreto mercurioso e salina, os animais foram decapitados e o sangue foi coletado do tronco e foi realizada dissecação femoral direita para coleta do material ósseo, os quais foram mantidos em solução de salina 0,9% a -20°C até o dia da análise.

3.5 Parâmetros Analisados

3.5.1 Biométricos

Peso corporal

Durante os 60 dias de tratamento, os pesos dos animais foram coletados três vezes por semana com objetivo de preparar a solução a ser injetada de acordo com o peso dos animais e acompanhamento do desenvolvimento.

Medidas do comprimento do fêmur direito

As medidas foram realizadas com ajuda de um paquímetro (precisão de 0,05 mm) tomando como referência o côndilo distal e saliência óssea mais proximal do trocanter maior.

Medidas das espessuras das diáfises femorais

Os diâmetros maiores e menores foram medidos na diáfise tomando como medida a base do terceiro trocanter. O diâmetro maior foi realizado na posição latéro-lateral e o menor, a ântero-posterior.

3.5.2 Biomecânica

As propriedades mecânicas dos fêmures direito foram mensuradas através do teste de flexão a três pontos realizado em uma máquina universal Instron modelo 4444

(figura1), com célula de carga com capacidade de 1 kN. As extremidades (regiões metafisárias) dos ossos focaram apoiadas em dois roletes com diâmetro de 3 mm, distanciados em 21,70 mm e a carga aplicada na região central de cada osso (figura1) (ROBLING & TURNER, 2002; SHIMANO, SHIMANO & VOLPON, 2002; AKHTER *et al.*, 2004)

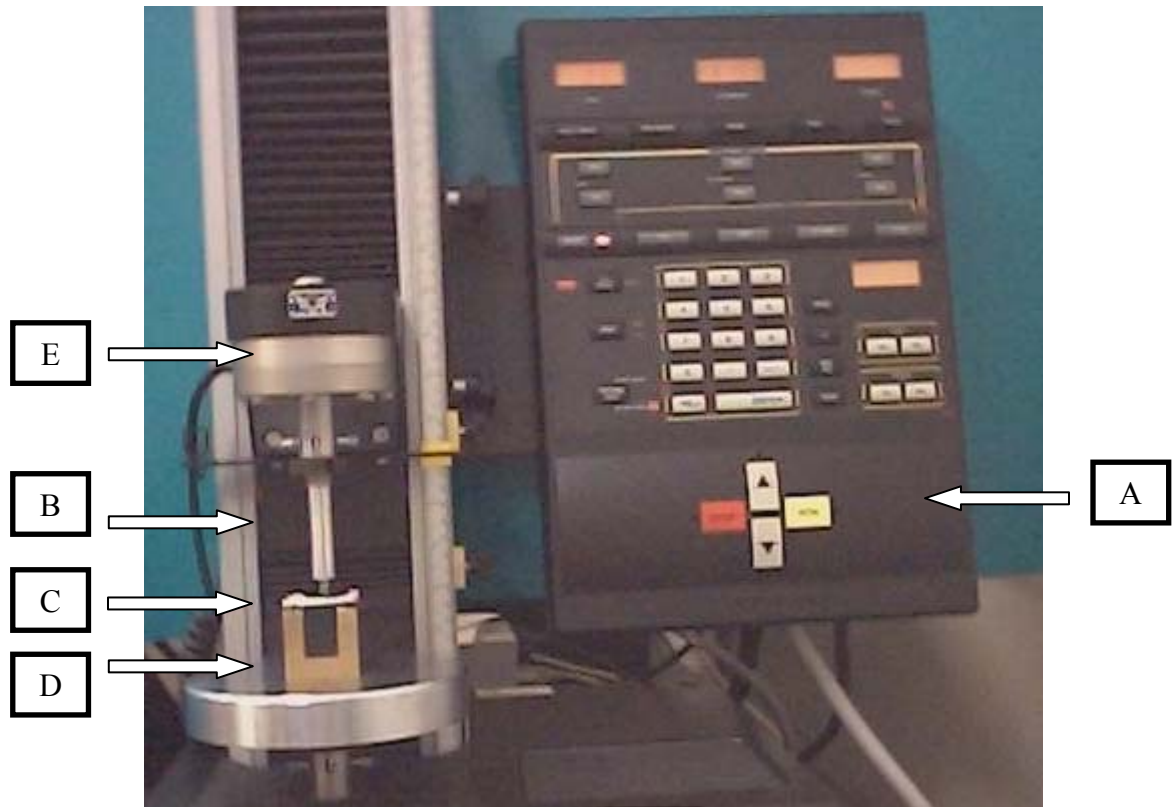


Figura 1: Máquina universal instron (modelo 4444) utilizado para o ensaio de flexão a três pontos em fêmur de rato. A: painel de controle; B: haste cilíndrica para a aplicação de carga (força); C: osso; D: suporte; E: célula de carga ligada à ponte de extensimetria.

No início do teste foi aplicada um pré-carga de 10 N por uma haste cilíndrica com um rolete de 3 mm na extremidade, no sentido pósterio-anterior e perpendicular ao eixo longitudinal para estabilizar o fêmur. O tempo de acomodação foi de um minuto para todos os grupos e após a estabilização e a acomodação, foi aplicada uma força no mesmo sentido, com velocidade constante de 0,5 cm/min até o momento da fratura.

Com o resultado da força aplicada ao fêmur, obteve-se um gráfico força-deformação pelo software Instron Series IX. Através desta curva obtiveram-se as principais propriedades biomecânicas:

Força máxima (N)

É a maior força suportada pelo osso durante o teste.

Força de ruptura (N)

Força obtida no momento da fratura.

Rigidez (J)

É a capacidade do material de sofrer carga sem se deformar permanentemente.

Resiliência

Trata-se da capacidade de um metal de absorver energia quando deformado elasticamente, isto é dentro da zona elástica, e libera-la quando descarregado..

3.5.3 Biofísicas

Após as análises biométricas dos fêmures dos animais dos grupos controle e contaminado, os ossos foram mantidos em um dessecador por 24 horas com objetivo da retirada do ar presente nos poros. Em seguida foram coletados os pesos imerso (P_i) e úmido (P_u). Esses dados foram coletados antes do ensaio biomecânico e, após o mesmo, os ossos foram colocados em uma estufa a 100° C durante 24 horas para serem desidratados e, a partir daí, obter-se o peso seco (P_s). Para obtenção do peso da cinza, os ossos foram colocados em uma mufla a 800° C durante 24 horas. Todas as medidas citadas foram obtidas através de uma balança eletrônica (marca Chyo).

Usando o Princípio de Arquimedes, calculou-se o volume ósseo e a seguir a densidade óssea e mineral, percentuais ósseos de água, material orgânico e material mineral, seguindo as fórmulas que seguem:

$$\text{Volume Ósseo} = \frac{P_u - P_i}{\rho} (\text{cm}^3)$$

$$\text{Densidade Óssea} = \frac{P_u}{\text{Volume Ósseo}} \left(\frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right)$$

$$\text{Densidade Mineral} = \frac{Pm}{\text{Volume Ósseo}} \left(\frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right)$$

$$\text{Percentual de água no osso} = \frac{100x(Pu - Ps)}{Pu}$$

$$\text{Percentual Material Orgânico} = \frac{100x(Ps - Pm)}{Pu}$$

$$\text{Percentual Material Mineral} = \frac{100xPm}{Pu}$$

Onde:

Pu = peso úmido ósseo

Ps = peso ósseo da amostra desidratada

Pi = peso imerso ósseo

Pm = peso do material mineral (cinzas)

ρ = densidade da água

3.5.4 Bioquímicos

O material mineral obtido dos fêmures dos animais (já descrito anteriormente) foram solubilizados com ácido clorídrico 2N (1-2 ml). Através do ensaio colorimétrico se determinou os conteúdos de cálcio e fósforo dos fêmures e a concentração plasmática dos animais utilizando kit comerciais específicos Labetes®.

3.6 Análises Estatísticas

Os dados obtidos em cada grupo (média± EPM) foram comparados entre si através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney, aplicado pelo software InStat 3.0 utilizando $p \leq 0.05$.

3.7 Normas metodológicas

As referências e citações, bem como a estrutura geral deste trabalho seguem as normas da Universidade Federal de São Carlos/UFSCar on-line versão, acesso em março de 07.

4 RESULTADOS

4.1 Propriedades Biométricas

4.1.1 Peso Corporal

A FIGURA 2 mostra a curva ponderal dos animais dos grupos controle e contaminado mostrando a homogeneidade do peso corporal inicial e a evolução do peso corporal durante 60 dias de tratamento.

Os pesos dos animais foram coletados três vezes por semana até completar os 60 dias de experimentação.

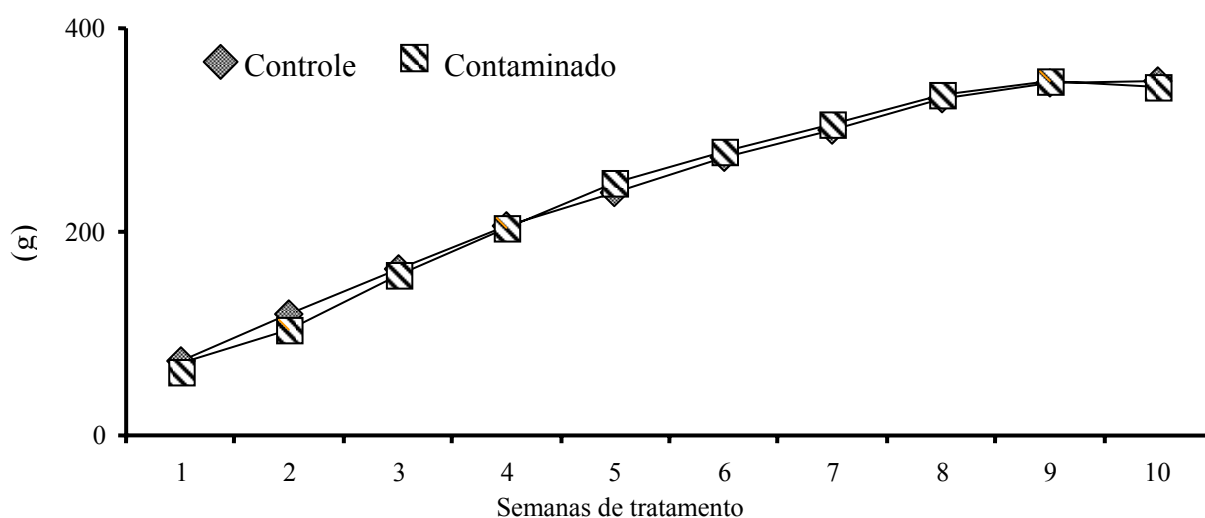


Figura 2: Peso corporal dos animais dos grupos controle e contaminado durante os 60 dias de tratamento.

A TABELA 1 e a FIGURA 3 apresentam os valores do peso corporal inicial e final, e ganho de peso dos animais analisados durante os 60 dias de tratamento. Não se observa diferenças destes parâmetros entre os grupos experimentais

Tabela 1: Peso corporal (PC) inicial e final, e ganho de peso dos animais dos grupos controle e contaminado.

Parâmetros	Grupos experimentais	
	Controle (9)	Contaminado (16)
PC inicial (g)	73,3 ± 2,16	71,7 ± 1,39
PC final (g)	351,9 ± 14,08	341,5 ± 5,31
Ganho PC (g)	278,6 ± 13,81	269,8 ± 4,67

Média ± Erro Padrão Média (EPM). () = n° animais

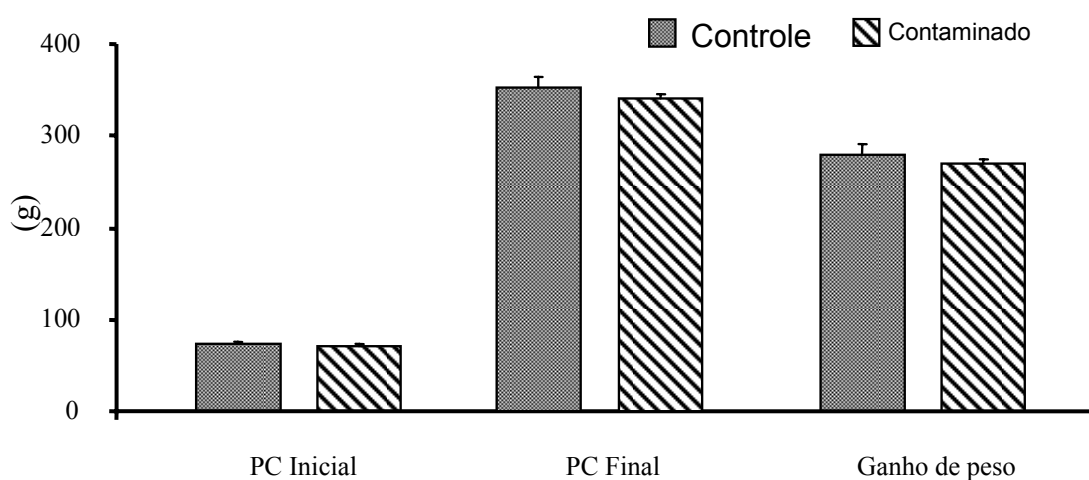


Figura 3 - Média ± EPM dos pesos corporais (PC) inicial, final e ganho de peso dos ratos dos grupos controle e contaminado.

4.1.2 Análise do Fêmur Direito

A TABELA 2 e a FIGURA 4 expressam os valores do comprimento, diâmetro maior e menor, peso úmido, imerso e das cinzas dos fêmures dos ratos dos grupos experimentais.

O comprimento, assim como os diâmetros e o peso úmido dos fêmures, não mostrou diferenças quando comparados os grupos experimentais.

Tabela 2: Comprimento, diâmetros maior e menor e peso úmido do fêmur dos animais dos grupos controle e contaminado

Parâmetros	Grupos experimentais	
	Controle (9)	Contaminado (16)
Comprimento (mm)	36,5 ± 0,1839	36,2 ± 0,0961
Diâmetro maior (mm)	4,00 ± 0,0437	3,95 ± 0,0391
Diâmetro menor (mm)	2,90 ± 0,0514	2,94 ± 0,0423
Peso úmido (g)	0,82 ± 0,0179	0,80 ± 0,0115
Peso imerso (g)	0,25 ± 0,0069	0,25 ± 0,0400
Peso das cinzas (g)	0,56 ± 0,0119	0,54 ± 0,0079

Média ± Erro Padrão Média (EPM). () = n° animais

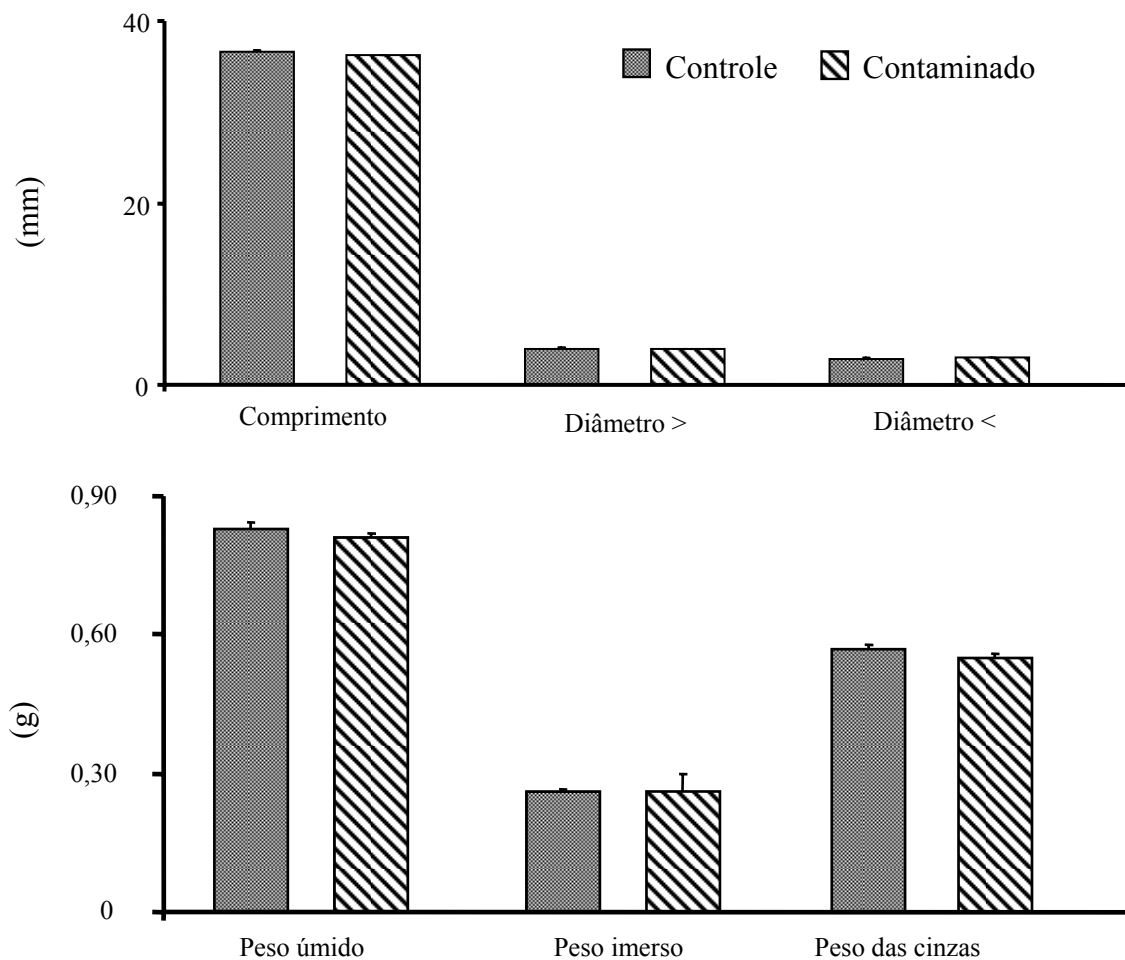


Figura 4: Parâmetros biométricos do fêmur dos ratos dos grupos experimentais controle e contaminado. Média ± EPM.

4.2 Propriedades Físicas

A TABELA 3 e a FIGURA 5 apresentam os valores das propriedades físicas (volume ósseo, densidade óssea e mineral, percentual ósseo de água, de material orgânico e de material mineral) dos fêmures dos animais dos grupos controle e contaminado.

Observou-se um aumento ($p=0,0460$) da densidade óssea dos animais contaminados em relação aos controles. Os parâmetros volume ósseo, densidade mineral, percentual ósseo de água e percentual material orgânico e mineral, não foram diferentes entre os dois grupos experimentais.

Tabela 3: Volume Ósseo, Densidade Óssea e Mineral, percentual ósseo de água e percentual material orgânico e mineral do fêmur dos animais dos grupos controle e contaminado.

Parâmetros	Grupos experimentais	
	Controle (9)	Contaminado (16)
Volume ósseo (cm ³)	0,56 ± 0,0119	0,54 ± 0,0079
Densidade óssea (g/cm ³)	1,45 ± 0,0073	1,47 ± 0,0036*
Densidade mineral (g/cm ³)	0,54 ± 0,0077	0,55 ± 0,0036
Percentual ósseo de água (%)	44,6 ± 0,4139	44,5 ± 0,2371
Percentual material orgânico (%)	17,5 ± 0,1721	17,6 ± 0,0978
Percentual material mineral (%)	37,7 ± 0,3476	37,7 ± 0,1591

Média ± Erro Padrão Média (EPM). $p < 0,05$: * vs controle. () = nº animais

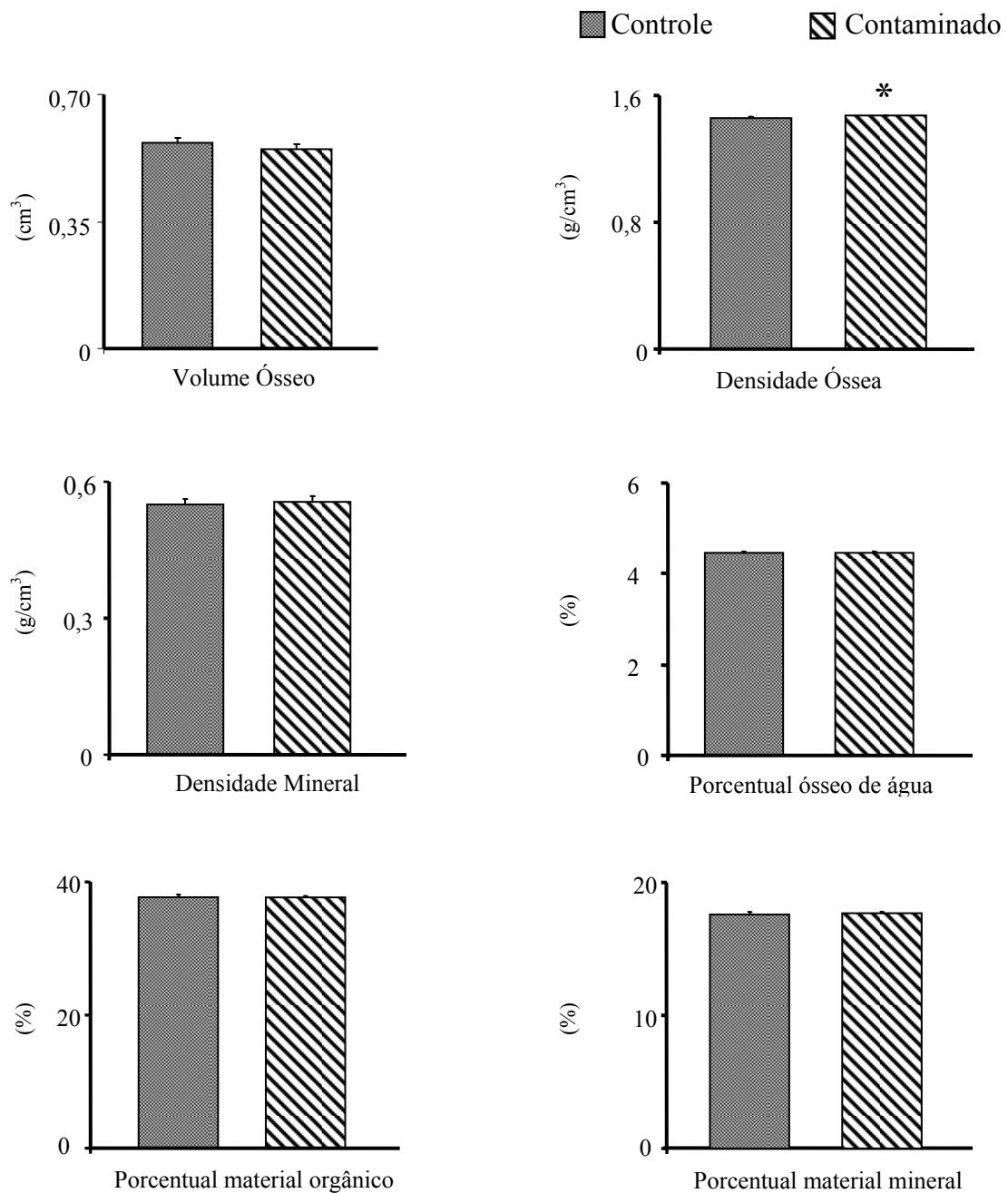


Figura 5: Parâmetros físicos do fêmur dos ratos dos grupos experimentais controle e contaminado. Média ± EPM. $p < 0,05$: * vs controle. () = n° animais

4.3 Propriedades Mecânicas

A TABELA 4 e a FIGURA 6 mostram os valores (força máxima, força de ruptura, rigidez e resiliência) obtidos através do teste de flexão a três pontos dos fêmures direito dos animais controle e contaminado com cloreto mercurioso.

Comparando-se as propriedades biomecânicas força máxima e de ruptura, rigidez e resiliência não apresentaram diferenças entre os dois grupos.

Tabela 4: Força máxima e de ruptura, rigidez e resiliência dos fêmures dos animais dos grupos controle e contaminado.

Parâmetros	Grupos experimentais	
	Controle (9)	Contaminado (16)
F. Máxima (N)	94,2 ± 0,0036	97,9 ± 0,0038
F. Ruptura (N)	84,1 ± 0,0099	97,7 ± 0,0099
Rigidez (N/mm)	183,3 ± 5,1590	184,5 ± 5,1887
Resiliência(J)	0,039 ± 0,0185	0,041 ± 0,0042

Média ± Erro Padrão Média (EPM). () = n° animais

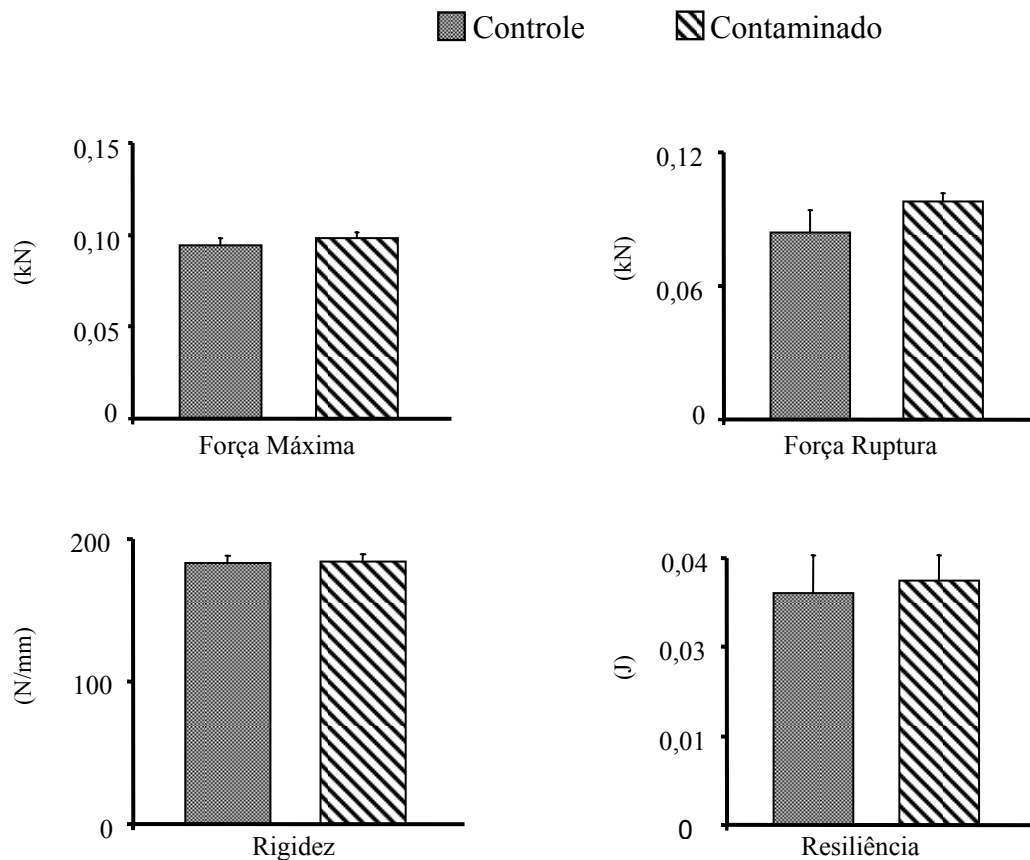


Figura 6: Força máxima e de ruptura, rigidez e resiliência dos fêmures dos animais dos grupos controle e contaminado. Média ± Erro Padrão Média (EPM).

4.4 Propriedades Bioquímicas

A Tabela 5 e a Figura 7 apresentam as concentrações de cálcio (mg Cálcio/mg cinzas do Osso) e fósforo (mg Fósforo/mg cinzas do Osso) dos fêmures direito dos animais do grupo controle e contaminado com cloreto mercurioso.

Quanto à concentração de fósforo do grupo contaminado, pode-se observar uma diminuição em comparação ao grupo controle. Já as concentrações de cálcio não tiveram diferenças entre os grupos controle e contaminado com cloreto mercurioso.

Tabela 5: Concentrações de Cálcio e Fósforo dos fêmures dos animais dos grupos controle e contaminado.

Parâmetros	Grupos experimentais	
	Controle (9)	Contaminado (16)
Cálcio (mgCálcio/mg cinza do Osso)	0,6232 ± 0,0566	0,5578 ± 0,0360
Fósforo (mgFósforo/mg cinza do Osso)	0,2063 ± 0,0075	0,1927 ± 0,0014*

Média ± Erro Padrão Média (EPM). $p < 0,05$ * vs controle. () = n° animais

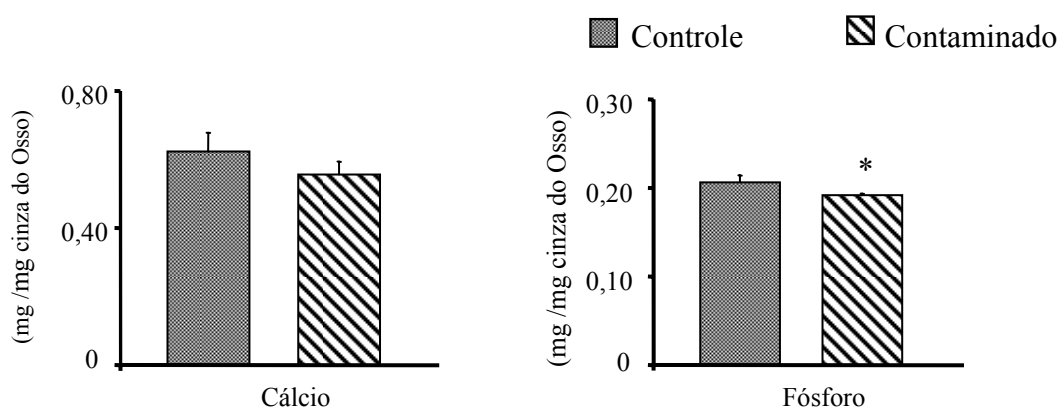


Figura 7: Concentrações de Cálcio e Fósforo dos fêmures dos animais dos grupos controle e contaminado. Média ± Erro Padrão Média (EPM). $p < 0,05$

A Tabela 6 e a Figura 8 apresentam as concentrações plasmáticas de cálcio (mg/dl) e fósforo (mg/dl) dos animais do grupo controle e contaminado com cloreto mercurioso.

Pode-se observar que não há diferença das concentrações plasmática de cálcio e fósforo do grupo contaminado em comparação ao grupo controle.

Tabela 6: Concentrações plasmáticas de Cálcio e Fósforo dos animais dos grupos controle e contaminado.

Parâmetros	Grupos experimentais	
	Controle (9)	Contaminado (16)
Cálcio (mg/dl)	9,3607 ± 0,0858	9,2718 ± 0,0712
Fósforo (mg/dl)	9,5926 ± 0,2513	9,0370 ± 0,1809

Média ± Erro Padrão Média (EPM). () = n° animais

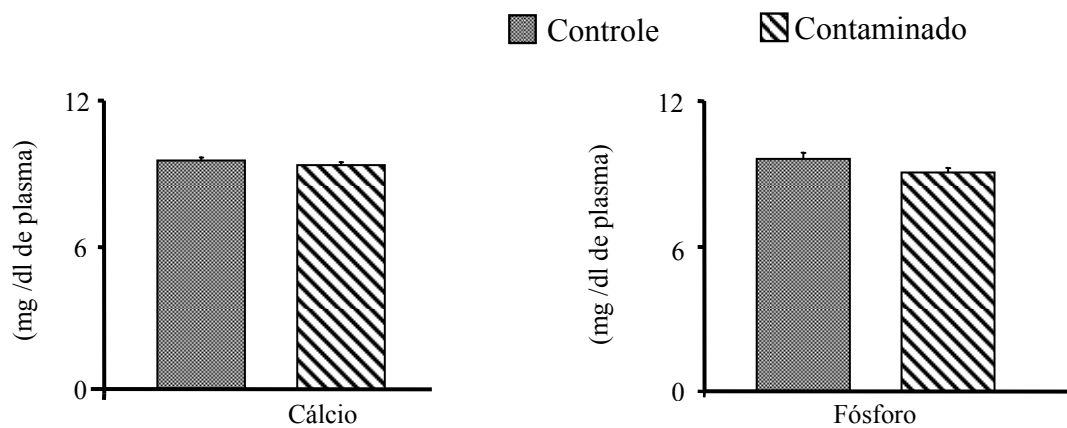


Figura 8: Concentrações de Cálcio e Fósforo do plasma dos animais dos grupos controle e contaminado. Média ± Erro Padrão Média (EPM).

5 DISCUSSÃO

Analisou-se alguns possíveis efeitos provocados pelo Hg_2Cl_2 em tecido ósseo de ratos em desenvolvimento. O modelo de contaminação através de gavagem gástrica promoveu fácil adaptação dos animais ao sistema, não apresentando diminuição significativa de massa corpórea nem alterações comportamentais.

Com relação ao peso corporal, os animais não apresentaram diferenças entre os grupos controle e contaminado ao longo dos 60 dias de tratamento. BERG & HARMISON, 1957; BURR, ROBLING & TURNER 2002 afirmaram que a homogeneidade do peso é importante pelo fato deste aumentar o estresse mecânico sobre os ossos e contribuir para o ganho de massa óssea.

No presente estudo, as medidas de comprimento, diâmetro maior e menor dos fêmures dos animais não mostraram diferenças significativas quando comparadas entre si. Entretanto, o comprimento e diâmetro maior tiveram tendência à diminuição, o que poderia indicar que a contaminação pelo mercúrio estaria interferindo no desenvolvimento dos animais (FIGURA 2). Os valores obtidos no grupo controle estão de acordo com alguns autores da literatura (HOCK *et al*, 1988; TREBACZ, 2001).

As propriedades físicas ósseas dos fêmures dos animais foram analisadas de forma direta através do princípio de Arquimedes, que consiste em um método simples e de fácil execução (TREBACZ, 2001). Com os valores de volume ósseo, densidade óssea e mineral, percentual ósseo de água e percentual de material orgânico e mineral obtidos, observou-se um aumento somente da densidade óssea dos animais contaminados em relação aos do grupo controle, estando de acordo com a literatura (TREBACZ, 2001). Isso se deve à tendência de diminuição do peso úmido em maior proporção em relação ao volume ósseo quando comparado aos respectivos parâmetros do grupo controle, mesmo não sendo diferentes (sabendo que a densidade óssea = peso úmido/ volume ósseo). A tendência ao aumento da densidade mineral não deve ser atribuída à deposição do mercúrio em tecido ósseo, já que esse tem ponto de evaporação abaixo de 800 °C (temperatura a qual é condicionada os fêmures para obtenção do material mineral) e o grupo contaminado apresentou valores menores do peso úmido em relação ao controle, mesmo não sendo diferentes. Um estudo realizado por ROTHCHILD & DUFFY (2005) verificou o acúmulo de mercúrio (orgânico e inorgânico) em maiores proporções no tecido ósseo quando comparado a tecidos muscular e nervoso central de aves migratórias. Porém pelo fato de ser

uma pesquisa com coleta aleatória de aves silvestres, como patos e gansos que habitam vários lugares e se alimentam de diferentes alimentos, não se pode saber a forma, o tempo de exposição e a via de contaminação do mercúrio nesses animais.

Todas as formas de mercúrios são tóxicas para todas as espécies do reino animal. Entretanto, os efeitos adversos do mercúrio no organismo dependem da sua forma, do tempo e duração da exposição e da via de administração. As formas de mercúrio são interconvertidas no meio ambiente e podem ser absorvidas de diversas formas como: ingestão, inalação, injeção e absorção epidérmica.

Em nosso trabalho, no fêmur houve diminuição da concentração de fósforo e uma tendência à diminuição do cálcio em relação ao grupo controle. Esses dados podem ser correlacionados com a hipótese do acometimento renal pelo mercúrio, que, segundo ZALUPS, (2000) o rim é o principal e primeiro órgão contaminado e acumulador do mercúrio inorgânico. Esse fato poderia contribuir para a causa de deficiência renal e alteração do equilíbrio ácido-básico. Esse desequilíbrio poderia induzir aumento da excreção urinária de cálcio devido a: diminuição da reabsorção renal do cálcio induzindo um hiperparatireoidismo secundário; ou devido ao efeito direto do ácido sobre o tecido ósseo. BUSHINSKY (2001) relatou em trabalho de revisão de alterações em culturas ósseas de camundongo promovidas pela diminuição do pH durante 3 horas, modelo de acidose aguda, causando dissolução mineral óssea. Esses estudos indicam que o mecanismo pelo o qual íons hidrogênio causam liberação do cálcio ósseo durante curto período é devido a alterações de fatores físico-químicos que governam a deposição e dissolução do tecido ósseo, e não mediado por alterações de atividades celulares relacionadas à reabsorção. No mesmo trabalho de revisão, foi relatado alguns autores realizaram Para confirmar essa hipótese cultivou-se disco de apatita carbonatado sintético em meio fisiologicamente ácido livre de células e verificou-se a liberação de cálcio em resposta da diminuição do pH. Podemos sugerir também que o mercúrio tenha atingido o interior das células e se ligado no lugar do fósforo. Os dados encontrados não puderam ser confrontados com a literatura em relação ao tecido ósseo no que se refere aos possíveis locais de ligação do mercúrio no interior celular.

Nos últimos anos, um grande número de proteínas transportadoras tem sido empregado no transporte de alguns metais tóxicos nas membranas celulares, tais como o Transportador de Ânion Orgânico 1 (OAT1) e 3 (OAT3) que estão implicados no transporte absorptivo de mercúrio orgânico e inorgânico nas células epiteliais renais, endoteliais e gliais (BALLATORI 2002; ZALUPS & AHMAD, 2004). Além disso, o mercúrio tem a capacidade de se ligar a albuminas e sofrer endocitose (ZALUPS, 2000). Uma vez no interior da célula,

os metais tóxicos como o mercúrio, têm a capacidade de se ligar a algumas substâncias e formar um complexo organo-metal mimetizando o efeito de outras. Uma concepção de mimetismo molecular e iônico tem sido postulada como mecanismo pelo qual certos metais tóxicos têm a capacidade de entrar na célula e agir ou servir como análogo estrutural e/ou funcional de outros endógenos biomoleculares (BRIDGES & ZALUPS, 2004).

O teste de flexão a três pontos possibilita observar as principais propriedades biomecânicas do tecido ósseo. Na análise desses resultados não houve diferença entre os grupos. Apesar das diferenças não significativas, houve tendência de aumento da força máxima e de ruptura suportada, rigidez e resiliência nas amostras do grupo contaminado em relação ao controle. Esse fato pode estar relacionado à capacidade do mercúrio de se ligar a moléculas intracelulares. BRIDGES & ZALUPS (2004) relataram sobre um conjugado molecular incluindo o mercúrio, capaz de mimetizar cistina e cistationina em sítios de ligação da membrana plasmática, além de sítios de moléculas que utilizam essas proteínas como substrato. Devido ao fato desse conjugado inativar a enzima na qual se ligava (γ -cistationase), os autores concluíram que esse mimetismo foi estrutural, porém não funcional. Sabe-se que as metalopeptidases, enzimas presentes no tecido ósseo, possuem resíduos de cistina em sua estrutura molecular (McCAW, EWALD & WERB, 2007). Dessa forma, se o mercúrio foi capaz de se conjugar a alguma molécula óssea modificando sua estrutura ou função, isso poderia ter influenciado as propriedades biomecânicas do presente estudo, por impedir a reabsorção da matriz no processo de remodelação óssea tornando o tecido mais resistente. Porém o peso úmido do fêmur do grupo contaminado foi menor em relação ao controle, o que invalida a hipótese do Hg estar inibindo a reabsorção, o que levaria ao aumento da matriz extracelular. Os resultados encontrados mostram tendência ao aumento das propriedades biomecânicas, o que caracteriza um tecido ósseo mais resistente, porém, diminuição da matéria orgânica e inorgânica, o que poderia proporcionar um material menos resistente.

GRAEME & POLLACK (1998) em um trabalho de revisão relataram que o mercúrio tem capacidade de atingir os vasos sanguíneos, penetrar neles e se ligar às células vermelhas. Em nosso estudo, para avaliação de algumas possíveis intercorrências causadas pelo cloreto mercurioso no plasma, analisamos as concentrações de cálcio e fósforo plasmático. Nos resultados obtidos verificou-se que as concentrações de cálcio e fósforo foram menores no grupo contaminado, porém as diferenças não foram significantes quando comparadas estatisticamente com o controle. Os valores obtidos no grupo controle estão de acordo com alguns autores da literatura (Hock, 1988, Ohta, 1995). SUZUKI *et al.*, (2004) relataram diminuição das concentrações de cálcio plasmático de peixe após 8 dias de

contaminação por metil mercúrio, o que pode estar relacionado à forma, dose, tempo de exposição do contaminante e à espécie utilizada.

6 CONCLUSÃO

Dentre as propriedades físicas ósseas analisadas houve aumento da densidade mineral diante da contaminação por cloreto mercuroso na dose de 1,25 mg/Kg PC. Os demais parâmetros físicos permaneceram inalterados.

As propriedades biomecânicas ósseas analisadas através do teste de flexão a 3 pontos, não apresentaram alterações diante da contaminação por Cloreto Mercuroso na dose utilizada.

Na análise das propriedades químicas obteve-se diminuição da concentração de fósforo plasmático. As concentrações de cálcio plasmático e ósseo além do fósforo ósseo permaneceram inalteradas.

Os resultados encontrados mostram tendência ao aumento das propriedades biomecânicas, o que caracteriza um tecido ósseo mais resistente, porém, diminuição da matéria orgânica e inorgânica, o que poderia proporcionar um material menos resistente.

A contaminação com mercúrio na forma (cloreto mercuroso) e dose (1,25 mg/Kg PC) utilizadas provocou uma pequena alteração do desenvolvimento ósseo de ratos, como pôde ser observado pela análise dos parâmetros biométricos, biofísicos, bioquímicos e biomecânicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHTER, MP., *et al.* Effects of nicotine on bone mass and strength in aged family rates. **J Orthop Res.** v.1; 21, p.14-9, may 2003.

AKHTER, MP., *et al.* Bone biomechanical properties in LRP5 mutant mice. **Bone.** v.35(1), p.162-9, jul.2004.

ALDEN, CJ., *et al.* Toxicology and carcinogenesis studies of mercuric chloride in F344 rats and b6c3f₁ mice. **Natl Toxicol Program Tech Rep Ser.** v. 408, p.1-260, feb. 1993.

BALLATORI, N. Transport of toxic metals by molecular mimicry. **Environ Health Perspect.**, v.110, Suppl 5, p.689-94, oct 2002.

BARON, R.; TROSS, R. & VIGNERY, A. Evidence of sequential remodeling in rat trabecular bone: morphology dynamic histomorphometric, and changes during skeletal maturation. **Anat Rec.** v.208(1), p.137-45, jan. 1984.

BERG, BN. & HARMISSON, CR. Growth, disease, and aging in the rat. **J Gerontol.** v.12(4), p.370-7, oct. 1957.

BRACCO, LO., KAYATH, MJ. & VIEIRA, JGH. **Hormônio da Paratireóide (1-34) no Tratamento da Osteoporose.** Eli Lilly do Brasil, São Paulo, Março, 2003.

BRIDGES, CC. & ZALUPS, RK. Homocysteine, system b⁰⁺ and the renal epithelial transport and toxicity of inorganic mercury. **Am J Pathol.** v.165(4), p.1385-94, oct. 2004.

BURR, DB., ROBLING, AG. & TURNER, CH. Effects of biomechanical stress on bones in animals. **Bone**, v. 30, n. 5, p. 781-86, may 2002.

BUSHINSKY, DA. Acid-base imbalance and the skeletal. **European Journal of Nutrition**, v. 40, n.5, p.238-44, 2001.

CARTER, DR. & SPENGLER, DN. Mechanical properties and composition of cortical bone. **Journal Bone Lippincott Company**, n. 135, p. 192-217, Sep.1978.

CILLINAME, DM. The role of osteocytes in bone regulation: mineral homeostasis versus mechanoreception. **Journal Musculoskelet Neuronal Interaction**, v. 2, p.242-4, 2002.

COSTA-PAIVA, L., *et al.* Prevalência de osteoporose em mulheres na pós-menopausa e associação com fatores clínicos e reprodutivos - Departamento de Tocoginecologia, Faculdade de Ciências Médicas- CAISM- Unicamp. **Revista Brasileira Ginecologia e Obstetrícia**, v. 25, nº 7, 2003 aug. 2003.

CUMMINGS, SR., *et al.* Risk factors for hip fracture in white women. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 12, p. 764-73, mar. 1995.

DAY, JJ., REED, MN. & NEWLAND, C. Neuromotor deficits and mercury concentration in rats exposed to metal mercury and fish oil. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 27, p. 629-41, 2005.

ESCRIBANO, A., *et al.* Effect of Lead on Bone Development and Bone Mass: A Morphometric, Densitometric, and Histomorphometric Study in Growing Rats. **Calcified Tissue International**, n.60, p.200-203, jul. 1997.

FARRIS, FF., *et al.* Physiological model for the pharmacokinetics of metal mercury in the growing rat. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 119, p. 74-90, 1993.

FROST, HM. & JEE, WSS. On the Rat Model of Human Osteopenias and Osteoporosis. **Bone and Mineral**, v.18, p.227-236, 1992.

GRAEME, KA. & POLLACK, CVJ. Heavy metal toxicity, part 1: arsenic and mercury. **The Journal Emergency Medicine**, v. 16, n.1, p. 45-56, 1998.

GRIEM, P., *et al.* Strain differences in tissue concentrations of mercury in inbred mice treated with mercury clorid. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 144, p. 163-170, 1997.

GUTIÉRREZ, EIC., *et al.* Evaluation of the mutagenic and cytotoxic effects of mercurous chloride by the micronuclei technique in golden Syrian hamsters. **Mutagenesis** vol. 19 no. 3 pp. 203±205, 2004.

HOCK JM, GERA I, FONSECA J, RAISZ LG. Human parathyroid hormone-(1-34) increases bone mass in ovariectomized and orchidectomized rats. **Endocrinology**, v.122(6), p.2899-904, jun.1988.

JOHNSTON, CC. & SLEMENDA, CW. Pathogenesis of Osteoporosis. **Bone**, v. 17, p. 19-22, Aug., 1995.

KALU, DN., *et al.* The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. **Endocrinology**, v.124, n.1, p.7-16, 1989.

KARIMI, A., *et al.* Mercury exposure among residents of a building block in Shiraz, Iran. **Enviromental Reseach Section A**, v. 88, p. 41-3, 2002.

MARCUS, R., FELDMAN, D. & KELSEY, J. **Osteoporosis**. The Bone Organ System, p. 3-22. Academic Press. San Diego USA. T.A Einhorn, 1996.

McCAW, AP., EWALD, JE. & WERB, Z. Matrix metalloproteinases and regulation tissue remodeling. **Molecular Cell Biology**, v. 8, p. 221-33, mar. 2007.

MUNDY GR. & GUISE TA. Hormonal Control of Calcium Homeostasis. **Clinical Chemistry** v.45, n.8(B), p. 1347–52, 1999.

NETO, AMP., *et al.* Consenso Brasileiro de Osteoporose. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.42, n.6, nov./dez., 2002.

NGUYEN, TV., *et al.* Genetic determination of bone mineral density: evidence for a major gene. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 8, p. 3614-620, August, 2003.

NOMURA, S., YAMAMOTO, TT. Molecular event caused by mechanical stress in bone. **Matrix Biol**, v. 19, p. 91-6, 2000.

PALUMBO, C. *et al.* Osteocyte-osteoclast morphological relationships and the putative role of osteocytes in bone remodeling. **Journal Musculosket Neuronal Interacion**, v. 1, n. 4, p.327-32, 2001.

PARFITT, A. Calcium homeostasis. In: **Physiology and Pharmacology of Bone**, editors: Mundy, G.R., Martin, T.J., Berlin: Spreinger-Verlag, 1993.

RAISZ, LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. **Clinical Chemistry**, vol. 45, n. 8, p. 1353-58, 1999.

RAMALHO, AC., *et al.* Osteoporotic fractures of proximal femur: clinical and epidemiological features in a population of the city of São Paulo. **São Paulo Medical Journal**, vol. 119, n. 2 p. 48-53, 2001.

ROBLING, AG. & TURNER, CH. Mechanotransduction in bone: genetic effects on mechanosensitivity in mice. **Bone**, v. 31, n. 5, p 562 – 69, 2002.

ROTHSCHILD, RFN. & DUFFY, LK. Mercury concentration in muscle, brain and bone of western Alaskan waterfowl. **Science of the Total Environment**, v. 349, p. 277-83, 2005.

SANTOS, E., *et al.* Avaliação dos níveis de exposição ao mercúrio entre índios Pakaanóva, Amazônia, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.19, n.1, p.199-206. Fev., 2003.

SANTOS, E., *et al.* 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, Jun., 1995.

SCHIRRMACHER, K., *et al.* Effects of Lead, Mercury, and Methyl Mercury on Gap Junctions and $(Ca^{+2})_I$ in Bone Cells. **Calcified Tissue International**, n.63, p. 134-139, October 1998.

SHIMANO, MM., SHIMANO AC. & VOLPON JB. Histerese de femurs de ratas submetidas a ensaio de flexão, em diferentes faixas etárias. **Revista Brasileira de Engenharia e Biomedicina**, v. 18, n. 2, p. 89-97, mai/ago 2002.

STERNLICHT, MD. & WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annual Reviews Cell Development Biology**, v. 17, p. 463-516, 2001.

SUZUKI, N., *et al.* Both mercury and cadmium directly influence calcium homeostasis resulting from the suppression of scale bone cells: the scale is a good model for the evaluation of heavy metals in bone metabolism. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 22, p. 439-46, 2004.

THOMPSON, DD., *et al.* FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. **Bone**, v.17, n.4, p.125s-133s, 1995.

TREBACZ, H. Disuse-induced deterioration of bone strength is not stopped after free remobilization in young adult rats. **Journal of Biomechanics**, v.34, p. 1631-636, 2001.

VAANANEN, HK. Pathogenesis of Osteoporosis. **Calcified Tissue International**, v.49, p.S11-S14, 1991.

VIEIRA, JLF. & PASSARELLI, MM. Determinação de mercúrio total em amostras de água, sedimento e sólidos em suspensão de corpos aquáticos por espectrofotometria de absorção atômica com gerador de vapor a frio. **Revista de Saúde Pública**, v.30, n.3, p.256-260. Jun., 1996.

VU, TH. & WERB, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes e Development**, v. 14, p. 2123-133, 2000.

YAMAMOTO, N, JEE WSS. & MA, YF. Bone Histomorphometric Changes in the Femoral Neck of Aging and Ovariectomized Rats. **The Anatomical Record**, n. 243, p.175-185, 1995.

ZALUPS, RK. Molecular interactions with mercury in the kidney. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 1, p. 113-43, 2000.

ZALUPS, RK. & AHMAD, S. Homocysteine and the renal epithelial transport and toxicity of inorganic mercury: role of basolateral transporter organic anion transporter 1. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, p. 2023-31, 2004.

ZAVARIZ, C. & GLINA DMR. Efeitos da exposição ocupacional ao mercúrio em trabalhadores de uma indústria de lâmpadas elétricas localizada em Santo Amaro, São Paulo, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, São Paulo, v.9, n.2, p.117-129, jun. 1993.

APÊNDICE E: PARÂMETROS BIOMECÂNICOS

GRUPO CONTROLE

	(kN)	(kN)	(N/mm)	(J)
Ratos	Força Máxima	Força de Ruptura	Rigidez	Resilência
1	97,7	19,3	184,7	0,0024
2	108,5	108,2	212,2	0,0456
3	104,5	104,5	179,1	0,0694
4	93,6	93,4	171,3	0,0452
5	82,6	82,0	184,3	0,0319
6	83,5	83,0	170,0	0,0393
7	83,5	83,0	170,0	0,0393
8	100,0	99,5	195,0	0,0386
MED	94,2	84,1	183,3	0,0390
DP	10,1444	28,0980	14,5919	0,0185
EPM	3,5866	9,9341	5,1590	0,0065
N	8	8	8	8

GRUPO CONTAMINADO

	(kN)	(kN)	(N/mm)	(J)
Ratos	Força Máxima	Força de Ruptura	Rigidez	Resilência
1	87,0	86,3	194,8	0,033
2	108,7	108,7	195,2	0,0511
3	105,5	105,4	191,3	0,0425
4	84,3	84,1	160	0,0541
5	117,6	117,4	206	0,0532
6	117,3	116,9	207,7	0,0547
7	93,4	93,4	184,6	0,0395
8	74,7	74,1	159	0,0272
9	95,9	95,7	185,8	0,0365
10	91,8	91,6	153,3	0,0055
11	97,1	96,9	192,3	0,0413
12	101,9	101,6	184,4	0,0558
MED	97,9	97,7	184,5333	0,0412
DP	13,0000	13,1000	17,9742	0,0147
EPM	3,7527	3,7784	5,1887	0,0042
N	12	12	12	12

Durante a execução deste protocolo alguns ossos deslocaram e, por este motivo, algumas amostras foram excluídos.

APÊNDICE E: PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

GRUPO CONTROLE

Ratos	mgCa ⁺⁺ /mgOsso	
	Cálcio	Fosfóro
1	0,4029	0,190
2	0,4684	0,196
3	0,3844	0,197
4	0,7402	0,203
5	0,7517	0,239
6	0,7369	0,190
7	0,8506	0,251
8	0,5831	0,197
9	0,6911	0,194
MED	0,6232	0,2063
DP	0,1698	0,0224
EPM	0,0566	0,0075
N	9	9

GRUPO CONTAMINADO

Ratos	mgCa ⁺⁺ /mgOsso	
	Cálcio	Fosfóro
1	0,4909	0,1932
2	0,4143	0,1843
3	0,3018	0,1898
4	0,5818	0,1877
5	0,5606	0,1947
6	0,5985	0,1956
7	0,6990	0,1939
8	0,7841	0,1848
9	0,6582	0,1938
10	0,6796	0,1919
11	0,6732	0,2012
12	0,6624	0,2019
13	0,3889	0,1983
14	0,4203	0,1939
15	0,4528	0,1849
MED	0,5578	0,1927
DP	0,1393	0,0055
EPM	0,0360	0,0014
N	16	16

APÊNDICE E: PARÂMETROS BIOQUÍMICOS**GRUPO CONTROLE**

	(mg/dl de plasma)	(mg/dl de plasma)
Ratos	Cálcio	Fosfóro
1	9,12734	11,09096
2	9,22288	10,07813
3	9,26017	9,09877
4	9,54212	9,30804
5	9,28813	10,05301
6	9,07655	9,55078
7	9,23314	8,71373
8	9,82407	8,73047
9	9,67261	9,70982
MED	9,36078	9,59263
DP	0,25757	0,75406
EPM	0,08586	0,25135
N	9	9

GRUPO CONTAMINADO

	(mg/dl de plasma)	(mg/dl de plasma)
Ratos	Cálcio	Fosfóro
1	9,05278	9,09040
2	8,84446	9,68471
3	8,96470	8,94810
4	9,10870	9,15737
5	8,95258	7,50837
6	9,22288	9,09040
7	8,91530	9,14063
8	9,63999	10,24554
9	9,56775	8,34542
10	9,23919	8,11105
11	8,85844	8,98996
12	9,11336	9,34152
13	9,73785	8,41239
14	9,47221	9,08203
15	8,98520	9,07366
16	9,27182	10,37109
MED	9,18420	9,03704
DP	0,28517	0,72372
EPM	0,07129	0,18093
N	16	16