

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Juciléia Barbosa Bezerra

ADMINISTRAÇÃO DE CLORETO DE MERCÚRIO A RATAS EM
DESENVOLVIMENTO: EFEITOS SOBRE O TECIDO ÓSSEO DE
RATAS ADULTAS DE DIFERENTES IDADES

São Carlos

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Juciléia Barbosa Bezerra

ADMINISTRAÇÃO DE CLORETO DE MERCÚRIO A RATAS EM
DESENVOLVIMENTO: EFEITOS SOBRE O TECIDO ÓSSEO DE
RATAS ADULTAS DE DIFERENTES IDADES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de
São Carlos como parte dos requisitos para obtenção
do Título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa Dra Keico Okino Nonaka.

São Carlos

2009

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

B574ac

Bezerra, Juciléia Barbosa.

Administração de cloreto de mercúrio a ratas em desenvolvimento : efeitos sobre o tecido ósseo de ratas adultas de diferentes idades / Juciléia Barbosa Bezerra. -- São Carlos : UFSCar, 2009.
65 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Tecido ósseo. 2. Mercúrio. 3. Biomecânica óssea. 4. Ratas.I. Título.

CDD: 619.93 (20^a)

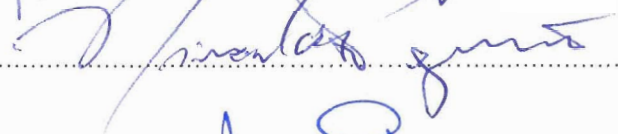
Universidade Federal de São Carlos
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Convênio UFSCar/UNESP-Araraquara

Defesa de Tese de Juciléia Barbosa Bezerra

Prof^a. Dr^a. Keico Okino Nonaka.....



Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto.....



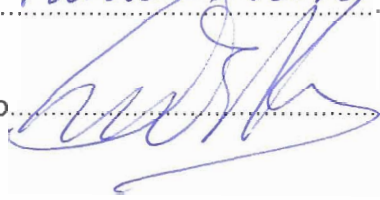
Prof. Dr. Mario Jefferson Quirino Louzada.....



Prof^a. Dr^a. Patricia Driusso.....



Prof. Dr. Derval Bertoncello.....



Orientadora
Profa. Dra. Keico Okino Nonaka

Este trabalho recebeu apoio à pesquisa da
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
Nível superior – CAPES.

Dedico este trabalho aos meus pais pelo seu amor,
por estarem sempre ao meu lado e pelo orgulho que
tenho deles.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sua presença e amor constantes, sobretudo nos momentos mais difíceis.

A Professora Dra Keico Okino Nonaka pela orientação, presença, incentivo, dedicação, força e amizade.

A minha mãe Clemides Ribeiro e ao meu pai José Moreira Bezerra por serem meu suporte em todos os momentos. Aos meus irmãos Julio Cesar e Luciane Moreira e sobrinhos Caio Cesar, Maria Vitória, Alexandre Raposo e em especial à Maria Eduarda Raposo por sua linda presença em minha vida, amo muito todos vocês!

Ao meu namorado Marcio Bertolote por confiar em mim.

Aos professores do Departamento de Fisiologia por sua contribuição à minha formação acadêmica.

Aos colegas de trabalho: Valéria Mattos, Daniel Mochiutti, Fernando D'Avila, Fábio Pastor, Danilo Cardin, Charles Wang, Adriana Macagnan e José Aparecido pela ajuda de sempre. A Juliana Thomaz, Diana Monteiro e Marcela Sene pela ajuda com os gráficos.

Aos meus queridos amigos que fizeram São Carlos ser mais especial: Francisco Medaglia, Rafael Guerreiro, Salete Martins, Sania Maria e a todos os amigos da Igreja Presbiteriana de São Carlos, obrigada.

A todos meu mais profundo agradecimento!

“Quem estuda somente os homens, adquire o corpo do conhecimento sem a alma; e quem estuda somente os livros, a alma sem o corpo. Quem adiciona observação àquilo que vê, e reflexão àquilo que lê, está no caminho certo do conhecimento, contanto que ao sondar os corações dos outros, não negligencie o seu próprio”.

(Caleb Colton)

RESUMO

O tecido ósseo sofre influências de fatores intrínsecos e extrínsecos. Entre os fatores externos ou ambientais, encontram-se os metais pesados, como por exemplo, o mercúrio. O composto cloreto de mercúrio (CM - HgCl_2) quando absorvido pelo ser humano, se deposita no tecido ósseo e gorduroso deslocando minerais nobres dos ossos e músculos para a circulação, podendo provocar doenças. Neste estudo, ratas Wistar foram divididas em 4 grupos: 3m, 6m, 9m e 12 meses (12m) de vida. Os animais tratados com mercúrio receberam HgCl_2 e os controles, salina por gavagem gástrica. O tratamento iniciou-se aos 30 dias de vida do animal, 5 vezes por semana, durante 60 dias. A dose diária foi de 0,3mg/kg de peso corporal de HgCl_2 e de 0,1ml de salina /100g de peso corporal. Após esse período, o grupo 3m foi sacrificado logo em seguida por decapitação enquanto que os demais grupos permaneceram sem tratamento até que completassem a idade desejada. Os animais tiveram seus fêmures direitos e vértebras (L5) retirados para análise dos parâmetros biométricos, físicos e biomecânicos. O tratamento com CM promoveu aumentos dos valores dos parâmetros físicos e biométricos no grupo 6m e redução no grupo 12m, e inalteração nos grupos 3 e 9 meses. Além disso, o tratamento com CM promoveu abertura vaginal das ratas tratadas com CM aos 51 dias de vida enquanto que nos controles essa abertura ocorreu nos 44,4 dias de vida. Concluímos que o tratamento com HgCl_2 , na dose de 0,3mg/Kg PC retardou a idade em que ocorre a mudança de velocidade do crescimento dos animais, especialmente nos grupos 6m e 12m. Além disso, a contaminação com mercúrio promoveu fragilidade óssea nos animais do grupo 12m, comprovada pela análise das propriedades biométricas, físicas e biomecânicas, tanto dos fêmures como das vértebras, além de atrasar a maturidade sexual das ratas.

Palavras chave: tecido ósseo, cloreto de mercúrio, biomecânica óssea, ratas.

ABSTRACT

The bone tissue is influenced by internal and external factors and heavy metals, as mercury, are examples of external or environmental factors. The mercury chloride (HgCl_2) when absorbed by human body, deposits in the bone and fat tissue and dislocates bones and muscles minerals to circulation, being able to provoke illnesses. In this study, Wistar rats were divided in 4 groups: 3m, 6m, 9m and 12 months (12m) days of life. The animals were treated with HgCl_2 or saline through gavage. The treatment began at 30 days of age, 5 times per week, during 60 days. The daily dose was of 0,3mg/Kg of body weight (BW) of HgCl_2 and 0,1ml of saline/100g BW. After this period, the group 3m was sacrificed immediately afterwards by decapitation whereas the other groups had remained without treatment until they completed the desired age. The right femurs and vertebrae (L5) were removed for biometrics, physical and biomechanics analysis. The treatment with mercury chloride induced higher values of physical and biometric parameters in the 6m group and lower values in the 12m group and no modifications in the 3 and 9 m groups, when compared with saline treatment. Moreover, the treatment with CM promoted rats vaginal opening with 51 days of life in treated group whereas in the controls this opening occurred in 44,4 days of life. We concluded that the treatment with HgCl_2 , in the dose of 0,3mg/Kg BW retarded the age at the speed change of the growth of the animals, especially in 6m and 12m groups. Moreover, the HgCl_2 promoted bone fragility in animals from 12m group, as can be observed by the analysis of the biometrics, physicals and biomechanics properties, in both femur and vertebrae. The treatment with CM still delayed the sexual maturity of rats.

Key Words: bone tissue, mercury chloride, bone biomechanic, rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Foto ilustrativa da administração de drogas pelo método de gavagem gástrica.	27
Figura 2	Máquina universal Instron (modelo 4444).	30
Figura 3	Curva força deformação esquemática obtida num teste biomecânico, pela qual se obtém os parâmetros biomecânicos que foram utilizados.	31
Figura 4	Evolução ponderal dos animais dos grupos 3m e respectivas curvas de regressão, indicando a idade em que ocorre mudança de inclinação da curva.	34
Figura 5	Evolução ponderal dos animais dos grupos 6m e respectivas curvas de regressão, indicando a idade em que ocorre mudança de inclinação da curva.	34
Figura 6	Evolução ponderal dos animais dos grupos 9m e respectivas curvas de regressão, indicando a idade em que ocorre mudança de inclinação da curva.	35
Figura 7	Evolução ponderal dos animais dos grupos 12m e respectivas curvas de regressão, indicando a idade em que ocorre mudança de inclinação da curva.	35
Figura 8	Evolução dos valores de densidade óssea dos fêmures dos animais dos grupos experimentais.	39
Figura 9	Evolução dos valores de densidade mineral dos fêmures dos animais dos grupos experimentais.	39
Figura 10	Evolução dos valores de percentual de material orgânico dos fêmures dos animais dos grupos experimentais.	40
Figura 11	Evolução dos valores de percentual de material mineral dos fêmures dos animais dos grupos experimentais.	40
Figura 12	Evolução dos valores de força máxima dos fêmures dos animais dos grupos experimentais obtidos com o teste biomecânico.	42
Figura 13	Evolução dos valores de força máxima das vértebras (L5) dos animais dos grupos experimentais, obtida através do teste de compressão.	44

Figura 14	Evolução dos valores de densidade óssea das vértebras (L5) dos animais dos grupos experimentais.	46
Figura 15	Evolução dos valores de densidade mineral das vértebras dos animais dos grupos experimentais.	47
Figura 16	Evolução dos valores de percentual de material orgânico das vértebras dos animais dos grupos experimentais.	47
Figura 17	Evolução dos valores de percentual de material mineral das vértebras dos animais dos grupos experimentais.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comprimento femural e diâmetros maior e menor da diáfise femural dos animais dos diferentes grupos experimentais.	36
Tabela 2	Parâmetros físicos do peso das cinzas, volume ósseo e percentual de água dos fêmures dos animais dos grupos experimentais.	38
Tabela 3	Parâmetros biomecânicos dos fêmures dos animais dos grupos experimentais obtidos com o teste de flexão de pontos.	42
Tabela 4	Altura máxima obtida através de medição com paquímetro e deslocamento máximo obtido no teste de compressão das vértebras (L5) dos animais dos diferentes grupos experimentais.	44
Tabela 5	Parâmetros físicos das vértebras (L5) dos animais dos grupos experimentais.	46
Tabela 6	Dias de vida dos animais quando ocorreu a abertura vaginal.	48

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Descrição Geral do Protocolo Experimental	26
3.1.1 Animais	26
3.1.2 Protocolo de Tratamento	26
3.2 Parâmetros Analisados	28
3.2.1 Propriedades Biométricas	28
3.2.2 Propriedades Físicas	28
3.2.3 Propriedades Biomecânicas	29
3.2.4 Determinação da abertura vaginal das ratas	31
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5. Normas técnicas referentes à elaboração deste trabalho	32
6. RESULTADOS	33
6.1 Parâmetros biométricos do fêmur dos animais dos grupos experimentais	33
6.2 Parâmetros físicos do fêmur dos animais dos grupos experimentais	37
6.3 Parâmetros biomecânicos do fêmur dos animais dos grupos experimentais	41
6.4 Altura e propriedades biomecânicas das vértebras (L5) dos animais dos grupos experimentais	43
6.5 Parâmetros físicos das vértebras (L5) dos animais dos grupos experimentais	45
6.6 Efeitos do mercúrio sobre a abertura vaginal das ratas	48

7. DISCUSSÃO	49
8. CONCLUSÕES	60
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo e seus elementos esqueléticos são muito mais do que apenas uma rede de fixação de músculos, possuindo grande variedade de funções vitais. Sem o esqueleto para resistir, a contração das fibras musculares seria incapaz de, por si só, fazer-nos andar, sentar ou correr. Sem algo para tracioná-los, os músculos simplesmente iriam ser curtos e redondos (MARTINI, 1998). O osso tem como funções primárias:

- a) Suporte – o esqueleto fornece suporte estrutural para todo o corpo. Ossos individualmente ou em grupos dão estrutura e proteção para tecidos moles e órgãos.
- b) Depósito de minerais e lipídeos – o tecido ósseo tem a função de estocar minerais e íons inorgânicos que contribuem para a regulação da osmolaridade dos fluidos corporais. Estes íons e minerais participam de vários processos fisiológicos, inclusive como cofatores enzimáticos. Os sais de cálcio do osso representam uma valiosa reserva mineral que mantém as concentrações normais dos íons cálcio e fosfato nos fluidos corporais, sendo o cálcio o mineral mais abundante no corpo humano. O esqueleto estoca energia ao armazenar lipídeos nas áreas da medula óssea amarela.
- c) Produção de células sangüíneas – as células vermelhas e brancas do sangue, bem como outros elementos sangüíneos são produzidas na medula óssea vermelha que preenche a cavidade interna de muitos ossos.
- d) Proteção – muitos órgãos e tecidos delicados são cercados por elementos esqueléticos. O tórax protege o coração e os pulmões, o crânio engloba o cérebro, as vértebras protegem a medula espinhal e a pélvis embala delicadamente os órgãos dos sistemas reprodutivo e digestivo.
- e) Sistema de alavancas – muitos ossos funcionam como alavancas que podem alterar a magnitude e direção das forças geradas pelos músculos esqueléticos. O sistema de alavancas multiplica a força gerada durante as contrações musculares, transformando-as em movimentos corporais. Os movimentos variam da delicadeza motora da flexão de um dedo a movimentos vigorosos nas alterações do corpo como um todo (MARTINI, 1998).

A matriz orgânica contribui com 30% do peso do osso e tem como principal componente a molécula de colágeno tipo I (95%). A capacidade do osso de resistir a fraturas depende de sua

massa e geometria, e também de suas propriedades intrínsecas (material). O tecido ósseo é considerado como um composto de dois componentes: colágeno e mineral (BURR, 2002). As características ósseas de resistência, dureza e elasticidade são dadas pela associação dos cristais de hidroxiapatita (componente mineral mais importante do osso – 65% do peso do osso) às fibras de colágeno. O osso é forte, um pouco flexível e muito resistente a fraturas (CARANO e FILVAROFF, 2003; DOBLARÉ, GARCIA e GÓMEZ, 2004).

Morfológicamente existem duas formas de osso: o osso trabecular ou esponjoso e o osso cortical ou compacto. O osso trabecular possui 50-95% de porosidade e é encontrado principalmente nos ossos cuboidais, chatos e no final dos ossos longos. Neste osso, os poros são interconectados e preenchidos pela medula (tecido composto por vasos sanguíneos, nervos e vários tipos de células cuja principal função é produzir células sanguíneas) enquanto que a matriz óssea tem a forma achatada e possui suportes chamados de trabéculas que tem espessura de aproximadamente 200 µm e possuem um arranjo variável. O osso cortical apresenta 5-10% de porosidade, diferentes tipos de poros e é encontrado principalmente no eixo, meio dos ossos longos e ao redor do osso trabecular formando um tipo de camada dos ossos chatos. O osso cortical tem funções mecânicas e de proteção e o osso trabecular, funções metabólicas (DOBLARÉ, GARCIA e GÓMEZ, 2004; MARKS e ODGREN, 2002).

O osso pode ser formado ou removido pelas células ósseas. As principais podem ser classificadas de acordo com suas funções:

- ✓ Osteoclastos - participam dos processos de absorção e remodelação do tecido ósseo. São células gigantes e multinucleadas, extensamente ramificadas, derivadas da fusão de monócitos que atravessam os capilares sanguíneos;
- ✓ Osteoblastos – sintetizam a parte orgânica da matriz óssea, composta por colágeno tipo I. Também concentram fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz;
- ✓ Osteócitos – estão localizados em cavidades ou lacunas dentro da matriz óssea. Destas lacunas formam-se canalículos que se dirigem para outras lacunas, tornando assim a difusão de nutrientes possível graças à comunicação entre os osteócitos. Os osteócitos têm um papel fundamental na manutenção da integridade da matriz óssea.

O tecido ósseo pode crescer, modificar sua forma (remodelamento externo ou modelamento), se auto-reparar quando fraturado e pode continuamente se auto-renovar através do

remodelamento interno. Todos esses processos são governados por fatores mecânicos, hormonais e fisiológicos. O crescimento e o modelamento do tecido ósseo ocorrem em grande parte, durante a infância; a consolidação de fraturas ocorre apenas durante um reparo de fratura e o remodelamento interno ocorre durante toda a nossa vida, apresentando um papel fundamental na evolução da microarquitetura óssea e, conseqüentemente, na adaptação das propriedades estruturais e reparo de microdanos. Durante o crescimento, o processo de remodelamento resulta em aumento do osso com maior formação do que absorção e, com a continuidade do crescimento, o volume ósseo permanece estático e a absorção e formação óssea são balanceadas. Tardiamente, mais ou menos por volta dos 50 anos, a absorção excede a formação óssea o que proporciona uma diminuição da massa óssea (DOBLARÉ, GARCIA e GÓMEZ, 2004; LOVERIDGE, 1999). Em resumo, o tecido ósseo em seu estado normal, tem seu pico máximo de desenvolvimento por volta dos 30 anos de idade. Nesse período, a formação óssea prevalece sobre a absorção. Por volta dos 35 a 40 anos há um equilíbrio entre esses dois processos, após esse período a absorção prevalece, levando à diminuição progressiva da massa óssea o que pode ser classificado como osteopenia (MARTINI, 1998). Muitos fatores podem interferir nesse processo de formação do tecido ósseo como por exemplo: má alimentação, sedentarismo, fatores hormonais, sexo, idade, fumo, álcool e fatores ambientais (YONAGA et al, 1985; MARCUS, FIELDMAN e KELSEY, 1996; SCHIRRMACHER et al, 1998; JIN et al, 2002; NGUYEN et al, 2003).

Vale ressaltar que as células ósseas são constantemente renováveis, havendo formação de novos osteócitos pelos osteoblastos e reabsorção óssea pelos osteoclastos no decorrer de toda a vida do indivíduo. O balanço entre as atividades das células é muito importante, porque se a atividade osteoclástica predomina, o osso fica mais frágil; por outro lado, se a atividade osteoblástica predomina, o osso torna-se muito forte e denso (MACKIE, 2003; MARTINI, 1998).

No que diz respeito ao remodelamento ósseo pode-se afirmar que este ocorre na superfície interna da matriz óssea (superfície do osso trabecular e sistema de Harvers no osso cortical). O osso apenas pode ser depositado ou removido pelas células ósseas nestas superfícies. Este processo não é realizado individualmente por cada célula óssea, mas por grupos de células que funcionam como unidades organizadas, denominadas por Frost (1991) de “unidades básicas multicelulares” (BMUs). Elas agem no periósteo, endósteo, superfícies trabeculares e no osso cortical, trocando osso velho por novo. A qualquer momento cerca de 20% da superfície do osso trabecular é remodelada. Cada BMU é geográfica e cronologicamente separada de outro pacote

de remodelamento. Isto sugere que a seqüência dos eventos celulares responsáveis pelo remodelamento é controlada localmente, talvez por fatores autócrinos ou parácrinos (HILL e ORTH, 1998).

O sinal que dá início ao remodelamento ósseo ainda não foi identificado. Segundo Hill e Orth (1998), o estresse mecânico pode alterar a arquitetura óssea. Em relação à seqüência de eventos no ciclo do remodelamento normal do osso, a ordem dos acontecimentos é bem conhecida. De maneira geral, sabe-se que os osteoclastos ativados iniciam o processo de absorção óssea e na seqüência ocorre a ativação dos osteoblastos que formam e reparam o osso (LOVERIDGE, 1999). Sabe-se que o processo de remodelamento é governado por muitos processos, entre eles, os hormonais. Portanto os hormônios calcitrópicos, o hormônio paratireoidiano, a vitamina D e a calcitonina, alteram a taxa de absorção do osso. Além destes, as citocinas também têm sido caracterizadas como moduladores da absorção óssea. Esta ação das citocinas parece ser autócrina e parácrina, isto é são produzidas e agem localmente (MACDONALD e GOWEN, 1993).

Em se tratando da ossificação existem duas formas: a direta (intramembranosa) ou a indireta (endocondral). A ossificação intramembranosa ocorre durante o desenvolvimento embrionário através da transformação direta das células mesenquimais em osteoblastos. Estes sintetizam o osteóide que logo se mineraliza englobando alguns osteoblastos que se transformam em osteócitos. Este tipo de ossificação contribui para o crescimento dos ossos chatos e para o crescimento em espessura dos ossos longos e é restrita aos ossos da caixa cranial, alguns ossos da face e partes da mandíbula e clavícula. A ossificação endocondral é o principal responsável pela formação dos ossos curtos e longos. Tem início sobre uma peça de cartilagem hialina e consiste em dois processos: (1) a cartilagem hialina sofre modificações, havendo hipertrofia dos condrócitos, redução da matriz cartilaginosa a finos tabiques, sua mineralização e a morte dos condrócitos; (2) as cavidades previamente ocupadas pelos condrócitos são invadidas por capilares sanguíneos e células osteogênicas vindas do conjuntivo adjacente. Estas células diferenciam-se em osteoblastos, que depositarão matriz óssea sobre os tabiques de cartilagem calcificada. Desse modo, há formação de tecido ósseo onde antes havia tecido cartilaginoso sem que ocorra a transformação deste tecido naquele; os tabiques de matriz calcificada da cartilagem servem apenas de ponto de apoio à ossificação (MARKS e ODGREN, 2002).

Quanto ao comportamento mecânico do tecido ósseo pode-se afirmar que pequenas mudanças do balanço entre a formação e absorção ósseas, em ciclos repetidos, levarão a significativas reduções da massa e força ósseas, podendo resultar em fraturas. Além disso, as propriedades mecânicas do osso variam significativamente com sua localização anatômica devido à heterogeneidade da composição e estrutura do material (MULLINS, BRUZZI e MCHUGH, 2007).

O comportamento mecânico do osso pode ser estudado em dois níveis: material e estrutural. As propriedades do tecido ósseo são avaliadas através de testes mecânicos com amostras uniformes desse tecido. Segundo, examinando o comportamento mecânico dos ossos, os parâmetros estruturais podem ser determinados. Esses parâmetros são: força máxima, resiliência, tenacidade e rigidez. Sendo a força máxima, a maior carga suportada pelo osso antes da fratura; resiliência a quantidade de energia absorvida pelo osso durante a fase elástica, sendo que a deformação sofrida pelo osso até esse ponto não é permanente; tenacidade, quantidade de energia absorvida pelo osso durante a fase elástica e plástica, sofrendo deformações permanentes e; rigidez, quantidade de força ou energia que o osso pode suportar sem sofrer deformações definitivas (CULLINANE e EINHORN, 2002).

A deposição e a absorção ósseas contínuas desempenham algumas funções fisiológicas importantes. Em primeiro lugar, o osso adapta habitualmente sua força ao grau do estresse ósseo. Por conseguinte, os ossos sofrem espessamento quando submetidos a cargas pesadas. Em segundo lugar, mesmo a forma do osso pode ser reorganizada para a sustentação adequada das forças mecânicas, pela deposição e absorção ósseas, de acordo com o tipo do estresse. Em terceiro lugar, como o osso velho torna-se relativamente fraco e quebradiço, é necessário a formação de nova matriz orgânica à medida que a matriz antiga sofre degeneração. Dessa maneira, é mantida a rigidez normal do osso. Com efeito, os ossos de crianças, em que a velocidade de deposição e de absorção são rápidas, são pouco quebradiços em comparação com os ossos do indivíduo idoso, quando a velocidade de deposição e de absorção ficam lentas (CARANO e FILVAROFF, 2003; MULLINS, BRUZZI e MCHUGH, 2007).

Em estado normal, o tecido ósseo tem seu pico máximo de desenvolvimento até os 30 anos de idade. Nesse período, a formação óssea prevalece sobre a reabsorção. Por volta dos 35 a 40 anos há um equilíbrio entre esses dois processos, após esse período a reabsorção prevalece,

levando à diminuição progressiva da massa óssea o que pode ser classificado como osteopenia (MARTINI, 1998; BOGLIOLO, 1993).

Com o avanço da idade, portanto, os ossos tornam-se finos e relativamente quebradiços. Mulheres perdem em média 8% de sua massa óssea por década enquanto os homens perdem 3% (MARTINI, 1998; BALAGUER e OLMOS, 2005).

O climatério promove variadas alterações nos diversos sistemas da mulher, incluindo o tecido ósseo. Estas alterações no sistema ósseo, decorrentes principalmente da queda da produção hormonal e de componente genético, levam à perda de massa óssea em ritmo variável podendo culminar na osteoporose (JUNQUEIRA et al, 2001).

Além das alterações mencionadas outros fatores, tais como má alimentação, sedentarismo e fatores ambientais, aceleram a perda de massa óssea e, portanto, a antecipação de problemas neste tecido.

Cloreto de Mercúrio

Uma das grandes preocupações do campo da Saúde Pública está relacionada a fatores ambientais. Entre eles, a poluição química de natureza orgânica ou inorgânica, desencadeada através dos despejos residenciais e industriais. Poluição pode ser definida como qualquer alteração física, química ou biológica que interfira no ciclo biológico normal e, portanto, na composição da fauna e da flora. A poluição aquática, uma das mais preocupantes, interfere nesse meio em todas as suas características, impossibilitando o consumo humano (AGUIAR e NOVAES, 2002). Alguns metais pesados são substâncias altamente tóxicas e por isso não compatíveis com a maioria dos tratamentos aquáticos. As principais fontes de poluição por metais pesados são provenientes dos efluentes industriais, de mineração e das lavouras. Desta maneira, o perigo está no solo, na água e no ar (ATKINSON et al, 2001).

Um composto de metal pesado que possui grande influência nesse tipo de contaminação ambiental é o cloreto de mercúrio (CM - HgCl_2), o qual tem sido usado na agricultura como fungicida, na medicina como anti-séptico tópico e desinfetante e na química como um intermediário na produção de outros compostos de mercúrio (ALDEN et al, 1993).

O mercúrio apresenta-se de três formas químicas: 1) mercúrio elemento, vapor ou líquido, 2) mercúrio inorgânico, sais ou minerais e 3) mercúrio orgânico. Todas as formas de mercúrio

são interconvertidas no meio em que está agindo, e o contato com todos os seus tipos pode produzir intoxicação sistêmica (GRAEME e POLLACK, 1998). Dentre os tipos de mercúrio inorgânico, destaca-se o CM, um agente industrial com efeitos tóxicos sobre o sistema imune, rins, pulmões, sistema nervoso e trato gastrointestinal (JIN et al, 2002; GRAEME e POLLACK, 1998).

As principais fontes de exposição ao mercúrio na forma de vapor são decorrentes do manufaturamento e reparo de termômetros, barômetros, relógios, transformadores, baterias, lâmpadas fluorescentes, e preparação e instalação do amálgama dentário, bem como na extração da prata e do ouro entre outros. A exposição ao mercúrio inorgânico ou orgânico também pode estar associada à sua síntese ou uso destes na síntese de outros compostos. Compostos orgânicos e inorgânicos são usados como pesticidas e embora o uso mercurial tenha declinado na medicina, muitos compostos são usados como desinfetantes e derivados de metoxipropilmercúrio como diurético na farmacologia de diversos países. Fenilmercúrio é usado como contraceptivo vaginal em algumas regiões e o mercúrio amoniado é o ingrediente ativo de cremes para clareamento de pele (MAGOS, 1997).

Segundo Magos (1997), a emissão diária de vapor de mercúrio de uma superfície de amálgama é de 0,73 μg , o qual é igualmente inalado, aspirado ou ingerido. A inalação do vapor de mercúrio é extremamente perigosa. Ele é quase totalmente absorvido e 75% é retido em órgãos como rins e fígado (GRAEME e POLLACK, 1998). A absorção do mercúrio pode ocorrer através dos pulmões, derme e do trato gastrointestinal (MAGOS, 1997). O fato de ser muito solúvel em água e bem absorvido no trato gastrointestinal facilita a expressão de suas características tóxicas (GRAEME e POLLACK, 1998). Quando absorvidos pelo ser humano, o cloreto de mercúrio se acumula nos tecidos biológicos e pode interferir em vários processos biológicos, incluindo respostas imunológicas como a alteração da função das células T, evidenciadas pelas diminuições das células T mitogênicas e pelos leucócitos (BRUNET et al, 1993; DIETER et al, 1983).

Em 1956, registrou-se que trabalhadores de fábricas do Japão apresentaram danos cerebrais devido a um derramamento de cloreto de metil mercúrio na baía de Minamata. Este derramamento causou contaminação em peixes e, conseqüentemente, em um grande número de pessoas. Mais tarde, neste mesmo ano, o metil mercúrio foi identificado como o agente causador destes danos no cérebro. Outras contaminações ocorreram nos anos subseqüentes através dos

compostos de mercúrio em diversos países (GRAEME e POLLACK, 1998). Atualmente no Brasil, o mercúrio continua muito empregado nas áreas de garimpo, onde é usado para separar o ouro das impurezas, pois este forma um amálgama com o ouro. Depois da mistura ser aquecida, o mercúrio evapora-se, restando somente o ouro. O amálgama residual é lançado ao rio e o mercúrio incorpora-se à cadeia alimentar, envenenando os rios e, conseqüentemente, os homens (VASSALLO et al, 1996). De acordo com Nriagu, Souza e Mierle (1992), mais de 650.000 pessoas estão envolvidas com o garimpo na Amazônia, resultando em uma descarga anual de 90 a 120 toneladas de mercúrio para o ecossistema local.

Muitos estudos relatam que a toxicidade do mercúrio gera radical de oxigênio e que este tem uma alta afinidade por grupos sulfídricos (SH) de biomoléculas, depletando assim tiols intracelulares e reduzindo a glutatona. Embora o mecanismo exato da geração de radicais livres não seja completamente entendido, postula-se que a depleção do antioxidante glutatona pelo mercúrio pode ser a causa da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que induzem oxidação lipídica, protéica e de DNA (GRAEME e POLLACK, 1998).

Estudos mostram os efeitos da contaminação por mercúrio sobre a reprodução de humanos e animais. Uma alta taxa de abortos espontâneos foram reportados em casais associados a aumento da concentração de mercúrio na urina de pais expostos ao mercúrio metálico antes da gravidez (CORDIE, DEPLAN e MANDEREAU, 1991; SIKORSHI, JUSZKIEWICZ, PASZKOWSKI, 1987). Similarmente, quando mulheres foram expostas ocupacionalmente ao mercúrio metálico tiveram mais abortos espontâneos, nascimentos de crianças mortas, má formação congênita e formação irregular, dor ou hemorragia menstrual do que mulheres que não foram expostas a este tipo de metal (SIKORSHI, JUSZKIEWICZ, PASZKOWSKI, 1987).

Em animais expostos ao mercúrio metálico houve prolongamento do ciclo estral (KHAN et al, 2004) e Atkinson et al (2001) mostraram que a exposição ao CM resultou em efeitos adversos sobre a prole, especialmente nos animais da primeira geração e, os efeitos da contaminação aos animais da segunda geração foram moderados tanto nos machos quanto nas fêmeas. Da mesma forma, Khan et al, (2004) observaram que ratos expostos a diferentes doses de CM tiveram o índice de fertilidade significativamente reduzido quando comparados ao grupo controle.

Estudos como os de Shimarrcher et al (2008), Dieter et al (1983), Jin et al (2002) entre outros, indicam que o tecido ósseo pode sofrer alterações da sua estrutura e composição quando em contato com o cloreto de mercúrio. Entre essas alterações podemos citar as mudanças dos

níveis (do teor de cálcio) de cálcio. Toimela, Salminen e Tähti (1998), também afirmam que o mercúrio muda os níveis (altera o conteúdo de cálcio de cálcio, o que pode levar a várias conseqüências celulares, como por exemplo, diminuição da densidade óssea. Este efeito pôde ser observado no estudo de Jin et al (2002), onde a aplicação do anticorpo anti-metalotioneína juntamente com cloreto de mercúrio em ratos, apresentou significativa redução da densidade mineral óssea.

Desta forma, buscando observar, confirmar e comparar os efeitos do cloreto de mercúrio sobre o tecido ósseo e sobre a maturidade sexual de ratas Wistar, justificamos este estudo.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Avaliar no animal adulto, possíveis alterações ósseas em ratas contaminadas com HgCl_2 durante o período de desenvolvimento.

2.2 Específicos:

- Observar o comportamento da curva ponderal dos animais controle e tratados com cloreto de mercúrio;
- Verificar os efeitos da contaminação do cloreto de mercúrio sobre o desenvolvimento do tecido ósseo de ratas, através das análises das propriedades biométricas, físicas e biomecânicas de fêmures e vértebras de ratas;
- Observar os efeitos da contaminação do cloreto de mercúrio sobre a maturidade sexual das ratas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Descrição Geral do Protocolo Experimental

Este protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (protocolo 014/2007).

3.1.1 Animais

Foram utilizadas 77 ratas da Linhagem “Wistar” com 30 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UFSCar. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas em sala sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e luz (10 horas claro e 14 horas escuro), com livre acesso à água e ração comercial. O peso corporal (PC) das ratas foi coletado a cada 3 dias durante o período da contaminação e após este período, 1 vez por semana.

Ao final do experimento, os animais foram sacrificados por decapitação em guilhotina e seus fêmures e vértebras foram coletados e congelados para análise posterior.

3.1.2 Protocolo de Tratamento

O tratamento com HgCl_2 e salina iniciou-se aos 30 dias de vida do animal, 5 vezes por semana, durante 60 dias. Para tal procedimento, foi utilizado o método de gavagem gástrica, onde uma sonda é introduzida até o estômago do animal e a substância desejada administrada (figura 1).



Figura 1 – Foto ilustrativa da administração de drogas pelo método de gavagem gástrica.

Nos grupos tratados com HgCl_2 , a dose diária foi de 0,3mg/Kg de peso corporal e nos grupos controles, a dose de salina foi de 0,1ml de salina/100g de PC. A dose de HgCl_2 foi escolhida por não alterar a curva ponderal bem como a não ocorrência de mortalidade, de acordo com o National Toxicology Program Working Group (NTP, 1993).

Grupos Experimentais

Para a realização deste estudo, as 77 ratas foram divididas em 2 grupos: Controle e Tratado (HgCl_2). O tratamento seguiu a seguinte estrutura:

30 dias + 2 meses de tratamento → sacrifício (grupo 3 meses) (n=15);

30 dias + 2 meses de tratamento + 3 meses → sacrifício (grupo 6 meses) (n=18);

30 dias + 2 meses de tratamento + 6 meses → sacrifício (grupo 9 meses) (n=22);

30 dias + 2 meses de tratamento + 9 meses → sacrifício (grupo 12 meses) (n=22);

Os grupos controles, que receberam salina, seguiram a mesma estrutura do seu respectivo grupo.

3.2 Parâmetros Analisados

3.2.1 Propriedades Biométricas

Inicialmente foram feitas as mensurações de comprimento, diâmetros maior e menor da diáfise dos fêmures direitos dos animais estudados. Nas vértebras (L5) foram feitas medidas da altura máxima. Para isso, foi utilizado um paquímetro.

3.2.2 Propriedades Físicas

Após as mensurações de comprimento, diâmetros e altura, os ossos foram mantidos em água destilada e colocados em um dessecador durante 24 horas com a finalidade de retirar o ar dos poros ósseos. Em seguida foram feitos os pesos imersos (P_i) e úmidos (P_u), para determinar o volume ósseo segundo o princípio de Arquimedes.

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

Os ossos foram colocados em uma estufa a 100° C durante 24 horas. Em seguida, foi realizado o peso seco (P_s) e colocados em uma mufla a 800°C durante 24 horas para obtenção do peso das cinzas (P_m).

As propriedades físicas de densidade óssea, densidade mineral, percentual ósseo de água e de material orgânico e mineral também foram determinadas através das seguintes fórmulas:

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

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

$$\text{Percentual Ósseo de Água} = \frac{100x(P_u - P_s)}{P_u}$$

$$\text{Percentual Material Orgânico} = \frac{100x(P_s - P_m)}{P_u}$$

$$\text{Percentual Material Mineral} = \frac{100xP_m}{P_u}$$

Onde:

P_u = peso úmido ósseo

P_s = peso ósseo da amostra desidratada

P_i = peso imerso ósseo

P_m = peso do material mineral (cinzas)

ρ = densidade da água

As mensurações foram realizadas utilizando uma balança eletrônica (marca Chyo).

3.2.3 Propriedades Biomecânicas

Os ensaios biomecânicos de flexão a três pontos do fêmur direito e o teste de compressão de vértebras, foram realizados em uma máquina universal Instron, modelo 4444 (figura 2), após as amostras serem descongeladas à temperatura ambiente. O teste de flexão a três pontos foi realizado com os fêmures onde as extremidades destes ossos ficaram apoiadas em dois roletes com diâmetro de 3 mm, distanciados em 21,70 mm e a carga aplicada na região central de cada osso (ROBLING, CASTILLO e TURNER, 2006; SHIMANO, SHIMANO e VOLPON, 2002; AKHTER, 2003 et al., AKHTER et al, 2004). A célula de carga foi de 1KN. No início do teste foi aplicada uma pré-carga de 10N 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. 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 do osso.

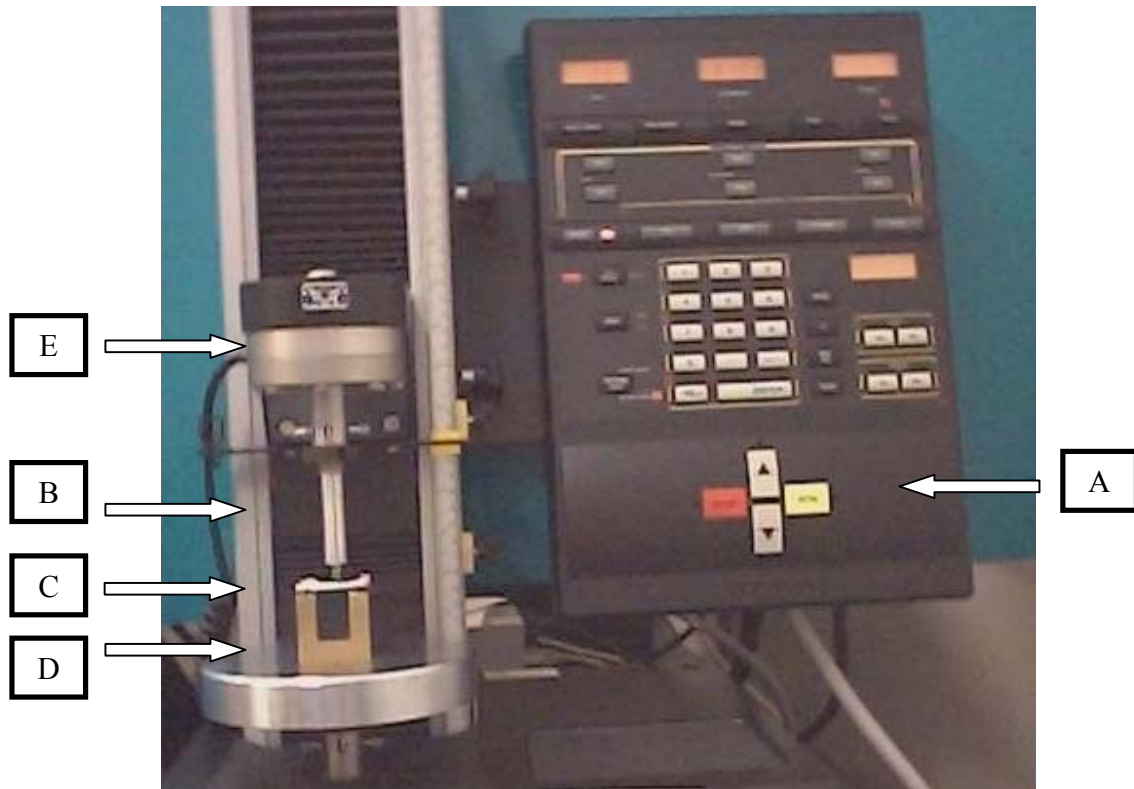


Figura 2: Máquina universal Instron (modelo 4444). Utilizada para o ensaio de flexão a três pontos em fêmur de rato, bem como para o teste de compressão de vértebras. A: painel de controle; B: haste cilíndrica para a aplicação de carga (força); C: osso; D: suporte; E: célula de carga ligada à ponte de extensimetria.

Para realização do teste de compressão das vértebras, a vértebra L5 foi separada das demais. Os processos espinhosos, os processos transversos e o arco vertebral foram retirados. As extremidades dos corpos das vértebras foram levemente lixadas na intenção de obter uma superfície plana na qual o osso pudesse ficar apoiado. A força foi aplicada no sentido crânio-caudal a uma velocidade constante de 2mm/mim até a compressão de 2/3 da altura da vértebra.

Os valores obtidos das cargas aplicadas e das deformações foram registrados pelo software Instron Series IX e a partir destes foram confeccionados os gráficos carga vs deformação onde foram obtidas as principais propriedades biomecânicas dos ossos (figura 3).

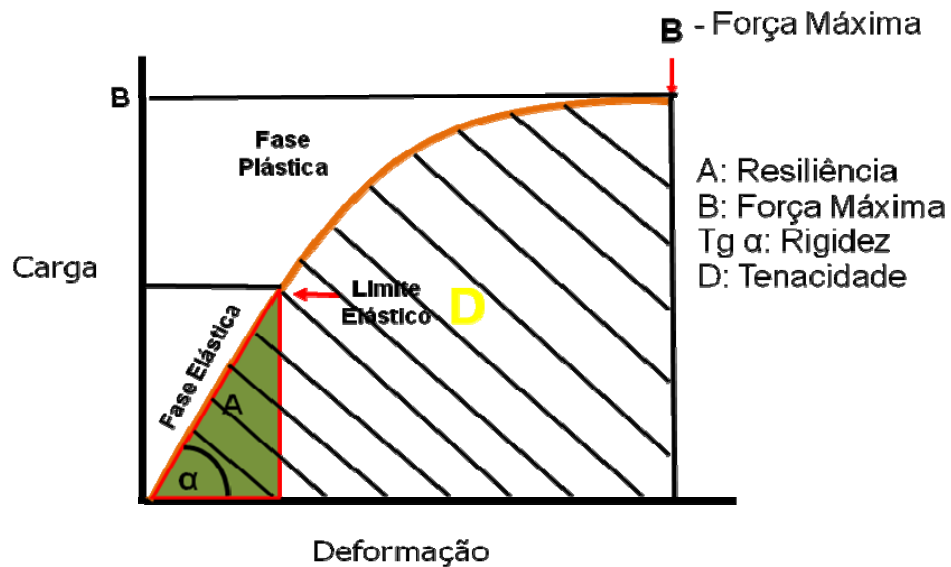


Figura 3 – Curva força deformação esquemática obtida num teste biomecânico, pela qual se obtém os parâmetros biomecânicos que foram utilizados.

3.2.4 Determinação da abertura vaginal das ratas

As ratas foram observadas durante a fase pré-puberal, para verificação da ocorrência da abertura vaginal. Todos os dias, no mesmo horário, observava-se a ocorrência ou não da abertura vaginal. Em caso de abertura, anotávamos o dia em que ocorrera. A partir do momento em que a rata perde a membrana que recobre a vagina, verifica-se que este animal está em fase de maturidade sexual.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos resultados dos diferentes parâmetros entre os grupos 3m, 6m, 9m e 12m (MÉDIA \pm EPM), foi realizada utilizando o teste Kruskal-Wallis e nos casos significativos utilizou-se o teste de Dunn para discriminar a diferença. Para a comparação entre mercúrio e salina foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, conforme adequação ao software INSTAT. O coeficiente de variação foi $p < 0,05$.

5. Normas técnicas referentes à elaboração deste trabalho

As referências e citações, bem como a estrutura geral deste trabalho seguem as normas da Universidade Federal de São Carlos/UFSCar versão on-line, acesso em novembro de 2008.

6. RESULTADOS

6.1 Parâmetros biométricos do fêmur dos animais dos grupos experimentais

A evolução ponderal dos animais dos grupos 3m, 6m, 9m e 12m pode ser observada nas figuras 4, 5, 6 e 7. Observa-se que em todos os grupos não houve diferença de PC inicial nem final dos animais. Este dado é importante, pois verifica-se que os grupos experimentais tiveram a mesma condição inicial e que os animais ganharam peso de maneira semelhante durante todo o experimento. Além disso, as figuras 4 a 7 mostram em que semana os animais passaram a ganhar peso em velocidade diferente, ou seja, entre a 7^a e a 11^a semana a curva ponderal muda de inclinação. Através dessas análises observamos que os grupos 3m alteram a velocidade de crescimento em idades semelhantes (7,94 e 6,90 semanas). O grupo 6m e 12m tratados com mercúrio apresentam alteração da velocidade de crescimento mais tardiamente (9,14 e 10,78 semanas, respectivamente) em relação a seus controles (7,31 e 9,75 semanas, respectivamente). Os grupos 9m não apresentaram diferenças na idade de mudança de velocidade de crescimento (9,74 e 9,77 semanas).

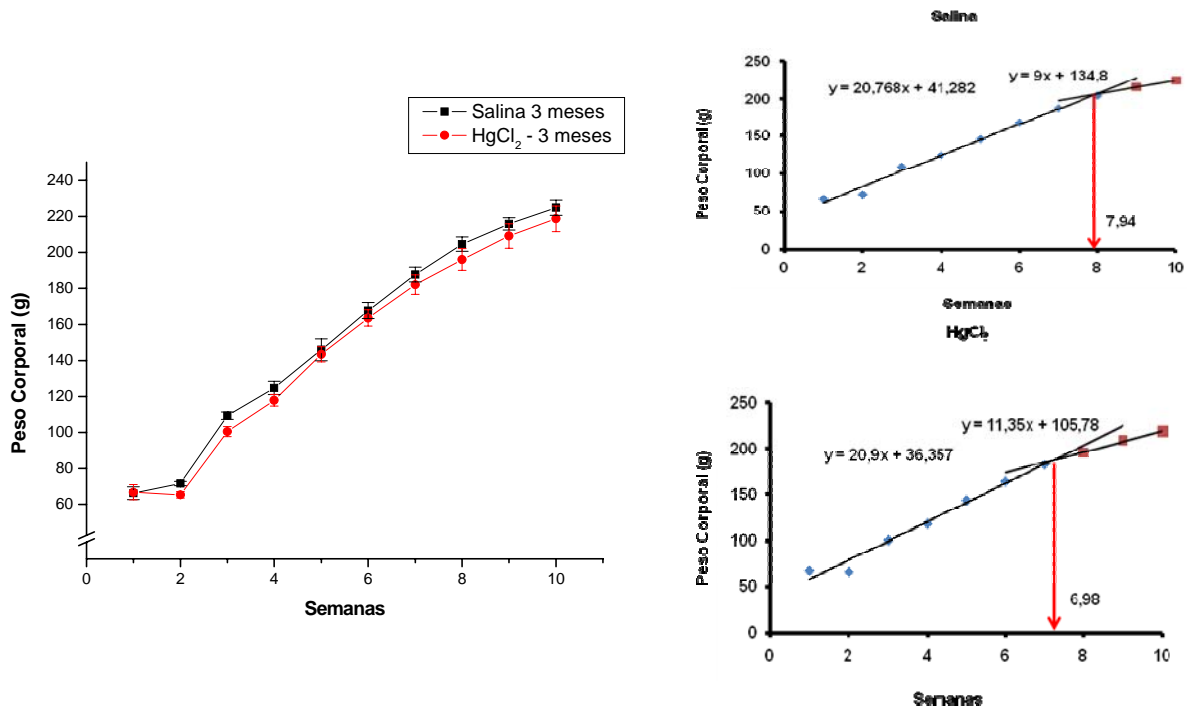


Figura 4 - Evolução ponderal dos animais dos grupos 3m e respectivas curvas de regressão, indicando a idade em que ocorre mudança de inclinação da curva.

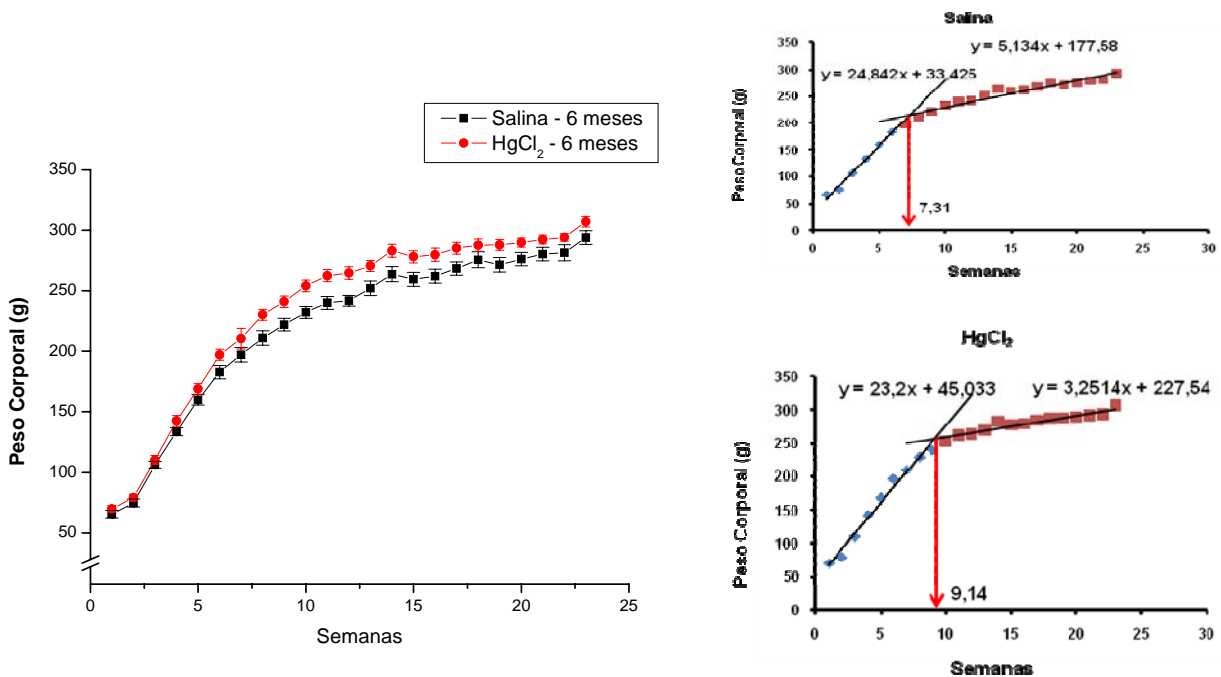


Figura 5 - Evolução ponderal dos animais dos grupos 6m e respectivas curvas de regressão, indicando a idade em que ocorre mudança de inclinação da curva.

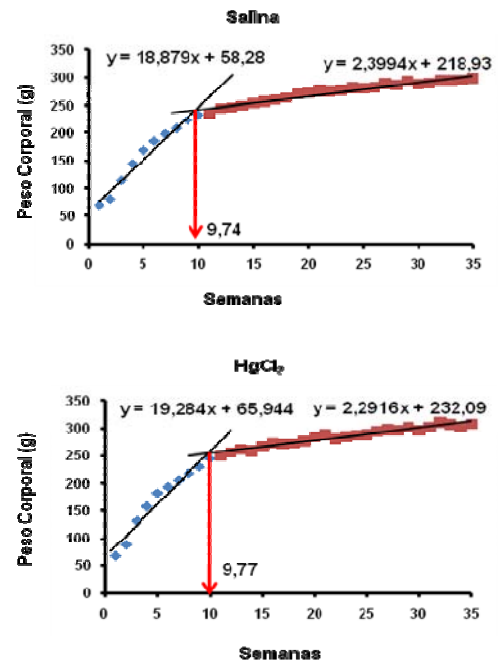
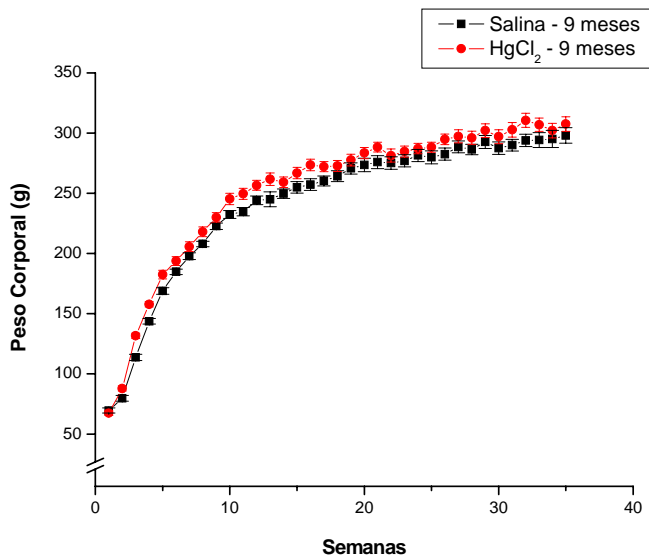


Figura 6 - Evolução ponderal dos animais dos grupos 9m e respectivas curvas de regressão, indicando a idade em que ocorre mudança de inclinação da curva.

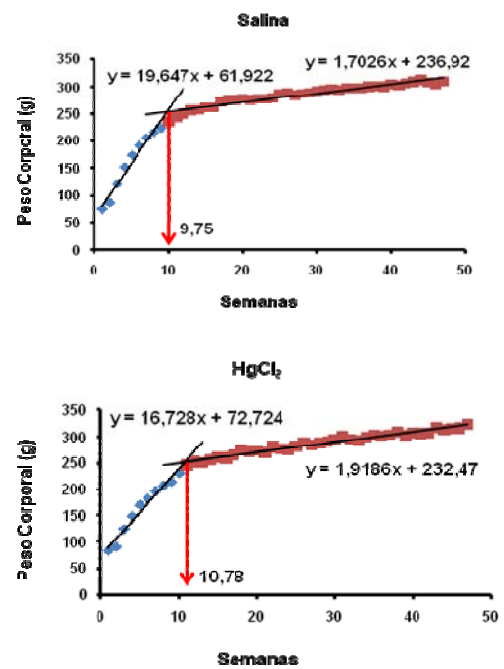
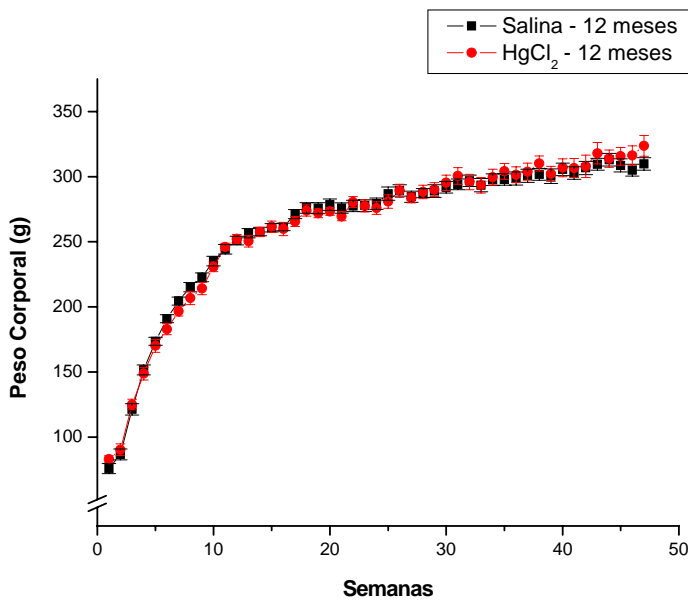


Figura 7 - Evolução ponderal dos animais dos grupos 12m e respectivas curvas de regressão, indicando a idade em que ocorre mudança de inclinação da curva.

O comprimento do fêmur e diâmetros maior e menor da diáfise femural dos animais dos grupos experimentais estão expressos na tabela 1. Entre os grupos com mesma idade, observa-se que apenas o grupo 12m apresenta diferenças nesses parâmetros em relação ao seu controle, já que houve redução dos valores de comprimento e diâmetro maior, no entanto o diâmetro menor não apresentou diferença. Observa-se, entre os grupos salina a evolução do comprimento dos fêmures uma vez que os grupos 9m e 12m foram significativamente maiores que o grupo 3m. Da mesma forma, no grupo mercúrio, percebe-se o aumento do comprimento dos seus fêmures já que o mercúrio 6m, 9m e 12m são significativamente maiores que o 3m. Em relação aos diâmetros maior e menor, observamos o mesmo comportamento tanto no grupo salina quanto no grupo mercúrio, ou seja, o aumento dos diâmetros maior e menor à medida que os animais vão crescendo.

Tabela 1 – Comprimento femural e diâmetros maior e menor da diáfise femural dos animais dos diferentes grupos experimentais. Valores expressos em média \pm EPM.

Comprimento	3m	6m	9m	12m
(mm)				
Salina	32,6 \pm 0,2	35,7 \pm 0,2	36,8 \pm 0,3 ^a	37,0 \pm 0,2 ^a
Mercúrio	32,3 \pm 0,4	36,2 \pm 0,2 ^a	36,1 \pm 0,2 ^a	35,6 \pm 0,2 ^{a,d}
Ø > (mm)				
Salina	3,6 \pm 0,07	4,1 \pm 0,06 ^a	3,9 \pm 0,07	4,1 \pm 0,04 ^a
Mercúrio	3,5 \pm 0,04	4,1 \pm 0,05 ^a	4,0 \pm 0,07 ^a	3,9 \pm 0,07 ^{a,d}
Ø < (mm)				
Salina	2,6 \pm 0,04	2,9 \pm 0,07	3,0 \pm 0,05 ^a	3,1 \pm 0,03 ^a
Mercúrio	2,7 \pm 0,06	3,1 \pm 0,03 ^a	3,1 \pm 0,03 ^a	3,0 \pm 0,05 ^a

p<0,05 para: a- em relação ao grupo 3m; b- em relação ao grupo 6m, c- em relação ao grupo 9m e d- em relação ao grupo salina.

6.2 Parâmetros físicos do fêmur dos animais dos grupos experimentais

A tabela 2 e os gráficos apresentados nas figuras 8-11 apresentam os valores dos parâmetros físicos dos fêmures dos animais de todos os grupos experimentais. Entre os grupos de idades iguais, observamos que no grupo 3m o percentual de material orgânico foi maior no grupo tratado com CM em relação ao seu controle (figura 10). Não houve diferença entre os demais parâmetros deste grupo. O grupo 6m apresentou maior peso das cinzas (tabela 2), da densidade óssea, da densidade mineral, e do percentual de material mineral dos fêmures dos animais tratados com CM (figuras 8, 9 e 11) em relação ao grupo salina. O grupo 9m tratado com mercúrio apresenta menores valores de percentual de material orgânico em relação ao seu controle (figura 10). Os demais parâmetros não apresentam diferenças. O grupo 12m demonstra menores valores de peso das cinzas e do volume ósseo dos animais tratados comparados ao seu controle (tabela 2). Os demais parâmetros não foram diferentes neste grupo. Analisando o peso das cinzas entre apenas os grupos salina 3m e 6m observamos que o grupo salina 6m é possui maior peso das cinzas comparado ao grupo salina 3m, no entanto ao compararmos todos os grupos, essa diferença desaparece.

Observamos que durante o período experimental houve evolução dos valores dos parâmetros físicos tanto no grupo salina quanto no tratado com mercúrio, com aumento do percentual de material mineral e material orgânico e consequentemente diminuição do percentual de água. Especificamente, observa-se que o peso das cinzas no grupo salina 3m, é significativamente menor que nos grupos 9m e 12m, da mesma forma, o grupo 6m é menor que o grupo 12m. Por outro lado, entre o grupo mercúrio, o grupo 3m é significativamente menor que os grupos 6m, 9m e 12m. O volume ósseo também apresenta o mesmo comportamento, ou seja, no grupo salina o volume ósseo do grupo 3m é menor apenas que os grupos 9m e 12m e no grupo mercúrio, o volume ósseo do grupo 3m é menor que os demais grupos. Como esperado, o percentual de água dos fêmures diminuiu à medida que os animais cresceram. No grupo salina este parâmetro foi significativamente maior no grupo 3m que nos grupos 9m e 12m. Igualmente, no grupo mercúrio o fêmur dos animais do grupo 3m também apresentou maiores percentuais de água que os demais grupos (tabela 2).

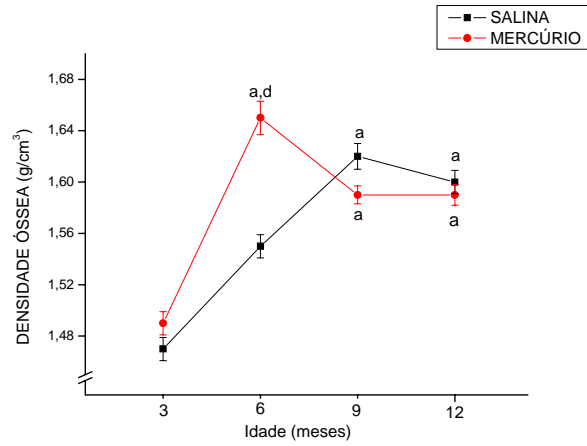
Notamos que a densidade óssea (figura 8) e a densidade mineral (figura 9), apresentam o mesmo comportamento, ou seja, o grupo salina 3m foi menor que os grupos 9m e 12m e no grupo

mercúrio o grupo 3m foi menor que os demais grupos. O percentual de material orgânico dos animais dos grupos experimentais mostra, na figura 10, que o grupo salina 3m é menor que os grupos 9m e 12m e que no grupo mercúrio não houve diferença, apesar da tendência. Em se tratando do percentual de material mineral (figura 11), observa-se que o grupo salina 3m mantém o padrão de ser menor que os grupos 9m e 12m e de ser menor que todos os demais grupos no grupo mercúrio.

Tabela 2 - Parâmetros físicos do peso das cinzas, volume ósseo e percentual de água dos fêmures dos animais dos grupos experimentais. Valores expressos em média \pm EPM.

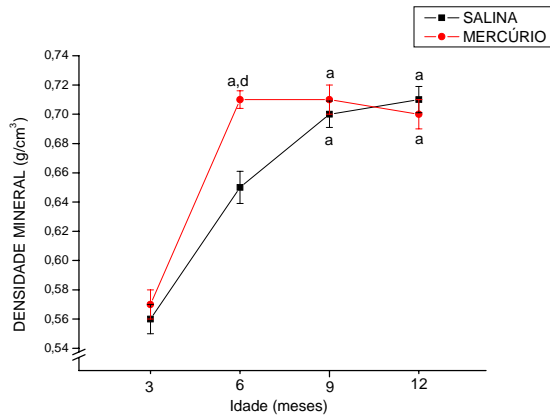
Peso das Cinzas (g)	3m	6m	9m	12m
Salina	0,248 \pm 0,006	0,337 \pm 0,007*	0,377 \pm 0,007 ^a	0,402 \pm 0,008 ^{a,b}
Mercúrio	0,240 \pm 0,007	0,381 \pm 0,007 ^{a,d,*}	0,382 \pm 0,009 ^a	0,371 \pm 0,009 ^{a,d}
Volume Ósseo				
(cm³)				
Salina	0,44 \pm 0,011	0,51 \pm 0,009	0,49 \pm 0,04 ^a	0,56 \pm 0,009 ^a
Mercúrio	0,41 \pm 0,012	0,53 \pm 0,009 ^a	0,53 \pm 0,008 ^a	0,52 \pm 0,009 ^{a,d}
% Água				
Salina	43,2 \pm 0,7	38,2 \pm 0,66	35,9 \pm 0,39 ^a	34,8 \pm 0,51 ^{a,b}
Mercúrio	42,02 \pm 0,7	36,4 \pm 0,22 ^a	35,6 \pm 0,69 ^a	35,8 \pm 0,46 ^a

p<0,05 para: a- em relação ao grupo 3m; b- em relação ao grupo 6m, c- em relação ao grupo 9m, d - em relação ao grupo salina e * iguais para teste Mann-Whitney.



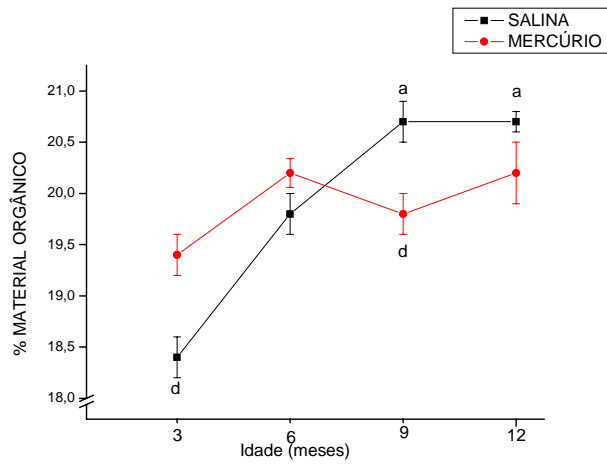
$p < 0,05$ para: a - em relação ao grupo 3m; b - em relação ao grupo 6m, c - em relação ao grupo 9m, d - em relação ao grupo salina

Figura 8 - Evolução dos valores de densidade óssea dos fêmures dos animais dos grupos experimentais.



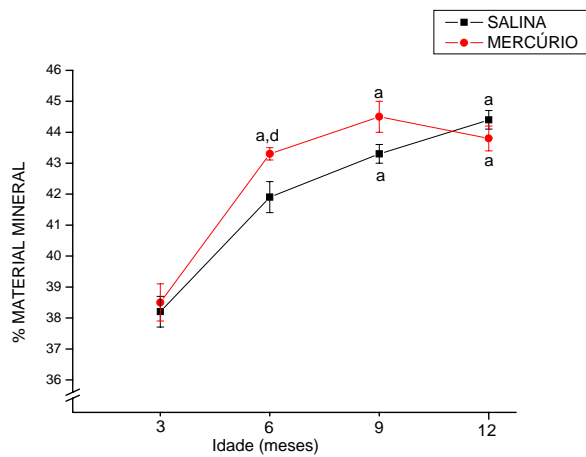
$p < 0,05$ para: a - em relação ao grupo 3m; b - em relação ao grupo 6m, c - em relação ao grupo 9m, d - em relação ao grupo salina

Figura 9 - Evolução dos valores de densidade mineral dos fêmures dos animais dos grupos experimentais.



$p < 0,05$ para: a - em relação ao grupo 3m; b - em relação ao grupo 6m, c - em relação ao grupo 9m, d - em relação ao grupo salina

Figura 10 - Evolução dos valores de percentual de material orgânico dos fêmures dos animais dos grupos experimentais.



$p < 0,05$ para: a - em relação ao grupo 3m; b - em relação ao grupo 6m, c - em relação ao grupo 9m, d - em relação ao grupo salina

Figura 11 - Evolução dos valores de percentual de material mineral dos fêmures dos animais dos grupos experimentais.

6.3 Parâmetros biomecânicos do fêmur dos animais dos grupos experimentais

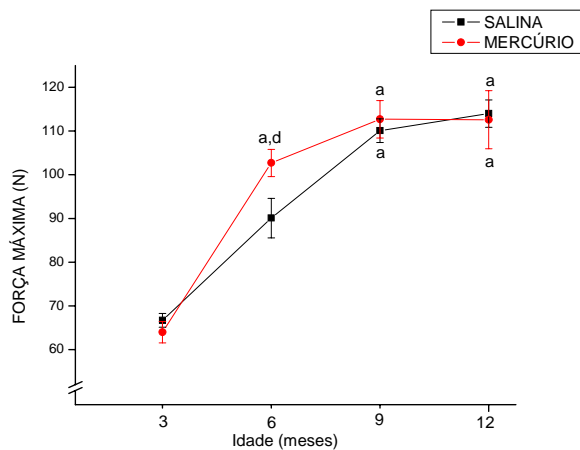
Os valores das propriedades biomecânicas do fêmur dos animais obtidas através do teste de flexão a três pontos estão expressos na tabela 3 e figura 12. Em relação aos grupos de mesma idade, verifica-se que, no grupo 3m, o tratamento com cloreto de mercúrio não interferiu sobre as propriedades biomecânicas, visto que não houve diferença em nenhum dos parâmetros desse grupo. No grupo 6m os valores de força máxima dos animais tratados com CM foram maiores comparados aos seus controles. Os demais parâmetros biomecânicos não apresentam diferenças. O grupo 9m não apresenta diferença em nenhum dos parâmetros biomecânicos. Já o grupo 12m apresenta menores valores de resiliência e tenacidade dos animais tratados com CM em relação aos controles.

Observando o comportamento desses parâmetros de forma evolutiva, vemos que houve aumento dos valores dos parâmetros biomecânicos à medida que os animais cresceram. Podemos perceber que não houve alteração do deslocamento máximo, nem entre o grupo salina, nem entre o grupo mercúrio de todos os grupos experimentais. No entanto, o grupo salina 3m tem menor resiliência que os grupos salina 9m e 12m e o grupo salina 6m também apresenta menor resiliência que o grupo salina 12m. Entre os grupos mercúrio, o grupo 3m tem menor resiliência apenas que o grupo 9m. Quanto à tenacidade, na análise de evolução não houve diferença entre os grupos salina e nem entre os grupos mercúrio. Por outro lado, a rigidez e a força máxima apresentam o mesmo padrão de comportamento da resiliência, onde entre os grupos salina, o grupo 3m é menor que os grupos 9m e 12m e entre os grupos mercúrio, o grupo 3m foi é menor que os grupos 6m, 9m e 12m. Se fizermos o teste entre apenas os grupos 3m e 6m, observaremos que existe significância entre os mesmos, o que não acontece quando analisamos com todos os demais grupos.

Tabela 3 – Parâmetros biomecânicos dos fêmures dos animais dos grupos experimentais obtidos com o teste de flexão de pontos. Valores expressos em média \pm EPM.

Desl Máx (cm)	3m	6m	9m	12m
Salina	0,80 \pm 0,04	0,64 \pm 0,03	0,83 \pm 0,14	0,64 \pm 0,05
Mercúrio	0,76 \pm 0,03	0,65 \pm 0,01	0,67 \pm 0,01	0,75 \pm 0,14
Resiliência (J)				
Salina	20.10 ⁻³ \pm 4.10 ⁻³	30.10 ⁻³ \pm 4.10 ⁻³	45.10 ⁻³ \pm 2.10 ^{-3a}	48.10 ⁻³ \pm 2.10 ^{-3 a,b}
Mercúrio	20.10 ⁻³ \pm 3.10 ⁻³	30.10 ⁻³ \pm 2.10 ⁻³	45.10 ⁻³ \pm 2.10 ^{-3a}	39.10 ⁻³ \pm 1.10 ^{-3 d}
Tenacidade (Mpa)				
Salina	87.10 ⁻⁴ \pm 5.10 ⁻⁴	74.10 ⁻⁴ \pm 8.10 ⁻⁴	80.10 ⁻⁴ \pm 3.10 ⁻⁴	101.10 ⁻⁴ \pm 5.10 ⁻⁴
Mercúrio	80.10 ⁻⁴ \pm 15.10 ⁻⁴	90.10 ⁻⁴ \pm 6.10 ⁻⁴	90.10 ⁻⁴ \pm 4.10 ⁻⁴	76.10 ⁻⁴ \pm 4.10 ^{-4 d}
Rigidez (N/cm)				
Salina	132,2 \pm 5,62*	178,53 \pm 14,11*	202,10 \pm 6,63 ^a	216,92 \pm 9,17 ^a
Mercúrio	126,2 \pm 7,19	195,03 \pm 6,63 ^a	212,11 \pm 10,46 ^a	211,08 \pm 11,57 ^a

p<0,05 para: a - em relação ao grupo 3m; b - em relação ao grupo 6m, c - em relação ao grupo 9m, d - em relação ao grupo salina e * iguais para teste Mann-Whitney.



p<0,05 para: a - em relação ao grupo 3m; b - em relação ao grupo 6m, c - em relação ao grupo 9m e d - em relação ao grupo salina.

Figura 12 - Evolução dos valores de força máxima dos fêmures dos animais dos grupos experimentais obtidos com o teste biomecânico.

6.4 Altura e propriedades biomecânicas das vértebras (L5) dos animais dos grupos experimentais

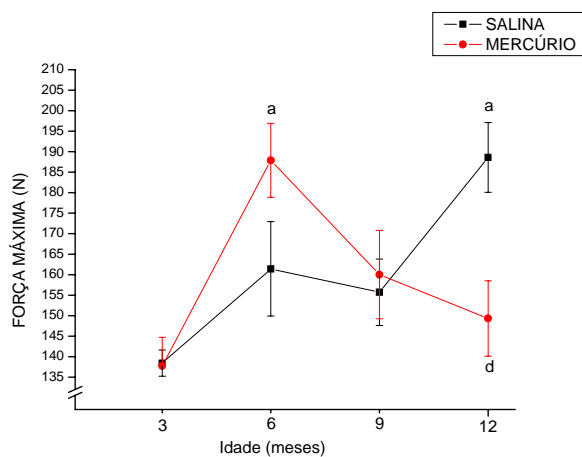
A altura máxima, obtida através de medição com paquímetro o deslocamento máximo e a força máxima obtidos através do teste de compressão de vértebras (L5) dos animais dos grupos experimentais estão expressos na tabela 4 e figura 13. Observamos que a altura da vértebra aumenta com o crescimento do animal. Entre os grupos de mesma idade, observamos que não houve diferença dos valores de altura máxima em nenhum dos grupos experimentais (tabela 4), já em relação aos parâmetros biomecânicos, nota-se que apenas o grupo 12m tratado com CM apresenta menor força máxima em relação ao grupo salina por outro lado, observamos que o grupo 6m apresenta uma tendência em aumentar a força máxima dos fêmures tratados com CM em relação ao grupo controle (figura 13). Observamos ainda, que não houve diferença em relação ao deslocamento máximo de nenhum dos grupos experimentais.

Com o crescimento dos animais, observamos entre os grupos salina que as vértebras do grupo 3m têm menor altura que as dos grupos 9m e 12m. Entre os grupos mercúrio, as vértebras do grupo 3m são menores apenas que as do grupo 6m. O deslocamento máximo desse osso no teste biomecânico não apresentou diferença entre os grupos. No entanto, a força máxima (figura 13) entre os grupos salina apresentou-se diferente, pois as vértebras dos animais do grupo 3m tiveram menor força máxima que as do grupo 12m. Entre os grupos mercúrio, a força máxima do grupo 3m apresenta-se menor apenas que a do grupo 6m.

Tabela 4 – Altura máxima obtida através de medição com paquímetro e deslocamento máximo obtido no teste de compressão das vértebras (L5) dos animais dos diferentes grupos experimentais. Valores expressos em média \pm EPM.

Altura máx (mm)	3m	6m	9m	12m
Salina	6,6 \pm 0,10	6,9 \pm 0,14	7,0 \pm 0,10 ^a	7,2 \pm 0,06 ^a
Mercúrio	6,6 \pm 0,16	7,2 \pm 0,09 ^a	7,1 \pm 0,05	6,9 \pm 0,14
Desl Máx (mm)				
Salina	1,1 \pm 0,3	1,5 \pm 0,6	1,1 \pm 0,1	1,5 \pm 0,4
Mercúrio	1,5 \pm 0,4	1,4 \pm 0,3	2,0 \pm 0,4	1,6 \pm 0,3

p<0,05 para: a - em relação ao grupo 3m; b - em relação ao grupo 6m, c - em relação ao grupo 9m e d - em relação ao grupo salina.



p<0,05 para: a - em relação ao grupo 3m; b - em relação ao grupo 6m, c - em relação ao grupo 9m e d - em relação ao grupo salina.

Figura 13 - Evolução dos valores de força máxima das vértebras (L5) dos animais dos grupos experimentais, obtida através do teste de compressão.

6.5 Parâmetros físicos das vértebras (L5) dos animais dos grupos experimentais

Os valores dos parâmetros físicos das vértebras (L5) dos animais dos grupos experimentais estão expressos na tabela 5 e nos gráficos das figuras 14-17. Entre os grupos com idades iguais observamos que no grupo 3m não houve diferença em nenhum dos parâmetros analisados. No grupo 6m o único parâmetro que apresenta diferença é o peso das cinzas, sendo este maior no grupo tratado com cloreto de mercúrio do que no controle. Os animais tratados com CM do grupo 9m apresentam maior percentual de água e menor percentual de material mineral em relação a seu controle. No grupo 12m o peso das cinzas e do percentual de água foram maiores no grupo tratado em relação ao seu controle e os valores de densidade mineral e de percentual de material mineral das vértebras foram menores nos animais do grupo tratado com CM em relação a seus controles.

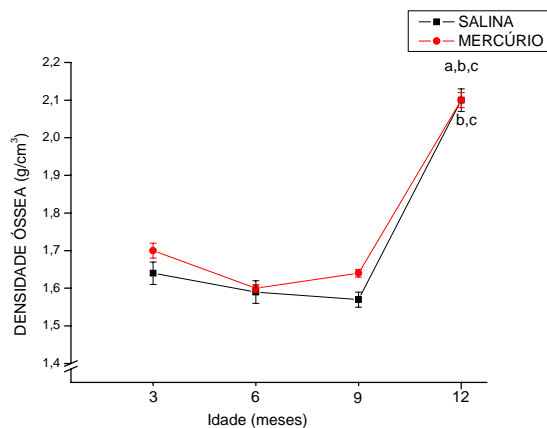
No que diz respeito à evolução dos parâmetros físicos das vértebras dos animais, notamos que o peso das cinzas dos grupos salina 3m foi menor que o grupo 12m e entre os grupos mercúrio, o grupo 3m apresentou menor peso das cinzas quando comparado aos grupos 6m e 9m. Inesperadamente, o volume ósseo das vértebras dos animais mostrou que, no grupo salina, o grupo 6m apresentou aumento desse parâmetro comparado ao grupo 12m. Da mesma forma, houve aumento do volume ósseo do grupo 9m quando comparado ao grupo 12m. Entre os grupos mercúrio, o grupo 3m apresentou menor valor de volume ósseo comparado aos grupos 6m e 9m e o grupo 12m teve menor valor de volume ósseo que os grupos 6m e 9m. O percentual de água das vértebras dos animais foi maior apenas no grupo salina 6m comparado ao grupo salina 12m. Ainda observando o comportamento desse tecido ósseo frente ao tratamento com cloreto de mercúrio, podemos notar na figura 14 que a densidade óssea dessas vértebras foi maior no grupo salina 12m comparado aos grupos 3m, 6m e 9m. No grupo mercúrio observa-se que o grupo 12m teve maior densidade óssea que os grupos 6m e 9m, não apresentando diferença em relação ao grupo 3m. Os parâmetros de densidade mineral se comportaram de maneira similar apenas em relação aos grupos salina, pois no grupo mercúrio a densidade mineral do grupo 12m foi maior que a dos grupos 3m, 6m e 9m (figura 15). O percentual de material orgânico desse tecido mostrou que entre os grupos salina, o grupo 6m apresentou menores valores de percentual de material orgânico que o grupo 9m, e este também foi maior que o grupo 12m. Entre os grupos mercúrio, os grupos 3m e 9m foram maiores que o grupo 12m (figura 16). Finalmente, quanto ao

percentual de material mineral do grupo salina, vê-se (figura 17), que os grupos 3m e 6m tiveram menores valores desse parâmetro que o grupo 12m. Por outro lado, o grupo mercúrio não apresentou diferença entre os grupos.

Tabela 5 - Parâmetros físicos das vértebras (L5) dos animais dos grupos experimentais. Valores expressos em média \pm EPM.

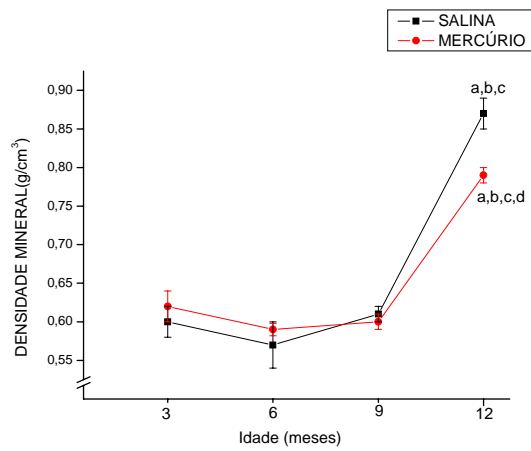
Peso das Cinzas (g)	3m	6m	9m	12m
Salina	0,028 \pm 0,001	0,033 \pm 0,001	0,035 \pm 0,001	0,040 \pm 0,001 ^a
Mercúrio	0,027 \pm 0,001	0,037 \pm 0,001 ^{a,d}	0,036 \pm 0,001 ^a	0,034 \pm 0,002 ^d
Volume Ósseo (cm³)				
Salina	0,04 \pm 0,002	0,05 \pm 0,003	0,05 \pm 0,002	0,04 \pm 0,002 ^{b,c}
Mercúrio	0,04 \pm 0,003	0,06 \pm 0,002 ^a	0,05 \pm 0,001 ^a	0,04 \pm 0,002 ^{b,c}
% Água				
Salina	42,2 \pm 1,1	44,3 \pm 1,4	39,4 \pm 0,7	39,1 \pm 0,6 ^b
Mercúrio	41,4 \pm 0,9	42,5 \pm 0,4	42,0 \pm 0,7 ^d	42,4 \pm 0,8 ^d

p<0,05 para: a - em relação ao grupo 3m; b - em relação ao grupo 6m, c - em relação ao grupo 9m e d - em relação ao grupo salina.



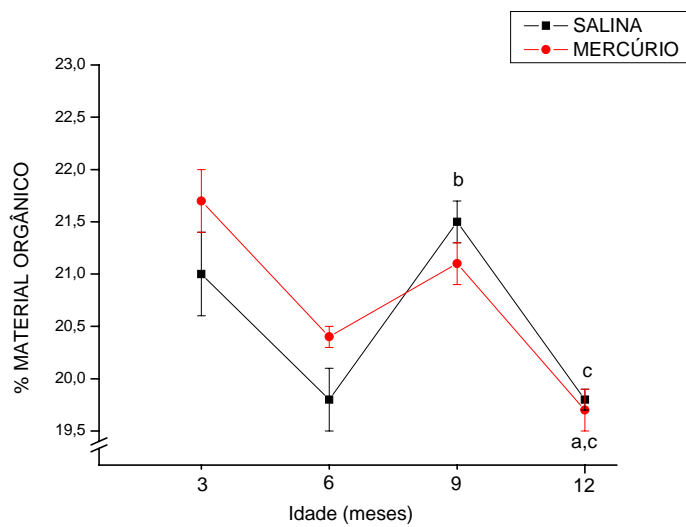
p<0,05 para: a - em relação ao grupo 3m; b - em relação ao grupo 6m, c - em relação ao grupo 9m e d - em relação ao grupo salina.

Figura 14 - Evolução dos valores de densidade óssea das vértebras (L5) dos animais dos grupos experimentais.



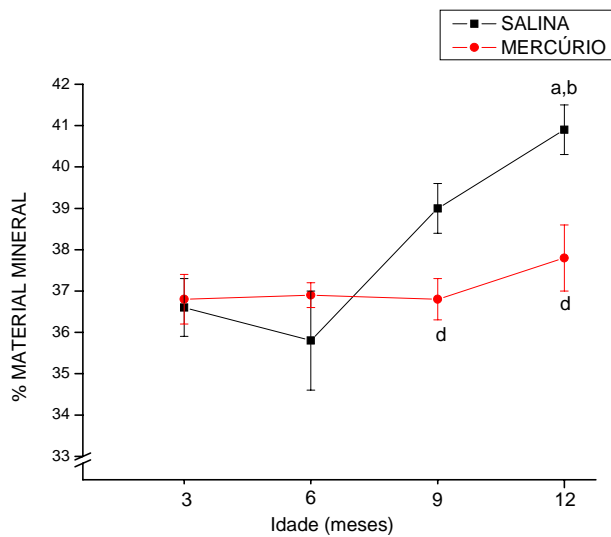
$p < 0,05$ para: a - em relação ao grupo 3m; b - em relação ao grupo 6m, c - em relação ao grupo 9m e d - em relação ao grupo salina.

Figura 15 - Evolução dos valores de densidade mineral das vértebras dos animais dos grupos experimentais.



$p < 0,05$ para: a - em relação ao grupo 3m; b - em relação ao grupo 6m, c - em relação ao grupo 9m e d - em relação ao grupo salina.

Figura 16 - Evolução dos valores de percentual de material orgânico das vértebras dos animais dos grupos experimentais.



p<0,05 para: a - em relação ao grupo 3m; b - em relação ao grupo 6m; c - em relação ao grupo 9m e d - em relação ao grupo salina.

Figura 17 - Evolução dos valores de percentual de material mineral das vértebras dos animais dos grupos experimentais.

6.6 Efeitos do mercúrio sobre a abertura vaginal das ratas

A tabela 6 apresenta a idade em que ocorreu a abertura vaginal das ratas durante o tratamento com cloreto de mercúrio ou salina. Nela observamos que este metal atrasa a maturidade sexual desses animais.

Tabela 6 – Dias de vida dos animais quando ocorreu a abertura vaginal. Valores expressos em média \pm EPM.

	Salina	Mercúrio
Dias de Vida	44,4 \pm 1,02	51,0 \pm 1,8*

* p < 0,05 vs salina correspondente.

7. DISCUSSÃO

A iniciativa de trabalharmos com a dose de 0,3mg/Kg de PC de cloreto de mercúrio (HgCl_2), foi feita de acordo com dados da literatura (NTP, 1993) que mostra que esta dose não influencia a curva ponderal dos animais. A massa corporal exerce estresse mecânico sobre os ossos e pode contribuir para o ganho de massa óssea (BERG e HARMISON, 1957; BURR, ROBLING e TURNER, 2002), portanto a homogeneidade do peso corporal é uma variável bastante importante. Diante disso, observamos que todos os grupos experimentais apresentam crescimento semelhante de PC e que entre a 7ª e 11ª semana ocorre alteração da velocidade de crescimento (figuras 4 - 7). Observamos que os grupos 3m e 6m tratados com mercúrio apresentam diferença de idade quando ocorre alteração do ganho de PC em relação a seus controles. No entanto, o grupo 3m tratado com CM mudou a velocidade do crescimento do PC antes do grupo salina, enquanto que o grupo 6m tratado com CM mudou a velocidade de crescimento do seu PC após a do grupo controle. O grupo 12m tratado com mercúrio apresenta uma tendência em mudar a inclinação da curva ponderal após a do grupo controle.

Dados da literatura afirmam que o tratamento com mercúrio promove diminuição do consumo alimentar e do PC (RAMALINGAM e VIMALADEVI, 2002; NTP, 1993; SIDDIQI e ALHOMIDA, 2005; KHAN et al, 2001), dependendo do período de contaminação e da dose ingerida. Outros autores como Yonaga et al (1985) ainda afirmam que, como o mercúrio induziu mudanças sobre o PC, o qual tem sido usado como indicador do crescimento, sugere-se que o mercúrio afeta o crescimento corporal. Entretanto, em nosso estudo não verificamos mudanças de ganho de PC produzida pela contaminação com cloreto de mercúrio apesar da alteração do comportamento da curva ponderal.

Na intenção de observar os efeitos do cloreto de mercúrio sobre o tecido ósseo de ratas, buscamos na literatura dados que nos permitissem afirmar que realmente este metal, ao ser ingerido ou injetado, chega ao tecido ósseo e tem ação sobre o mesmo. Autores como Rothschild e Duffy (2005) observaram maior presença deste metal no tecido ósseo de aves quando comparado a outros tecidos. Estas aves foram coletadas em áreas contaminadas do norte do pacífico e do Alaska e são bons objetos de estudos para verificar a concentração de mercúrio porque elas se alimentam em diferentes regiões, podem viver por muito tempo e são abundantes e distribuídas extensamente. Neste estudo foi observado que a concentração total de mercúrio no

osso variou de 0,7 a 422,9 ng/g. Igualmente, Chardi, Fuster e Nadal (2007) também quantificaram o bioacúmulo de mercúrio no tecido ósseo de 105 mamíferos mussaranho de dentes brancos (*Crossidura russula*) em áreas poluídas do Ebro Delta. Nas ilhas Medas foram coletados os controles, já que não há presença de mercúrio por ser um local não afetado pelas atividades humanas. A deposição de mercúrio nos ossos desses mamíferos revelou diferenças dependentes do sexo, da idade e do local de captura dos animais.

Em nosso trabalho não analisamos a presença deste metal no osso. Porém Ferreira (2008) e Mochiutti (2008) utilizando o mesmo protocolo experimental e dose diária de 2,5 mg/kg PC de HgCl₂ e de 0,625mg/kg de peso corporal (PC) de HgCl₂ respectivamente, detectaram a presença do elemento mercúrio no tecido ósseo de ratos.

No entanto, a forma pela qual o mercúrio se incorpora ao tecido ósseo ainda não está completamente elucidada, além de ser difícil dosar a concentração de mercúrio neste tecido. Alguns autores como Anner e Moosmayer (1992) mostram que a ligação do mercúrio à região de interface da molécula de Na⁺-K⁺-ATPase está implicada no transporte ativo mediado pela Na⁺-K⁺-ATPase e que o mercúrio induz a inibição do transporte de potássio. Essa inibição do transporte de íons potássio aumenta os níveis intracelulares de íons sódio levando a um aumento da concentração de cálcio intracelular, o que resulta numa extrusão mais lenta dos íons cálcio pelo trocador Na⁺-Ca²⁺. Portanto, mais íons cálcio permanecem no interior da célula. Gallagher, Noelle, Mccann (1995) também observaram a afinidade do mercúrio à região de interface da molécula de Na⁺-K⁺-ATPase através de experimentos com cloreto de mercúrio demonstrando que nos linfócitos B de humanos o movimento destes íons (principalmente íons potássio) pela membrana plasmática é de vital importância para que se inicie o processo mitogênico. Neste experimento houve uma possível associação deste metal à molécula de Na⁺-K⁺-ATPase levando à supressão da passagem de íons potássio. Outro mecanismo afirma que os metais ao se ligarem em sítios nucleofílicos de determinadas moléculas biológicas, formam complexos capazes de imitar estruturalmente e funcionalmente os substratos endógenos que normalmente se ligam ou ocupam os locais ativos de proteínas carreadoras, canais, proteínas estruturais, enzimas e/ou fatores de transcrição. Segundo Gallagher, Noelle, Mccann (1995), nos últimos anos, um número de proteínas carreadoras tem sido relacionadas com o transporte de alguns metais pesados como os transportadores de ânion orgânicos (OAT1 e OAT3) os quais possuem relação com o transporte de formas inorgânicas e orgânicas do Hg em células epiteliais renais, endoteliais e em células

gliais. O transporte molecular mimetizado apresenta os meios preliminares para a entrada e saída de determinados metais através destes transportadores (ASLAMKHAN et al, 2003; ZALUPS e AHMAD, 2004; ZALUPS, 2000). Além disso, a similaridade de tamanho e de carga de vários compostos de mercúrio, particularmente o HgCl_2 , aos íons fisiológicos como Na^+ e Ca^{2+} sugerem que estes compostos entram na célula via canais iônicos (MIYAMOTO, 1983).

Em nosso estudo observamos que no grupo 3m tratado com CM houve um significativo aumento do percentual de material orgânico dos fêmures dos animais tratados com CM em relação a seu controle (figura 10). Isto poderia levar a aumentos tanto da densidade óssea e mineral quanto da força máxima no ensaio biomecânico. No entanto esses parâmetros permaneceram sem alteração. Quanto às vértebras desses animais, não houve alteração em nenhum dos parâmetros analisados. No grupo 6m observamos um aumento do percentual de material mineral dos fêmures dos animais tratados com mercúrio em relação a seu controle. Nestas condições, poderíamos encontrar maiores valores de densidade óssea e mineral para os animais tratados com CM quando comparados a seu controle bem como aumento do peso das cinzas. Quanto à biomecânica deste tecido, a força máxima dos fêmures dos animais tratados com mercúrio poderia ser maior. Estas hipóteses realmente se confirmaram nos animais do grupo 6m. Em se tratando das vértebras desses animais observamos que no grupo 6m tratado com CM houve aumento do peso das cinzas em relação ao controle além de tendência em aumentar os valores de força máxima das vértebras dos animais tratados com mercúrio em relação ao grupo controle (figura 13).

Com o panorama do grupo 9m observamos diminuição do percentual de material orgânico dos fêmures dos animais tratados com mercúrio em relação ao seu controle o que poderia levar a diminuição da densidade óssea e mineral bem como da força máxima dos fêmures dos animais tratados comparados ao controle. No entanto, nenhum desses parâmetros sofreu alteração. Quanto à vértebra, observamos que neste grupo houve diminuição do percentual de material mineral das vértebras dos animais do grupo tratado com mercúrio o que poderia levar a reduções das densidades e dos parâmetros biomecânicos. Entretanto, não houve mudança em nenhum desses parâmetros. Já o grupo 12 meses apresentou menor peso das cinzas e do volume ósseo dos fêmures dos animais tratados com mercúrio em relação a seu controle o que também poderia apresentar reduções dos percentuais de material orgânico e mineral, da densidade óssea e mineral além de menores valores dos parâmetros biomecânicos. Em contra partida, o que observamos foi

que os parâmetros citados permaneceram inalterados. E, mesmo não havendo alteração da força máxima, podemos afirmar que houve comprometimento da biomecânica desses fêmures tratados com mercúrio, uma vez que apresentam menores valores de resiliência e tenacidade. Neste grupo também observamos diminuição do comprimento e diâmetro maior dos fêmures dos animais tratados com mercúrio em relação a seu controle. Além disso, as vértebras do grupo 12m tratado com mercúrio também apresentaram diminuição do peso das cinzas além da diminuição da densidade mineral e do percentual de material mineral, isto poderia comprometer o comportamento biomecânico dessas vértebras. De fato, observamos a diminuição dos valores de força máxima das vértebras do grupo tratado com CM em relação a seu controle.

Uma possível causa para os aumentos de percentual orgânico ocorrido no grupo 3m refere-se aos distúrbios que o mercúrio pode causar sobre o metabolismo do colágeno, uma vez que o mercúrio, ao entrar no organismo, tem a capacidade de ligar-se aos radicais sulfídricos (SH) das proteínas e romper a propriedade funcional das enzimas sulfidrilas (BAUM, 1999). Estudos mostraram que animais injetados uma única vez com dose intra-peritoneal de 2mg HgCl₂/kg PC, tiveram um aumento significativo de hidroxiprolina sérica total (aminoácido contido exclusivamente no colágeno) (SIDDIQI e ALHOMIDA, 2005). A presença de hidroxiprolina indica a presença de colágeno, dos seus precursores ou dos produtos de degradação (RABADJIJA, KOREN e PENDE, 1971). No nosso estudo pode ter ocorrido a síntese de colágeno e então os aumentos dos percentuais de material orgânico.

Por outro lado, o aumento do percentual de material mineral bem como o do peso das cinzas e o aumento da densidade óssea e mineral do fêmur dos animais dos grupos 6m tratados com CM, prediz um osso mais denso. Além dos valores aumentados do peso das cinzas das vértebras dos animais tratados com mercúrio e a tendência em aumentar a força máxima em relação ao seu controle no grupo 6m tratado com CM o que também pode predizer um osso mais forte e denso. Estes dados podem estar relacionados com a mobilização do cálcio extracelular para o meio intracelular mediado pelo mercúrio ou mesmo pelos distúrbios que o CM pode causar sobre o metabolismo do colágeno como vimos anteriormente. No que diz respeito ao cálcio, há um consenso na literatura em relação às mudanças de sua homeostase frente ao tratamento com mercúrio. Muitos autores têm demonstrado que o tratamento com cloreto de mercúrio, em diversas doses, aumenta os níveis de cálcio intracelular de muitas células (PARASHAR, et al, 1999). No tecido ósseo, por exemplo, o aumento dos percentuais de material

mineral, do peso das cinzas e da densidade óssea e mineral e pode estar relacionado com a mobilização do cálcio extracelular para o meio intracelular mediado pelo mercúrio. Anner e Moosmayer (1992) observaram, através de uma população de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em lipossomas com ATP e Na^+ , que a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ é capaz de interagir fortemente com os metais e que esta possui uma alta afinidade pelo mercúrio, além disso os autores afirmam que o lado intracelular da molécula pode ser o maior alvo do Hg in vivo. Neste trabalho, Anner e Moosmayer (1992), notaram que o cloreto de mercúrio inibiu a atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, o que levou ao aumento da concentração de cálcio intracelular devido ao aumento intracelular de Na^+ e isto, resulta numa extrusão mais lenta dos íons cálcio pelo trocador $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$. Este mesmo autor ainda afirma que a concentração intracelular de cálcio pode aumentar mais com o mercúrio do que com a oubaína, possivelmente porque o mercúrio interage intracelularmente e deve desprender cálcio adicional dos estoques de compartimentos intracelulares. Schirmacher et al (1998) estudaram os efeitos da aplicação extracelular e intracelular de Hg e outros metais nas junções gap usando culturas de células osteoblásticas e observaram que a aplicação extracelular de mercúrio ($5\mu\text{mol/litro}$) em fragmentos de crânio de ratos recém nascidos aumentou os níveis intracelulares de cálcio e, esta aplicação não interferiu no acoplamento elétrico das junções gap. Uma possível explicação poderia ser o fato de este aumento do cálcio intracelular ter sido abaixo do limiar que cause o fechamento dos canais das junções gap. Toimela, Salminen e Tähti (1998), também sugerem que o mercúrio muda os níveis de cálcio, o que pode levar a várias conseqüências celulares incluindo efeitos tóxicos.

Os menores valores de percentual de material orgânico dos fêmures dos animais do grupo 9m tratado com CM poderiam levar a reduções dos parâmetros biomecânicos, no entanto, isso não ocorreu. Igualmente, a redução do percentual de material mineral das vértebras dos animais tratados com mercúrio em relação ao grupo controle também poderia levar a reduções das densidades e dos parâmetros biomecânicos. Da mesma forma que no fêmur, não ocorreram tais alterações nas vértebras dos animais tratados com mercúrio comparado ao grupo controle. Portanto, estes dados parecem não ser suficientes para promover um osso mais frágil. Além disso, estes resultados podem ter relação com a possível capacidade do organismo de reverter os danos causados pelo cloreto de mercúrio quando cessou sua administração, já que os grupos tiveram o mesmo tempo de tratamento e o grupo 6m demonstra maiores mudanças do comportamento do tecido ósseo do que o grupo 9m (que, após contaminação, permaneceu sem tratamento por 6

meses). Embora não tenhamos dosado, estes resultados também podem estar relacionados com as metalotioneínas (MT) que possuem um efeito protetor contra os metais pesados e, em resposta à contaminação, há um aumento dessa proteína. De acordo com Jin et al (2002), a aplicação de 1mg/kg de cloreto de mercúrio de forma subcutânea, 3 vezes por semana, não apresentou mudança da densidade mineral óssea e este metal não causou alteração óssea nesta dose e com esta forma de administração quando aplicado sozinho. No entanto, quando introduzido juntamente com o anticorpo anti-metalotioneína (anti-MT), observou-se significativa redução da densidade mineral óssea após 2 semanas. Alguns autores afirmam que o mercúrio inorgânico pode causar danos no fígado e rins, mas que, altos níveis intracelulares de MT são capazes de prevenir os efeitos tóxicos do mercúrio (MORCILLO e SANTAMARIA, 1996; SUGAWARA et al, 1998).

A diminuição do comprimento, diâmetro maior e do volume ósseo dos fêmures dos animais do grupo 12m tratados com mercúrio em relação a seu controle (tabela 1 e 2) pode revelar que, mesmo sem diferença de PC final (figura 7), os animais do grupo tratado com CM tiveram seu desenvolvimento ósseo comprometido. Nossos dados divergem dos de Yonaga et al (1985), uma vez que estes autores observaram através de um estudo histológico em dentes de ratos imaturos, a inibição da formação do dente incisivo durante o tratamento de 6 dias com doses subcutâneas (s.c) de 2, 4 e 8 mg/Kg PC de $HgCl_2$. No entanto, após o término do tratamento, o efeito inibitório sobre o crescimento aposicional (formação) desapareceu completamente, ou seja, o efeito do mercúrio parece ser revertido após o final do tratamento. Talvez possamos compreender melhor esses resultados considerando as diferenças de tecido ósseo utilizado bem como a dose e a via de administração do nosso estudo e do de Yonaga et al (1985). Portanto, os dados biométricos de nosso estudo indicam que o desenvolvimento ósseo do grupo 12m foi comprometido pelo tratamento com mercúrio.

Consequentemente, o comportamento mecânico dos fêmures dos animais dos grupos 12m tratados com CM também se modificou. Resiliência e tenacidade representam, entre outros, o comportamento mecânico do tecido ósseo e, portanto, seus valores reduzidos refletem uma maior fragilidade óssea. Além disso, as vértebras desses animais revelam menor peso das cinzas, menor densidade mineral e percentual de material mineral e, consequentemente, menores valores de força máxima dos animais tratados com CM em relação a seu controle. Estes dados nos indicam que essa diferença dos resultados de força máxima entre os tecidos ósseos (fêmur e vértebra)

parece ter relação com o tipo de tecido ósseo e sua função mecânica no rato, já que o fêmur é um tecido de sustentação de todo o peso corporal do animal e, portanto apresenta efeitos mecânicos, por outro lado, as vértebras desses animais não apresentam essa função de sustentação tal qual o fêmur. Segundo a lei de Wolff, apud Caixeta et al (2008), a carga mecânica promove deformação no osso e conseqüentemente gera um estímulo para uma resposta óssea local. Assim, acompanhando o desenvolvimento desses animais, nota-se que a força máxima do osso submetido ao teste biomecânico (grupo 6m), diminuiu significativamente (grupo 12m) com o tratamento com cloreto de mercúrio. Isso nos permite afirmar que não apenas o fêmur dos animais do grupo 12m encontra-se debilitado pelo HgCl_2 , como também as vértebras. Portanto, pode-se afirmar que a contaminação com cloreto de mercúrio alterou o comportamento de todo o tecido ósseo dos animais do grupo 12m.

Estudos relatam que a toxicidade do mercúrio gera radical de oxigênio e que este tem uma alta afinidade por grupos sulfídricos (SH) de biomoléculas, depletando assim tiols intracelulares e reduzindo a glutathione. Embora o mecanismo exato da geração de radicais livres não seja completamente entendido, postula-se que a depleção do antioxidante glutathione pelo mercúrio pode ser a causa da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que induzem oxidação lipídica, protéica e de DNA. A geração de EROs no citoplasma das células pode aumentar a produção de peróxido de hidrogênio mitocondrial e peroxidação lipídica na membrana mitocondrial, resultando em perda da integridade da membrana e finalmente necrose ou apoptose (KAUR, ASCHNER e SYVERSEN, 2006; JEZEK e HLAVATÁ, 2005; OH et al, 1997; VALKO et al, 2006). Assim, parece haver uma grande associação entre estresse oxidativo e a patologia da osteoporose. Segundo Maggio et al (2003), marcadores antioxidantes foram encontrados no plasma de mulheres osteoporóticas e Basu et al (2001) afirmam que há também uma relação bioquímica entre estresse oxidativo e redução da densidade mineral óssea em homens e mulheres com idades avançadas. Como o mercúrio pode induzir estresse oxidativo e este aumenta a diferenciação e função dos osteoclastos (GARRETT et al, 1990), em nosso estudo, especificamente neste grupo experimental (12m), pode ter ocorrido a produção suficiente de EROs, já que observamos diminuição do peso das cinzas e do volume ósseo, levando portanto a uma diminuição da resiliência e tenacidade. Park e Park (2007) investigaram a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelo cloreto de mercúrio em culturas de células epiteliais de brônquios de humanos e observaram que o aumento de EROs estava relacionado com a

diminuição dos níveis do antioxidante glutathiona, o que levou à morte dessas células. Como as atividades metabólicas das células ósseas podem ser debilitadas pelos metais pesados (SCHIRRMACHER et al, 1998), em nosso estudo, as células ósseas dos grupos 12m podem ter gerado EROs e conseqüentemente causado danos em sua estrutura, levando a uma disfunção dessas células já que esses dados, segundo Hernandez e Keaveny (2006); Mullins, Bruzzi e McHugh (2007), podem ser úteis em predizer os riscos de uma fratura.

Como em nosso trabalho todos os grupos tiveram as mesmas condições tais como o tempo de tratamento, a via de administração e a mesma dose, mas, no entanto, os grupos tiveram idades diferentes, imagina-se que este fato possa ajudar a explicar as diferenças de resultados, visto que o organismo se comporta de diferente maneira em cada fase do desenvolvimento bem como na maturidade. Segundo Carter e Spengler (1978), o aumento da idade está associado a mudanças significativas da morfologia e composição dos ossos. Conseqüentemente, ocorrem alterações das propriedades mecânicas (SHIMANO, SHIMANO e VOLPON, 2002).

Quando observamos o fêmur de todos os animais dos grupos experimentais, podemos observar seu desenvolvimento, visto que, em termos gerais, os parâmetros dos fêmures do grupo 12m são maiores que os demais grupos. Desta forma, analisando os parâmetros biométricos, físicos e biomecânicos dos fêmures dos animais de todos os grupos experimentais, observamos o crescimento dos fêmures não apenas nos grupos salina como nos grupos mercúrio. Estes efeitos do mercúrio sobre o tecido ósseo através da observação de várias fases do desenvolvimento ainda não tinham sido estudados. Com o presente estudo, pudemos verificar que a contaminação com cloreto de mercúrio não inibiu o crescimento ósseo nem sua formação ao longo do desenvolvimento, uma vez que os grupos mais velhos apresentam maiores valores biométricos em relação aos grupos mais novos. Nossos dados divergem mais uma vez dos de Yonaga et al (1985), visto que estes autores, observando os efeitos do cloreto de mercúrio sobre o crescimento longitudinal da tíbia proximal de ratos utilizando doses de 2, 4 e 8mg/kg HgCl₂ de PC, demonstraram que quando o mercúrio foi injetado continuamente o crescimento endocondral da tíbia foi inibido em todos os grupos. Após algumas doses diárias a taxa de crescimento estava 50% menor que a da pré-dose. Além disso, depois que as injeções cessaram o osso voltou a crescer. No nosso estudo, todos os grupos apresentam desenvolvimento do tecido ósseo, além de os fêmures continuarem crescendo durante e após a contaminação com mercúrio.

Igualmente, os parâmetros físicos e biomecânicos dos fêmures mostram o aumento desses valores de acordo com o crescimento dos animais, tanto entre os grupos salina quanto entre os grupos mercúrio. No entanto, como esperado, o percentual de água diminui à medida que os animais se desenvolvem. Estes dados nos permitem concluir que o tratamento com cloreto de mercúrio não afetou nem o crescimento nem a qualidade dos fêmures dos animais ao longo do crescimento.

Observando o desenvolvimento das vértebras dos animais, vemos que os valores dos parâmetros físicos como: peso das cinzas, volume ósseo, densidade óssea e mineral revelam seu aumento nas vértebras dos animais dos grupos salina e mercúrio. No entanto, os valores de percentual de material orgânico diminuíram ao final do experimento (comportamento do percentual de material orgânico de todos os grupos). Estes dados têm direta relação com os valores dos parâmetros biométricos e biomecânicos das vértebras L5 os quais mostram que, à medida que esses animais se tornam mais velhos os valores de força máxima das vértebras (figura 13) continuam aumentando em condições normais. Contrariamente, em situações de contaminação, os valores de força máxima das vértebras diminuem acentuadamente. Este dado é um indicativo de que o tratamento com mercúrio compromete as propriedades biomecânicas das vértebras de animais tratados com cloreto de mercúrio, especialmente no grupo 12m.

Apesar de verificarmos que o mercúrio apresenta efeitos que comprometem o comportamento do tecido ósseo cortical e trabecular, a via pela qual esse metal chega ao osso ainda não foi elucidada. A literatura não apresenta estudos dos efeitos do mercúrio sobre, especificamente, o tecido ósseo trabecular. No entanto sabemos que, nos sistemas biológicos, o mercúrio sempre está ligado a biomoléculas que contêm grupo tiol, o que facilita seu transporte por servir como um imitador molecular. Numerosos estudos têm relacionado algumas formas de imitação molecular para compreender os conjugados de tiols de mercúrio inorgânico e orgânico em células alvo seletivas. O rim é o primeiro órgão alvo que captura o mercúrio do sangue e o acumula. O acúmulo deste metal nos rins é muito rápido e os túbulos proximais são as principais partes do néfron que captam e acumulam mercúrio. Até recentemente os mecanismos pelos quais o mercúrio entrava no compartimento intracelular era desconhecido. Atualmente, existem algumas teorias a respeito do transporte de mercúrio nas células epiteliais dos túbulos proximais. Uma delas postula que os íons de mercúrio ligados à albumina entram pela membrana plasmática luminal das células dos túbulos proximais por endocitose. Durante cada passagem pelo sistema

circulatório renal, apenas uma pequena fração (aproximadamente 20 a 30%) do sangue é realmente filtrado no glomérulo. A maior parte do sangue que entra nos rins atravessa os capilares peritubulares e vasa recta e então saem via veias renais. Conseqüentemente, solutos plasmáticos como conjugados tiol-S de mercúrio podem ser filtrados nos glomérulos, dentro do compartimento luminal do néfron (assumindo que os compostos são ultrafiltrados) e podem sair via capilar peritubular (aproximadamente ao mesmo tempo) para a superfície basolateral do néfron. Estudos recentes indicam que há pelo menos dois mecanismos distintos responsáveis pela tomada de mercúrio em células do túbulo proximal: pelo menos um localizado na membrana luminal e pelo menos outro na membrana basolateral (ZALUPS e AHMAD, 2004; BRIDGES e ZALUPS, 2004).

Várias evidências indicam que o mercúrio conjugado à cisteína (e a outros aminoácidos), na forma (CIS-S-Hg-CIS) são substratos que podem ser capturados pelas células epiteliais dos túbulos proximais em sua membrana basolateral por um ou mais sistema de transportadores de ânion orgânico (OAT1 e talvez OAT3). Desta forma, uma vez que o mercúrio se encontra nos rins ele pode ser filtrado ou reabsorvido para o líquido extracelular e, conseqüentemente ir para os demais tecidos, como por exemplo, o tecido ósseo. Obviamente a concentração de mercúrio que consegue chegar ao osso é menor do que a que foi injetada visto que este é filtrado pelos rins e também atinge outros órgãos como, especialmente, fígado e cérebro (ZALUPS e AHMAD, 2004).

No que diz respeito aos efeitos do mercúrio sobre a abertura vaginal das ratas, observa-se que o tratamento com cloreto de mercúrio atrasa a maturidade sexual desses animais (tabela 6). Milosević et al (2005), investigando os efeitos *in vitro* do cádmio e do mercúrio sobre a atividade da Mg^{2+} -ATPase na membrana plasmática do ovário e útero de ratas, também afirmam que tanto o mercúrio quanto o cádmio podem afetar a fertilidade de mamíferos. Igualmente, Khan et al (2004) observaram que a exposição de ratos machos e fêmeas ao $HgCl_2$ (0; 0,25; 0,5 e 1mg/kg de PC, por gavagem) nos períodos de pré-acasalamento, acasalamento e gestação, observaram significativa redução da fertilidade. Atkinson et al (2001), em um estudo multigeracional em roedores, observou que a exposição a diferentes doses (0; 0,50; 1,0; ou 2,0mg/kg de PC, por gavagem) de CM em ratos, a primeira geração sofreu significativa redução da fertilidade, da eficiência do acasalamento e da taxa de nascimento, mas que a exposição continuada de CM a

ratos da segunda geração, não afetou o índice de fertilidade, no entanto, afetou a eficiência do acasalamento e da taxa de nascimento.

Khera (1973) descreveu uma redução dose dependente da ninhada quando ratos tratados com 1,0, 2,5 ou 5,0 mg/kg/dia de metil mercúrio durante 7 dias, foram acasalados com ratas não tratadas. Burbacher et al (1988) observaram aumento da taxa de reprodução fracassada avaliada com a diminuição das concepções e aumentos de abortos ocorridos em macacas expostas a 0,06 ou 0,08 mg/kg/dia de metil mercúrio durante 4 meses. Em nosso estudo, observamos que o tratamento com o mercúrio, em sua forma inorgânica, atrasou a maturidade sexual das ratas.

8. CONCLUSÕES

O tratamento com HgCl_2 , na dose de 0,3mg/Kg PC alterou a idade de mudança da velocidade de crescimento, avaliado pela massa corporal, especialmente nos grupos 3m e 6m.

No grupo 6m, o tratamento com cloreto de mercúrio promoveu aumentos dos valores dos parâmetros físicos e biomecânicos do tecido ósseo das ratas.

Nossos resultados demonstram que o grupo 12m tratado com HgCl_2 apresenta fragilidade óssea como pode ser observado pela análise das propriedades biométricas, físicas e biomecânicas, tanto dos fêmures como das vértebras.

Na dose de 0,3mg/Kg PC o tratamento com cloreto de mercúrio atrasou a maturidade sexual das ratas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR MRMP, NOVAES AC. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. **Quím. Nova**, v.25, n.6B, p.1145-1154, 2002.

AKHTER, M.P. et al. Effects of nicotine on bone mass and strength in aged female rats. **Journal Orthopaedic Research**, v. 1, n. 21, p. 14-19, may 2003.

AKHTER, M.P. et al. Bone biomechanical properties in LRP5 mutant mice. **Bone**, v. 35, n. 1, p. 162-169, jul. 2004.

ALDEN, CJ et al. Toxicology and carcinogenesis studies of mercuric chloride in F344 rats and B6C3F₁ mice. **U.S. department of health and human services, technical report series**, n.408, feb. 1993.

ANNER BM, MOOSMAYER. Mercury inhibits Na-K-ATPase primarily at the cytoplasmic side. Switzerland, **Am J Physiol.**, v.262, n.5 Pt 2, p.F843-8, may. 1992.

ASLAMKHAN AG, et al. Human renal organic anion transporter 1-dependent uptake and toxicity of mercuric-thiol conjugates in Madin-Darby canine Kidney cells. **Mol Pharmacol.**, v.63, p.590-596, 2003.

ATKINSON A, et al. Assessment of a two-generation reproductive and fertility study of mercuric chloride in rats. **Food and Chemical Toxicology**, p.39:73-84, 2001.

BASU S, et al. Association between oxidative stress and bone mineral density. **Bioch biophysical res communic.**, v.288, n.1, p.275-279, oct. 2001.

BAUM CR: Treatment of mercury intoxication. **Curr Opinion Ped.**, v.11, n.3, p.265-268, 1999.
BERG, B.N.; HARMISSON, C.R. Growth, disease, and aging in the rat. **Journals of Gerontology**, v. 12, n. 4, p. 370-377, oct. 1957.

BERG BN, HARMISSON CR. Growth, disease and aging in the rat. **Journals of Gerontology**, v.12, n.4, p.370-377, 1957.

CULLINANE DM, EINHORN TA. Biomechanics of bone. In BILEZIKIAN JP, RAISZ LG, RODAN GA. **Principles of Bone Biology**. Boston, 2002. P.17-31.

BRIDGES, C.C.; ZALUPS, R.K. Homocysteine, system b⁰⁺ and the renal epithelial transport and toxicity of inorganic mercury. **The American Journal of Pathology**, v. 4, p. 1385-1394, 2004.

BRUNET S, et al. Cytometric profiles of bone marrow and spleen lymphoid cells after mercury exposure in mice. **Int. J. Immunopharmac.**, v.15, n.7, p.811-819, 1993.

BURBACHER TM, MOHAMMED MK, MOTTETT NK. Methyl mercury effects on reproduction and offspring size at birth. **Reproductive Toxicol.**, v.1, p.267-278, 1988.

- BURR DB. The contribution of the organic matrix to bone's material properties. **Bone**, v.3, n.1, p. 8-11, 2002.
- BURR DB, ROBLING AG, TURNER CH. Effects of biomechanical stress in animals. **Bone**, v.30, n.5, p.781-786, may 2002.
- CAIXETA LF, et al. Impacto da atividade física sobre a massa óssea de ratas osteopênicas. **Conexões**, Campinas, v. 6, n. especial, p.1516-4381, 2008.
- CARANO RAD, FILVAROFF EH. Angiogenesis and bone repair. **Research Focus**. USA November. v.8, n.21, p.980-989, 2003.
- CARTER DR, SPENGLER DM. Mechanical properties and composition of cortical bone. **Clin Orthop Rel Res**, n.135, p 192-217, sept. 1978.
- CHARDI AS, FUSTER MJL; NADAL J. Bioaccumulation of lead, mercury and cadmium in the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*, from the Ebro Delta (NE Spain): Sex and age-dependent variation. **Environmental Pollution**, v.145, p.7-14, 2007.
- CORDIE S, DEPLAN F, MANDEREAU L. Paternal exposure to mercury and spontaneous abortions. **British J Industrial Medicine**, v.48, p.375-381, 1991.
- DIETER MP et al. Immunological and biochemical responses in mice treated with Mercuric Chloride. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v.68, p.218-228, 1983.
- DOBLARÉ M, GARCÍA JM, GÓMEZ MJ. Modeling bone tissue fracture and healing: a review. **Engineering Fracture Mechanics**, v.71, n.13/14, p.1809-1840, 2004.
- FERREIRA JA. Efeitos do cloreto mercúrico sobre o tecido ósseo de ratos. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, 2008.
- FROST HM. A new direction for osteoporose research: a review and proposal. **Bone**, v.12, n.6, p.429-37, 1991.
- GALLAGHER JD, NOELLE RJ, MCCANN FV. Mercury suppression of a potassium current in human B lymphocytes, **Cellular sign.**, v.7, n.1, p.31-38, Jan. 1995.
- GARRETT R, et al. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. **J. Clin. Invest.**, v.85, p.632-639, march 1990.
- GRAEME KA, POLLACK CV Jr. Heavy metal toxicology, Part I: arsenic and mercury. **J Emerg Med.**, v.16, n.1, p.45-56, 1998.
- HERNANDEZ CJ, KEAVENY TM. A biomechanical perspective on bone quality, **Bone**, v.39, n. 6, p.1173–1181, 2006.

- HILL PA, ORTH M. Bone remodeling, London, **British Journal of Orthodontics**, v. 25, p.101-107, 1998.
- JEZEK P, HLAVATÁ L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. **International J bioch cell biology**, v.37, n.12, p.2478-2503, Dec. 2005.
- JIN GB, et al. Induction of anti-metallothionein antibody and mercury treatment decreases bone mineral density in mice. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.185, n.2, p.98-110, 2002.
- KAUR P, ASCHNER M, SYVERSEN T. Glutathione modulation influences methyl mercury induced neurotoxicity in primary cell cultures of neurons and astrocytes. **Neuro Toxicology**, v.27, n.4, p.492-500, July 2006.
- KHAN, AT, et al. Uptake and distribution of mercury in rats after repeated administration of mercuric chloride. **J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.**, v.36, n.10, p.2039-45, 2001.
- KHAN, AT, et al. Effects of inorganic mercury on reproductive performance of mice. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p.571-577, 2004.
- KHERA KS. Reproductive capability of male rats and mice treated with methyl mercury. **Toxicology and Applied Pharmacol.**, V.24, p.167-177, 1973.
- LOVERIDGE N. Bone: More than a stick. **Journal of animal scienc.**, V. 77, n. 2: p. 190-196, Jan. 1999.
- MAGOS L. Physiology and Toxicology of Mercury. **Metal ions in biological systems**, v. 34, p. 321-370, Jan 1997.
- MACKIE EJ. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. **The international journal of biochemistry cell biology**, p.1301-1305, 2003.
- MARCUS R, FELDMAN D, KELSEY J. **Osteoporosis**. The Bone Organ System, p. 3-22. Academic Press. San Diego USA. T.A Einhorn, 1996.
- MAGGIO D, et al. Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of a cross-sectional study. **J clin endocrinol metab.**, v.88, n.4, p. 1523-1527, 2003.
- MARKS SC, ODGREN PR. Structure and development of the skeleton, Massachusetts, **Principles of Bone Biology**, v.1, p.3-15, 2002.
- MARTINI FH. (1998). **Fundamentals of anatomy and physiology**. 4thed. New Jersey: Prentice Hall, 1123p.
- MACDONALD BR, GOWEN M. The cell biology of bone, *Baillière's Clinical Rheumatology*, v.7, n. 3, October. 1993.

- MILOSEVIĆ M, et al. Effects of metal ions on plasma membrane Mg^{2+} -ATPase in rat uterus and ovaries. **Ann N Y Acad Sci.**, v.1048, p.445-8, jun. 2005.
- MOCHIUTTI D. Efeitos do Cloreto Mercúrico Sobre o Desenvolvimento do Tecido Ósseo: Propriedades Físicas e Biomecânicas do Fêmur de Ratos. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, 2008.
- MORCILLO, MA, SANTAMARIA J. Mercury distribution and renal metallothionein induction after subchronic oral exposure in rats. **Biometals**, v.9, p.213-220, 1996.
- MULLINS LP, BRUZZI MS, MCHUGH PE. Measurement of the microstructural fracture toughness of cortical bone using indentation fracture. **J Biomech** v.40, n.14, p.3285–3288, 2007.
- MIYAMOTO, M.D. Hg^{2+} causes neurotoxicity at an intracellular site following entry through Na^+ and Ca^{++} channels. **Brain Research**, v. 267, p. 375-379, 1983.
- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM WORKING GROUP. Toxicology and carcinogenesis studies of mercuric chloride in F344 rats and B6C3F1 mice (gavage studies). **Natl Toxicol Prog Tech Report Series**. p.408: 260, 1993.
- NGUYEN, T.V. 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.
- NRIAGU JO, SOUZA CMM, MIERLE G. Mercury pollution in Brazil. **Nature** v.356, p.389-390, 1992.
- OH IS, et al. Mercuric compounds inhibit human monocyte function by inducing apoptosis: Evidence for formation of reactive oxygen species, development of mitochondrial membrane permeability transition and loss of reductive reserve. **Toxicology**, v.124, p.211-224, 1997.
- PARASHAR A, et al. Mercuric chloride induces increases in both cytoplasmic and nuclear free calcium ions through a protein phosphorylation-linked mechanism. **Free Radic Biol Med.**, v.26, n.1/2, p.227-231, 1999.
- PARK EJ, PARK K. Induction of reaction oxygen species and apoptosis in BEAS-2B cells by mercury chloride, Republic of Korea, v.21, p.789-794, February. 2007.
- RABADJIJA L, KOREN E, PENDE B. Studies on the composition of extracellular fluid from calf costal cartilage. **Biochem Biophys Acta.**, v.230, n.3, p.620–626, 1971.
- RAMALINGAM V, VIMALADEVI V. Effect of mercuric chloride on membrane-bound enzymes in rat testis. **Asian J Androl.**, v.4, n.4, p.309-311, 2002.
- ROBLING AG, CASTILLO AB, TURNER CH. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v.8, p.455-498, 2006.

ROTHSCHILD RFN, DUFFY LK. Mercury concentration in muscle, brain and bone of western Alaskan waterfowl. **Science of the Total Environment**, v. 349, p. 277-283, 2005.

SCHIRRMACHER K, et al. Effects of lead, mercury, and methyl mercury on gap junctions and [Ca²⁺] in bone cells. **Calcif Tissue Int.**, v.63, n.2, p.134-139, 1998.

SHIMANO MM, SHIMANO AC, VOLPON JB. Histerese de femurs de ratas submetidos a ensaio de flexão, em diferentes faixas etárias. **Rev. Brasileira de Engenharia Biomédica**, v.18, n.2, p.89-97, maio 2002.

SIDDIQI NJ, ALHOMIDA AS. Effect of mercuric chloride on various hydroxyproline fractions in rat serum. **Mol Cell Biochem**, v.271, n.1-2, p.159-165, 2005.

SIKORSHI R, JUSZKIEWICZ T, PASZKOWSKI. Women in dental surgeries: reproductive hazards in occupational exposure to metallic Mercury. **Internal Arch Occupational Environ Health.**, v.59, p.551-557, 1987.

SUGAWARA N, et al. Decreased hepatobiliary secretion of inorganic mercury, its deposition and toxicity in Eisai hyperbilirubinemic rat with no hepatic canalicular organic anion transporter. **Toxicology**, v.126, p.23-31, 1998.

TOIMELA T, SALMINEN L, TÄHTI H. Intracellular changes after exposure to mercuric chloride. **Toxicology Letters**, v.95, n.1, p.171-171, july, 1998.

VALKO M, et al. Free radicals, metals antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-biological interactions**, v. 160, n.1, p. 1-40, march 2006.

VASSALLO DV, et al. Ações tóxicas agudas do mercúrio sobre o aparelho cardiovascular. Centro médico da universidade federal do Espírito Santo. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.67, n.1, p.39-45, jul. 1996.

YONAGA T, et al. Effect of organic and inorganic mercury compounds on the growth of incisor and tibia in rats. **Anat. Anz.**, v.159, n.1-5, p.373-383, 1985.

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

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