

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

**EFEITOS DO CLORETO MERCÚRICO SOBRE O TECIDO
ÓSSEO DE RATOS**

JOSÉ APARECIDO FERREIRA

SÃO CARLOS
2008

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

**EFEITOS DO CLORETO MERCÚRICO SOBRE O TECIDO
ÓSSEO DE RATOS**

JOSÉ APARECIDO FERREIRA

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

Orientadora: Profa. Dra. Keico Okino Nonaka

SÃO CARLOS
2008

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

F383ec

Ferreira, José Aparecido.

Efeitos do cloreto mercúrico sobre o tecido ósseo de ratos
/ José Aparecido Ferreira. -- São Carlos : UFSCar, 2008.
66 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2008.

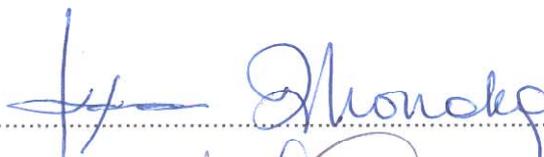
1. Osso. 2. Cloreto mercúrico. 3. Biomecânica óssea. 4.
Densidade mineral óssea. 5. Rato. I. Título.

CDD: 619.93 (20^a)

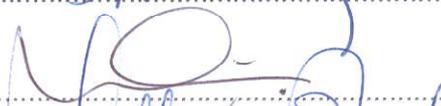
Universidade Federal de São Carlos
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Defesa de Dissertação de José Aparecido Ferreira

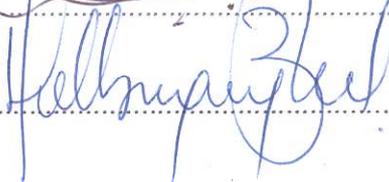
Prof. Dra. Keico Okino Nonaka.....



Prof. Dr. Mário Jefferson Quirino Louzada.....



Prof. Dr. Francisco José Albuquerque de Paula.....



Orientadora
Profa. Dra. Keico Okino Nonaka

Esse trabalho recebeu apoio financeiro à
pesquisa da CNPq.

"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."

Martin Luther King

À minha noiva, Edilene, por ter sido meu alicerce emocional nesta trajetória.

Aos meus pais, Antonio (in memoriam) e Maria, pelo apoio e confiança em mim depositados.

A todos os meus irmãos por terem acreditado e apostado em mim durante todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, em especial:

À Deus, por ter me dado força para conseguir tal realização;

À Profa. Dra. Keico Okino Nonaka, pela oportunidade em participar deste programa de Pós-graduação, e de conviver com sua competência e ética profissional no decorrer deste tempo;

Aos meus pais pela educação, compreensão e amor incondicional na minha juventude, sempre me incentivando em busca de meus sonhos, mesmo que estes parecessem distantes e difíceis de se realizar;

À minha noiva pelo eterno companheiro e apoio nos momentos difíceis.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas, pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho, especialmente Sr. Sérgio Dias;

À Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo por ter disponibilizado seu laboratório (Laboratório de Farmacologia, Bioquímica e Biologia Molecular / Departamento de Ciências Fisiológicas – UFSCar) para a utilização do espectrofotômetro;

À Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes pela utilização do leitor de micro placas (ELISA) do Laboratório de Histologia e Microscopia / Departamento de Ciências Fisiológicas – UFSCar.

Ao Prof. Dr. Elson Longo pela utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) do Laboratório de Análise Microestrutural, Departamento de Química – UFSCar. E também ao técnico de laboratório Rorivaldo de Camargo e o mestrando Ricardo Luís Tranquilin pela ajuda na preparação das amostras e realização da análise.

Aos professores Dra. Ana Cláudia Garcia de Oliveira Duarte / Departamento de Educação Física e Motricidade Humana – UFSCar, Dra. Ana Lúcia Kalinin / Departamento de Ciências Fisiológicas (Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa) – UFSCar e Dr. José Marcos Alves / Departamento de Engenharia Elétrica – USP (São Carlos) pelas contribuições importantes no exame de qualificação.

Aos (ex e atuais) pós-graduandos do Laboratório de Neuroendocrinologia, Daniel Mochiutti, Juciléia Barbosa Bezerra, Fernando Vidal D'Ávila, Charles Chenwei Wang, Fabio Alexandre, Valéria Matos, Edvanina de Souza Costa Queiroz, Lucélia Maria Albertin e Adriana Edler Macagnan pelo companheirismo indispensável ao cumprimento deste trabalho.

À Ronaldo Soares, amigo das partidas de xadrez, obrigado pela sua amizade e apoio concedidos em momentos difíceis.

Aos meus amigos de república: Carlos Henrique, Thiago Moraes e Guilherme Yukio Goto pelo companheiro ao longo desses anos e pelos momentos de descontração em momentos difíceis.

À minha sogra Julinda pelo apoio e compreensão ao longo desses anos.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Á Profa. Dra. Keico pela orientação, exemplo de profissionalismo e pelo apoio recebido quando iniciei esta jornada.

Á sua disponibilidade irrestrita, sua forma exigente, crítica e criativa de argüir as idéias apresentadas, me ajudaram a crescer pessoalmente e profissionalmente.

Obrigado pela oportunidade!!!

RESUMO

O mercúrio é utilizado na indústria, medicina, agricultura e outros campos. Pouco se sabe sobre seu envolvimento com o metabolismo ósseo. O objetivo desse estudo foi avaliar possíveis alterações físicas, bioquímicas e biomecânicas ósseas em ratos adultos intoxicados com cloreto mercúrico durante seu desenvolvimento. Os animais foram divididos em grupo contaminado e controle, sendo 10 ratos machos tratados com salina 0,9% (0,1 ml/100g PC) e 8 ratos machos tratados com cloreto mercúrico (2,5 mg/Kg PC), durante 5 dias/semana, por 60 dias pelo método de gavagem gástrica. O peso corporal, comprimento femoral e espessura das diáfises femorais foram mensurados. As propriedades (força máxima e de ruptura, rigidez e resiliência) dos fêmures foram mensuradas através do teste de flexão à três pontos em uma máquina universal modelo Instron 4444. Através do Princípio de Arquimedes, calculou-se o volume ósseo, e a partir deste parâmetro as densidades óssea e mineral foram determinadas utilizando as propriedades físicas: peso seco, peso imerso, peso úmido e das cinzas. O peso corporal, comprimento e o diâmetro menor do fêmur não foram diferentes entre os grupos, porém o diâmetro maior aumentou no grupo contaminado ($p=0,0002$). Houve aumento do volume ósseo ($p=0,0044$) e diminuição da densidade mineral ($p=0,0009$) e percentual de material mineral ($p=0,0001$) dos fêmures do grupo contaminado, porém essas alterações não foram suficientes para provocar alteração dos parâmetros biomecânicos. A contaminação com cloreto mercúrico na dose de 2,5 mg/Kg PC causou pequena alteração do desenvolvimento ósseo dos ratos, como pode ser observado pela alteração dos parâmetros biométricos e biofísicos, mas não suficiente para alterar os parâmetros bioquímicos e biomecânicos do fêmur.

Palavras chaves: tecido ósseo, cloreto mercúrico, biomecânica óssea, densidade mineral, ratos.

ABSTRACT

The mercury is used in the industry, medicine, agriculture and other fields. However, little is known about its involvement with the bone metabolism. The aim of this study was to evaluate the physical, biochemical and biomechanical bone parameters in adult rats contaminated with mercuric chloride during the development phase. The animals were separated as control group: 10 male rats treated with saline 0.9% (0,1 ml/100g BW) and contaminated group: 8 male rats treated with mercuric chloride (2.5 mg/Kg BW). The animals were treated during 60 days, 5 days/week, by stomacal gavage. The body weight, femoral length and diaphysis thickness were measured. The mechanical properties (maximum and failure forces, stiffness and yield) of femurs were evaluated by the three-point bending test using the universal machine Instron model 4444. The bone volume was estimated by the Archimedes Principle. The wet and ash weight were also determined. The body weight, length and minor diameter of the femurs were not different between the groups; however the major diameter increased in contaminated group ($p=0.0002$). It was observed an increase ($p=0.0044$) of bone volume and a decrease of the bone mineral density ($p=0.0009$) and of the percentage of mineral material ($p=0.0001$) of the femurs of the contaminated group. The bone response to biomechanical test was similar in both groups. The rat contamination with mercuric chloride in the dose of 2.5 mg/Kg BW caused small alteration in the development of bones, as observed by the biometrical and biophysical parameters analyzed. However these alterations were not enough to induce modification of the biomechanical and biochemical parameters.

Key words: bone tissue, mercuric chloride, bone biomechanics, mineral density, rat.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|--|----|
| FIGURA 1. | Máquina universal Instron (modelo 4444) utilizado para o ensaio de flexão a três pontos em fêmur de rato | 29 |
| FIGURA 2. | Gráfico força x deformação, obtido com o teste de flexão, utilizado para determinação das propriedades biomecânicas | 30 |
| FIGURA 3. | Esquema para coleta de amostra da diáfise tibial para análise por MEV. | 32 |
| FIGURA 4. | Micrografia da área superficial da tíbia direita obtida por Espectometria por Dispersão de Raios-X mostrando a incorporação do mercúrio. | 35 |
| FIGURA 5. | Micrografia da área interna da tíbia direita obtida por Espectometria por Dispersão de Raios-X mostrando a incorporação do mercúrio. | 35 |
| FIGURA 6. | Evolução ponderal dos animais dos grupos controle e contaminado durante os 60 dias de tratamento. | 36 |
| FIGURA 7. | Média \pm EPM dos pesos corporais (PC) inicial e final e ganho de peso dos ratos dos grupos controle e contaminado. | 37 |
| FIGURA 8. | Parâmetros biométricos do fêmur dos ratos dos grupos experimentais controle e contaminado. | 39 |
| FIGURA 9. | Parâmetros físicos do fêmur dos ratos dos grupos experimentais controle e contaminado. | 41 |
| FIGURA 10. | Conteúdo de Cálcio e Fósforo dos fêmures dos animais dos grupos controle e contaminado. | 42 |
| FIGURA 11. | Concentrações plasmáticas de Cálcio e Fósforo dos animais dos grupos controle e contaminado. | 43 |
| FIGURA 12. | Força máxima e de ruptura, rigidez e resiliência dos fêmures dos animais dos grupos controle e contaminado. | 45 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|--|----|
| TABELA 1. | Espectometria de Dispersão de Raios-X (EDX) da região superficial da tíbia mostrando a composição percentual (%) dos elementos Ca, P, Hg e de outros elementos (Cl, O, C, Na, Mg). | 34 |
| TABELA 2. | Espectometria de Dispersão de Raios-X (EDX) da região interna da tíbia mostrando a composição percentual (%) dos elementos Ca, P, Hg e de outros elementos (Cl, O, C, Na, Mg). | 34 |
| TABELA 3. | Peso corporal (PC) inicial e final, e ganho de peso dos animais dos grupos controle e contaminado. | 36 |
| TABELA 4. | Comprimento, diâmetros maior e menor das diáfises femorais e peso úmido, imerso, seco e das cinzas do fêmur dos animais dos grupos controle e contaminado. | 38 |
| TABELA 5. | Volume ósseo, densidade óssea e mineral, porcentual de água no osso e porcentual de material orgânico e mineral do fêmur dos animais dos grupos controle e contaminado. | 40 |
| TABELA 6. | Conteúdo de Cálcio e Fósforo dos fêmures dos animais dos grupos controle e contaminado. | 42 |
| TABELA 7. | Concentrações plasmáticas de Cálcio e Fósforo dos animais dos grupos controle e contaminado. | 43 |
| TABELA 8. | Força máxima e de ruptura, rigidez e resiliência dos fêmures dos animais dos grupos controle e contaminado. | 44 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP Enzima Fostase Alcalina

BMPs Proteínas Morfogenéticas Ósseas

Ca⁺⁺ Cálcio

CHO-K1 Linhagem celular de ovário de hamster

DCF Departamento de Ciências Fisiológicas

EDX Espectometria de Dispersão de Raios-X

EPM Erro padrão da média

F Força

FGF Fator de Crescimento Fibroblástico

GM-CFU Unidades Formando Colônias de Granulócitos e Macrófagos

GSH – Px Enzima Glutationa Peroxidase

H₂O₂ Peróxido de Hidrogênio

Hg Mercúrio

HgCl₂ Cloreto mercúrico

Hg₂Cl₂ Cloreto mercurioso

IGF Fator de Crescimento Semelhante à Insulina

M-CSF Fator Estimulante da Colônia de Macrófagos

MEC Matriz extracelular

MED Média

MEV Microscópio Eletrônico de Varredura

MMPs Metalopeptidases de matriz

2 N Dois Normal

n Número de animais

NPSH Grupos Protéicos Não Tiólicos

O- Superóxido de oxigênio

OAT1 Transportador de Ânion Orgânico 1

OAT3 Transportador de Ânion Orgânico 3

OH Radical Hidroxil

OPG Osteoprotegerina

ρ Rô

P Fósforo

PC Peso corporal

PDGF Fator de Crescimento Derivados de Plaquetas

PGE2 Prostaglandina E2

Pi Peso imerso

Pm Peso do material mineral (cinzas)

Ps Peso seco

PTH Hormônio da paratireóide

Pu Peso úmido

ROS Espécies reativas de oxigênio

SH Grupos sulfidrílicos

Tang θ Tangente de Theta

TGF β Fator de Crescimento Transformante Beta

TRAP Tartrate-resistant acid phosphatase (Fosfatase Ácida Resistente ao Tartrato)

vs Versus

°C Graus Celsius

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 2. OBJETIVOS..... | 26 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 27 |
| 3.1 Modelos de Estudo..... | 27 |
| 3.2 Animais..... | 27 |
| 3.3 Protocolo Experimental..... | 27 |
| 3.4 Sacrifício..... | 28 |
| 3.5 Parâmetros Analisados..... | 28 |
| 3.5.1 Biométricos..... | 28 |
| 3.5.2 Biomecânicos..... | 29 |
| 3.5.3 Físicos..... | 30 |
| 3.5.4 Bioquímicos..... | 32 |
| 3.5.5 Análise Microestrutural..... | 32 |
| 3.6 Análises Estatísticas..... | 33 |
| 3.7 Normas metodológicas..... | 33 |
| 4. RESULTADOS..... | 34 |
| 4.1 Análise Microestrutural..... | 34 |
| 4.1 Parâmetros Biométricos..... | 36 |
| 4.1.1 Peso Corporal..... | 36 |
| 4.1.2 Análise do Fêmur Direito..... | 37 |
| 4.2 Parâmetros Físicos..... | 39 |
| 4.3 Parâmetros Bioquímicos..... | 42 |
| 4.4 Parâmetros Biomecânicos..... | 44 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 46 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 54 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 55 |
| APÊNDICE..... | 66 |

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é constituído de células e uma matriz extracelular que contém componentes orgânicos (35%) e inorgânicos (65%). A fase orgânica tem muitas funções, dentre elas, determina a estrutura e as propriedades mecânicas ósseas e é composta da matriz óssea ou osteóide e das células ósseas do tecido ósseo. A matriz óssea é formada principalmente por colágeno tipo I e outras moléculas como fatores de crescimento, citocinas e proteínas da matriz extracelular (osteonectina, osteopontina, sialoproteínas ósseas, osteocalcina, proteoglicanos, fosfoproteínas e proteolipídeos, perfazendo 98% do material orgânico ósseo). Os 2% restantes são formados pelas células ósseas, os osteoblastos, responsáveis pela formação da matriz óssea; os osteócitos, que representam os osteoblastos que ficam circundados pela matriz óssea e os osteoclastos que são células multinucleadas, responsáveis pela reabsorção óssea (EINHORN, 1996; FERNANDEZ et al., 2006a).

A fase mineral (inorgânica) é composta principalmente de um mineral contendo maiores quantidades de cálcio, fosfato e carbonato formando os cristais de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO)_6(OH)_2]$ e menores quantidades de magnésio, sódio, potássio, manganês e flúor em associação às fibras de colágeno (FERNANDEZ et al., 2006a). Na superfície do cristal, os íons são mantidos por cargas eletrostáticas. Apenas íons com propriedades químicas semelhantes às do elemento que compõe o cristal pode realmente penetrar e tornar-se parte do cristal. Além disso o estrôncio e o chumbo podem repor e substituir as posições do cálcio na hidroxiapatita; o fluoreto ou cloreto podem substituir o íon hidroxila (TUREK, 1991).

O tecido ósseo possui funções importantes como servir de suporte para as partes moles e proteger os órgãos vitais como os que estão contidos na caixa torácica e craniana. Os ossos ainda servem como locais de inserção para músculos e assim agem como alavancas para locomoção. Outra função é servir como depósito de minerais, sobretudo de cálcio e fosfato. O esqueleto ainda serve como segunda linha de defesa contra acidose e devido à sua vasta área de superfície mineral pode adsorver toxinas e metais pesados minimizando seus efeitos sobre outros tecidos (LOVERIDGE, 1999; RAISZ, 1999; FERNANDEZ et al., 2006a).

No tecido ósseo, destacam-se os seguintes tipos celulares: osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Os osteoblastos são as células formadoras do tecido ósseo e derivam de células primitivas, as osteoprogenitoras. Diversos fatores, como proteínas e fatores de

crescimento, estimulam a diferenciação das células osteoprogenitoras em osteoblastos. Uma classe dessas proteínas que possui importante função regulatória durante o processo de diferenciação osteoblástica tanto *in vivo* como *in vitro* é a das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). Quando ativos, os osteoblastos depositam colágeno, principalmente do tipo I, na matriz extracelular adjacente em arranjos regulares que futuramente serão calcificados pela deposição de cristais de hidroxiapatita e passarão a ser denominados de osteócitos. Os osteoblastos e os osteócitos se comunicam por proteínas de membrana (conexina 43) ou integrinas, que agem como um fator de ligação entre essas células ou entre uma célula e a matriz extracelular, permitindo a passagem de mensageiros, tais como cálcio, citocinas e prostaglandinas. Os osteócitos também mantêm a comunicação entre eles através de prolongamentos com os osteócitos adjacentes em canaliculos presentes no interior do osso, mantendo dessa forma o equilíbrio e a manutenção do tecido ósseo. Uma função importante do osteócito e que vem sendo amplamente estudada é a sua participação como célula responsável por traduzir a força mecânica imposta ao osso em sinais bioquímicos que regulam o turnover ósseo (MARCUS, FELDMAN, KELSEY, 1996; NOMURA, YAMAMOTO, 2000; PALUMBO et al., 2001; MACKIE, 2003; BAUER et al., 2004; BONEWALD, 2004; FERNANDEZ et al., 2006b; RUBIN, RUBIN, JACOBS, 2006).

Já os osteoclastos, são células que reabsorvem tecido ósseo e originam-se de células mononucleadas hematopoiéticas conhecidas como “Granulocyte-Macrophage Colony-Forming Units” (GM-CFU), precursoras de macrófagos e monócitos. Os osteoblastos são células com importante papel durante a fase inicial da osteoclastogênese (formação de células multinucleadas gigantes) através da produção do Fator Estimulante da Colônia de Macrófagos (M-CSF). Existem três chaves moleculares que regulam esse processo: OPG (osteoprotegerina, uma proteína solúvel sintetizada por osteoblastos e pré-osteoblastos), RANKL (um ligante situado sobre a superfície dos osteoblastos e pré-osteoblastos) e RANK (um receptor situado na membrana de osteoclastos e pré-osteoclastos). A interação entre RANKL e seu receptor inicia a atividade e diferenciação osteoclástica, aumentando a reabsorção. A ligação de OPG a RANK inativa esse receptor, sendo assim a diferenciação osteoclástica é inibida. A regulação sistêmica se dá principalmente através da ação do hormônio da paratireóide (PTH) que tem seu receptor nos osteoblastos, e uma ação parácrina sobre os osteoclastos. Nessas células, o PTH ativa a reabsorção do tecido mineralizado com a finalidade da manutenção das concentrações dos íons de cálcio no sangue. Os osteoclastos atacam a superfície óssea mineralizada e iniciam a absorção pela secreção de íons de hidrogênio e enzimas lisossomais, tais como a catepsina K, os quais podem degradar todos os

componentes da matriz óssea, incluindo colágeno, em baixo pH (MARCUS, FELDMAN, KELSEY, 1996; RAISZ, 1999; PALUMBO et al., 2001; TROEN, 2003; FERNANDEZ et al., 2006b).

A formação do esqueleto ocorre por dois processos distintos:

1) Ossificação intramembranosa: ocorre durante o desenvolvimento do embrião pela transformação direta das células mesenquimais em osteoblastos. Esse tipo de ossificação está restrita a alguns ossos do crânio, face e partes da mandíbula e clavícula. Os ossos do crânio crescem em direção ao centro de ossificação primária e se encontram nas suturas. As suturas são domínios celulares fibroblásticos compostas de periósteo de ossos adjacentes. O centro da sutura contém uma população de células em proliferação que se diferenciam e migram em direção à superfície óssea adjacente, tornando-se osteoblastos. Durante a migração essas células produzem colágeno tipo III em baixa quantidade, tipos V e XI em quantidade média e finalmente colágeno tipo I, o principal colágeno ósseo (WURTZ et al., 1998).

2) Ossificação endocondrial: processo de formação óssea na qual o osso é formado a partir de um molde de cartilagem. Em tal processo as células mesenquimais se diferenciam em células cartilaginosas, refletindo a posição e a forma do osso a ser formado. O crescimento longitudinal resulta da proliferação e da atividade metabólica dos condrócitos na placa de crescimento, que pode ser subdividida em várias zonas distintas, na qual as células podem ser caracterizadas pela sua forma, tamanho e atividade metabólica específicas.

a) Zona de repouso: encontram-se condrócitos em repouso e que são recrutados para a zona de proliferação.

b) Zona de proliferação: os condrócitos se dividem e após um número de divisões, estas células param a divisão e entram na zona de hipertrofia.

c) Zona de hipertrofia: os condrócitos hipertrofiados produzem uma abundante matrix extracelular que mais tarde se tornará mineralizada. A seguir os condrócitos sofrem apoptose.

A regulação do crescimento longitudinal ainda não é completamente entendida, mas sabe-se que há uma grande variedade de fatores locais e sistêmicos envolvidos neste processo como por exemplo: fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF-I), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento transformante beta (TGF β), 1,25 dihidroxivitamina D3, hormônio paratireóideo (PTH), entre outros (LOVERIDGE, 1999).

O crescimento ósseo em diâmetro é acompanhado mais basicamente pela formação externa (periósteo) e reabsorção interna (endósteo). Este processo ocorre restritamente na região central dos ossos longos. Na região apical de um osso longo em crescimento, o colar periósteo cerca externamente parte da placa de crescimento e se estende

muito mais longe periféricamente do centro ósseo. Assim, durante o crescimento ósseo, com a extensão de um novo colar periosteal, o velho colar periosteal é removido e modificado em direção ao centro ósseo. Este processo é acompanhado pela formação sobre a superfície periosteal e reabsorção sobre a superfície endosteal (BILEZIKIAN, RAISZ, RODAN, 1996).

O tecido ósseo é vital e dinâmico, mantendo-se em constante modificação. Este dinamismo está ligado a vias metabólicas associadas à homeostasia mineral e é necessário para manter sua integridade estrutural e manutenção dos estoques de cálcio e fósforo. Esse processo denominado remodelamento ósseo é regulado pelas células responsáveis pela formação e reabsorção do tecido, osteoblastos e osteoclastos, respectivamente, que liberam uma grande variedade de enzimas, tendo o papel de desempenhar o *turnover* da matriz extracelular (MEC). O remodelamento inclui funções metabólicas integrais para o *turnover* do colágeno fibrilar e a deposição e reabsorção de tecido. O sistema apresentado é de essencial importância para os tecidos, e estas enzimas proteolíticas extracelulares atuam no remodelamento tecidual (STERNLICHT, WERB, 2001).

O processo de remodelamento ósseo ocorre em resposta a sinais químicos, mecânicos, elásticos e eletromagnéticos. Em condições normais, o equilíbrio entre a formação e a reabsorção visa garantir a integridade das funções do esqueleto, mantendo a sua competência biomecânica, prevenindo-o contra o acúmulo de perigosas fadigas e protegendo os componentes teciduais para que estes estejam sempre disponíveis para manter o equilíbrio mineral (HILL, ORTH, 1998; FERNANDEZ et al., 2006b).

O processo de remodelamento ósseo é cíclico e envolve os seguintes estágios: quiescência, ativação, reabsorção, formação e mineralização. Durante o estágio de quiescência, a superfície óssea encontra-se inativa com respeito ao remodelamento, sendo coberta por uma fina camada de células de revestimento (osteoblastos modificados). O sinal que inicia o processo de remodelamento ainda é desconhecido, mas evidências demonstram que as células de revestimento possuem receptores para fatores sistêmicos e locais, como paratormônio (PTH) e prostaglandina E2 (PGE2), que quando estimulados fazem com que tais células sintetizem e liberem proteases e exponham uma pequena área de matriz óssea mineralizada (EINHORN, 1996; HILL, ORTH, 1998). Uma classe destas proteases responsáveis pela exposição da matriz óssea mineralizada e do remodelamento da MEC é a das metalopeptidases de matriz (MMPs). As MMPs são enzimas responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção da MEC, desempenhando papel importante na remodelação da mesma em vários processos fisiológicos e patológicos (VU, WERB, 2000). Em tecidos

ricos em colágeno como tecido ósseo, a organização da MEC envolve vários fatores inibidores e estimuladores.

A partir de tal evento, ocorre a conversão desta pequena superfície da quiescência para atividade, referida como ativação. As células mononucleares do sistema fagocitário são atraídas para esta superfície, ancoram-se e fundem-se, originando os osteoclastos. O estágio seguinte é a reabsorção, quando os osteoclastos começam a erodir uma cavidade de forma e dimensões características, denominada lacuna de Howship no osso trabecular e cone de reabsorção no osso cortical. Este processo permite a liberação de fatores de crescimento presentes dentro da matriz, fundamentalmente fator de crescimento transformante beta (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento semelhante à insulina I e II (IGF-I e II) e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). Em seguida tem início o estágio de formação, nos quais os fatores liberados durante a fase de reabsorção estimulam a diferenciação dos pré-osteoblastos. Em poucos dias, o osteoblasto diferenciado inicia a síntese da matriz óssea, que posteriormente é mineralizada, a cavidade produzida pelos osteoclastos é preenchida e a superfície óssea retorna à quiescência. A duração do estágio de formação é de aproximadamente 3 meses e o ciclo de remodelamento ósseo leva aproximadamente 4 meses para ser completado, porém um período de 3 a 6 meses é requerido para o osso tornar-se plenamente maduro (PARFITT, CHIR, 1987; HILL, ORTH, 1998; FERNANDEZ et al., 2006b).

O desenvolvimento do tecido ósseo ocorre através de constantes modificações do tecido ao longo da vida. Essas alterações fisiológicas no homem ocorrem através de uma relação entre formação e reabsorção do tecido ósseo, que tem seu pico máximo de desenvolvimento até os 30 anos de idade, prevalecendo a formação. Entre os 35 e 40 anos ocorre uma estabilização entre esses dois mecanismos, e após esse período a reabsorção prevalece, levando à diminuição progressiva de massa óssea. No período de predominância da reabsorção óssea, tanto o homem quanto a mulher perde cerca de até 0,3% de massa óssea ao ano. Na mulher, a perda de massa óssea é maior nos 10 primeiros anos pós-menopausa, podendo chegar a 3% ao ano, e é maior na mulher sedentária. A constante formação e reabsorção em estado fisiológico são importantes, pois contribuem para a preservação de um tecido sempre novo e de boa qualidade funcional o que preserva a integridade mecânica (VAANANEN, 1991; YAMAMOTO, JEE, MA, 1995; MARCUS, FELDMAN, KELSEY, 1996).

O processo de formação do tecido ósseo pode ser influenciado por diversos fatores tais como hormonais, alimentação, genética, sexo, idade, doenças intercorrentes e

fatores ambientais (YONAGA et al., 1985; MARCUS, FIELDMAN, KELSEY, 1996; SCHIRRMACHER et al., 1998; JIN et al., 2002; AKHTER et al., 2004; NGUYEN et al., 2003; DOREA, DONANGELO, 2006; VAHTER et al., 2007).

O mercúrio é um poluente ambiental encontrado em toda biosfera em três formas básicas: mercúrio elemento, orgânico e inorgânico. A principal origem natural do mercúrio é o desgaste da crosta terrestre, emissão por vulcões e evaporação oriunda do metabolismo de animais aquáticos. O homem utiliza diversas formas de mercúrio e depois libera para o ambiente, causando aumento da sua concentração no ambiente. Os principais poluidores são as indústrias, garimpeiros, desmatamentos, agriculturas, tintas e uso laboratorial (ZAVARIZ, GLINA, 1993; SANTOS et al., 1995; JARÜP, 2003; SANTOS et al., 2003). Algumas formas de mercúrio, como o cloreto mercúrico, ainda é amplamente utilizado em certos tipos de baterias domésticas, lâmpadas elétricas, incluindo lâmpadas fluorescentes, interruptores e em termômetros (CLARKSON, 1997). A população em geral pode ser exposta a esta forma de mercúrio através da água, alimentos contaminados e através de amálgamas dentários. Ainda a presença dessa forma do metal em conjunto com as demais, tem sido associada com a intoxicação humana em áreas de mineração (DRASH et al., 2001). A forma mercúrica, cujo principal representante é o cloreto de mercúrico (HgCl_2), é alvo de inúmeras investigações porque além de sua toxicidade intrínseca, é atribuída a ela a toxicidade do mercúrio elementar e, parcialmente, a do metilmercúrio, uma vez que, por oxidação e desmetilação, respectivamente, ambas as formas são convertidas em Hg^{2+} (PATRICK, 2002). Um estudo realizado pela U.S Department of Health and Human Services (NTP, 1993) relata as possíveis mudanças que podem ocorrer devido a algumas atividades microbianas que são capazes de converter mercúrio inorgânico em metilmercúrio orgânico, mercúrio orgânico em inorgânico, ou ainda, em condições apropriadas, formar mercúrio metálico.

Desastres em massa ocorreram mundialmente como nas cidades de Minamata (sul do Japão) entre 1950 e 1960, cuja catástrofe foi protagonizada pela fábrica Chisso Corporation que usava o mercúrio inorgânico como catalizador para a fabricação de plástico e, na década de 30, iniciou a deposição de seus efluentes industriais nesse local. As águas foram contaminadas e o metal pesado foi convertido à uma de suas formas orgânicas denominada metilmercúrico, que é mais tóxica que a forma inorgânica. A intoxicação da população ocorreu através do consumo de peixe contaminado com metilmercúrio, causando alterações do sistema nervoso central (SNC). Em outro desastre ocorrido no Iraque em 1970,

3000 pessoas foram hospitalizadas e 100 morreram após consumir grãos tratados com fungicida organomercurado (CASTOLD et al., 2001).

A restrição global do uso de mercúrio, como recomendada por órgãos governamentais e organizações ambientais nem sempre é respeitada (CLARKSON, 1997). Nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, como no Brasil, o mercúrio ainda é amplamente utilizado na atividade de mineração do ouro, assim a exposição ocupacional ocorre nos garimpeiros e na população das imediações do garimpo. Estudos realizados na região do rio Tapajós, considerado o maior afluente do rio Amazonas e área de mineração, tem demonstrado que o mercúrio está presente em todos os compartimentos do meio ambiente. Nessa região onde o peixe é a principal fonte de alimento diária, os níveis de exposição ao mercúrio, medidas em raiz de cabelo, variaram até mais de 150ug/g, nível considerado tóxico (AMORIM et al., 2000).

A legislação brasileira (NR 7/78), anexo 1, do Ministério do Trabalho e Emprego) determina o limite de referência da normalidade de mercúrio na urina (HgU) em 5µg/g de creatinina para a população, de 35 µg de Hg/g de creatinina para o trabalhador e 40 µg de mercúrio/m³ no ar, que são muitas vezes ultrapassados. Sendo assim, o risco de intoxicação é alto (FARIA, 2003).

ZAVARIZ, GLINA (1993) realizaram uma pesquisa com objetivo de verificar a intoxicação por mercúrio metálico em trabalhadores de uma indústria de lâmpadas elétricas localizada na cidade de São Paulo, e concluíram que 84,62% dos trabalhadores estavam intoxicados. Relataram sobre a gravidade do problema em virtude da natureza da doença, que acomete áreas nobres do organismo e da ineficácia dos tratamentos diante da intoxicação. Os danos causados pelo mercúrio são graves, e em grande parte dos casos, permanentes.

As pesquisas sobre a influência da contaminação por metais pesados em tecidos biológicos se destacaram quando se buscou compreender melhor as modificações orgânicas em humanos, principalmente em tecido nervoso central, cardíaco, gastrointestinal, hepático e renal. O cloreto mercúrico é um dos sais mercuriais mais tóxicos devidos a sua alta solubilidade em água e sua absorção pelo trato gastrointestinal, que está na faixa de 7% (VON BURG, GREENWOLD, 1991). Esta forma de mercúrio acumula-se principalmente nos rins, fígado, baço, medula óssea, intestino, pele e mucosa respiratória (FUORTES et al., 1995).

Todas as formas de mercúrio são tóxicas, devido à alta afinidade entre mercúrio e enxofre, ocorrendo ligação entre mercúrio e os grupos tiólicos de proteínas, peptídeos e aminoácidos. Essa interação com grupos sulfidrílicos de proteínas como as metalotioneínas, glutatona e cisteína está diretamente envolvida com a captação, acúmulo, transporte e

consequentemente, toxicidade do mercúrio. A indução da expressão de metalotioneínas é o principal efeito intracelular do mercúrio inorgânico divalente (ZALUPS, 2000; KARIMI et al., 2002). A interação do cloreto mercúrico com os grupos sulfidrílicos (SH) resulta em alteração de atividades enzimáticas como, por exemplo, das metaloproteinases de matriz, fundamentais ao processo de remodelamento tecidual (SOUZA, GERLACH, LINE, 2000; VU, WERB, 2000); inibição de enzimas antioxidantes estimulando a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) como o superóxido de oxigênio (O⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical hidroxil (OH) e assim, induzindo aumento da peroxidação lipídica, o que induz danos ao DNA e alteração da homeostase do cálcio (ELIA et al., 2003; BRANDÃO et al., 2006). O cloreto mercúrico também pode competir com o cálcio em múltiplos sítios de ligação, reduzindo o estoque de cálcio intracelular, o que afetaria os canais de junção do tipo “gap” (SCHIRRMACHER et al., 1998).

Alguns autores examinaram o efeito dos metais pesados como o mercúrio e o cádmio sobre a homeostasia do cálcio, analisando as concentrações plasmáticas de cálcio e calcitonina em peixe. Os autores avaliaram também a ação sobre osteoblastos e osteoclastos através da mensuração da atividade das enzimas fosfatase ácida resistente ao tartarato (*tartrate-resistant acid phosphatase* – TRAP) e fosfatase alcalina (*Alkaline phosphatase* – ALP) como respectivos indicadores da atividade de ambos os tipos celulares. Os resultados mostraram que o mercúrio agiu diretamente sobre as células ósseas, influenciando a homeostasia do cálcio e a atividade osteoclástica em curto tempo de exposição, porém, a longo prazo, inibiu a atividade osteoblástica (SUZUKI et al., 2004).

Vários trabalhos determinaram que animais não completamente desenvolvidos têm uma marcada sensibilidade quando expostos a metais pesados, praguicidas ou outros agentes tóxicos (MOSER, 2000; FERRI et al., 2003; SINGH, RISHI, 2005; DOREA, DONANGELO, 2006). A grande vulnerabilidade desses organismos quanto a agentes químicos está relacionada à imaturidade dos órgãos e membranas e à incapacidade de processar adequadamente os mesmos (NIES, SPIELBERG, 1996; TYL, 1998).

Muitos autores estudaram alterações do tecido ósseo em ratos durante seu desenvolvimento, demonstrando que o desenvolvimento ósseo nesses animais possui as mesmas características fisiológicas na formação e reabsorção que ocorre durante o desenvolvimento do tecido ósseo em humanos (BERG, HARMISSON, 1957; KALU et al., 1989; THOMPSON et al., 1995).

Existem alguns relatos sobre a influência de metais pesados, como o mercúrio, sobre as alterações do desenvolvimento ósseo em ratos durante a fase de crescimento.

YONAGA et al (1985) relataram inibição do crescimento longitudinal em tíbias de ratos contaminados com doses de 2, 4 e 8 mg/Kg PC de HgCl₂ (s.c.) por 6 dias. Outros autores como JIN et al (2002) observaram alteração da densidade mineral óssea de fêmures de ratos contaminados com a dose de 1mg/Kg PC (s.c.) mais anticorpo contra metalotioneína (10 µg/camundongo – s.c.), 3 vezes por semana por um período de 3 semanas. Estudos *in vitro* também observaram alterações em células ósseas contaminadas com Hg²⁺ intracelular (5µmol/L), como a redução do acoplamento elétrico mediado por conexina-43 em cultura de células como os osteoblastos, provavelmente esgotando os estoques de cálcio intracelular, já que a comunicação célula-à-célula via junções do tipo “gap” são sensíveis ao cálcio (SCHIRRMACHER et al., 1998).

Pouco se sabe sobre o envolvimento do HgCl₂ com o metabolismo mineral ósseo. Devido à carência de dados e a partir do conhecimento de alta gravidade da sua contaminação em virtude do acometimento dos órgãos alvos, e o seu efeito sobre o desenvolvimento do tecido ósseo, torna-se importante investigar os parâmetros ósseos influenciados pelo seu efeito nesse tecido.

2 OBJETIVOS

Geral:

Avaliar as possíveis alterações ósseas em ratos adultos intoxicados com HgCl_2 durante a fase de desenvolvimento.

Específicos:

- Analisar a incorporação do HgCl_2 no tecido ósseo através de Microscopia Eletrônica de Varredura (EDX – Espectrometria por Dispersão de Raios-X) da tíbia direita de animais intoxicados com HgCl_2 ;
- Analisar os parâmetros químicos ósseos através da análise das concentrações plasmáticas de cálcio e fósforo e conteúdo de cálcio e fósforo dos fêmures de animais intoxicados com HgCl_2 ;
- Analisar os parâmetros físicos ósseos de animais intoxicados com HgCl_2 ;
- Analisar os parâmetros biomecânicos ósseos através do teste de flexão a 3 pontos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelos do Estudo

Estudo experimental com modelo animal foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos Protocolo CEEA nº 007/2006.

3.2 Animais

Utilizou-se 18 ratos Wistar intactos com peso corporal inicial médio de 75g, com um mês de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar.

O experimento realizou-se no Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar. Os ratos foram mantidos no biotério deste laboratório, num regime de luz (10 horas claro e 14 horas escuro) e temperatura controlados (25 ± 2 °C). Os animais receberam ração comercial e água “ad libitum”

3.3 Protocolo Experimental

Analizou-se os efeitos do Cloreto Mercúrico sobre as características ósseas, dividindo aleatoriamente os animais nos seguintes grupos experimentais:

Grupo1 = 10 ratos intactos tratados com salina 0,9% (0,1 ml/100g PC)

Grupo2 = 08 ratos intactos tratados com cloreto mercúrico (2,5 mg/kg PC)

A dose de HgCl₂ foi escolhida por não alterar a curva ponderal dos animais contaminados (NTP, 1993). A administração do cloreto mercúrico e salina foram realizadas

durante cinco (5) dias/semana por um período de 60 dias utilizando o método de gavagem gástrica.

3.4 Sacrifício

Após 60 dias da administração de cloreto mercúrico e salina, os animais foram decapitados, o sangue foi coletado do tronco e foi realizada dissecação femoral direita para coleta do material ósseo, os quais foram mantidos em solução de salina 0,9% a -20°C até o dia da análise. Foi também coletada a tíbia direita para análise por MEV (Microscópio Eletrônico de Varredura) para detecção de mercúrio.

3.5 Parâmetros Analisados

3.5.1 Biométricos

Peso corporal

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

Medidas do comprimento do fêmur direito

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

Medidas das espessuras das diáfises femorais

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

3.5.2 Parâmetros Biomecânicos do Fêmur

As propriedades mecânicas dos fêmures direito foram mensuradas através do teste de flexão a três pontos realizado em uma máquina universal Instron modelo 4444 (FIGURA 1), com célula de carga com capacidade de 1 kN. As extremidades dos fêmures 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 (Figura1) (ROBLING, TURNER, 2002; SHIMANO, SHIMANO, VOLPON, 2002; AKHTER, 2003 et al., AKHTER et al, 2004).

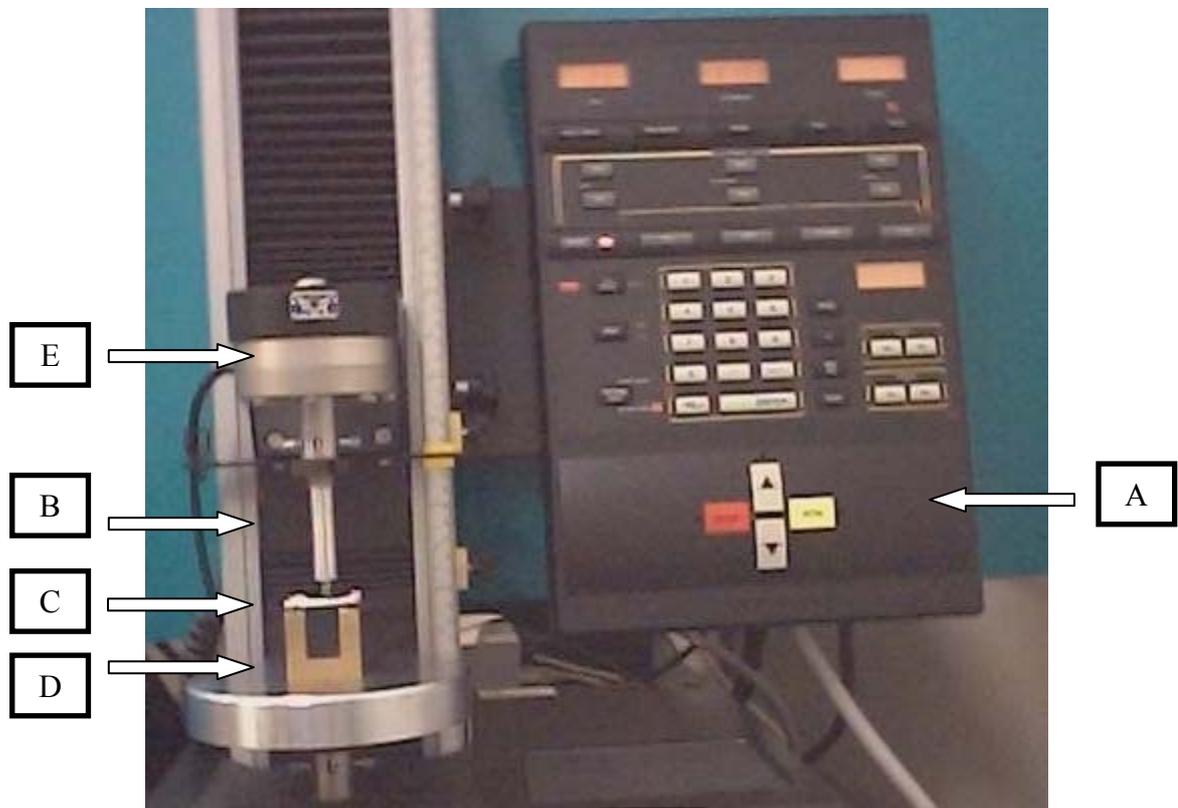


Figura 1: Máquina universal instron (modelo 4444) utilizado para o ensaio de flexão a três pontos em fêmur de rato. A: painel de controle; B: haste cilíndrica para a aplicação de carga (força); C: osso; D: suporte; E: célula de carga ligada à ponte de extensimetria.

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

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

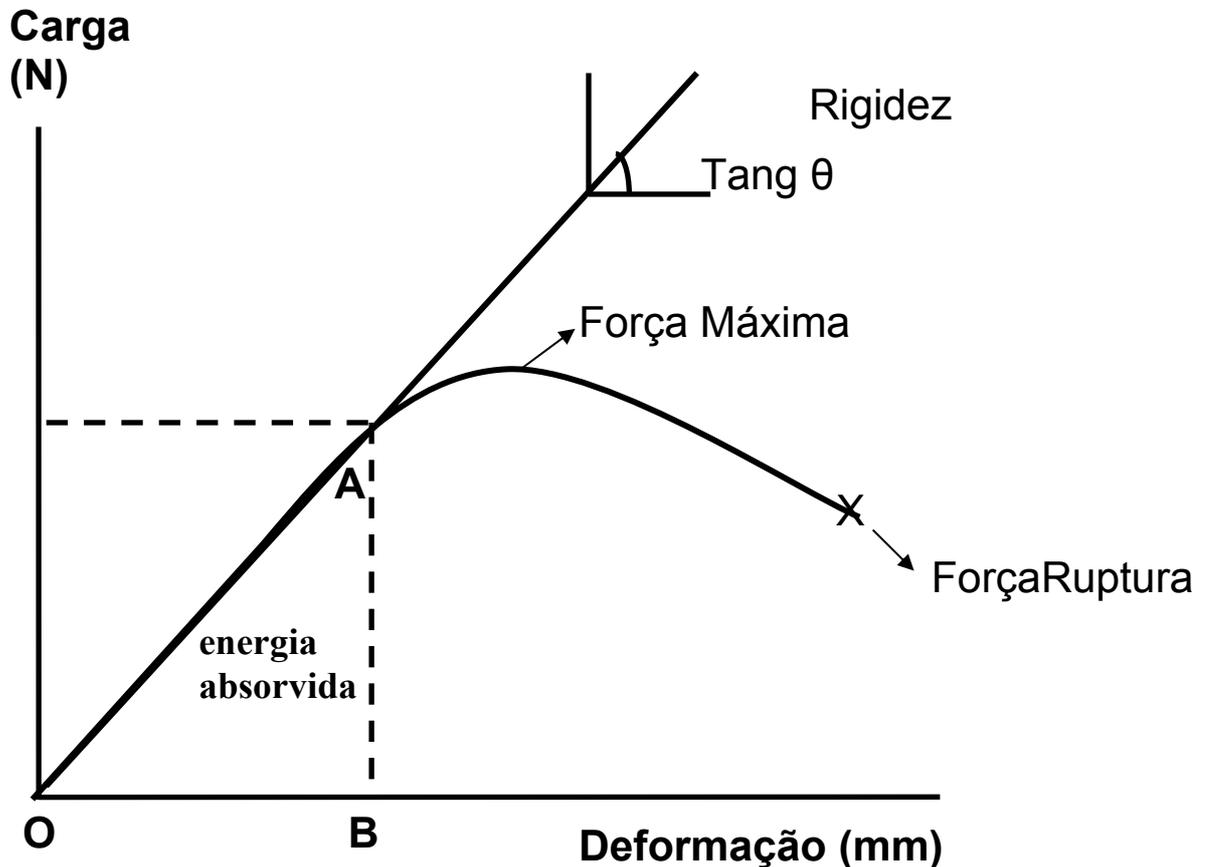


Figura 2: Gráfico força x deformação utilizado para determinação das propriedades biomecânicas, ilustrando o ponto máximo da força aplicada (limite máximo); curva AO – o cálculo de sua inclinação ($\text{Tang } \theta$) determina a rigidez do material e a região elástica AOB (o cálculo desta área determina a resiliência ou a energia absorvida pelo material na fase elástica).

3.5.3 Parâmetros Físicos dos Fêmures Direitos

Após as análises biométricas dos fêmures dos animais dos grupos controle e contaminado, os ossos foram mantidos em um dessecador por 24 horas com objetivo de retirar ar presente nos poros. Em seguida foram coletados os pesos imerso (P_i) e úmido (P_u). Esses dados foram coletados antes do ensaio biomecânico e, após o mesmo, os ossos foram colocados em uma estufa a 100°C durante 24 horas para serem desidratados e, a partir daí, obter-se o peso seco (P_s). Para obtenção do peso das cinzas (material mineral), os ossos foram

colocados em uma mufla a 800° C durante 24 horas. Todas as medidas citadas foram obtidas através de uma balança eletrônica (marca Chyo).

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

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

$$\text{Densidade óssea} = \frac{P_u}{\text{Volume Ósseo}} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

$$\text{Densidade mineral} = \frac{P_m}{\text{Volume ósseo}} \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

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

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

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

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

3.5.4 Análise Bioquímica

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

3.5.5. Análise Microestrutural

A análise microestrutural para detecção do Hg na tíbia direita dos animais foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizando um microscópio ZEISS (modelo DSM 940A) acoplado à um detector de dispersão de energia de raio-x (EDX) e um software analisador de imagens (INCA). Essas análises foram realizadas no Laboratório de Caracterização Microestrutural – Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

Para o preparo das amostras foi realizado um corte transversal na diáfise do osso em questão, retirando uma baguete óssea (5mm) que posteriormente foi cortada longitudinalmente (FIGURA 3), objetivando a análise da região superficial e também da região interna.

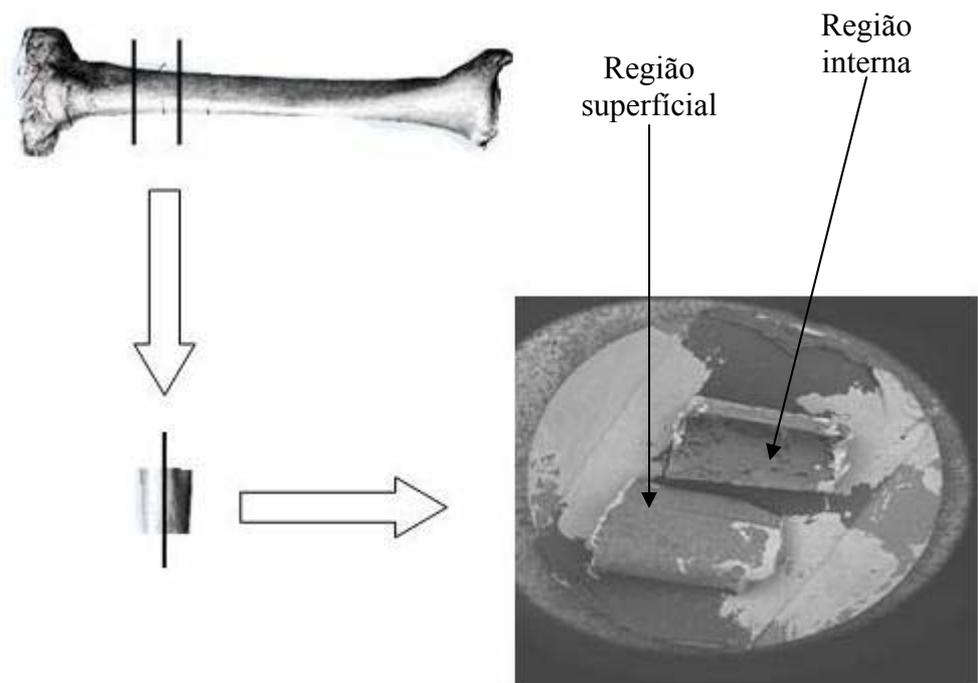


Figura 3: Esquema para coleta de amostra da diáfise tibial para análise por MEV.

Após a preparação, as amostras foram fixadas com fita de carbono nos suportes, colocadas em contato com uma tinta à base de prata para facilitar o fluxo dos elétrons e foram recobertas com uma fina camada de ouro (Sputter Coater – Balzers ISCD 004 Bal Tec), tornando-as condutoras e, portanto, preparadas para serem observadas ao microscópio eletrônico de varredura. Para detectar a presença do elemento mercúrio foi usado aumento de 200 vezes. Foi analisada a região superficial e interna da tíbia permitindo a identificação dos elementos no osso, fornecendo assim a composição química e a distribuição dos elementos de interesse na amostra.

3.6 Análises Estatísticas

Os dados obtidos em cada grupo (média± EPM) foram comparados entre si através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney, aplicado pelo Software Instat 3.0 adotando um nível de significância de $p < 0,05$.

3.7 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 maio de 2008.

4 RESULTADOS

4.1 Análise Microestrutural

A TABELA 1 e 2 apresentam o conteúdo de Ca, P e Hg (%) nas amostras das tíbias dos animais dos grupos controle e contaminado realizados por Espectrometria de Dispersão de Raios-X, respectivamente na região superficial e interna das tíbias.

Verifica-se a incorporação do Hg tanto na região superficial (9,35%), como também na região interna (15,55%) das tíbias dos animais do grupo contaminado.

Tabela 1: Espectrometria de Dispersão de Raios-X (EDX) da região superficial da tíbia mostrando a composição percentual (%) dos elementos Ca, P, Hg e de outros elementos (Cl, O, C, Na, Mg).

| Parâmetros | Grupos experimentais | |
|----------------------|----------------------|-----------------|
| | Controle (4) | Contaminado (4) |
| Ca (%) | 34,42 ± 5,35 | 29,99 ± 2,44 |
| P (%) | 12,85 ± 2,28 | 14,99 ± 1,60 |
| Hg (%) | 0 | 9,35 ± 0,60 |
| Outros elementos (%) | 52,72 ± 7,57 | 45,66 ± 3,84 |
| Total (%) | 100 | 100 |

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

Tabela 2: Espectrometria de Dispersão de Raios-X (EDX) da região interna da tíbia mostrando a composição percentual (%) dos elementos Ca, P, Hg e de outros elementos (Cl, O, C, Na, Mg).

| Parâmetros | Grupos experimentais | |
|----------------------|----------------------|-----------------|
| | Controle (4) | Contaminado (4) |
| Ca (%) | 35,57 ± 4,21 | 18,49 ± 2,70* |
| P (%) | 16,32 ± 1,44 | 12,23 ± 1,61 |
| Hg (%) | 0 | 15,55 ± 0,73 |
| Outros elementos (%) | 48,12 ± 5,20 | 54,67 ± 4,83 |
| Total (%) | 100 | 100 |

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

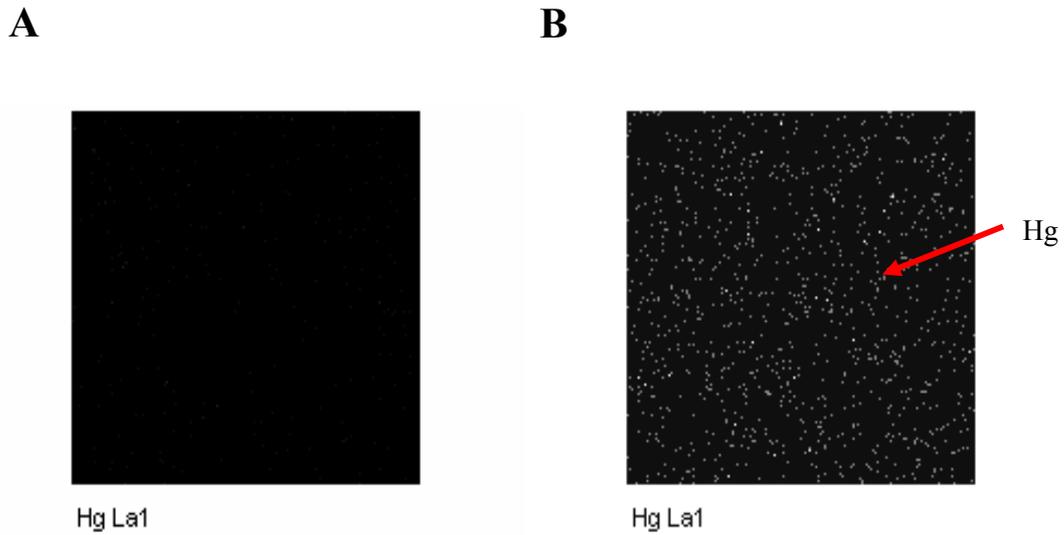


Figura 4: Micrografia da região superficial da tíbia direita obtida através de Espectrometria por Dispersão de Raios-X mostrando a incorporação do mercúrio. A – controle B – contaminado com HgCl_2 .

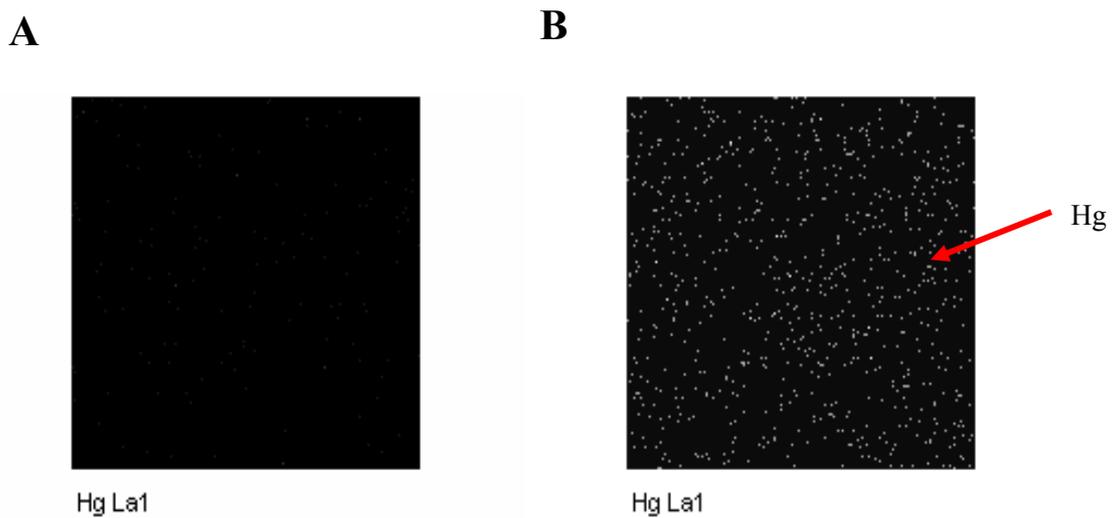


Figura 5: Micrografia da região interna da tíbia direita obtida através de Espectrometria por Dispersão de Raios-X mostrando a incorporação do mercúrio. A – controle B – contaminado com HgCl_2 .

4.2 Parâmetros Biométricos

4.2.1 Peso Corporal

A FIGURA 6 mostra a evolução ponderal dos animais dos grupos controle e contaminado durante os 60 dias de tratamento, onde se observa a sobreposição das curvas.

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

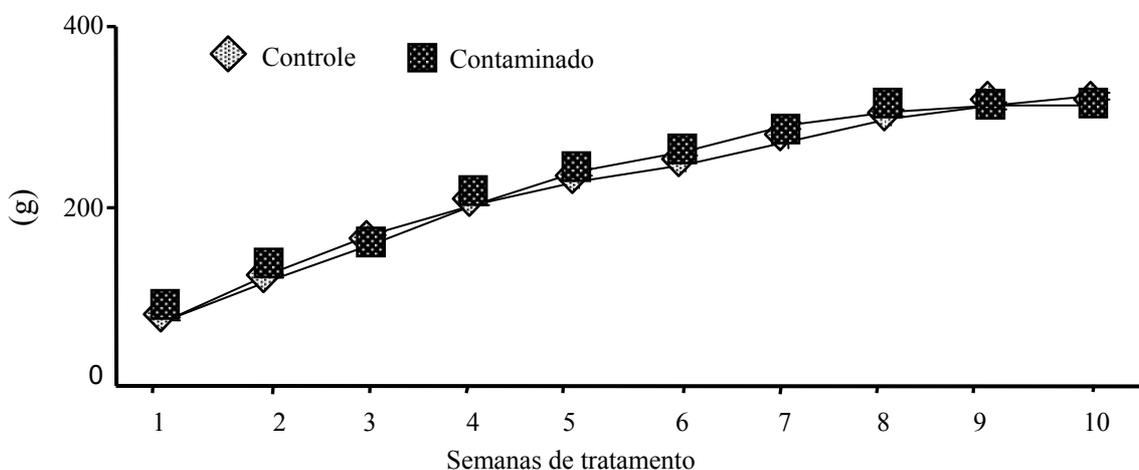


Figura 6: Peso corporal dos animais dos grupos controle e contaminado durante os 60 dias de tratamento.

A TABELA 3 e a FIGURA 7 apresentam os valores do peso corporal inicial e final, e ganho de peso dos animais analisados durante os 60 dias de tratamento. Não se observa diferenças destes parâmetros entre os grupos experimentais.

Tabela 3: Peso corporal (PC) inicial e final, e ganho de peso dos animais dos grupos controle e contaminado.

| Parâmetros | Grupos experimentais | |
|----------------|----------------------|-----------------|
| | Controle (10) | Contaminado (8) |
| PC inicial (g) | 75,2 ± 2,18 | 75,5 ± 1,34 |
| PC final (g) | 312,5 ± 5,46 | 317,5 ± 2,83 |
| Ganho PC (g) | 237,3 ± 6,21 | 242,3 ± 2,90 |

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

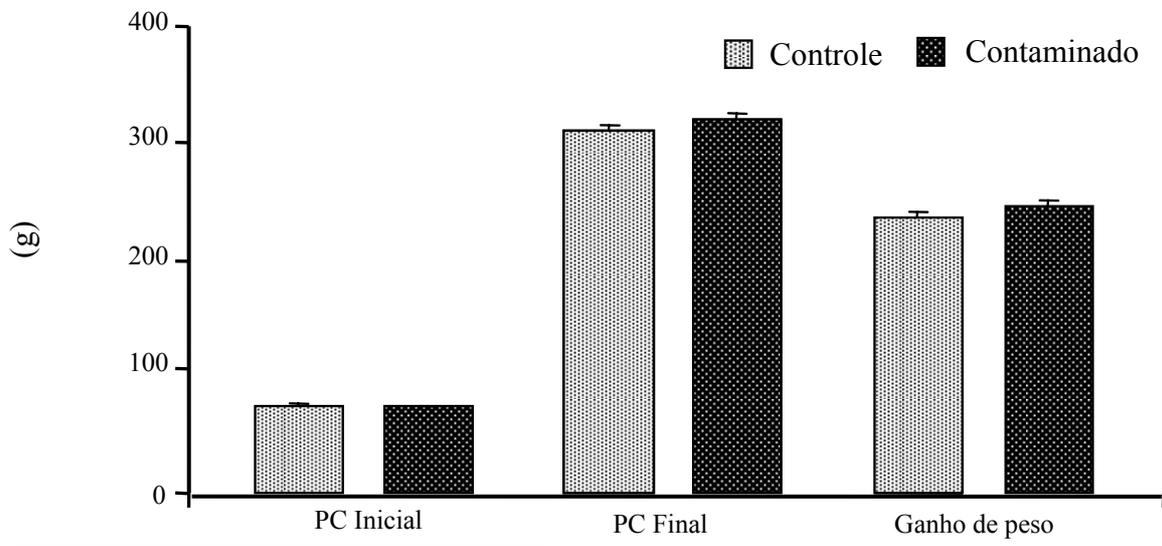


Figura 7 - Média \pm EPM dos pesos corporais (PC) inicial e final e ganho de peso dos ratos dos grupos controle e contaminado.

4.2.2 Análise do Fêmur Direito

A TABELA 4 e a FIGURA 8A expressam os valores do comprimento, diâmetro maior e menor. A TABELA 4 e a FIGURA 8B expressam os valores do peso úmido, imerso, seco e das cinzas dos fêmures dos ratos dos grupos experimentais.

Neste estudo, as medidas de comprimento, diâmetro menor, peso seco e peso das cinzas dos fêmures dos animais não mostraram diferenças quando comparadas entre si. Entretanto, o diâmetro maior da diáfise ($p=0,0002$), peso úmido ($p=0,0001$) e peso imerso ($p=0,0001$) dos fêmures aumentaram no grupo contaminado.

Tabela 4: Comprimento, diâmetros maior e menor das diáfises femorais e peso úmido, imerso, seco e das cinzas do fêmur dos animais dos grupos controle e contaminado.

| Parâmetros | Grupos experimentais | |
|---------------------|----------------------|-----------------|
| | Controle (10) | Contaminado (8) |
| Comprimento (mm) | 35,53 ± 0,22 | 35,30 ± 0,23 |
| Diâmetro maior (mm) | 3,81 ± 0,06 | 4,33 ± 0,06* |
| Diâmetro menor (mm) | 2,87 ± 0,02 | 2,91 ± 0,03 |
| Peso úmido (g) | 0,685 ± 0,008 | 0,767 ± 0,007* |
| Peso imerso (g) | 0,216 ± 0,004 | 0,254 ± 0,004* |
| Peso seco (g) | 0,430 ± 0,005 | 0,442 ± 0,004 |
| Peso das cinzas (g) | 0,286 ± 0,004 | 0,275 ± 0,002 |

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

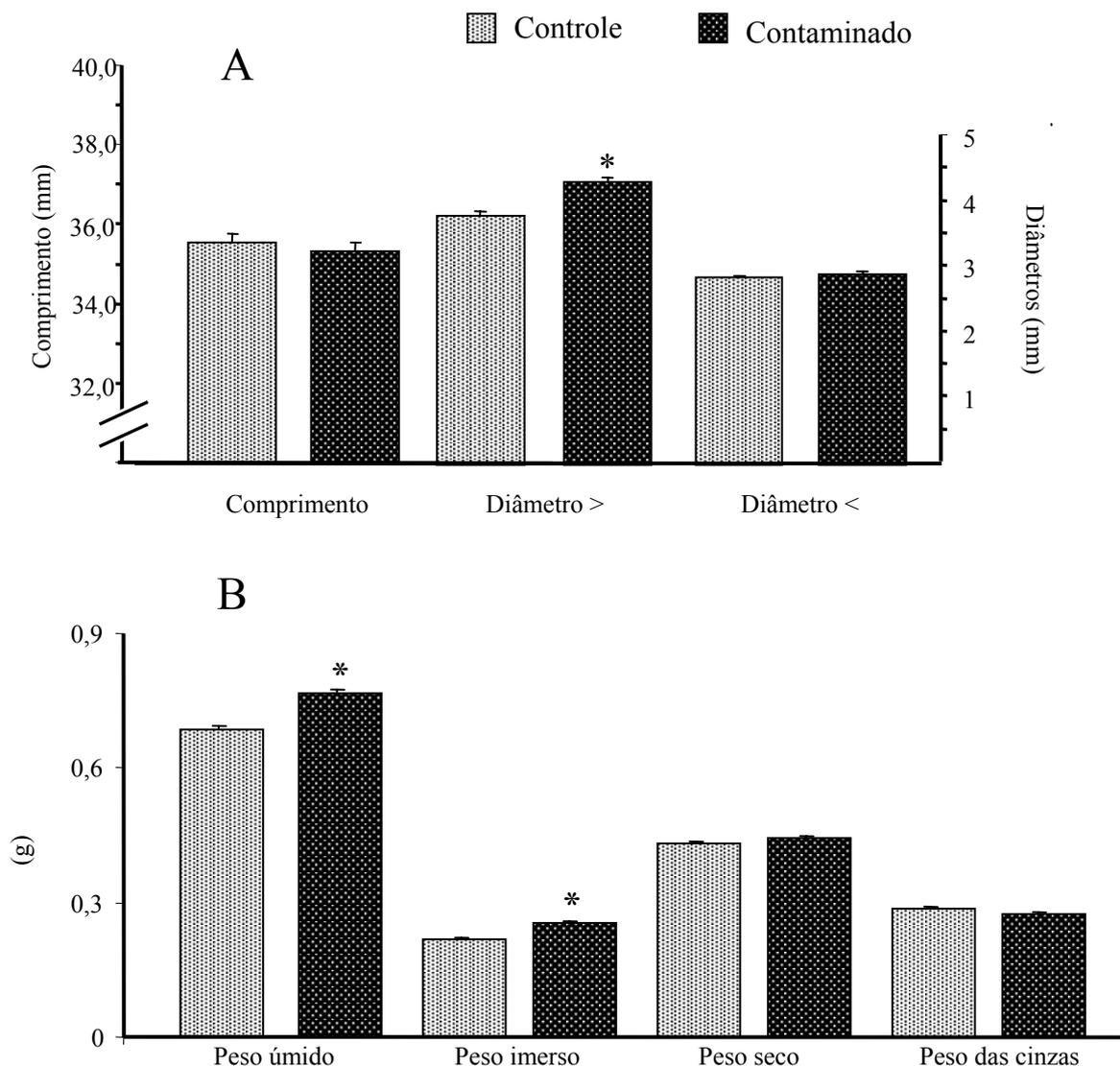


Figura 8: Parâmetros biométricos do fêmur dos ratos dos grupos experimentais controle e contaminado. Média \pm EPM. $p < 0,05$: * vs controle.

4.3 Parâmetros Físicos

A TABELA 5 e a FIGURA 9 apresentam os valores das propriedades físicas (volume ósseo, densidade óssea e mineral, percentual ósseo de água, de material orgânico e de material mineral) dos fêmures dos animais dos grupos controle e contaminado.

Observou-se um aumento do volume ósseo ($p=0,0044$) e do percentual de água no osso ($p=0,0002$) dos animais contaminados em relação aos controles. Entretanto a densidade mineral ($p=0,0009$) e o percentual de material mineral ($p=0,0001$) diminuíram no grupo contaminado. Os parâmetros densidade óssea e percentual de material orgânico não foram diferentes entre os dois grupos experimentais

Tabela 5: Volume ósseo, densidade óssea e mineral, percentual ósseo de água e percentual material orgânico e mineral do fêmur dos animais dos grupos controle e contaminado.

| Parâmetros | Grupos experimentais | |
|--|----------------------|-----------------|
| | Controle (10) | Contaminado (8) |
| Volume ósseo (cm ³) | 0,469 ± 0,008 | 0,512 ± 0,007* |
| Densidade óssea (g/cm ³) | 1,46 ± 0,01 | 1,49 ± 0,01 |
| Densidade mineral (g/cm ³) | 0,61 ± 0,01 | 0,53 ± 0,01* |
| Percentual água no osso (%) | 37,15 ± 0,77 | 42,30 ± 0,60* |
| Percentual material orgânico (%) | 21,06 ± 0,54 | 21,79 ± 0,62 |
| Percentual material mineral (%) | 41,77 ± 0,57 | 35,90 ± 0,55* |

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

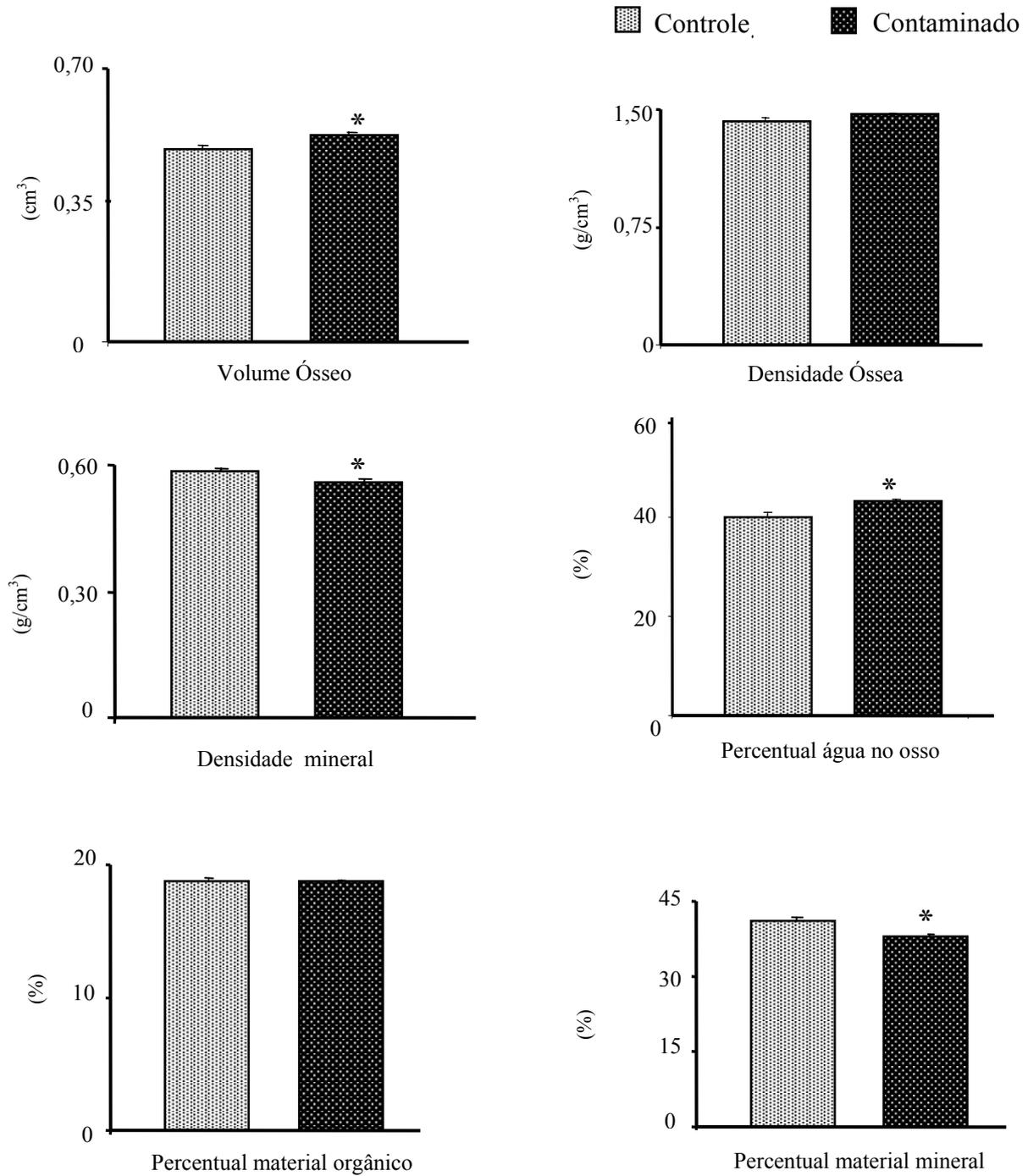


Figura 9: Parâmetros físicos do fêmur dos ratos dos grupos experimentais controle e contaminado. Média ± EPM, $p < 0,05$: * vs controle.

4.4 Análise Bioquímica

A Tabela 6 e a Figura 10 apresentam o conteúdo de cálcio e fósforo dos fêmures direito dos animais do grupo controle e contaminado com cloreto mercúrico.

Em relação ao conteúdo de cálcio e fósforo nos fêmures dos animais não houve diferença significativa entre o grupo contaminado quando comparado ao grupo controle.

Tabela 6: Conteúdo de Cálcio e Fósforo dos fêmures dos animais dos grupos controle e contaminado.

| Parâmetros | Grupos experimentais | |
|--------------|----------------------|-----------------|
| | Controle (10) | Contaminado (8) |
| Cálcio (mg) | 101,29 ± 2,83 | 98,36 ± 2,12 |
| Fósforo (mg) | 71,33 ± 1,63 | 72,81 ± 2,94 |

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

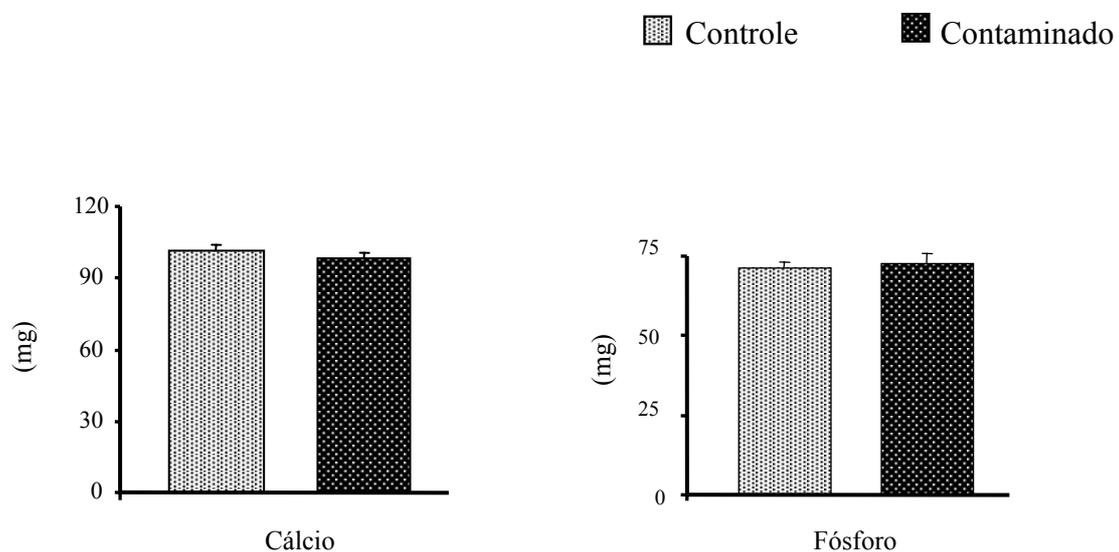


Figura 10: Conteúdo de Cálcio e Fósforo dos fêmures dos animais dos grupos controle e contaminado. Média ± Erro Padrão Média (EPM).

A Tabela 7 e a Figura 11 apresentam as concentrações plasmáticas de cálcio e fósforo dos animais do grupo controle e contaminado com cloreto mercúrico.

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

Tabela 7: Concentrações plasmáticas de Cálcio e Fósforo dos animais dos grupos controle e contaminado.

| Parâmetros | Grupos experimentais | |
|-----------------|----------------------|-----------------|
| | Controle (10) | Contaminado (8) |
| Cálcio (mg/dl) | 8,65 ± 0,51 | 9,15 ± 0,28 |
| Fósforo (mg/dl) | 4,91 ± 0,13 | 5,02 ± 0,14 |

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

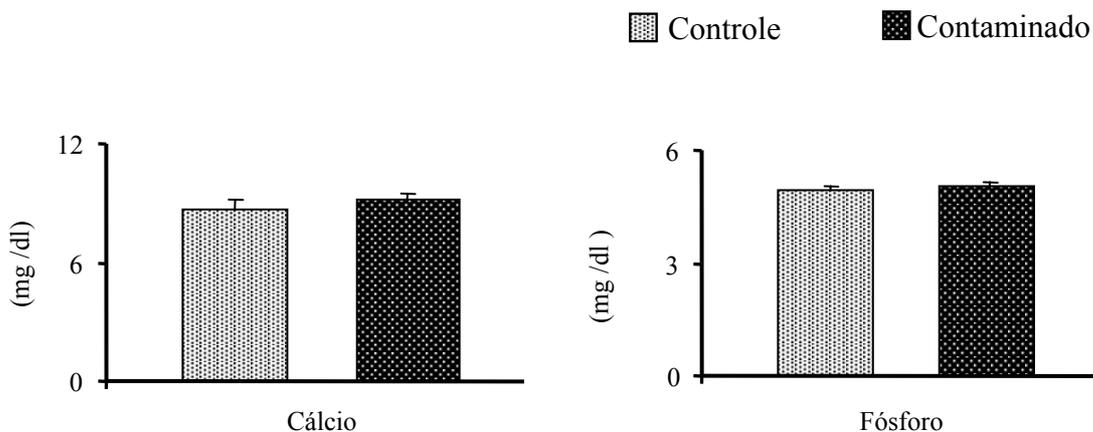


Figura 11: Concentrações plasmáticas de Cálcio e Fósforo dos animais dos grupos controle e contaminado. Média ± Erro Padrão Média (EPM).

4.5 Parâmetros Biomecânicos

A TABELA 8 e a FIGURA 12 mostram os valores de parâmetros biomecânicos (força máxima, força de ruptura, rigidez e resiliência) obtidos através do teste de flexão a três pontos dos fêmures direito dos animais controles e contaminados com cloreto mercúrico.

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

Tabela 8: Força máxima e de ruptura, rigidez e resiliência dos fêmures dos animais dos grupos controle e contaminado.

| Parâmetros | Grupos experimentais | |
|-------------------------------------|----------------------|-----------------|
| | Controle (10) | Contaminado (8) |
| F. Máxima (N) | 88,4 ± 2,45 | 96,2 ± 2,56 |
| F. Ruptura (N) | 73,0 ± 2,99 | 79,8 ± 3,08 |
| Rigidez (N/mm) | 163,07 ± 4,89 | 151,76 ± 8,24 |
| Resiliência (J x 10 ⁻³) | 49,3 ± 3,2 | 55,2 ± 3,3 |

Média ± Erro Padrão Média (EPM). () = nº animais

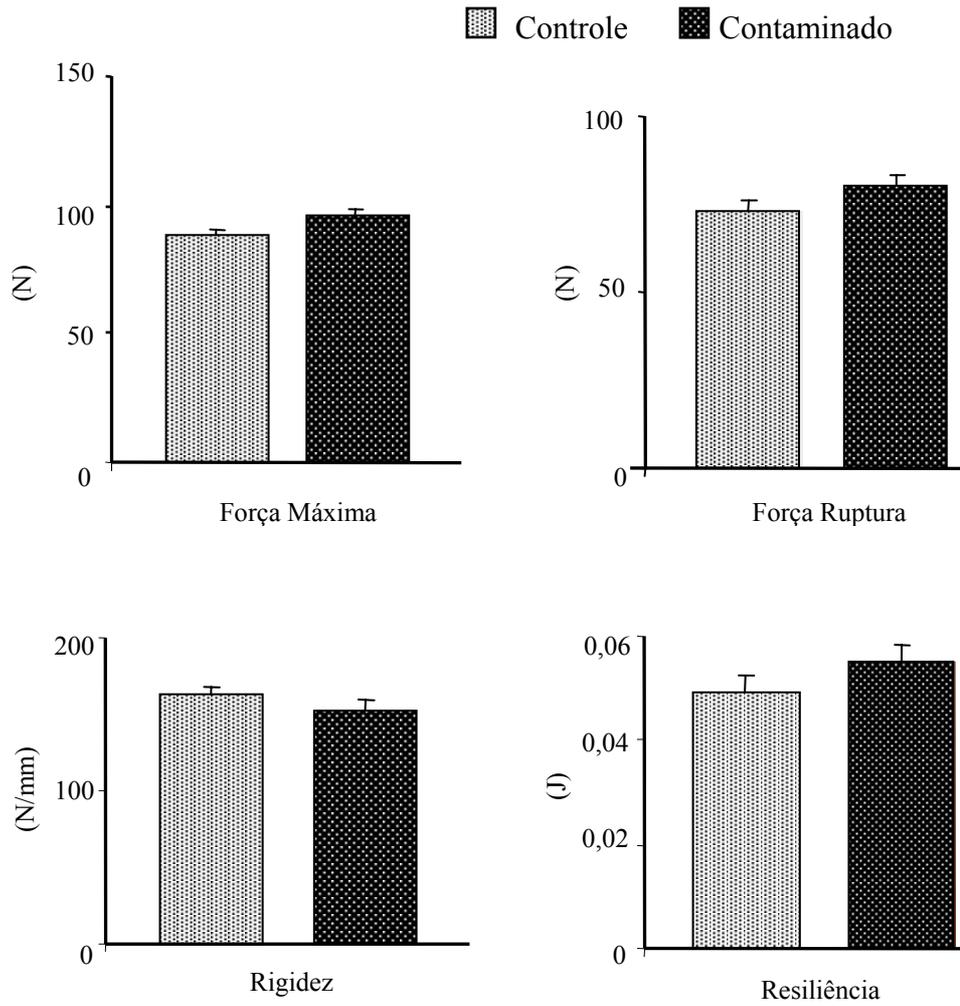


Figura 12: Força máxima e de ruptura, rigidez e resiliência dos fêmures dos animais dos grupos controle e contaminado. Média ± Erro Padrão Média (EPM).

5 DISCUSSÃO

Este estudo analisou alguns efeitos provocados pela contaminação com HgCl_2 , durante a fase de desenvolvimento, sobre o tecido ósseo de ratos adultos. O modelo de contaminação através de gavagem gástrica promoveu fácil adaptação dos animais ao sistema, não apresentando alterações significativas de massa corpórea nem comportamentais.

Os metais pesados assim como o mercúrio tem a propriedade de se incorporar nos tecidos. Neste estudo observou-se incorporação de mercúrio no tecido ósseo dos animais contaminados (TABELA 1 e 2 e FIGURA 4 e 5), enquanto nos animais controles não foi detectada a presença do metal nas tíbias. Um estudo realizado por ROTHSCILD, DUFFY (2005) verificou o acúmulo de mercúrio (orgânico e inorgânico) em maiores proporções no tecido ósseo quando comparados aos tecidos muscular e nervoso central de aves migratórias. Porém pelo fato de ser uma pesquisa com coleta aleatória de aves silvestres, como patos e gansos que habitam vários lugares e se alimentam de diferentes alimentos, não se pode saber a forma, o tempo de exposição e a via de contaminação do mercúrio nesses animais. Em outro estudo com o pequeno mamífero mussaranho de dentes brancos (*Crossidura russula*), espécie que habita o Delta do Ebro (Espanha), uma área contaminada por Hg devido à atividade industrial e doméstica, demonstrou-se incorporação de mercúrio nos ossos desses animais. A deposição do mercúrio nos ossos revelou diferenças dependendo do sexo, da idade e do local de captura dos animais (CHARDI, FUSTER, NADAL, 2007).

O mercúrio pode estar incorporado nas células óssea e ter entrado através do Transportador de Ânion Orgânico 1 (OAT1) e 3 (OAT3) que estão implicadas no transporte absorvivo de mercúrio orgânico e inorgânico nas células epiteliais renais, endoteliais e gliais (BALLATORI, 2002; ZALUPS, AHMAD, 2004). O Hg^{2+} também pode estar entrando nas células ósseas por canais iônicos, devido à similaridade de tamanho e carga com íons tais como Na^+ e Ca^{++} (MIYAMOTO, 1983), ou estar se ligando a albuminas e sofrendo endocitose (ZALUPS, 2000). Além disso, esse metal pode estar na matriz óssea, incorporado nos cristais de hidroxiapatita (BLUMENTAL et al., 1995; CHRISTOFFERSEN et al., 1998).

A homogeneidade de peso corporal é uma variável bastante importante, pois a massa corporal exerce estresse mecânico sobre os ossos e contribui para o ganho de massa óssea (BERG, HARMISON, 1957; BURR, ROBLING, TURNER, 2002). Com relação ao peso corporal, os animais não apresentaram diferenças entre os grupos controle e contaminado ao longo dos 60 dias de tratamento (FIGURA 6), concordando com os resultados obtidos por

NTP (1993), utilizando animais com a mesma idade dos usados nesse trabalho, o mesmo tempo de tratamento, a dose e via de administração do HgCl_2 .

Dependendo do período e da quantidade ingerida, o mercúrio provoca redução do consumo de alimento, ocasionando diminuição do crescimento e ganho de peso (NTP, 1993). Na literatura, resultados conflitantes são encontrados, no que diz respeito ao período, dose e via de administração do HgCl_2 correlacionados com o peso corporal. SIDDIQI, ALHOMIDA (2005) mostraram que ratos injetados com uma única dose de 3 mg/Kg PC (i.p.) tiveram diminuição do peso corporal e do consumo alimentar. Em outro estudo realizado com ratos em que administrou-se a dose de 4 mg/Kg dia durante 14 dias consecutivos, mostrou que houve redução do peso corporal e do consumo alimentar (KHAN et al., 2001). Nestes estudos observa-se que, independente da dose e do tempo de administração, houve redução do peso corporal.

No presente estudo, as medidas de comprimento e diâmetro menor dos fêmures dos animais não mostraram diferenças quando se compara os grupos experimentais (TABELA 4 e FIGURA 8A), mostrando que a contaminação com HgCl_2 não alterou esses parâmetros. Entretanto, YONAGA et al. (1985), em um estudo histológico em tíbia de ratos imaturos, verificaram inibição do crescimento longitudinal em ratos contaminados com doses de 2, 4 e 8 mg/Kg PC de HgCl_2 (s.c.) por 6 dias, portanto estes autores afirmaram que o HgCl_2 pode afetar o crescimento ósseo. Essa diferença de resultados está relacionada com o tipo de osso analisado, a dose, o tempo de contaminação, a via de administração e a técnica usada para análise do crescimento. Entre estes fatores o tipo de osso analisado é um fator importante, pois diferença de constituição óssea da tíbia e do fêmur é que pode estar induzindo as diferenças de resultados entre os estudos. É conhecido que a tíbia é mais rica em osso trabecular do que osso cortical, enquanto o fêmur é mais rico em osso cortical do que osso trabecular. Apesar de não ocorrer aumento do peso corporal final entre os grupos experimentais, verificou-se aumento do diâmetro maior da diáfise femoral nos animais do grupo contaminado (TABELA 4 e FIGURA 8A), indicando que a contaminação com HgCl_2 interfere no crescimento ósseo em diâmetro, através do aumento da formação periosteal em resposta à reabsorção endosteal levando ao aumento do diâmetro maior observado neste estudo (HIETALA, 1993). SHAINI et al. (2000) demonstraram que os osteoblastos são mais afetados pelos efeitos tóxicos dos metais pesados (incluindo o mercúrio) do que as células periosteas. Esta diferença de toxicidade celular está relacionada com a grande quantidade de células não-diferenciadas na população de células periosteas, e estas células não-diferenciadas ajudariam a compensar o número de células mortas. D'ÁVILA (2007) não observou alteração

significativa do diâmetro maior em ratos contaminados com a dose de 1,25 mg/Kg PC de Hg_2Cl_2 (v.o) durante 60 dias de tratamento. Em relação a essa discrepância de resultados, alguns fatores estão interferindo como a dose usado no estudo de D'ÁVILA (2007), que é a metade da usada neste estudo e a toxicidade dos sais de mercúrio, já que se tem relatos da literatura que descrevem o cloreto mercúrico (HgCl_2) como um sal mercurial mais tóxico do que o cloreto mercurioso (Hg_2Cl_2). Isso se deve a sua grande solubilidade em água e absorção pelo trato gastrointestinal, que está na faixa de 7% (VON BURG, GREENWOLD, 1991).

As propriedades físicas ósseas dos fêmures dos animais foram analisados de forma direta através do princípio de Arquimedes, que consiste em um método simples e de fácil execução (MARTINI, 1990; RENNO et al., 2007). O tecido ósseo é composto por minerais, por material orgânico e frações de água, e alterações da densidade deveriam estar associadas a mudanças em alguns ou em todos estes parâmetros. Os fêmures dos animais contaminados apresentaram peso úmido e peso imerso maiores do que os animais do grupo controle (TABELA 4 e FIGURA 8B). Esses parâmetros aumentados refletiram em um maior volume ósseo (TABELA 5 e FIGURA 9) dos fêmures dos animais contaminados (sabendo que o volume ósseo = peso úmido-peso imerso/densidade da água) corroborando com o aumento do diâmetro maior observado neste estudo (KIEBZAK et al., 1988; YENI, BROWN, NORMAN, 1998; NORDSLETTEN et al., 1994; MONTEAGUDO et al., 1997).

O aumento do diâmetro maior e do volume ósseo e diminuição do percentual de material mineral nos fêmures dos animais do grupo contaminado refletiu em diminuição da densidade mineral óssea nesse grupo (TABELA 5 e FIGURA 9). Nossos resultados se opõem aos do estudo realizado por JIN et al. (2002), em que se administrou HgCl_2 , na dose de 1mg/Kg PC na forma subcutânea, 3 vezes por semana durante o período de 3 semanas em camundongos com 56 dias de vida e não observou mudança da densidade mineral óssea nesses animais. Entretanto, quando se administrou HgCl_2 mais anticorpo contra a metalotioneína, foi observada uma maior concentração de HgCl_2 no plasma e fígado do que nos rins e diminuição da densidade mineral óssea e diminuição da atividade da ALP e osteocalcina nesse grupo. A produção de metalotioneína no rim e fígado é induzida pela contaminação com HgCl_2 , já que esses são os órgãos alvo para o acúmulo de HgCl_2 no organismo quando em administrações crônicas (NTP, 1993; ZALUPS, 2000). Sendo assim, quando a expressão de metalotioneína é interrompida (usando um anticorpo específico contra a metalotioneína, como destes autores), o acúmulo de HgCl_2 diminui no rim e a toxicidade em outros tecidos é aumentada, inclusive no tecido ósseo através da alteração da atividade das células ósseas (osteoblastos e osteoclastos). Em nosso estudo supõe-se que ocorreu produção

de metalotioneína em menor proporção à necessária para prevenir os efeitos tóxicos do cloreto mercúrico. Ou ocorreu uma alta produção de metalotioneínas no rim e fígado, mas esta produção não afetou a toxicidade do cloreto mercúrico. Estudos feitos em uma linhagem de células CHO-K1 (ovário de hamster) no qual se estimulou a overexpressão de metalotioneínas, observou-se que a presença de altos níveis de metalotioneína não afetou a toxicidade do cloreto mercúrico. Esses autores sugerem que o mecanismo para a toxicidade do cloreto mercúrico pode envolver a ligação desse metal à ligantes com menor constante de dissociação (menor afinidade) do que as metalotioneínas. Assim a presença abundante de metalotioneína pode ter menos influência sobre a ligação do Hg^{2+} à este ligante de alta afinidade. Isso também se deve ao fato de que o mercúrio pode causar toxicidade por diferentes mecanismos, e o Hg^{2+} poderia estar causando toxicidade através da ligação a proteínas transportadoras da membrana celular, por exemplo, a metalotioneína presente no citosol não teria nenhuma influência sobre este processo. Em suporte a esta idéia, sabe-se que Hg^{2+} inorgânico é um potente inibidor de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ presente na membrana plasmática (BEATTIE et al., 2005).

Neste estudo, os animais do grupo contaminado não apresentaram diferença de peso seco e peso das cinzas dos fêmures quando comparados ao do grupo controle, porém se observou aumento de volume ósseo, do peso úmido e peso imerso. A proporção entre eles indica que o grupo contaminado tem menor densidade mineral e percentual de material mineral e maior percentual de água do que o grupo controle (TABELA 5 e FIGURA 9).

Em relação à diminuição da densidade mineral neste estudo vários mecanismos podem estar influenciando a atividade de osteoblastos e osteoclastos e interferindo no processo de remodelamento ósseo. Um dos mecanismos está relacionado com dano renal e gastrointestinal, interferindo no metabolismo dos minerais como cálcio e fósforo. Um outro mecanismo envolve a estimulação da reabsorção e inibição da formação via uma influência direta sobre a diferenciação e ativação de osteoclastos e osteoblastos (BRZÓSKA, JAKONIUK, 2005).

De acordo com o primeiro mecanismo, o acúmulo de HgCl_2 no tecido ósseo é marcadamente menor quando comparado a outros órgãos como rim e fígado (NTP, 1993; GRIEM et al., 1997; ZALUPS, 2000). Danos às células epiteliais do túbulo proximal do néfron culminam com o cessamento da reabsorção de água e solutos (CLARKSON, 1997) e podem ser observados em ratos 1 hora após administração de uma dose muito alta de HgCl_2 . Exposição a doses menores do que 1-5 mg/Kg de HgCl_2 causa necrose ao longo do túbulo proximal, visível ao microscópio óptico, no mínimo, após 12 horas de exposição (ZALUPS et

al., 2000). Esse fato poderia contribuir para a causa da deficiência renal e alteração do equilíbrio ácido-básico. Esse desequilíbrio poderia induzir aumento da excreção urinária de cálcio devido à diminuição da reabsorção renal de cálcio, induzindo um hiperparatireoidismo secundário ou devido ao efeito direto do ácido sobre o tecido ósseo. BUSHINSKY (2001) relatou em trabalho de revisão alterações em culturas de células ósseas de camundongo promovidas pela diminuição do pH durante 3 horas, modelo de acidose aguda, causando dissolução mineral óssea. Esses estudos indicam que o mecanismo pelo o qual íons hidrogênio causam liberação do cálcio ósseo durante curto período é devido a alterações de fatores físico-químicos que governam a deposição e dissolução de minerais do tecido ósseo, e não mediado por alterações de atividades celulares relacionadas à reabsorção. BURCK et al. (2005), em outro estudo usando cultura de células ósseas, observaram que a acidose pode contribuir para redução da mineralização óssea via aumento da solubilidade da hidroxiapatita e diminuição da atividade da fosfatase alcalina (ALP).

No outro mecanismo, o HgCl_2 pode estar agindo diretamente sobre as células ósseas (osteoblastos) através da inibição da atividade da fosfatase alcalina, uma enzima essencial para o processo de mineralização óssea (ROBINSON, 1923; REGISTER, WURTHIER, 1984; BRADBEER et al., 1992, 1994). Em experimentos com peixes, analisou-se a ação do cloreto mercúrico sobre osteoblastos e osteoclastos. Os resultados mostraram que o HgCl_2 influenciou a homeostasia do cálcio e a atividade osteoclástica em curto tempo de exposição (inibição da fosfatase ácida resistente ao tartrato – TRAP) e inibiu a atividade osteoblástica (inibição da fosfatase alcalina – ALP) sob exposição em longo prazo (SUZUKI et al., 2004). Sendo assim, o HgCl_2 estaria alterando a atividade dos osteoblastos através da inibição da ALP sob exposição em longo prazo como o deste estudo, e isto levou a diminuição da densidade mineral e percentual de material mineral dos fêmures dos animais contaminados.

O HgCl_2 poderia estar ainda causando toxicidade às células ósseas através do mecanismo de indução de estresse oxidativo. O mercúrio divalente (Hg^{2+}), após entrar na célula, pode reagir com os grupos tióis (-SH) de proteínas e enzimas, desse modo esgotando os tióis intracelulares, especialmente glutatona, causando estresse oxidativo (GSTRAUNTHALER, PFALLER, KOTANKO, 1983). Recentes estudos demonstram que a produção de radicais livres e o estresse oxidativo, hábito de fumar, hipertensão e diabetes mellitus estão classificados como fatores de risco para osteoporose (RODRIGUEZ et al., 2007; SHEWEITA, KHOSHHAL, 2007). GIRARDI, ELIAS (1985) observaram alteração da atividade das enzimas glutatona peroxidase (GSH-Px) e catalase em animais com conteúdo

reduzido de grupos tiólicos não-protéicos (NPSH) uma hora após a exposição dos animais a 5,0 mg/Kg de cloreto de mercúrio (HgCl_2). Neste estudo o HgCl_2 poderia estar causando estresse oxidativo nas células ósseas e alterando a sua atividade. Outros estudos que mostram que altos níveis de H_2O_2 favorecem a diferenciação de osteoclastos e inibem a diferenciação de osteoblastos e liberação do estoque de cálcio intracelular por um mecanismo sensível ao IP3 (inositol-3-fosfato) (NAM et al., 2002), propiciando dessa forma uma acentuada diminuição da densidade mineral óssea corroborando com o resultado de densidade mineral deste estudo, nos quais pode-se sugerir que ocorra aumento da reabsorção óssea pelos osteoclastos e diminuição da formação óssea pelos osteoblastos (MODY et al., 2001; SONTAKE, TARE, 2002; BAI et al., 2004). O HgCl_2 pode estar alterando a expressão da via de sinalização da Wnt, induzindo o fator de transcrição FOXO (Forkhead Box) por ROS (espécies reativas de oxigênio) e, assim antagonizando a via de sinalização Wnt/ β -catenina que é um estímulo essencial para a osteoblastogênese e responsável por suprimir a apoptose osteoblástica, adipogênese e osteoclastogênese (ALMEIDA et al., 2007).

O teste de flexão a três pontos possibilita observar as principais propriedades biomecânicas do tecido ósseo. De acordo com MELTON et al. (1986), as propriedades biomecânicas correspondem, provavelmente, aos parâmetros mais importantes referente ao risco de fraturas, que é o efeito clínico de maior relevância na osteoporose. Para PENG et al. (1994), embora a osteopenia em ratos não leve a fraturas, é possível avaliar a resistência mecânica, e conseqüentemente, a qualidade óssea dos animais estudados através destes parâmetros. A resistência mecânica do osso à fraturas está relacionada ao grau de mineralização (BOYDE et al., 1995; CURREY, BREA, ZIOUPS, 1995, LEOPOLA et al., 1996). Esta relação tem sido estudada extensivamente, mas os ótimos valores de densidade mineral para a resistência óssea não tem sido determinados, embora recentes estudos tem sugerido que possa ser modificada pelo estado estrogênico (BOYDE et al., 1998). A diminuição do percentual de material mineral levou a uma redução da densidade mineral que poderia promover alteração do comportamento biomecânico. Entretanto em nosso estudo não observou-se alteração significativa dos parâmetros biomecânicos (TABELA 8 e FIGURA 12). KATSUMATA et al. (1995) observaram diminuição da densidade mineral óssea do fêmur de ratas ovariectomizadas em relação ao grupo intacto, no entanto não houve diferença da força de fratura e da rigidez. Mesmo se observando diminuição do percentual de material mineral e da densidade mineral dos fêmures diante da contaminação com cloreto mercúrico, esta diminuição da densidade não foi suficiente para alterar os parâmetros biomecânicos. Este fato pode estar relacionado com a capacidade dos metais pesados como Cd, Pb e Hg poderem se

incorporar nos cristais da hidroxiapatita (BLUMENTHAL et al., 1995; CHRISTOFFERSEN et al., 1998) ou ligar-se a proteínas ósseas, incluindo as metalotioneínas (BRANDÃO et al., 2005, PEIXOTO et al., 2007) ou a outras substâncias e formar um complexo organo-metal mimetizando o efeito de outras. Essa concepção de mimetismo molecular e iônico tem sido postulada como mecanismo pelo qual certos metais tóxicos têm a capacidade de entrar na célula e agir ou servir como análogo estrutural e/ou funcional de outros endógenos biomoleculares (BRIDGES, ZALUPS, 2004). O metal incorporado nos cristais de hidroxiapatita poderia estar afetando suas propriedades e contribuindo para a alteração dos parâmetros biomecânicos servindo como análogo estrutural ou funcional no lugar do cálcio, diminuindo a sua incorporação ou aumentando a sua liberação do osso. Outro metal que se assemelha ao cálcio em suas propriedades atômicas e iônicas é o estrôncio e devido a isto pode repor ou substituir as posições do cálcio na hidroxiapatita (TUREK, 1991). Recentes estudos tem mostrado que o ranelato de estrôncio (Protelos) é eficaz no tratamento da osteoporose (FOGELMAN, BLAKE, 2005; REGINSTER et al., 2005; BRUYERE et al., 2007). O mecanismo pelo qual isso ocorre está relacionado com a sua capacidade de estimular a diferenciação de pré-osteoblastos e a síntese de colágeno, hipotetiza-se que esse metal tem a propriedade de agir como agonista do receptor extracelular sensível ao cálcio (CaR), aumentando assim a formação óssea. Além disso ocorre diminuição da diferenciação de osteoclastos, reduzindo assim a reabsorção óssea. O tratamento com ranelato de estrôncio promoveu aumento do ganho de massa óssea e densidade mineral que refletiu em aumento da força máxima óssea indiretamente confirmada pela redução do risco de fraturas em experimentação humana (MARIE, 2005; FONSECA, 2008).

Outros fatores, como a geometria óssea e as propriedades materiais também poderiam estar influenciando os resultados dos parâmetros biomecânicos deste estudo (EINHORN, 1996). Mesmo o mercúrio estando incorporado nos cristais de hidroxiapatita, este metal não alterou as propriedades materiais dos ossos, como demonstrado pela manutenção dos parâmetros biomecânicos ósseos dos fêmures dos animais do grupo contaminado.

GRAEME, POLLAK em um trabalho de revisão relatam que o cloreto mercúrico tem a capacidade de atingir os vasos sanguíneos, penetrar neles e se ligar a células vermelhas. Em nosso estudo, analisamos as concentrações plasmáticas de cálcio e fósforo com o objetivo de verificar se estes parâmetros pudessem nos fornecer algumas alterações sobre uma lesão renal. Nos resultados obtidos verificou-se que as concentrações plasmáticas de cálcio e fósforo foram maiores nos animais grupo contaminado, porém as diferenças não

foram significantes quando comparados com o controle (TABELA 7 e FIGURA 11). Resultados semelhantes foram demonstrados por JIN et al (2002) que observaram diminuição da densidade mineral óssea em animais contaminados com HgCl_2 mais anticorpo contra a metalotioneína, mas também não observaram alterações nesses parâmetros. SUZUKI et al. (2004) relataram diminuição das concentrações plasmáticas de cálcio de peixe após 8 dias de contaminação por metilmercúrio, o que pode estar relacionado com a via de administração, animal, dose, tempo de exposição do contaminante e à espécie química utilizada. Em nosso estudo o cloreto mercúrico não causou lesão renal ou causou uma lesão renal não significativa para alterar as concentrações de cálcio e fósforo plasmático.

Em relação ao conteúdo de cálcio e fósforo dos fêmures dos animais determinados através de ensaio colorimétrico não houve diferença entre os grupos experimentais (TABELA 6 e FIGURA 10), entretanto, observou-se diminuição do percentual de cálcio determinado por Espectometria de Dispersão de Raios-X nas tíbias dos animais contaminados com cloreto mercúrico (TABELA 1 e 2). Alguns fatores podem estar influenciando a diferença de resultados como a técnica usada para a análise do cálcio e o osso usado para a análise. Na Espectometria de Dispersão de Raios-X realizou-se um escaneamento da superfície do osso a ser analisado e o resultado é dado pela leitura de diferentes espectros de raios-x para cada elemento, enquanto na análise pelo ensaio colorimétrico usa-se o osso total e o resultado é dado pela leitura de cor. Outro fator que poderia estar contribuindo é a diferença de constituição óssea do fêmur e da tíbia. A tíbia é mais rica em osso trabecular do que em osso cortical, enquanto o fêmur é mais rico em osso cortical do que em osso trabecular. Se considerarmos que a produção de metalotioneínas está relacionada com a deposição de mercúrio no tecido ósseo e que a sua produção estimulada por metais pesados é maior no osso trabecular do que no osso cortical (ODA et al., 2001; BRANDÃO et al., 2005; PEIXOTO et al., 2007), então sugere-se que possa estar ocorrendo maior deposição de mercúrio no osso trabecular do que no osso cortical. Se a incorporação de mercúrio é maior em ossos mais ricos em osso trabecular (tíbia), o percentual de átomos de cálcio estaria menor, já que o Hg^{2+} pode-se ligar aos sítios de ligação do cálcio, diminuindo a sua incorporação ou aumentando a sua liberação. A incorporação de mercúrio estaria maior nas tíbias dos animais contaminados, levando à diminuição do percentual de cálcio, estando de acordo com os resultados obtidos por Espectometria por Dispersão de Raios-X.

6 CONCLUSÕES

A contaminação com cloreto mercúrico na dose de 2,5 mg/Kg PC durante 60 dias permitiu observar:

- que o tratamento via gavagem gástrica foi efetivo em promover a incorporação desse metal no tecido ósseo.
- que os parâmetros bioquímicos não mostraram alterações.
- aumento dos pesos (imerso e úmido), do diâmetro maior, do volume ósseo e percentual de água dos fêmures dos animais diante da contaminação por cloreto mercúrico e diminuição do percentual de material mineral e da densidade mineral nesse grupo.
- que apesar da redução dos parâmetros percentual de material mineral e densidade mineral dos fêmures dos animais do grupo contaminado não houve alteração dos parâmetros biomecânicos analisados através do teste de flexão a três pontos.

A contaminação com mercúrio na forma (cloreto mercúrico), dose (2,5 mg/Kg PC) durante 60 dias provocou pequena alteração do desenvolvimento ósseo de ratos, como pôde ser observado pelo aumento do diâmetro maior da diáfise femoral que refletiu em aumento do volume ósseo nos fêmures dos animais do grupo contaminado e diminuição do percentual de material mineral levando a diminuição da densidade mineral, sem alterar os parâmetros biomecânicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ALMEIDA, M. et al. Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 41342-41351, 2007.

AMORIM, M.I.M. et al. Cytogenetic damage related to low levels of methylmercury contamination in the Brazilian Amazon. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 72, n. 4, p. 497-507, 2000.

BAI, X.C. et al. Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells ERK and NF-Kappa B. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 314, p. 197-207, 2004.

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

BAUER, T.W. et al. The osteocyte. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 1-8, 2004.

BEATTIE, J.H. et al. Metallothionein overexpression and resistance to toxic stress. **Toxicology Letters**, v. 157, p. 69-78, 2005.

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.

BILEZIKIAN, J.P.; RAISZ, L.G.; RODAN, GA. **Principles of bone biology**. Academic Press. San Diego, Califórnia, cap. 1, p. 11-13, 1996.

BONEWALD, L.F. Osteocyte biology: Its implications for osteoporosis. **Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions**, v. 4, n. 1, p. 101-104, 2004.

BOYDE, A. et al. Mineral density quantitation of the human cortical iliac crest by back-scattered electron image analysis – Variations with age, sex and degree of osteoarthritis. **Bone**, v. 16, p. 619-627, 1995.

BOYDE, A. et al. The effects of estrogen suppression on the mineralization density of iliac crest biopsies in young women as assessed by backscattered electron imaging. **Bone**, v. 22, p. 241–250, 1998.

BLUMENTHAL, N.C. et al. The effect of cadmium on the formation and properties of hydroxyapatite in vitro and its relation to cadmium toxicity in the skeletal system. **Calcified Tissue International**, v. 56, p. 316–322, 1995.

BRADBEER, J.N.; LINDSAY, P.C.; REEVE, J. Fluctuation of mineral apposition rate at individual bone-remodeling sites in human iliac cancellous bone; Independent correlations with osteoid width and osteoblastic alkaline phosphatase activity. **Journal of Bone Mineral Research**, v. 9, p. 1679–1686, 1994.

BRADBEER, J.N. et al. Relationship between the location of osteoblastic alkaline phosphatase activity and bone formation in human iliac crest bone. **Journal of Bone Mineral Research**, v. 7, p. 905–912, 1992.

BRANDÃO, R. et al. Antioxidants and metallothionein levels in mercury-treated mice. **Cell Biology Toxicology**, v. 22, p. 429-438, 2006.

BRIDGES, C.C.; ZALUPS, R.K. Homocysteine, system $b^{0,+}$ and the renal epithelial transport and toxicity of inorganic mercury. **The American Journal of Pathology**, v. 4, p. 1385-1394, 2004.

BRUYERE, O. et al. Relationship between bone mineral density changes and fracture risk reduction in patients treatment with strontium ranelate. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, p. 3076-3081, 2007.

BRZÓSKA, M.M.; JAKONIUK, J.M. Bone metabolism of male rats chronically exposed to cadmium. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 207, p. 195– 211, 2005.

BURCK, A.B. et al. Acidosis inhibits bone formation by osteoblasts in vitro by preventing mineralization. **Calcified Tissue International**, v. 77, p. 167-174, 2005.

BURR, D.B.; ROBLING, A.G.; TURNER, C.H. Effects of biomechanical stress on bones in animals. **Bone**, v. 30, p. 781-786, may 2002.

BUSHINSKY, D.A. Acid-base imbalance and the skeleton. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 40, p. 238-244, 2001.

CASTOLD, A.F. et al. Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. **Brain Research Bulletin**, v. 55, n. 2, p. 197-203, 2001.

CHARDI, A.S.; FUSTER, M.J.L.; 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.

CLARKSON, T.W. The toxicology of mercury. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 34, p. 369-403, 1997.

CHRISTOFFERSEN, J. et al. Interaction of cadmium ions with calcium hydroxyapatite crystals: a possible mechanism contributing to the pathogenesis of cadmium induced bone disease. **Calcified Tissue International**, v. 42, p. 331– 339, 1988.

CURREY, J.D.; BREAR, K.; ZIOUPS, P. The effects of ageing and changes in mineral content in degrading the toughness of human femora. **Journal of Biomechanics**, v. 29, p. 257-260, 1995.

D'ÁVILA, F.V. Efeitos do Cloreto Mercuroso Sobre o Tecido Ósseo de Ratos. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, 2007.

DOREA, J.G.; DONANGELO, C.M. Early (in uterus and infant) exposure to mercury and lead. **Clinical Nutrition**, v. 25, n. 3, p. 369-376, Jun 2006.

DRASH, G. et al. The Mt. Diwata study on the Phillipines – assessing mercury intoxication on the population by small scale gold mining. **Science of the Total Environment**, v. 267, p. 151-158, 2001.

EINHORN, T.A. The bone organ system: form and function. In: MARCUS, R., FELDMAN, D., KELSEY, J. **Osteoporosis**. San Diego: Academic Press, p. 3-22, 1996.

ELIA, A.C. et al. Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 55, p. 162-167, 2003.

FARIA, M.A. Mercurismo metálico crônico ocupacional. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n.1, p. 116-127, 2003.

FERNANDEZ, I. et al. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirurgia Bucal**, v. 11, p. E47-E51, 2006a.

FERNANDEZ, I. et al. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirurgia Bucal**, vol. 11, p. E151-E157, 2006b.

FERRI, A. et al. Iron, zinc and copper levels in brain, serum and liver of neonates exposed to 2,2-dichlorophenoxyacetic acid. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 25, p. 607-613, 2003.

FOGELMAN, I.; BLAKE, G.M. Strontium ranelate for the treatment of osteoporosis. **British Medical Journal**, v. 330, p. 1401-1402, 2005.

FONSECA, J.E. Rebalancing bone turnover in favour on formation with strontium ranelate: implication for bone strength. **Rheumatology**, v. 47, p. iv17-iv19, 2008.

FUORTES, L.J. et al. Immune thrombocytopenia and elemental mercury poisoning. **Journal of Toxicology Clinical Toxicology**, v. 33, p. 449-455, 1995.

GRIEM, P. et al. Strain Differences in Tissue Concentrations of Mercury in Inbred Mice Treated with Mercuric Chloride. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 144, p. 163–170, 1997.

GIRARDI, G.; ELIAS, M.M. Mercuric chloride effects on rat renal redox enzymes activities: SOD protection. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, p. 61-66, 1995.

GRAEME, K.A.; POLACK, C.V.J. Heavy metal toxicity, part 1: arsenic and mercury. **The Journal Emergency Medicine**, v. 16, n. 1, p. 45-46, 1998.

GSTRAUNTHALER, G.; PFALLER, W.; KOTANKO, P. Glutathione depletion and *in vitro* lipid peroxidation in mercury or maleate induced acute renal failure. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, p. 2969-2972, 1983.

HIETALA, E.L. The effect of ovariectomy on periosteal bone formation and bone resorption in adult rats. **Journal of Bone Mineral**, v. 20, p. 57-65, 1993.

HILL, P.A.; ORTH, M. Bone Remodeling. **British Journal of Orthodontics**, v. 25, p. 101-107, 1998.

JARÜP, L. Hazard of heavy metals contamination. **British Medical Bulletin**, v. 68, p. 167-182, 2003.

JIN, G.B. et al. Induction of anti-metallothionein antibody and mercury treatment decreases bone mineral density in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 185, p. 98-110, 2002.

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

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

KATSUMATA, T. et al. Intermittent cyclical etidronate treatment maintains the mass, structure and the mechanical property of bone in ovariectomized rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 10, n. 6, p. 921-931, 1995.

KHAN, A.T. et al. Uptake and distribution of mercury in rats after repeated administration of mercuric chloride. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, v. 36, p. 2039-2045, 2001.

KIEBZAK, G.M. et al. Bone status of senescent male rats: chemical, morphometric and mechanical analysis. **Journal of Mineral Research**, v. 3, n. 1, p. 37-45, 1988.

LEOPOLA, V.T. et al. Long-term effects of clodronate on growing rat bone. **Bone**, v. 18, n. 2, p. 191-196, 1996.

LOVERIDGE, N. Bone: More Than Stick. **Journal of Animal Science**, v. 77, Suppl. 2/J. Dairy Sci. v. 82, Suppl. 2/1999, 1999.

MACKIE, E.J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, 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.

MARIE, P.J. Strontium ranelate: a novel mode of action optimizing bone formation and resorption. **Osteoporose International**, v. 16, p. S7-S10, 2005.

MARTINI, R.B. Effects of simulated weightlessness on bone properties in rats. **Journal of Biomechanics**, v. 23, n. 10, p. 1021-1029, 1990.

MELTON III, L.J. et al. Osteoporosis and the risk of hip fracture. **American Journal of Epidemiology**, v. 124, p. 254-261, 1986.

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.

MODY, N. et al. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. **Free Radical Biology Medicine**, v. 31, p. 509-519, 2001.

MONTEAGUDO, M.D. et al. Comparison of the bone robusticity index and bone weight/bone length index with the results of bone densitometry and bone histomorphometry in experimental studies. **Acta Anatomica**, v. 160, p. 195-199, 1997.

MOSER, V.C. Dose-response and time-course of neurobehavioral changes following oral chlorpyrifos in rats of different ages. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 22, p. 713-723, 2000.

NAM, S.H. et al. H₂O₂ enhances Ca release from osteoblast internal stores. **Yonsei Medical Journal**, v. 43, n. 2, p. 229-235, 2002.

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.

NIES, A.S.; SPILLBERG, S.P. Principles of therapeutics. *In*: HARDMAN, J.G.; GILMAN, A.G.; LIMBIRD, L.E. (Eds). **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9th ed. New York: McGraw-Hill, Chapter 3, p. 43-62, 1996.

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

NORDSLETTEN, L. et al. The development of femoral osteopenia in ovariectomized rats is not reduced by high intensity treadmill training: a mechanical and densitometric study. **Calcified Tissue International**, v. 55, p. 436-442, 1994.

NTP. Toxicology and carcinogenesis studies of mercuric chloride (CAS no. 7487-94-7) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). Research Triangle Park, NC, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Toxicology Program (NTP TR 408; NIH Publication No. 91-3139), v. 408, p. 1-260, feb 1993.

ODA, N. et al. Metallothionein expression and localization in rat bone tissue after cadmium injection. **Toxicology Letters**, v. 123, p. 143-150, 2001.

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

PARFITT, A.M.; CHIR, M.B.B. Bone remodeling and bone loss: understanding the pathophysiology of osteoporosis. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 30, n. 4, p. 789-811, 1987.

PATRICK, L. Mercury toxicity and antioxidants: Part I: Role of glutathione and alpha-lipoic acid in the treatment of mercury toxicity. **Alternative Medicine Reviews**, v. 7, p. 456-471, 2002.

PEIXOTO, N.C. et al. Metallothionein, zinc, and mercury levels in tissues of young rats exposed to zinc and subsequently to mercury. **Lifes Sciences**, v. 81, p. 1264-1271, 2007.

PENG, Z. et al. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. **Bone**, v. 15, n. 5, p. 523-532, 1994.

RAISZ, L.G. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 1353-1358, 1999.

RENNO, A.C. et al. The effects of a progressive loading exercise program on femoral physical properties and strength of osteopenic rats. **Acta Ortopedica Brasileira**, v. 15, n. 5, p. 276-279, 2007.

REGINSTER, J.Y. et al. Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: tropos study. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, p. 2816-2822, 2005.

REGISTER, T.C.; WUTHIER, R.E. Effect of L- and D-tetramisole on ^{32}P i and ^{45}Ca uptake and mineralization by matrix enriched fractions from chicken epiphyseal cartilage. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 922-928, 1984.

ROBINSON, R. The possible significance of hexose phosphoric esters in ossification. **Biochemical Journal**, v. 17, p. 286-293, 1923.

ROBLING, A.G.; TURNER, C.H. Mechanotransduction in bone: genetic effects on mechanosensitivity in mice. **Bone**, v. 31, n. 5, p. 562 - 69, 2002.

RODRIGUEZ, M.A.S. et al. Oxidative stress as a risk factor for osteoporosis in elderly Mexicans as characterized by antioxidant enzymes. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 8, p. 124, 2007.

ROTHSCHILD, R.F.N.; DUFFY, L.K. Mercury concentration in muscle, brain and bone of western Alaskan waterfowl. *Science of the Total Environment*, v. 349, p. 277-283, 2005.

RUBIN, J.; RUBIN, C.; JACOBS, C.R. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. *Gene*, v. 367, p. 1-16, 2006.

SANTOS, E. et al. Diagnóstico das condições de saúde de uma comunidade garimpeira na região do Rio Tapajós, Itaituba, Pará, Brasil, 1992. *Caderno de Saúde Pública*, v. 11, n. 2, p. 212-225, Jun. 1995.

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

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

SHAINI, F.J. et al. In vitro evaluation of the effect of freshly mixed amalgam and gallium-based alloy on the viability of primary periosteal and osteoblast cell cultures. *Biomaterials*, v. 21, p. 113-119, 2000.

SHEWEITA, S.A.; KHOSHHAL, K.I. Calcium metabolism and oxidative stress in bone fractures: role of antioxidants. *Current Drug Metabolism*, v. 8, p. 519-525, 2007.

SHIMANO, M.M.; SHIMANO, A.C.; VOLPON, J.B. Histerese de femurs de ratas submetidas a ensaio de flexão, em diferentes faixas etárias. *Revista Brasileira de Engenharia e Biomedicina*, v. 18, n. 2, p. 89-97, mai/ago 2002.

SIDDIQI, N.J.; ALHOMIDA, A.S. Effect of mercuric chloride on various hydroxyproline fractions in rat serum. *Molecular Cell Biomechanics*, v. 271, n. 1-2, p. 159-165, 2005.

SINGH, M.; RISHI, S. Plasma acetylcholinesterase as a biomarker of triazophos neurotoxicity in young and adult rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* v. 19, p. 417-476, 2005.

SONTAKKE, A.N.; TARE, R.S. A duality in the roles of reactive oxygen species with respect to bone metabolism. **Clinica Chimica Acta**, v. 318, p. 145-148, 2002.

SOUZA, A.P.; GERLACH, R.F.; LINE, S.R.P. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. **Dental Materials**, v. 16, p. 103-108, 2000.

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

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

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

TROEN, B.R. Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation. **Experimental Gerontology**, v. 38, p. 605-614, 2003.

TUREK, S.L. **Ortopedia. Princípios e sua aplicação**. Trad. por Alfredo Jorge Cherem, et al. 4 ed, v. 1, São Paulo, Manole, 1991.

TYL, R.W. Toxicity Testing, Developmental. In: WEXLER, P. (Ed.). **Encyclopedia of Toxicology**. San Diego: Academic Press, v. 3, p. 305-319, 1998.

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

VAHTER, M. et al. Gender differences in the disposition and toxicity of metals. **Environmental Research**, v. 104, n. 1, p. 85-89, 2007.

VON BURG, R.; GREENWOLD, M.R. Mercury. In: MERIAN, E. (Ed), **Metals and Their Compounds in the Environment Occurrence, Analysis and Biological Relevance**. Weinheim, New York, p. 1045-1088, 1991.

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

WURTZ, T.; et al. Collagen mRNA expression during tissue development: the temporospatial order coordinates bone morphogenesis with collagen fiber formation. **Matrix Biology**, v. 17, p. 349-360, 1998.

YAMAMOTO, N.; JEE, W.S.S.; MA, Y.F. Bone Histomorphometric Changes in the Femoral Neck of Aging and Ovariectomized Rats. **The Anatomical Record**, n. 243, p. 175-185, 1995.

YONAGA, T. et al. Effect of organic and inorganic mercury compounds on the growth of incisor and tibia in rats. **Anatomischer Anzeiger**, v. 159, 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.

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

APÊNDICE F: PARÂMETROS BIOMECÂNICOS

GRUPO CONTROLE

| | (kN) | (kN) | (N/mm) | (J) |
|--------------|---------------------|-------------------------|----------------|-------------------|
| Ratos | Força Máxima | Força de Ruptura | Rigidez | Resilência |
| 1 | 98,4 | 81,6 | 178,0 | 0,0684 |
| 2 | 90,1 | 81,3 | 166,5 | 0,0430 |
| 3 | 97,4 | 82,0 | 179,4 | 0,0622 |
| 4 | 78,0 | 53,9 | 164,9 | 0,0415 |
| 5 | 94,0 | 69,3 | 181,1 | 0,0399 |
| 6 | 82,3 | 68,8 | 165,8 | 0,0386 |
| 7 | 80,4 | 71,0 | 141,4 | 0,0428 |
| 8 | 96,5 | 63,4 | 156,2 | 0,0493 |
| 9 | 81,9 | 80,8 | 162,7 | 0,0518 |
| 10 | 85,5 | 78,3 | 134,7 | 0,0563 |
| MED | 88,45 | 73,04 | 163,07 | 0,0493 |
| DP | 7,7522 | 9,4579 | 15,4884 | 0,0102 |
| EPM | 2,4515 | 2,9908 | 4,8978 | 0,0032 |
| N | 10 | 10 | 10 | 10 |

GRUPO CONTAMINADO

| | (kN) | (kN) | (N/mm) | (J) |
|--------------|---------------------|-------------------------|----------------|-------------------|
| Ratos | Força Máxima | Força de Ruptura | Rigidez | Resilência |
| 1 | 92,0 | 74,2 | 155,1 | 0,0456 |
| 2 | 103,1 | 87,0 | 145,9 | 0,0668 |
| 3 | 106,6 | 84,8 | 155,2 | 0,0587 |
| 4 | 91,7 | 91,7 | 122,6 | 0,0476 |
| 5 | 101,4 | 64,6 | 175,8 | 0,0628 |
| 6 | 88,6 | 79,5 | 113,9 | 0,0657 |
| 7 | 99,3 | 83,6 | 173,9 | 0,0475 |
| 8 | 87,3 | 73,6 | 171,7 | 0,0467 |
| MED | 96,25 | 79,88 | 151,76 | 0,0552 |
| DP | 7,2433 | 8,7262 | 23,3199 | 0,0092 |
| EPM | 2,5609 | 3,0852 | 8,2448 | 0,0033 |
| N | 8 | 8 | 8 | 8 |

APÊNDICE G: PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

GRUPO CONTROLE

| | mg | mg |
|------------|-----------------|----------------|
| Ratos | Cálcio | Fosfóro |
| 1 | 114,2 | 78,9 |
| 2 | 96,4 | 75,8 |
| 3 | 110,3 | 71,2 |
| 4 | 96,4 | 73,6 |
| 5 | 109,7 | 75,2 |
| 6 | 99,5 | 61,2 |
| 7 | 106,6 | 67,4 |
| 8 | 92,7 | 66,7 |
| 9 | 101,9 | 70,3 |
| 10 | 85,4 | 72,9 |
| MED | 101,2958 | 71,3304 |
| DP | 8,96333 | 5,1737 |
| EPM | 2,834454 | 1,6361 |
| N | 10 | 10 |

GRUPO CONTAMINADO

| | mg | mg |
|------------|---------------|----------------|
| Ratos | Cálcio | Fosfóro |
| 1 | 103,2 | 84,3 |
| 2 | 110,0 | 81,3 |
| 3 | 98,1 | 76,5 |
| 4 | 90,9 | 74,3 |
| 5 | 97,3 | 63,6 |
| 6 | 97,9 | 61,2 |
| 7 | 92,4 | 66,3 |
| 8 | 97,1 | 74,9 |
| MED | 98,366 | 72,8104 |
| DP | 6,010 | 8,3363 |
| EPM | 2,125 | 2,9473 |
| N | 10 | 8 |

APÊNDICE H: PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

GRUPO CONTROLE

| | (mg/dl de plasma) | (mg/dl de plasma) |
|--------------|-------------------|-------------------|
| Ratos | Cálcio | Fosfóro |
| 1 | 9,6286 | 4,514 |
| 2 | 7,2635 | 4,405 |
| 3 | 8,1822 | 5,415 |
| 4 | 9,3214 | 5,393 |
| 5 | 9,2674 | 5,251 |
| 6 | 4,6114 | 4,563 |
| 7 | 8,9468 | 5,415 |
| 8 | 9,7167 | 4,612 |
| 9 | 9,8111 | 4,651 |
| 10 | 9,8434 | 4,967 |
| MED | 8,6593 | 4,9187 |
| DP | 1,6411 | 0,4150 |
| EPM | 0,5189 | 0,1312 |
| N | 10 | 10 |

GRUPO CONTAMINADO

| | (mg/dl de plasma) | (mg/dl de plasma) |
|--------------|-------------------|-------------------|
| Ratos | Cálcio | Fosfóro |
| 1 | 9,8310 | 4,885 |
| 2 | 9,4174 | 4,907 |
| 3 | 9,8583 | 5,873 |
| 4 | 8,3255 | 5,082 |
| 5 | 9,3154 | 5,120 |
| 6 | 9,2147 | 4,525 |
| 7 | 9,7425 | 5,180 |
| 8 | 7,5447 | 4,634 |
| MED | 9,1562 | 5,02593 |
| DP | 0,8173 | 0,41265 |
| EPM | 0,2889 | 0,14589 |
| N | 8 | 8 |