

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

**ATIVIDADE METALOPROTEINASES E PROPRIEDADES
FÍSICAS, QUÍMICAS E BIOMECÂNICAS DE OSSOS DE
RATOS TRATADOS COM CLORETO DE MERCÚRIO**

Fernando Vidal D'Ávila

**São Carlos
2011**

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

**ATIVIDADE METALOPROTEINASES E PROPRIEDADES
FÍSICAS, QUÍMICAS E BIOMECÂNICAS DE OSSOS DE
RATOS TRATADOS COM CLORETO DE MERCÚRIO**

Fernando Vidal D'Ávila

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

Orientadora: Prof.Dra. Keico Okino Nonaka

Agência Financiadora:CAPES

São Carlos
2011

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

D259am D'Ávila, Fernando Vidal.
Atividade metaloproteinases e propriedades físicas,
químicas e biomecânicas de ossos de ratos tratados com
cloreto de mercúrio / Fernando Vidal D'Ávila. -- São Carlos :
UFSCar, 2013.
47 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2011.

1. Ossos. 2. Rato. 3. Metaloproteinases. 4. Mercúrio. 5.
Biomecânica. I. Título.

CDD: 619.93 (20ª)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

Tese de Doutorado de Fernando Vidal D'Avila

Dia 15/09/2011

Profª. Drª. Keico Okino Nonaka.....

Prof. Dr. João Cesar Bedran de Castro.....

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

Prof. Dr. Dernival Bertonecello.....

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

Prof.Dra. Keico Okino Nonaka
(Orientadora)

Esse trabalho recebeu apoio
financeiro à pesquisa da CAPES.

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

Autor desconhecido

DEDICATÓRIA ESPECIAL I

À minha mãe, Maria Margarida

MÃE...

que na presença constante me ensinou
na pureza do seu coração a vislumbrar caminhos...

MÃE...

dos primeiros passos, das primeiras
palavras...

MÃE...

do amor sem dimensão, de cada momento, dos atos de
cada capítulo de minha vida não ensaiados,
mas vividos em cada emoção...

MÃE...

da conversa no quintal, do acalanto do meu sono aquecido
de amor, aninhada em seu coração...

MÃE ...

do abraço, do beijo que levo na
lembrança...

MÃE...

é você que me inspira a caminhar...

MÃE...

a presença de cada passo que o tempo não apaga:
por mais longo e escuro que seja o caminho, haverá
sempre um horizonte...

MINHA MÃE...

não mais presente entre nós, pelo exemplo de força e
disposição e, principalmente por ter sempre acreditado em mim;

MÃE...

saudade eterna.

DEDICATÓRIA ESPECIAL II

A minha querida e amada esposa Fernanda Guzzo Gomes D'Avila

“Agradeço a ela por ser essa pessoa tão especial em minha vida.

Juntos enfrentamos muitas dificuldades.

Que somente nós somos capazes de compreender.

Existem coisas que precisamos lembrar para não esquecer, mas tem coisas
impossíveis de esquecer: você!”

AGRADECIMENTOS

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

Às minhas irmãs pelo apoio e por simplesmente ser quem são!
Amo vocês!

Aos meus tios, Rogério e José Maria, pelos direcionamentos seguros e sensatos e por tamanho incentivo sem o qual eu não teria chegado até aqui.

À minha família que sempre me incentivou pela busca dos meus sonhos, por participarem com união e acolhimento em todos os momentos da minha vida.

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

Ao amigo Leandro Ruffoni pela amizade e companheirismo incomparáveis. “Léo: valeu”!

Ao amigo Gilberto E. Shiguemoto, o Juca, pela amizade e pelos trabalhos em parceria. Aprendi muito com você; obrigado pelas oportunidades!

Aos (ex e atuais) colegas de laboratório André Luis da Cruz, Cléo Leite, Lyandra Zanatta, Fernanda Sampaio, Juciléia Barbosa, Daniel Mochiutt, Charles Wang, Valéria Mattos, José Aparecido Ferreira, Fabio Alexandre, Dernival Bertoncelo, Lucélia Maria, Edvanina de Souza, Fabio H. Bogni ,

Adriana Adler e companheiros desta jornada pela amizade e bons momentos de descontração.

Aos meus queridos amigos de república, de futebol, da UFSCAr e de São Carlos por serem especial e fazerem parte da minha historia.

Ao Técnico de Laboratório Sr. Sergio Dias pelo trabalho de dia-a-dia.

À banca de mestrado: Professores Mário Jefferzon Q. Lousada e João César Bedran de Castro pela contribuição em minha defesa e pelo incentivo de continuidade na pesquisa.

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

Muito obrigado!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profa. Keico,

Com quem aprendi sobre pesquisa, ética e profissionalismo,

Que me recebeu com acolhimento no “lar” laboratório de neuroendocrinologia,

Que contribuiu de forma imensurável para a minha formação e crescimento profissional,

Que sempre esteve disponível de forma profissional, generosa e compreensiva,

Obrigado por você existir em minha vida.

Minha eterna gratidão e amizade!

RESUMO

Devido à carência de dados sobre o envolvimento do mercúrio sobre alterações do metabolismo ósseo, torna-se importante investigar a influência do seu efeito sobre os parâmetros ósseos. Avaliou-se as possíveis alterações biométricas, físicas, biomecânicas e enzimáticas (MMPs) ósseas em ratos intoxicados com cloreto mercurioso durante seu desenvolvimento. Os animais foram divididos em 4 grupos: 3m, 6m, 9m e 12 meses de vida. Os animais tratados com cloreto de mercúrio receberam HgCl_2 , e os controles, salina por gavagem gástrica. O tratamento iniciou-se aos 30 dias de vida do animal, 5 vezes por semana, durante 60 dias. A dose diária foi de 5mg/kg de massa corporal de HgCl_2 e de 0,1ml de salina /100g de massa corporal. Os animais foram pesados 3 vezes por semana até o dia do sacrifício. Após esse período, o grupo 3m foi sacrificado por decapitação enquanto que os demais grupos permaneceram sem tratamento até que completassem a idade desejada (6m, 9m e 12 meses de vida). Os animais tiveram seus fêmures, tíbias e vértebras (L5) retirados para análise dos parâmetros biométricos, biomecânicos e enzimático. Para análise estatística dos resultados foi feito o Teste de normalidade Shapiro-Wilk, o teste de variância Two-way analysis (ANOVA) (para tempo e tratamento) e o Teste de Tukey para múltiplas comparações utilizando o programa Graphpad Instat (version 3.00 - dezembro de 1997). Todos os valores foram expressos como média \pm erro padrão da media e o nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$. Houve tendência de aumento de percentual do material mineral, densidade mineral e óssea e da força máxima suportada, das amostras dos fêmures dos grupos contaminados em relação aos seus controles respectivos. Os animais contaminados também apresentaram diferenças de força máxima das vértebras, onde o 6 meses foi maior em relação ao grupo 3M. Houve maior atividade das MMP-2 no grupo mercúrio em relação ao grupo salina de mesma idade. Os resultados desse trabalho mostraram que o HgCl_2 , na concentração de 5mg/kg PC, quando comparados com o grupo controle não apresentaram diferenças das alterações

das propriedades biométricas, biofísicas e biomecânicas do tecido ósseo em desenvolvimento dos ratos. O tratamento com HgCl_2 estimulou a atividade das MMP-2 nos animais no final do tratamento e permaneceu em um período de até 6 meses depois.

Palavras chaves: rato, osso, metaloproteinases, mercúrio, força máxima

Abstract

There are few data about the mercury influence on bone metabolism then it is important to investigate the bone parameters that can be affected by it. The aim of this study was to evaluate the biometric, physical, biomechanical and enzymatic (MMPs) bone alterations in adult rats contaminated with mercurous chloride (HgCl_2) during their development. The animals were separated in 4 groups: 3, 6, 9 and 12 months. The animals received mercuric chloride (experimental group) and saline (control group) by stomach gavage. The treatment had begun on 30 days of animals life, 5 times a week during 60 days. The daily dose was 5mg/kg of body weight of HgCl_2 and 0,1ml of saline /100g of body weight. The animals were weighted 3 times a week until the sacrifice day. After the period of contamination, the 3 months groups were sacrificed, while the other groups stayed without treatment to complete their ages (6, 9 and 12 months). The animals' femurs, tibia and vertebrae (L5) were dissected to be analyzed on biometric, biomechanical and enzymatic parameters. To statistical analyze it was used the normality test Shapiro-Wilk, the variance test Two-way analysis (ANOVA) (for time and treatment), and the Tukey Test to do multiple comparisons using Graphpad InStat (version 3.00 – December 1997). All the values were expressed as media \pm standard error media and the significance level was $p \leq 0.05$. There was a tendency of a percent increase of mineral material, mineral and bone density and of the maximum force of femurs sample on contaminated groups related to their respective controls. The contaminated animals showed difference on the maximum force of the vertebrae, which the 6 months had a higher value than the 3 months group. It was higher MMP-2 activity on mercury group than on the saline group with the same age. The results showed that the HgCl_2 on 5m/Kg dose, when related to the control group, did not present difference of biometric, biophysical and biomechanical parameters on bone tissue of rats in development. The HgCl_2 contamination stimulated the MMP-2 activity at the end of the contamination period and remained until 6 months after the contamination.

Keywords: rat, bone, metalloproteinases, mercury, Maximum Force.

SUMÁRIO

Banca Examionadora	I
Agradecimentos	I
Agradecimentos especiais	III
Resumo	V
Abstract	VII
Sumário	IX
Lista de tabela	XI
Lista de figuras	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XV
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 Animais	11
3.2 Grupo Experimental	12
3.3 Protocolo de tratamento	12
3.4 Eutanasia	13
3.5 Analise dos dados	13
3.6 Propriedades biométricas	13
3.7 Propriedade biomecânica	14

3.7.1 Ensaio mecânico de flexão a três pontos	16
3.7.2 Ensaio mecânico de compressão de vértebra	17
3.8 Propriedades Físicas	18
3.9 Determinação da Atividade MMPs (Zimografia)	19
3.10 Análise dos resultados	20
Normas metodológicas	21
4. RESULTADOS	22
5. DISCURSÃO	32
6. CONCLUSÃO	38
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	39

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Massa corporal (MC) inicial e final dos animais dos diferentes grupos experimentais. Valores expressos em média \pm EPM.	38
TABELA 2.	Comprimento e diâmetros maior e menor dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais. Valores expressos em média \pm EPM.	39
TABELA 3.	Parâmetros físicos do volume ósseo, densidade óssea e percentual (%) de água dos fêmures dos animais dos grupos experimentais. Valores expressos em média \pm EPM.	41
TABELA 4.	Parâmetros biomecânicos dos fêmures dos animais dos grupos experimentais obtidos com o teste de flexão de pontos. Valores expressos em média \pm EPM.	43
TABELA 5.	Altura máxima obtida através de medição com paquímetro e deslocamento máximo obtido no teste de compressão das vértebras (L5) dos animais dos diferentes grupos experimentais. Valores expressos em média \pm EPM.	46
TABELA 6.	Parâmetros físicos das vértebras (L5) dos animais dos grupos experimentais. Valores expressos em média \pm EPM.	48

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Figura ilustrativa da administração de drogas pelo método de gavagem gástrica. 30
- FIGURA 2. Máquina de ensaio universal Instron (modelo 4444) preparada para o teste 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 extensiometria. 32
- FIGURA 3. Representação gráfica da curva força-deformação obtida com o teste de flexão a três pontos dos fêmures e compressão das vértebras de ratos. 34
- FIGURA 4. Gel de gelatina 1%-SDS-PAGE. Cada banda representa um *pool* de amostra (n=7). 44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ca ⁺⁺	Cálcio
cm	centímetros
CM	Carga máxima
Da	Dalton
DCF	Departamento de Ciências Fisiológicas
DP	Desvio padrão
EPM	Erro padrão da média
F	Força
g	Gramas
Hg	Mercúrio
Hg ²⁺	Sais de mercúrio
HgCl ₂	Cloreto mercúrio
Hg ₂ Cl ₂	Cloreto mercurioso
J	Joule
K	Quilo
L5	Quinta vértebra lombar
Máx	Máxima
MEC	Matriz extracelular
MED	Média
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mm	milímetros

MMPs	Metalopeptidases de matriz
n	Número de animais
N	Newton
OAT1	Transportador de Ânion Orgânico 1
OAT3	Transportador de Ânion Orgânico 3
ρ	Rô
P	Fósforo
Pb ²⁺	Sais de Chumbo
PC	Peso corporal
pH	Potencial hidrogênio iônico
P_i	Peso imerso
Pm	Peso do material mineral (cinzas)
Ps	Peso seco
PTH	Hormônio da paratireóide
P_u	Peso úmido
S	Solução Salina
SH	Grupamentos sulfídricos
TRAP	<i>Tartrate-resistant acid phosphatase</i>
vs	Versus
μ	micro
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
Ø	Diâmetro
>	Maior
<	Menor

\leq Menor ou igual

Introdução

1.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é o constituinte principal do esqueleto, constituído de uma matriz extracelular que contém componentes orgânicos (35%) e inorgânicos (65%). Apresenta funções importantes ao organismo como de suporte para as partes moles e proteção os órgãos vitais, como os que estão contidos na caixa torácica e craniana **[MARCUS, FELDMAN e KELSEY, 1996; FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL *et al.*, 2006a]**

Os ossos funcionam como um sistema de alavancas que amplia as forças geradas pela contração da musculatura esquelética para realização do movimento. Os ossos ainda são grandes armazenadores de substâncias, sobretudo íons cálcio e fosfato. O esqueleto ósseo também serve como uma segunda linha de defesa contra acidose e sua vasta área de superfície mineral pode adsorver toxinas e metais pesados e minimizar seus efeitos adversos sobre outros tecidos **[RAISZ, 1999; MUNDY, 1999]**.

Por ser uma estrutura inervada e irrigada, o osso apresenta grande sensibilidade e capacidade de regeneração **[MARCUS, FELDMAN e KELSEY, 1996; PIVONKA P, 2008]**.

Ao contrário do que se imagina, o tecido ósseo é uma estrutura que sofre constantes modificações ao longo da vida, podendo ser fisiológicas ou patológicas **[PARFITT, 1987]**. As alterações fisiológicas ocorrem através de uma relação entre formação e reabsorção do tecido ósseo, que tem seu pico máximo de desenvolvimento até os 30 anos de idade, prevalecendo a formação. Entre os 30 e 40 anos ocorre uma estabilização entre esses dois mecanismos, e após esse período a reabsorção prevalece, levando à diminuição progressiva da 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 e MA, 1995; DATTA, 2008]. Estudos têm mostrado que a força necessária para se causar uma fratura óssea é diretamente proporcional com a densidade óssea [NGUYEN *et al.*, 2003].

Em casos patológicos, a reabsorção do tecido ósseo acontece em um grau mais elevado e pode levar à ocorrência da perda de massa óssea e até mesmo à osteoporose. O fato de o tecido ósseo ser uma estrutura sólida faz com que ele esteja vulnerável a fraturas, principalmente na osteoporose [RALSTON e CROMBRUGGHE, 2006]. A fratura conseqüente da diminuição da massa óssea torna-se preocupante, visto que a mesma pode ocasionar problemas como infecções, pneumonias, entre outros, e até levar a mortalidade. Dentre todas as patologias envolvidas com o enfraquecimento ósseo, a osteoporose é a de maior ocorrência na população mundial e a mais freqüente das doenças osteometabólicas, sendo, portanto, a que tem recebido maior atenção da literatura científica [NETO *et al.*, 2002]. Devido à sua importância, várias são as preocupações e cuidados especiais com o que possa causar alterações ósseas ao longo da vida.

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

bioquímicos que regulam o *turnover* ósseo [TEITELBAUM *et al*, 2000; MACKIE, 2003; BONEWALD, 2004].

Já os osteoclastos, são células reabsorvedoras do tecido e originam-se de células mononucleadas hematopoiéticas. Sua ativação se dá principalmente através da ação do hormônio da paratireóide (PTH) que tem seu receptor nos osteoblastos, e uma ação parácrina nos osteoclastos. Nessas células, o PTH ativa a reabsorção do tecido mineralizado com finalidade da manutenção das concentrações dos íons de cálcio no sangue. Os osteoclastos atacam a superfície óssea mineralizada e inicia a absorção pela secreção de íons de hidrogênios e enzimas lisossomais, o qual pode degradar todos os componentes da matriz óssea, incluindo colágeno, em baixo pH [RAISZ, 1999; PIVONKA, 2008]. O processo de remodelação óssea é caracterizado por variedade de enzimas liberadas pelos osteoblastos e osteoclastos, tendo o papel de desempenhar o *turnover* da matriz extracelular (MEC). A remodelação inclui funções metabólicas integrais para o *turnover* do colágeno fibrilar e a deposição e reabsorção de tecido. O sistema apresentado é de essencial importância para os tecidos, e estas enzimas proteolíticas extracelulares atuam no remodelamento tecidual [STERNLICHT e WERB, 2001]. Uma classe destas proteínas responsáveis pelo remodelamento da MEC é a das metalopeptidases de matriz (MMPs). As MMPs são enzimas responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção da MEC, desempenhando papel importante na remodelação da mesma em vários processos fisiológicos e patológicos [VU e WERB, 2000]. Em tecidos ricos em colágeno como tecido ósseo, a organização da MEC envolve vários fatores inibidores e estimuladores para que haja equilíbrio entre produção e degradação.

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

1.2 Metalopeptidases ou Metaloproteinases (MMPs)

As MMPs foram descobertas em 1962 por Gross e Lapiere quando observaram que certas enzimas (as MMPs) degradavam fibras de colágeno. Mais tarde, ao fim da década de 60 e início de 70, maior importância foi dada ao estudo das MMPs devido à observação do papel regulador dessas enzimas relacionado a certas doenças como artrite reumatóide e câncer. Os estudos que abordam a relação das MMPs com patologias são extremamente complexos, visto que, há casos em que o aumento de sua atividade induz a, por exemplo, progressão tumoral e outros casos em que sua atividade aumentada inibe o tumor **[GROSS e LAPIERE, 1962; BRINCKERHOFF e MATRISIAN, 2002]**.

Como já mencionado, as MMPs foram consideradas como componentes de degradação da MEC. Entretanto, a proteólise das MMPs pode criar espaços para migração celular, pode produzir fragmentos de substratos com atividade biológica independente, além de poder ativar, desativar ou modificar a atividade das moléculas sinalizadoras, tanto direta quanto indiretamente. Ou seja, de acordo com o substrato degradado e o tipo de MMP ativada para essa degradação, diferentes comportamentos biológicos podem ocorrer, inclusive de produção, o que seria, a princípio, “contraditório” à sua função de degradação dos efeitos causados pelas MMPs **[STEINLICHT e WERB, 2001]**.

As MMPs expressas na ossificação endocondral têm sido localizadas numa variedade de análises. A MMP-3 está presente nos osteócitos e osteoblastos, enquanto que sua forma inativa (Pro MMP-3) está na MEC ao longo do perióstio. Já a MMP-10 é expressa nos osteoclastos e outras células relacionadas à reabsorção. A MMP primariamente envolvida na ossificação endocondral é a MMP-9, a qual é altamente expressa em monócitos e osteoclastos durante o desenvolvimento de camundongos. A MMP-9 ativa é concentrada em sítios de reabsorção de cartilagem, próximo à junção osteocondral, onde a invasão vascular ocorre. Já a MMP-2 é difusamente expressa em osteoblastos, células da medula óssea e perióstio. O papel crucial das MMPs na ossificação endocondral pode ser observado tratando camundongos de 1 a 2 semanas de idade (quando os ossos desenvolvem-se

rapidamente) com um inibidor de MMPs. Isso resulta em um hiper desenvolvimento da cartilagem no primeiro sítio de ossificação e uma inibição de ossificação no segundo sítio das epífises **[ORTEGA, BEHONIC e WERB, 2004]**.

As MMPs melhor estudadas nos osteoclastos são MMP-9 e MMP-14. Ambas são muito importantes no recrutamento de osteoclastos em ossos longos e na formação da cavidade marrom. Porém, não há evidência de seu envolvimento (nem de outras) na solubilização da matriz óssea. Para estudar as MMPs envolvidas com a solubilização da matriz óssea, Houli *et al* (2004) clonaram a MMP-12 de osteoclastos de coelhos e avaliaram sua expressão em células ósseas extraídas de coelhos e camundongos. A MMP-12 não é detectada em tecido adulto normal e possui distribuição celular muito limitada. Porém, ela está envolvida em diversos papéis de regulação, degradação e produção. Os autores investigaram também quando a MMP-12 é a MMP fundamental na reabsorção óssea. Esses autores afirmaram que a MMP-12 desses animais é muito semelhante à dos humanos, sendo inclusive mais semelhante do que a de ratos e camundongos. Os resultados mostraram que os osteoclastos de camundongos também expressam MMP-12, mas os de coelho nem sempre as expressam. Essa expressão seletiva da MMP-12 levou aos autores concluírem que essa MMP tem seu papel mais evidente como resposta a situações críticas, demonstrando ter uma função muito específica.

A família das MMPs consiste de três grupos principais: colagenases intersticiais, as gelatinases e as estromelisinases. As MMPs são secretadas como proenzimas e são reguladas por inibidores específicos, os quais influenciam a remodelação óssea principalmente por ativar ou inibir os osteoclastos **[HILL *et al*, 1994]**.

Costa *et al* (2008) induziram a tirotoxicose em gatos domésticos para que houvesse a desmineralização óssea e pudessem avaliar o papel das MMPs-2 e -9 no processo de remodelamento da matriz óssea. Através da zimografia, os autores puderam verificar a atividade das MMPs nos gatos tirotóxicos, onde essas enzimas apresentaram correlação negativa com os valores da densidade mineral óssea nos primeiros 14 dias de administração

hormonal, quando a desmineralização óssea teve sua maior amplitude. Isso demonstrou ação rápida dessas MMPs nos casos de tirotoxicose, sendo um fator agravante nos processos de osteoporose secundária em pacientes com hipertireoidismo. A conclusão dos autores foi de que a desmineralização óssea secundária à tirotoxicose aumentou a atividade das MMP-2 e -9 em gatos.

Com base nos estudos descritos observa-se o importante papel das metaloproteinases no *turnover* ósseo, comportando-se como marcadores biológicos para identificação dos processos de remodelação desse tecido.

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

1.3 Cloreto de Mercúrio

O mercúrio é um metal líquido altamente volátil e sua concentração altera-se de acordo com a temperatura, sendo que quanto mais elevada maior será sua evaporação.

Questões ambientais tem sido alvo de preocupação e estudos na tentativa de conseguir a evolução científica e tecnológica com a menor agressão ambiental possível.

O mercúrio é um poluente ambiental encontrado em toda biosfera. O homem usa o mercúrio e depois o libera para o ambiente, causando um aumento de até quatro vezes da sua concentração. As principais fontes de poluição por metais pesados são provenientes dos efluentes industriais (incluindo uso laboratorial), de mineração e das lavouras [VIEIRA & PASSARELLI, 1996; ATKINSON *et al*, 2001; SANTOS *et al*, 2003; BRODKIN *et al*, 2007].

No Brasil o mercúrio começou a ser amplamente usado na década de 70 para fins garimpeiros, especialmente na região Amazônica. Todo mercúrio utilizado no Brasil é importado, pois o país não produz esse metal. Nos anos 80 as pesquisas mostraram que a contaminação de peixes em rios de capitais como São Paulo era significativa. Na última década esses números diminuíram demonstrando que os cuidados das indústrias relacionados à poluição causada pelo Hg no ambiente estão sendo de fato providenciados. No entanto, com o avanço do garimpo realizado na Amazônia e região Central do Brasil, o uso do Hg para esse fim tem aumentado, representando mais de 84% do total de mercúrio emitido anualmente no Brasil **[LACERDA, 1997]**.

O mercúrio pode ser encontrado em três formas químicas: mercúrio elemento, orgânico e inorgânico. Vários sais e compostos são achados conjugados ao mercúrio orgânico e inorgânico tornando-os amplamente mais tóxicos **[GRAEME e POLLACK, 1998]**.

Um composto de metal pesado que possui grande influência na contaminação ambiental é o cloreto de mercúrio (HgCl_2), o qual tem sido usado na agricultura como fungicida, na medicina como anti-séptico tópico e desinfetante e na química como um intermediário na produção de outros compostos de mercúrio **[ALDEN et al, 1993]**. Essa variação do mercúrio inorgânico tem efeitos tóxicos sobre o sistema imune, rins, pulmões, sistema nervoso e trato gastrointestinal e seus danos são graves, e em grande parte dos casos, permanentes. O mercúrio é um irritante de pele e do trato gastrointestinal e possui uma rápida absorção através desses. A absorção do vapor de mercúrio se dá principalmente pelos pulmões, através da inalação e retenção pulmonar **[GRAEME e POLLACK, 1998; JIN et al, 2002]**.

As principais fontes de exposição ao mercúrio na forma de vapor são decorrentes da produção e reparo de termômetros, barômetros, relógios, transformadores, baterias, lâmpadas fluorescentes, e preparação e instalação do amálgama dentário, na extração da prata e do ouro, entre outros. Compostos orgânicos e inorgânicos são usados como pesticidas e embora o uso mercurial tenha declinado na medicina, muitos compostos são usados como desinfetantes e derivados de metoxipropilmercúrio como diurético na

farmacologia de diversos países. Fenilmercúrio é usado como contraceptivo vaginal em algumas regiões e o mercúrio amoniado é o ingrediente ativo de cremes para clareamento de pele **[MAGOS, 1997]**.

Quando absorvido pelo ser humano, o cloreto de mercúrio se acumula nos tecidos biológicos e pode interferir em vários processos biológicos, incluindo respostas imunológicas como a alteração da função das células T, evidenciadas pelas diminuições das células T mitogênicas e pelos leucócitos **[DIETER *et al*, 1983; BRUNET *et al*, 1993]**.

Um estudo realizado pela U.S Department of Health and Human Services **[ALDEN *et al*, 1993]** relata as possíveis mudanças que podem ocorrer devido a algumas atividades microbianas que são capazes de converter mercúrio inorgânico em metil mercúrio orgânico, mercúrio orgânico em inorgânico, ou ainda, em condições apropriadas, formar mercúrio metálico. Zavariz e Glina (1993) verificaram a intoxicação por mercúrio metálico em trabalhadores de uma indústria de lâmpadas elétricas localizada na cidade de São Paulo. Em mais de 1 ano de pesquisa, através de fichas de anamneses e diversos exames laboratoriais como: fezes, urina, uréia e creatinina, hemograma, além de exame de audiometria tonal e avaliações psicológicas, concluíram que 84,62% dos trabalhadores tinham algum grau de intoxicação. Os autores 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 contaminação.

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. À medida que o mercúrio passa para o sangue, se liga a proteínas do plasma e eritrócitos, distribuindo-se pelos tecidos e concentrando-se nos rins, fígado e sangue, medula óssea, parede intestinal, parte superior do aparelho respiratório, mucosa bucal, glândulas salivares, cérebro, ossos e pulmões. **[FARRIS *et al*, 1993; GRIEM *et al*, 1997; GRAEME e POLLACK, 1998]**. O mercúrio é um tóxico celular geral, que provoca desintegração de tecidos com formação de proteínas mercuriais

solúveis e por bloqueio dos grupamentos sulfídricos (SH), o que provoca inibição de sistemas enzimáticos, como das metaloproteínas, fundamentais à oxidação celular [GRAEME e POLLACK, 1998; KARIMI *et al*, 2002; DAY, RIID e NEWLAND, 2005; ROTHSCILD e DUFFY, 2005].

Na literatura há relatos da influência de metais pesados como o mercúrio e seus derivados (por exemplo, HgCl₂) sobre alterações do tecido ósseo, capazes de prejudicar o funcionamento das células [DIETER, 1983; ALDEN, 1993; GRIEM, 1997; ATKINSON *et al*, 2001; SANTOS *et al*, 2003; SUZUKI *et al*, 2004; DAY, RIID e NEWLAND, 2005; BRODKIN *et al*, 2007]. No tecido ósseo sabe-se que o mercúrio muda o ritmo de formação óssea, o qual depende da concentração intracelular de cálcio livre. Já que os metais pesados competem com o cálcio em múltiplos sítios de ligação, o Hg intracelular reduz o estoque de cálcio, o que afeta canais de junção do tipo “gap” [SCHIRRMACHER *et al*, 1998].

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

Estudos como os de Dieter *et al*, (1983); Shimarrcher *et al*, (1998); Jin *et al*, (2002), indicam que o tecido ósseo pode sofrer alterações de sua estrutura e composição quando em contato com o cloreto de mercúrio. Entre essas alterações podemos citar as mudanças dos níveis do teor de cálcio. Toimela, Salminen e Tähti (2001) também afirmam que o mercúrio altera o conteúdo de cálcio, o que pode levar a várias conseqüências celulares, como por exemplo, diminuição da densidade óssea. Este efeito pôde ser observado no estudo de

Jin *et al* (2002), onde a aplicação do anticorpo anti-metalotioneína juntamente com cloreto de mercúrio em ratos, apresentou significativa redução da densidade mineral óssea.

Muitos autores estudaram alterações do tecido ósseo em ratos durante seu desenvolvimento, demonstrando que o desenvolvimento ósseo nesses animais possui as mesmas características fisiológicas dos humanos. Isso, portanto, justifica o estudo experimental em ratos para avaliação da contaminação por metais pesados, nesse caso, o cloreto de mercúrio [**BERG e HARMISSON, 1957; KALU, 1989; FROST e JEE 1992; THOMPSON *et al*, 1995**].

Pouco se sabe sobre envolvimento do HgCl_2 sobre as alterações do metabolismo mineral ósseo. Desta forma, devido à carência de dados e a partir do conhecimento da alta gravidade da sua contaminação em virtude do acometimento dos órgãos alvos, e o efeito sobre o metabolismo mineral ósseo, torna-se importante investigar os parâmetros ósseos influenciados pelo seu efeito nesse tecido. Dessa forma, propõe-se uma análise não só física e mecânica dos ossos, como também uma avaliação fisiológica do comportamento das metaloproteinases frente à contaminação por cloreto de mercúrio.

2. OBJETIVOS

Geral:

O objetivo desse estudo foi avaliar as possíveis alterações ósseas em ratos adultos (de 3 a 12 meses de idade, contaminados com HgCl_2 durante o período de grande desenvolvimento (1 a 3 meses)).

Específicos:

- Verificar os efeitos da contaminação do cloreto de mercúrio sobre o desenvolvimento do tecido ósseo de ratos, através das análises das propriedades biométricas, bioquímicas, biofísicas e biomecânicas de fêmures e vértebras de ratos;
- Verificar as concentrações das metaloproteinases no tecido ósseo contaminado por cloreto de mercúrio através da zimografia.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 96 ratos Wistar intactos, com um mês de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, mantidos no laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar. Foi mantida condição de temperatura de 25 ± 2 °C, com regime de luz de 10 horas claro e 14 horas escuro.

A alimentação foi com ração comercial Labina® (uma dieta com ração padrão para ratos fornecida pela Purina, Brasil) e água a vontade. Os animais foram divididos em grupos experimentais e controles, e mantidos em gaiolas diferentes devido à contaminação tóxica.

3.2 Grupos Experimentais

Para a realização deste estudo os ratos foram divididos em 4 grupos:

Tratados com HgCl_2

Grupo 1: 2 meses de tratamento = 3 meses → sacrifício (Grupo 3Hg);

Grupo 2: 2 meses de tratamento + 3 meses → sacrifício (Grupo 6Hg);

Grupo 3: 2 meses de tratamento + 6 meses → sacrifício (Grupo 9Hg);

Grupo 4: 2 meses de tratamento + 9 meses → sacrifício (Grupo 12Hg).

O grupo controle seguiu a mesma estrutura do seu respectivo grupo tratado com HgCl_2 .

Grupo 1: 2 meses de tratamento = 3 meses → sacrifício (Grupo 3S);

Grupo 2: 2 meses de tratamento + 3 meses → sacrifício (Grupo 6S);

Grupo 3: 2 meses de tratamento + 6 meses → sacrifício (Grupo 9S);

Grupo 4: 2 meses de tratamento + 9 meses → sacrifício (Grupo 12S).

3.3 Protocolo de Tratamento

A administração do cloreto de mercúrio e salina foi realizada durante 5 dias/semana por um período de 60 dias utilizando o método de gavagem gástrica (Figura 1).

A dose diária foi de 5 mg/Kg de Massa corporal (MC) de HgCl_2 e de 0,1ml/100g de Massa corporal (MC) de salina [ALDEN *et al*, 1993; ZALUPS, 2000].



Figura 1: foto ilustrativa da administração de drogas pelo método de gavagem gástrica

3.4 Eutanásia

Os animais foram decapitados, o sangue coletado do tronco e foi realizada dissecação femural e tibial bilateral e da coluna vertebral para coleta do material ósseo. Esse material foi mantido em uma solução de salina 0,9% a -20°C .

3.5 Análise dos dados

3.6 Propriedades Biométricas

Massa corporal

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

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 a saliência óssea mais proximal do trocânter maior.

Diâmetros 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 látero-lateral e o menor, a ântero-posterior.

Altura dos corpos vertebrais

Nas quintas vértebras lombares (L5) foram feitas medidas da altura máxima dos corpos vertebrais.

3.7 Propriedades Biomecânicas

Os parâmetros utilizados para avaliar as propriedades mecânicas dos fêmures e das vértebras foram: força máxima (N), rigidez (N/mm) e resiliência (J). Estes parâmetros foram obtidos através de ensaios mecânicos de flexão a três pontos (nos fêmures) e de compressão (nas vértebras), realizados em uma máquina universal Instron, modelo 4444 (Figura 2), em temperatura ambiente **[PENG et al., 1994]**.

Doze horas antes do ensaio biomecânico, os ossos foram descongelados à temperatura ambiente e mantidos em solução salina até o momento da análise biomecânica. Os valores obtidos das cargas aplicadas e das deformações foram registrados pelo software Instron Series IX e a partir destes foram confeccionados os gráficos carga vs deformação (figura 3) onde foram obtidas as principais propriedades biomecânicas dos ossos, como a carga máxima, rigidez e resiliência.

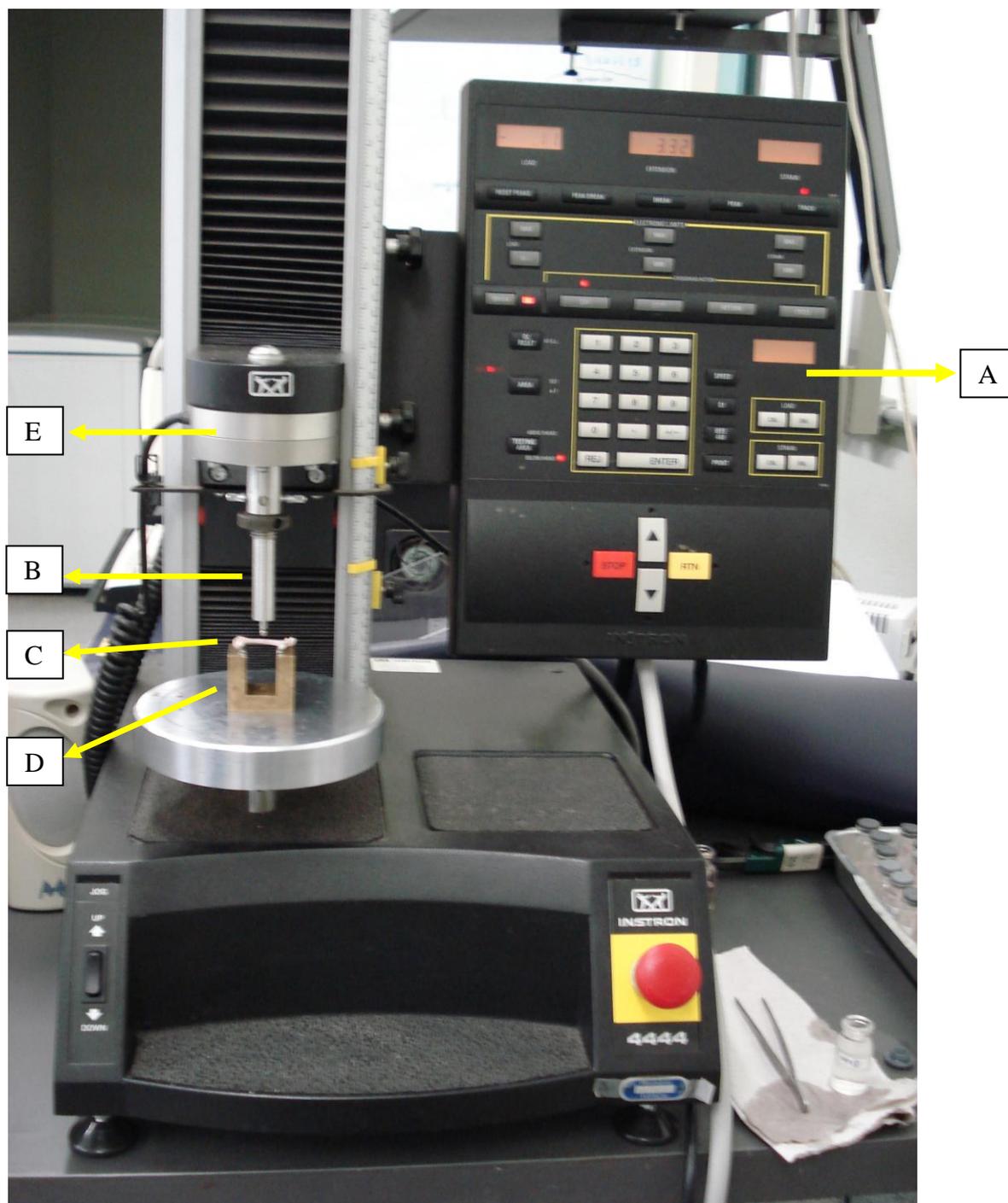


Figura 2. Foto ilustrativa da máquina de ensaio universal Instron (modelo 4444) preparada para o teste de flexão a três pontos em fêmur de rato. A: painel de controle; B: haste cilíndrica para a aplicação de carga (força); C: osso; D: suporte; E: célula de carga ligada à ponte de extensimetria.

3.7.1 Ensaio mecânico de flexão a três pontos

As extremidades (regiões metafisárias) dos ossos focaram apoiadas em dois roletes com diâmetro de 3 mm, distanciados em 21,70 mm e a carga aplicada na região central de cada osso (figura2). No início do teste foi aplicada um pré-carga de 10N por uma haste cilíndrica com um rolete de 3 mm na extremidade, no sentido pósterio-anterior e perpendicular ao eixo longitudinal para estabilizar o fêmur. O tempo de acomodação foi de um minuto para todos os grupos e após a estabilização e a acomodação, foi aplicada uma força no mesmo sentido, com velocidade constante de 0,5 cm/min até o momento da fratura.

Com resultado da força aplicada ao fêmur, obteve-se um gráfico força-deformação pelo software Instron Series IX (figura 3). Através desta curva obtiveram-se as principais propriedades biomecânicas:

Força máxima (N)

É a maior força suportada pelo osso durante o teste.

Rigidez (J)

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

Resiliência

Trata-se da capacidade dos materiais de absorverem energia na fase elástica.

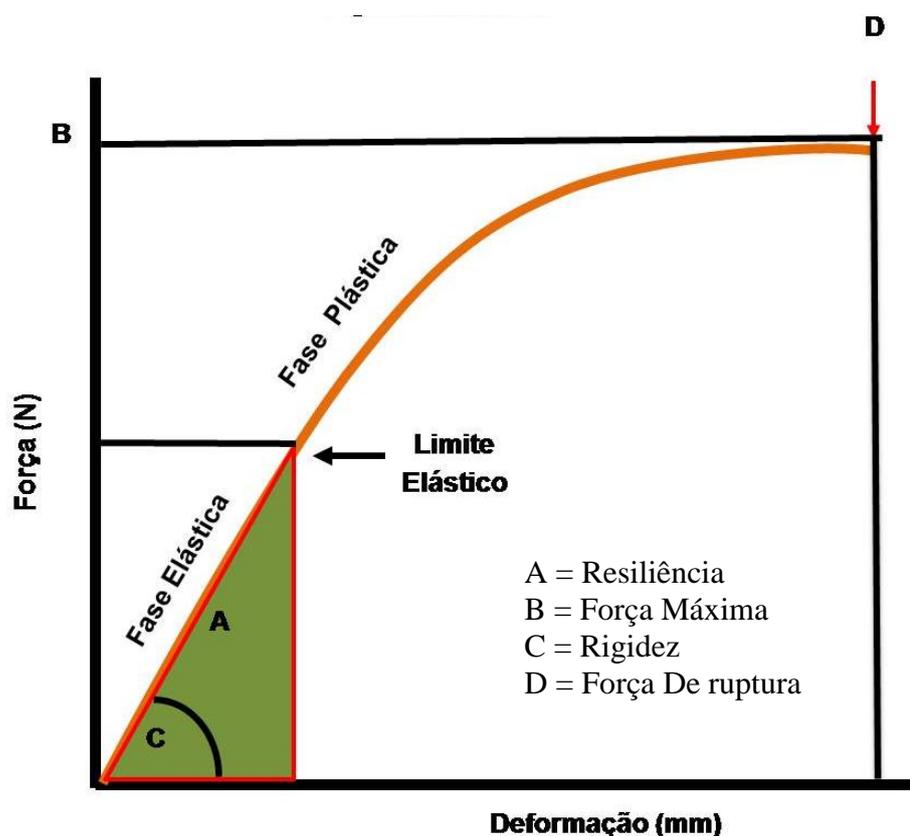


Figura 3. Representação gráfica da curva força-deformação obtida com o teste de flexão a três pontos dos fêmures e compressão das vértebras de ratos.

3.7.2 Ensaio mecânico de compressão de vértebras

No teste de compressão das vértebras, as extremidades do corpo vertebral foram previamente lixadas para a obtenção de superfícies planas, e colocadas sobre um suporte plano para receberem a carga de compressão. Esta carga foi aplicada utilizando uma célula de carga Instron, modelo CM, com capacidade máxima de 1KN. A carga foi aplicada no sentido crânio-caudal por uma haste com extremidade plana em uma velocidade constante de 2 mm/min até a compressão de dois terços da altura de cada amostra.

Foram obtidas as curvas de força-deformação para os ensaios e os parâmetros relacionados como carga máxima, rigidez e resiliência.

3.8 Propriedades Físicas

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

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

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

Em seguida os ossos foram colocados em uma mufla a 800°C durante 24 horas para obtenção das cinzas (P_m). As mensurações foram realizadas utilizando uma balança eletrônica (marca Chyo).

Propriedades físicas avaliadas:

- Volume ósseo
- Densidade óssea
- Densidade mineral
- Percentual ósseo de água, de material orgânico e mineral

O volume ósseo foi obtido através do princípio de Arquimedes [KEENAN *et al.* 1997] e as demais propriedades calculadas pelas fórmulas a seguir:

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

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

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

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

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

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

Onde:

Pu = peso úmido ósseo

Ps = peso ósseo da amostra desidratada

Pi = peso imerso ósseo

Pm = peso do material mineral (cinzas)

ρ = densidade da água

3.9 Determinação da atividade de MMPs por zimografia

Os procedimentos para determinação da atividade MMP-2 do osso foram realizados segundo protocolo estabelecido por Marquet *et al.* (2008) e adaptados para esse estudo. Após a retirada da tíbia, foi realizada uma limpeza e a remoção de qualquer tipo de tecido periférico, como células musculares e demais membranas visíveis e o terço proximal da tíbia foi macerado em nitrogênio líquido. As amostras, ou o osso macerado, foram homogeneizadas e incubadas em 0,2 ml de tampão de extração [10 mM de ácido cacodílico (pH 5,0), 0,15 M NaNO₃ e 0,01% de Triton X-100] a 4 °C por um período de 24 horas. Após este tempo o tampão de extração foi coletado por centrifugação (10 minutos, 4°C em 13000 rpm) e o pH foi elevado a 7,4 pela adição de 4 µl de solução de NaOH 0,5 M. As amostras foram concentradas de maneira que

cada poço do gel de zimografia tinha 20 µg de proteína e 10 µl de tampão de amostra sem β-mercapto (agente redutor), totalizando 30 µl de solução por poço. As amostras foram resolvidas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e gelatina na concentração final de 2mg/ml. Após a corrida, o gel foi lavado uma vez durante 30 minutos em solução 2,5% de Triton X-100 para remoção do SDS. O gel foi incubado no tampão de substrato (Tris-HCl 50mM pH 8,0, CaCl₂ mM e NaN₃ 0,02%), a 37°C, durante 20 horas. Após este tempo, os géis foram corados com Coomassie Blue Brilliant R-250 por 1 h e 30 minutos, descorado com ácido acético: metanol: água (1:4:5) para visualização das áreas de atividade. Nas amostras detectamos ambas as formas pro e ativa da MMP-2 porém aqui demonstradas somente na forma ativa. Os géis foram fotografados com uma câmera Canon G6 Power Shot 7.1 mega pixels (Virginia, USA). As médias de intensidade de banda foram mensuradas por meio do software Gene Tools® (Philimath, OR, USA). Foi utilizado o software “Kodak Digital Science 1D” para fotografar o gel e visualizar a atividade proteolítica das bandas.

3.10 Análise dos resultados

Primeiramente foi feito o Teste de normalidade Shapiro-Wilk.

Foi realizado o teste de variância Two-way analysis (ANOVA) (para tempo e tratamento).

Teste Tukey foi aplicado para múltiplas comparações utilizando o programa Graphpad InStat (version 3.00 - dezembro de 1997).

Todos valores foram expressos como média ± erro padrão da media

O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$.

Normas Técnicas referentes à elaboração deste trabalho

A estrutura geral deste trabalho, bem como as referências bibliográficas e citações, seguem a NBR 6024 e 14724 de dezembro de 2005, de autoria da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT.

4 - Resultados

Massa Corporal

A Tabela 1 apresenta os valores da massa corporal (MC) inicial e final dos animais analisados durante o tratamento. Os valores de MC inicial não se mostraram diferentes quando comparados os grupos intoxicados com seus respectivos controles. A MC final dos animais controles aumentou gradualmente com a idade, e o único grupo que apresentou diferença na MC final em relação ao seu grupo controle foi o grupo 12M. Verifica-se que os grupos experimentais tiveram a mesma condição inicial e que os animais ganharam peso de maneira semelhante durante todo o experimento.

Tabela 1: Massa corporal (MC) inicial e final dos animais dos diferentes grupos experimentais. Valores expressos em média \pm EPM.

	Grupo			
	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
MC inicial (g)				
Salina	65,7 \pm 1,56	67,0 \pm 1,54	65,9 \pm 1,52	68,3 \pm 1,04
Mercúrio	66,17 \pm 1,21	68,5 \pm 1,32	65,5 \pm 1,92	67,1 \pm 1,57
MC final (g)				
Salina	298,8 \pm 1,30	416,3 \pm 10,43 ³	428,3 \pm 6,47 ³	464,5 \pm 9,51 3,6,9
Mercúrio	304,6 \pm 2,69	414,5 \pm 7,24 ³	448,5 \pm 11,73 ³	537,5 \pm 17,71 ^{C,3,6,9}

$p \leq 0,05$ para: (3) - em relação ao grupo 3 meses; (6) - em relação ao grupo 6 meses, (9) - em relação ao grupo 9 meses, (c) - em relação ao seu respectivo controle. (n=12)

Análise do fêmur direito

Propriedades biométricas

O comprimento, diâmetro maior ($\emptyset >$) e menor ($\emptyset <$) dos fêmures dos ratos dos grupos experimentais estão expressos na Tabela 2. Entre os grupos com mesma idade, o comprimento, assim como os diâmetros dos fêmures, não mostrou diferenças quando comparados com seus respectivos controles. O comprimento dos fêmures dos animais aumentou gradualmente com a idade tanto nos grupos controles quanto nos intoxicados (6m, 9m e 12m foram maiores que o grupo 3m). No entanto, a intoxicação com cloreto de mercúrio (HgCl_2) estimulou o crescimento dos fêmures, uma vez que os seus comprimentos foram maiores no grupo 9m em relação ao grupo 6m. Observa-se no grupo mercúrio uma estabilização para os valores do $\emptyset >$ ao longo do 12 meses de tratamento.

Tabela 2 – Comprimento e diâmetros maior e menor dos fêmures dos animais dos diferentes grupos experimentais. Valores expressos em média \pm EPM.

	Grupo			
	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Comprimento (mm)				
Salina	33,7 \pm 0,30	39,6 \pm 0,28 ³	40,6 \pm 0,32 ³	41,4 \pm 0,27 ^{3,6}
Mercúrio	34,3 \pm 0,28	39,4 \pm 0,30 ³	41,2 \pm 0,30 ^{3,6}	42,0 \pm 0,40 ^{3,6}
$\emptyset >$ (mm)				
Salina	3,8 \pm 0,06	4,3 \pm 0,05 ³	4,6 \pm 0,06 ^{3,6}	4,6 \pm 0,06 ^{3,6}
Mercúrio	3,9 \pm 0,05	4,4 \pm 0,07 ³	4,5 \pm 0,06 ³	4,6 \pm 0,08 ³
$\emptyset <$ (mm)				
Salina	2,8 \pm 0,10	3,2 \pm 0,20 ³	3,2 \pm 0,05 ³	3,3 \pm 0,05 ³
Mercúrio	2,8 \pm 0,03	3,2 \pm 0,19 ³	3,3 \pm 0,06 ³	3,5 \pm 0,06 ^{3,6}

$p \leq 0,05$ para: (3) - em relação ao grupo 3 meses; (6) - em relação ao grupo 6 meses, (9) - em relação ao grupo 9 meses, (c) - em relação ao seu respectivo controle. (n=12)

Parâmetros biofísicos

As propriedades físicas ósseas dos fêmures dos animais foram analisadas de forma direta através do princípio de Arquimedes, que consiste em um método simples e de fácil execução [Trebacz, 2001]. A Tabela 3 apresenta os valores dos parâmetros físicos dos fêmures dos animais de todos os grupos experimentais. Demonstra que houve diferença entre as medidas de volume ósseo entre os grupos controle (salina) de 6 e 9 meses em relação ao de 3 meses, e entre o de 12 meses em relação aos grupos de 3, 6 e 9 meses. O volume ósseo nos grupos experimentais (mercúrio) foram diferentes comparando-se o grupo de 6 com o de 3 meses, o de 9 com os de 3 e 6 meses e o de 12 com os de 3,6 e 9 meses, demonstrando ter havido diferença entre os grupos de todas as idades.

Analisando a densidade óssea, pudemos verificar que houve diferença entre suas medidas para o grupo salina de 6 meses em relação ao de 3 meses, para o grupo de 9 meses em relação aos de 3 e 6 meses e para o grupo de 12 meses a diferença foi apenas com relação ao de 6 meses. Já no grupo mercúrio essa diferença se deu entre os grupos de 6 meses em relação ao de 3 e nos grupos de 9 e 12 meses em relação ao de 6 meses apenas. A densidade mineral nos grupos controle foi maior no grupo de 6 meses em relação ao de 3, no de 9 meses em relação aos grupos de 3 e 6 meses e no grupo de 12 meses apenas em relação ao grupo de 3 meses. No grupo mercúrio a relação foi a mesma do grupo salina, com exceção de que o grupo de 12 meses teve a densidade mineral maior tanto em relação ao grupo de 3 quanto ao grupo de 9 meses.

O percentual de água no tecido ósseo foi maior nos grupos de 6, 9 e 12 meses em relação ao de 3 meses, tanto no grupo salina quanto no mercúrio. A única diferença se deu no grupo salina de 9 meses, cujo valor também foi maior em relação ao grupo de 6 meses e não somente ao de 3.

O percentual de material orgânico teve relação bem parecida nos grupos experimental e controle. Em ambos o percentual orgânico foi maior no grupo de

6 meses em relação ao de 3 e no grupo de 9 meses em relação aos de 3 e 6 meses. A diferença se deu nos grupos de 12 meses, onde o grupo salina dessa idade foi maior que o grupo de 3 meses, e o grupo mercúrio da mesma idade foi maior que os grupos de 3 e 6 meses. A única diferença entre os grupos salina e mercúrio para percentual de material mineral foi nos grupos de 12 meses. O percentual de material mineral nos grupos de 6 e 9 meses foi maior do que o de 3 meses tanto para controle quanto para experimental. O valor no grupo salina de 12 meses foi maior que os de 3 e 9 meses, e no mercúrio essa relação se deu entre os grupos de 3 e 6 meses.

Já a comparação entre os grupos experimentais e seus respectivos controles de mesma idade, não apresentou diferença estatística em nenhum dos parâmetros analisados.

Tabela 3 - Parâmetros físicos do volume ósseo, densidade óssea e percentual (%) de água dos fêmures dos animais dos grupos experimentais. Valores expressos em média \pm EPM.

	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Volume Ósseo (cm³)				
Salina	0,43 \pm 0,01	0,65 \pm 0,01 ³	0,70 \pm 0,01 ³	0,78 \pm 0,01 ^{3,6,9}
Mercúrio	0,46 \pm 0,01	0,63 \pm 0,01 ³	0,74 \pm 0,02 ^{3,6}	0,82 \pm 0,02 ^{3,6,9}
Densidade Óssea (g/mm³)				
Salina	1,57 \pm 0,01	1,6591 \pm 0,01 ³	1,53 \pm 0,01 ^{3,6}	1,56 \pm 0,06 ⁶
Mercúrio	1,57 \pm 0,01	1,6726 \pm 0,01 ³	1,55 \pm 0,01 ⁶	1,58 \pm 0,01 ⁶
Densidade mineral (g/mm³)				
Salina	0,55 \pm 0,01	0,70 \pm 0,02 ³	0,62 \pm 0,01 ^{3,6}	0,67 \pm 0,01 ³
Mercúrio	0,55 \pm 0,01	0,71 \pm 0,01 ³	0,66 \pm 0,01 ^{3,6}	0,70 \pm 0,01 ^{3,9}
Porcentual ósseo de água (%)				

Salina	47,74 ± 0,31	38,04 ± 1,06 ³	40,38 ± 0,23 ^{3,6}	38,16 ± 0,49 ³
Mercúrio	47,84 ± 0,51	37,69 ± 0,49 ³	38,33 ± 0,34 ³	36,76 ± 0,48 ³
Porcentual material orgânico				
(%)				
Salina	17,14 ± 0,16	19,96 ± 0,47 ³	18,67 ± 0,19 ^{3,6}	19,22 ± 0,17 ³
Mercúrio	16,99 ± 0,17	20,06 ± 0,22 ³	19,04 ± 0,09 ^{3,6}	19,27 ± 0,18 ^{3,6}
Porcentual material mineral (%)				
Salina	35,12 ± 0,28	42,00 ± 0,66 ³	40,95 ± 0,32 ³	42,62 ± 0,40 ^{3,9}
Mercúrio	35,17 ± 0,39	42,25 ± 0,33 ³	42,63 ± 0,30 ³	43,97 ± 0,44 ^{3,6}

p ≤ 0,05 para: (3) - em relação ao grupo 3 meses; (6) - em relação ao grupo 6 meses, (9) - em relação ao grupo 9 meses, (c) - em relação ao seu respectivo controle. (n=12)

Parâmetros biomecânicos

A TABELA 4 mostra os valores de força máxima (Máx), rigidez e resiliência obtidas através do teste de flexão a três pontos dos fêmures direito dos animais controle e contaminado com cloreto mercúrio. Em relação aos grupos de mesma idade, comparando-se as propriedades biomecânicas dos dois grupos (controle e contaminado), parâmetros força máxima, rigidez e resiliência não apresentaram diferenças. No entanto, observando o comportamento desses parâmetros ao longo dos 12 meses de tratamento, vemos que houve aumento dos valores dos parâmetros biomecânicos de acordo com o crescimento dos animais e desenvolvimento dos ossos. Os parâmetros analisados foram maior nos grupos de 6, 9 e 12 meses em relação ao de 3 meses, tanto no grupo salina quanto no mercúrio. Em ambos os grupos, todos os parâmetros foram maior no grupo de 12 meses em relação ao de 6 e 9 meses.

Tabela 4 – Parâmetros biomecânicos dos fêmures dos animais dos grupos experimentais obtidos com o teste de flexão de pontos. Valores expressos em média \pm EPM.

	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Força Máx (kN)				
Salina	69,79 \pm 2,59	135,82 \pm 3,33 ³	132,70 \pm 3,86 ³	162,57 \pm 4,76 ^{3,6,9}
Mercúrio	75,38 \pm 2,35	137,09 \pm 4,11 ³	148,33 \pm 6,60 ³	174,83 \pm 7,05 ^{3,6,9}
Rigidez (N/cm)				
Salina	138,48 \pm 7,12	313,26 \pm 8,67 ³	306,98 \pm 9,39 ³	375,34 \pm 10,99 ^{3,6,9}
Mercúrio	157,01 \pm 5,42	308,08 \pm 10,26 ³	345,98 \pm 16,34 ³	412,57 \pm 12,48 ^{3,6,9}
Resiliência (J)				
Salina	0,0324 \pm 0,001	0,0582 \pm 0,003 ³	0,0558 \pm 0,002 ³	0,0773 \pm 0,004 ^{3,6,9}
Mercúrio	0,0357 \pm 0,003	0,0611 \pm 0,002 ³	0,0657 \pm 0,002 ³	0,0863 \pm 0,005 ^{3,6,9}

p \leq 0,05 para: (3) - em relação ao grupo 3 meses; (6) - em relação ao grupo 6 meses, (9) - em relação ao grupo 9 meses, (c) - em relação ao seu respectivo controle. (n=12)

Análise da Tíbia direita

Atividade das MMP-2

As bandas encontradas em todos os grupos foram de 62-72kDa. Embora as amostras apresentassem outras bandas de atividade da MMP-2, nesse estudo, foi enfatizada a banda ativa [BIRKEDAL-HANSEN H, 1995].

O Gráfico 1 mostra as diferenças entre os grupos controle e experimental na análise de MMP-2 no extrato do osso da tíbia direita. Já de início, houve maior atividade das MMP-2 no grupo mercúrio em relação ao salina de mesma idade. O grupo mercúrio de 3 meses obteve maior atividade do que seu controle e menor em relação ao grupo de 3 meses e o grupo salina

de 6 meses obteve diferença (menor atividade das MMP-2) em relação ao salina de 6 meses .

Os grupos salina e mercúrio de 9 e 12 meses foram diferentes (menor atividade) dos grupos de 3 e 6 meses. Observou-se que à medida que a idade dos ratos foi aumentando, a atividade das MMP-2 foi diminuindo, tanto no grupo salina quanto no grupo mercúrio.

Figura 4

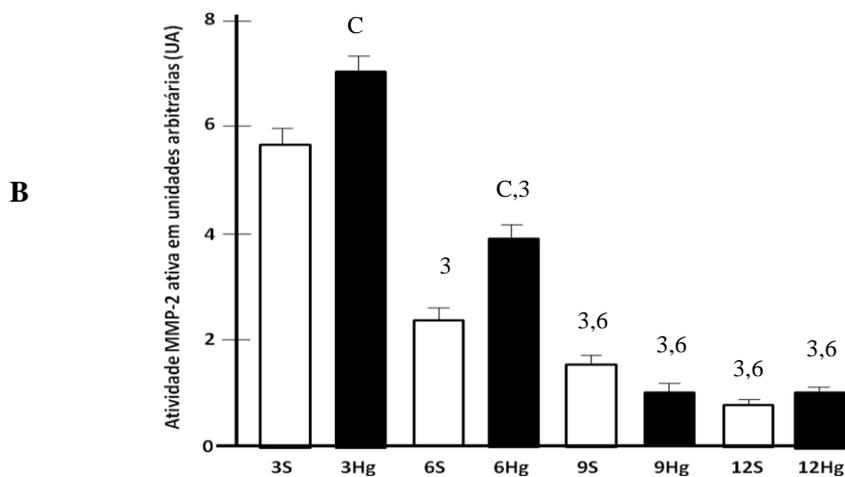
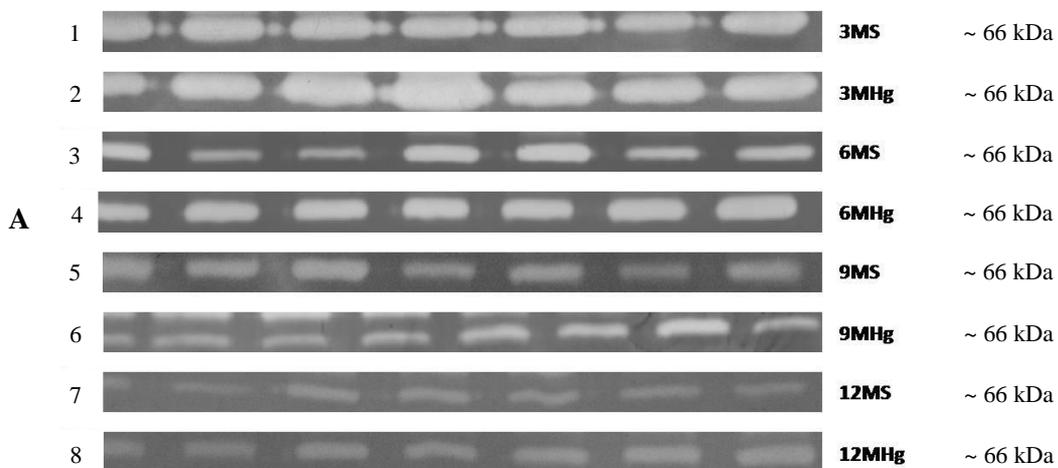


Figura 4: Análise da atividade da MMP-2 no extrato do osso da Tíbia direita obtida por meio de zimografia e expressa em unidades arbitrárias. A: Gel de gelatina 1%-SDS-PAGE. Cada banda representa um *pool* de amostra (n=7). B: Os valores foram expressos por média \pm erro padrão da média (SEM), $p \leq 0,05$. Grupos 3, 6, 9 e 12 meses Salina (3S, 6S, 9S e 12S

respectivamente) e grupos 3, 6, 9 e 12 Mercúrio (3Hg, 6Hg, 9Hg e 12Hg respectivamente). (3) - em relação ao grupo 3 meses; (6) - em relação ao grupo 6 meses, (9) - em relação ao grupo 9 meses, (c) - em relação ao seu respectivo controle. (n=7)

Análise das vértebras (L5)

Propriedades biométricas e biomecânicas

Pudemos verificar através da Tabela 5 que a altura das vértebras foi maior nos grupos de 6,9 e 12 meses em relação ao de 3 meses, tanto para salina quanto para mercúrio. O grupo 12 meses controle também apresentou uma diferença em relação ao grupo 6 meses.

A força máxima das vértebras dos animais controle aumentou gradualmente com a idade (6m, 9m e 12m foram maiores que o grupo 3m). O grupo 12 meses controle também foi maior em relação ao 6 meses. Os animais tratados com mercúrio também apresentaram diferenças onde o 6 meses foi maior em relação ao grupo 3 e 9 meses e nos grupos 9 e 12 meses em relação ao grupo 3 meses.

Tabela 5 – Altura máxima obtida através de medição com paquímetro e deslocamento máximo obtido no teste de compressão das vértebras (L5) dos animais dos diferentes grupos experimentais. Valores expressos em média \pm EPM.

	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Altura máx (mm)				
Salina	5,19 \pm 0,11	6,83 \pm 0,14 ³	7,17 \pm 0,12 ³	7,35 \pm 0,12 ^{3,6}
Mercúrio	5,58 \pm 0,18	7,04 \pm 0,14 ³	7,23 \pm 0,12 ³	7,56 \pm 0,10 ³
Força Máx (kN)				
Salina	79,71 \pm 3,39	142,67 \pm 5,41 ³	156,73 \pm 8,86 ³	170,24 \pm 1,66 ^{3,6}
Mercúrio	62,14 \pm 4,25	167,56 \pm 8,86 ^{C,3}	152,13 \pm 6,45 ³	160,99 \pm 5,55 ³

$p \leq 0,05$ para: (3) - em relação ao grupo 3 meses; (6) - em relação ao grupo 6 meses, (9) - em relação ao grupo 9 meses, (c) - em relação ao seu respectivo controle. (n=7 a 12)

Parâmetros biofísicos

A tabela 6 mostra que o volume ósseo das vértebras foi maior nos grupos de 6,9 e 12 meses em relação ao de 3 meses, tanto para salina quanto para mercúrio. Em ambos os grupos, na idade de 12 meses a diferença se deu também em relação ao grupo de 6 meses.

A densidade óssea só foi diferente no grupo mercúrio de 6 meses em relação ao de 3 meses. Nas demais idades não houve diferença significativa. Já a densidade mineral foi diferente nos grupos salina e mercúrio de 12 meses em relação aos seus respectivos 3 meses e no mercúrio de 6 meses também em relação ao de 3.

Na análise do percentual ósseo de água verificou-se diferença significativa no grupo salina de 9 meses em relação ao de 3 meses e no mercúrio de 12 meses também em relação ao de 3.

O percentual de material orgânico foi maior nos grupos salina e mercúrio de 9 meses em relação aos respectivos grupos de 3 meses. O grupo salina de 12 meses teve percentual de material orgânico maior que o de 9 meses e para o mercúrio a relação se deu entre o grupo de 12 meses com os de 3 e 6 meses. O grupo mercúrio de 6 meses também apresentou diferença, sendo maior que o grupo de 3 meses.

O único grupo que apresentou diferença no percentual de material mineral foi o mercúrio de 12 meses, o qual foi maior do que os grupos de 3 e 6 meses.

Os grupos não citados representam a ausência de diferença estatística em suas comparações.

Tabela 6 - Parâmetros físicos das vértebras (L5) dos animais dos grupos experimentais. Valores expressos em média \pm EPM.

	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Volume Ósseo (cm³)				
Salina	0,0409 \pm 0,002	0,0738 \pm 0,003 ³	0,0765 \pm 0,002 ³	0,0880 \pm 0,003 ^{3,6}
Mercúrio	0,0470 \pm 0,003	0,0809 \pm 0,003 ³	0,0840 \pm 0,002 ³	0,0957 \pm 0,003 ^{3,6}
Densidade Óssea (g/mm³)				
Salina	1,3626 \pm 0,002	1,3982 \pm 0,011	1,3764 \pm 0,012	1,4097 \pm 0,012
Mercúrio	1,3331 \pm 0,014	1,4039 \pm 0,010 ³	1,3687 \pm 0,016	1,3847 \pm 0,015
Densidade mineral (g/mm³)				
Salina	0,4516 \pm 0,005	0,4700 \pm 0,008	0,4778 \pm 0,009	0,5030 \pm 0,013 ³
Mercúrio	0,4210 \pm 0,012	0,4758 \pm 0,010 ³	0,4626 \pm 0,019	0,5111 \pm 0,012 ³
Porcentual ósseo de água (%)				
Salina	49,2783 \pm 0,990	47,5662 \pm 0,537	44,8299 \pm 0,668 ³	46,5154 \pm 1,145
Mercúrio	1,5505 \pm 1,145	45,5160 \pm 0,738 ³	47,6190 \pm 1,444	44,2807 \pm 1,036 ³
Porcentual material orgânico (%)				
Salina	17,540 \pm 0,363	18,8410 \pm 0,367	20,4781 \pm 0,174 ³	17,8526 \pm 0,761 ⁹
Mercúrio	16,8335 \pm 0,528	20,6152 \pm 0,451 ³	18,6403 \pm 0,375 ³	18,8349 \pm 0,376 ^{3,6}
Porcentual material mineral (%)				
Salina	33,1817 \pm 0,945	33,5929 \pm 0,403	60,4233 \pm 2,400	66,7083 \pm 1,077
Mercúrio	31,6160 \pm 0,980	33,8688 \pm 0,582	64,3666 \pm 0,367	66,1990 \pm 0,226 ^{3,6}

p \leq 0,05 para: (3) - em relação ao grupo 3 meses; (6) - em relação ao grupo 6 meses, (9) - em relação ao grupo 9 meses, (c) - em relação ao seu respectivo controle. (n=7 a 12)

5 – Discussão

A proposta desse pesquisa foi analisar as possíveis alterações promovidas pela contaminação com cloreto de mercúrio (HgCl_2) durante a fase de desenvolvimentos dos animais. Analisou-se alguns possíveis efeitos provocados pelo HgCl_2 em tecido ósseo de ratos em desenvolvimento. A modalidade de administração utilizada foi a gavagem gástrica, pois proporciona uma oferta exata da massa desejada. O modelo de contaminação escolhido promoveu fácil adaptação dos animais ao sistema, não apresentando diminuição significativa de massa corpórea nem alterações comportamentais.

Todas as formas de mercúrio são tóxicas para todas as espécies. No entanto o efeito adverso do mercúrio no sistema biológico depende da sua forma, tempo e duração da exposição. A forma como o mercúrio se apresenta é modificada no meio ambiente e podem serem absorvidas por diferentes vias pelo nosso organismo como ingestão, inalação, injeção e através da pele. Foi demonstrado que o mercúrio tem a capacidade de acumular no tecido ósseo quando administrado na forma de cloreto mercurioso (Hg_2Cl_2) (1.25mg/kg MC) durante 60 dias, 5 dias/semana pelo método de gavagem gástrica [D'Ávila *et al*, 2007]. Em nosso trabalho não analisamos a presença deste metal no osso. Porém Ferreira *et al* (2008) utilizando o mesmo protocolo experimental e dose diária de 2,5 mg/kg de MC de HgCl_2 , detectaram a presença mercúrio no tecido ósseo de ratos. Um estudo realizado por Rothschild & Duffy (2005) verificou o acúmulo de mercúrio (orgânico e inorgânico) em maiores proporções no tecido ósseo quando comparado a tecidos muscular e nervoso central de aves migratórias. Porém não se sabe a forma, o tempo de exposição e a via de contaminação do mercúrio nesses animais. Entretanto, o seu efeito sobre o tecido ósseo não está completamente compreendido o que necessita de maiores investigações.

A dose de 5mg/Kg de MC de cloreto de mercúrio (HgCl_2) foi escolhida de acordo com dados da literatura que mostram que esta dose não influencia a curva ponderal dos animais [NTPWG, 1993]. Berg e Harmison (1957); Burr,

Robling e Turner (2002) afirmaram que a homogeneidade da massa corporal (MC) é importante pelo fato de aumentar o estresse mecânico sobre os ossos e contribuir para o ganho de massa óssea. No presente estudo, não houve diferença de massa corporal inicial dos animais de todos os grupos experimentais em relação aos seus controles mostrando homogeneidade da massa corporal dos animais no início do tratamento (TABELA 1). A MC final dos animais controles aumentou gradualmente com a idade, e o único grupo que apresentou diferença de MC final em relação ao seu grupo controle foi o grupo 12M. Ramalingam e Vimaladevi (2002) mostraram que o tratamento com HgCl_2 pode promover diminuição da massa corporal. Entretanto o período de contaminação e dose foram diferentes das utilizadas em nosso trabalho. Por outro lado, outros autores como Yonaga *et al* (1985) ainda afirmam que, como o mercúrio induziu mudanças sobre a MC, o mercúrio afeta o crescimento corporal. Na literatura existem controvérsias em relação ao ganho ou perda de massa corporal pela contaminação com HgCl_2 . Em nosso estudo verificamos mudanças de ganho de MC produzida pela contaminação com HgCl_2 apenas no grupo 12M.

No presente estudo, as medidas de comprimento, diâmetro maior e menor dos fêmures dos animais não mostraram diferenças significativas quando comparados entre os grupos controles e contaminados. Quando observamos o comprimento do fêmur de todos os animais dos grupos experimentais, podemos observar seu desenvolvimento, visto que, em termos gerais, os parâmetros dos fêmures do grupo 12M são maiores que os demais grupos. No entanto, nossos resultados divergem com dados da literatura que mostram que a intoxicação com cloreto de mercúrio (HgCl_2) inibiu o desenvolvimento ósseo. Porém a contaminação ocorreu com a dose 2, 4 e 8 mg HgCl_2/Kg de MC subcutânea durante 6 dias [YONAGA *et al*, 1985]. O Hg^{2+} poderia entrar nas células ósseas por canais iônicos, devido à similaridade de tamanho e carga com íons fisiológicos tais como Na^+ e Ca^{++} [MIYAMOTO, 1983].

O teste de flexão a três pontos possibilita analisar as principais propriedades biomecânicas do tecido ósseo. Em relação aos grupos de mesma

idade, verifica-se que, não houve diferença significativa entre os grupos. Apesar dos resultados não significativos, houve tendência de aumento da força máxima, resiliência e rigidez suportada nas amostras do grupo contaminado em relação aos seus respectivos grupos controle. Com exceção do grupo 6M que apresentou uma tendência de diminuição da rigidez. Esse fato pode estar relacionado à capacidade do mercúrio de se ligar a moléculas intracelulares. Nos últimos anos, um grande número de proteínas transportadoras tem sido empregado no transporte de alguns metais tóxicos nas membranas celulares, tais como o Transportador de Ânion Orgânico 1 (OAT1) e 3 (OAT3) que estão implicados no transporte absorptivo de mercúrio orgânico e inorgânico nas células epiteliais renais, endoteliais e gliais **[BALLATORI 2002; ZALUPS e AHMAD, 2004]**. Além disso, o mercúrio tem a capacidade de se ligar a albuminas e sofrer endocitose **[ZALUPS, 2000]**. Uma vez no interior da célula, os metais tóxicos como o mercúrio, têm a capacidade de se ligar a algumas substâncias e formar um complexo organo-metal mimetizando o efeito de outras. Uma concepção de mimetismo molecular e iônico tem sido postulada como mecanismo pelo qual certos metais tóxicos têm a capacidade de entrar na célula e agir ou servir como análogo estrutural e/ou funcional de outros endógenos biomoleculares **[BRIDGES e ZALUPS, 2004]**.

Mercúrio é um agente celular tóxico, o qual promove desintegração tecidual através da formação de proteínas mercurial solúveis e bloqueando sulfato-hidrogênio, promovendo inibição de sistemas enzimáticos como das MMPs, o qual são fundamentais para oxidação **[GRAEME e POLLACK, 1998; DAY, REED e NEWLAND, 2005; ROTHSCHILD e DUFFY, 2005]**. Sabe-se que as metalopeptidases, enzimas presentes no tecido ósseo, possuem resíduos de cistina em sua estrutura molecular **[MCCAW, EWALD e WERB, 2007]**. A cisteína oxida-se formando cistina, composta por duas cisteínas unidas por uma ligação dissulfureto. Resíduos de cisteínas podem também reagir com íons metais pesados (Pb^{2+} , Hg^{2+} , Ag^2) devido à alta afinidade que o grupo -SH tem de ligar-se fortemente com os metais pesados. Esta interação pode deformar ou inativar proteínas, e é um mecanismo que ocorre no envenenamento com metais pesados **[TALLANT, MARRERO e GOMIS-RÜTH,**

2010]. Um conjugado molecular incluindo mercúrio foi mencionado com capacidade de mimetizar cistina e cistationeína em seus sítios de ligação da membrana plasmáticas, e outras proteínas. Como a ligação pode promover também a inativação da enzima, os autores concluíram que esse mimetismo pode ser somente estrutural **[BRIDGES e ZALUPS, 2004]**. Dessa forma, se o mercúrio foi capaz de se conjugar a alguma molécula óssea modificando sua estrutura ou funcionamento, isso poderia ter influenciado as propriedades biomecânicas do presente estudo, por alterar a reabsorção da matriz no processo de remodelação óssea tornando o tecido mais resistente de acordo com as tendência de aumento da força máxima, resiliência e rigidez suportada pelas amostras.

As enzimas presentes no tecido ósseo, chamadas metaloproteínases (MMPs), contem resíduos de cisteína na sua estrutura molecular **[VU e WERB, 2000; MCCAWE, EWALD e WERB, 2007; STERNLICHT e WERB, 2001]**. Nosso resultados mostraram que houve maior atividade das MMP-2 no grupo 3 e 6 meses mercúrio em relação aos controles salina de mesma idade. Portanto, se o mercúrio teve a capacidade de conjugar com alguma molécula óssea poderia alterar sua estrutura ou função, o que poderia ter influenciado a atividade das MMPs. As MMPs constituem um família multigênica com mais 23 endopeptidases zinco dependentes na superfície celular que podem degradar ou processar numerosos substratos em pH neutro **[TALLANT, MARRERO e GOMIS-RÜTH, 2010]**. Suzuki *et al* (2004) relataram diminuição das concentrações de cálcio plasmático de peixe após 8 dias de contaminação por metil mercúrio, o que pode estar relacionado à forma, dose, tempo de exposição do contaminante e à espécie utilizada. Esses dados podem ser correlacionados com a hipótese do acometimento renal pelo mercúrio, que, segundo Zalups (2000) o rim é o principal e primeiro órgão contaminado e acumulador do mercúrio inorgânico. Esse fato poderia contribuir para a causa de deficiência renal e alteração do equilíbrio ácido-básico. Esse desequilíbrio poderia induzir aumento da excreção urinária de cálcio devido a uma diminuição da reabsorção renal do cálcio induzindo um hiperparatireoidismo secundário; ou devido ao efeito direto do ácido sobre o tecido ósseo.

Bushinsky (2001) relatou em trabalho de revisão de alterações em culturas ósseas de camundongo promovidas pela diminuição do pH durante 3 horas (modelo de acidose aguda) causando dissolução mineral óssea. Esses estudos indicam que o mecanismo pelo o qual íons hidrogênio causam liberação do cálcio ósseo durante curto período é devido a alterações de fatores fisicoquímicos que governam a deposição e dissolução do tecido ósseo, e não mediado por alterações de atividades celulares relacionadas à reabsorção. Para confirmar essa hipótese cultivou-se disco de apatita carbonatado sintético em meio fisiologicamente ácido livre de células e verificou-se a liberação de cálcio em resposta da diminuição do pH **[Bushinsky, 2001]**. Pode-se sugerir também que o mercúrio tenha atingido o interior das células e se ligado no lugar do fósforo e Ca+. Os dados encontrados não puderam ser confrontados com a literatura em relação ao tecido ósseo no que se refere aos possíveis locais de ligação do mercúrio no interior celular. Entretanto, ao longo do experimento a atividade das MMPs voltaram ao normal demonstrando que a contaminação aguda poderia estar estimulando a atividade das MMPs, porém voltando ao normal depois com a possível eliminação do mercúrio pelo organismo. Foi observado também que à medida que a idade dos ratos foi aumentando, a atividade das MMP-2 foi diminuindo, tanto no grupo salina quanto no grupo mercúrio.

Outra hipótese para explicar a interação do aumento da atividade das MMPs com o mercúrio pode ser explicada pelas citocinas inflamatórias. A indução aumentada das MMPs pelo mercúrio pode estar relacionada à inflamação ocasionada pelo mercúrio durante o período de contaminação. As MMPs são rigorosamente reguladas nos seus níveis transcricional e pos-transcricional e também controladas nos seus níveis protéicos pelos seus ativadores, inibidores, localizados na superfície celular. Se o formidável potencial proteolítico das MMPs não for preciso para seu controle perfeitamente ajustável, a desregulação pode aumentar a degradação e desenvolver uma patologia. Isso acontece durante a inflamação, ulceração, artrite, periodontite, fibrose e enfisema **[TALLANT, MARRERO e GOMIS-RÜTH, 2010; GIACHELLI e STEITZ, 2000]**. No entanto mais estudos precisam

ser realizados para descrever os mecanismos envolvidos na indução do aumento da atividade das MMPs nos ossos.

O aumento da atividade das MMPs está associado à degradação da MEC e aumento do remodelamento tecidual [MOTT e WERB, 2004; YAN e BOYD, 2007]. Assim, a contaminação com HgCl_2 , o qual tem uma alta afinidade pela cisteína (que é componente funcional de ligação das MMPs), poderia estar estimulando a sua atividade e conseqüentemente renovando a matriz óssea e proporcionando um tecido ósseo com caráter novo e mais resistente. Em contraste, nenhum dano ósseo foi observado nesse estudo em relação aos parâmetros biofísicos. O grupo tratado não foi diferente quando comparado como seu grupo controle e invalida a hipótese que o mercúrio inibe ou estimule a reabsorção, o qual poderia aumentar os valores da matriz extracelular. Apesar dos valores não significativos é possível observar uma tendência de aumento do percentual de material mineral, densidade mineral e óssea. Esse fato poderia caracterizar um tecido ósseo mais resistente, o qual deveria refletir nas propriedades biomecânicas. Apesar de não significativo também houve uma tendência de aumento da força máxima. A tendência ao aumento da densidade mineral não deve ser atribuída à deposição do mercúrio em tecido ósseo, já que esse tem ponto de evaporação abaixo de $800\text{ }^\circ\text{C}$ (temperatura a qual é condicionada os fêmures para obtenção do material mineral).

É possível observar que o esqueleto ósseo com sua vasta área de superfície mineral pode adsorver toxinas e metais pesados e minimizar seus efeitos adversos sobre o tecido ósseo.

6. CONCLUSÕES

Os resultados desse trabalho mostraram que a intoxicação com HgCl_2 , na concentração de 5mg/kg PC, quando comparados com o grupo controle não apresentaram diferenças das alterações das propriedades biométricas, biofísicas e biomecânicas do tecido ósseo em desenvolvimento de ratos.

Apesar dos resultados não significativos, houve tendência de aumento do porcentual de material mineral, densidade mineral e óssea e da força máxima suportada pelas amostras do grupo contaminado em relação aos seus respectivos grupos controle. O que caracteriza um tecido ósseo mais resistente.

Nossos resultados demonstram que houve maior atividade das MMP-2 nos grupos mercúrio em relação aos controles salina de mesma idade, principalmente no final da contaminação e em até 6 meses depois do período de contaminação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALDEN CJ *et al.* Toxicology and carcinogenesis studies of mercuric chloride in f344 rats and b6c3f₁ mice. **U.S. Department of Health and Human Services, Technical Report Series**, nº 408, Feb. 1993. Introdução
2. ATKINSON A, *et al.* Assessment of a two-generation reproductive and fertility study of mercuric chloride in rats. **Food and Chemical Toxicology**, pag.39:73-84, 2001. Introdução
3. Ballatori, N. Transport of toxic metals by molecular mimicry. **Enviromental Health Perspectives**, vol.110, suppl. 5, pag.689-94, Oct. 2002. Discussão
4. BERG BN; HARMISSON CR. Growth, disease, and aging in the rat. **Journal of gerontology**, vol.12, pag.370-77, May 1957. Discussão
5. BIRKEDAL-HANSEN H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. **Curr Opin Cell Biol.** vol.7(5), pag.728-35, Oct. 1995. Resultados
6. BONEWALD, LF. Osteocyte biology: its implications for osteoporosis. **Journal Musculoskelet Neuronal Interact**, vol.4, nº1, pag.101-4, Mar. 2004. Introdução
7. BRIDGES, CC; ZALUPS, RK. Homocysteine, system b^{0,+} and the renal epithelial transport and toxicity of inorganic mercury. **American Journal of Pathology**, v.165, n. 4, Oct. 2004. Discussão
8. BRINCKERHOFF CE; MATRISIAN LM. Matriz metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. **Nature Review Mol. Cell Biology**, vol.3, pag.207-214, 2002. Introdução

9. BRODKIN E. *et al.* Lead and mercury exposures: interpretation and action. **Canadian Medical Association Journal** , vol.176(1), pag.59-63, Jan. 2007.
Introdução
10. BRUNET S, *et al.* Cytometric profiles of bone marrow and spleen lymphoid cells after mercury exposure in mice. **Int. J. Immunopharmac.**, vol.15, n.7, pag.811-819, 1993. Introdução
11. BURR, DB., ROBLING, AG. & TURNER, CH. Effects of biomechanical stress on bones in animals. **Bone**, vol.30, n. 5, pag.781-86, May 2002.
Discussão
12. COSTA FS, *et al.* Avaliação das metaloproteinases de matriz -2 e-9 em gatos com desmineralização óssea secundária à tirotoxicose induzida. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, vol.60 (5), pag.1053-1060, 2008. Introdução
13. DATTA H; NG WF; WALKER JA; TUCK SP; VARANASI SS. The cell biology of bone metabolism. **Journal of Clinical Pathology**, vol.61, pag.577-587, 2008. Introdução
14. D'ÁVILA, FV. Efeitos do Cloreto Mercuroso Sobre o Desenvolvimento do Tecido Ósseo de Ratos: Propriedades Físicas, Químicas e Biomecânicas do Fêmur de Ratos. 54f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas)** – Centro de Ciências Fisiológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2007. Discussão
15. DAY JJ; REED MN & NEWLAND MC. Neuromotor deficits and mercury concentration in rats exposed to metal mercury and fish oil. **Neurotoxicology and Teratology**, vol.27, pag. 629-41, 2005. Introdução

16. DIETER MP *et al.* Immunological and biochemical responses in mice treated with Mercuric Chloride. **Toxicol Appl Pharmacol.**, vol.68, pag.218-228, 1983. Introdução
17. ESCRIBANO, A *et al.* Effect of Lead on Bone Development and Bone Mass: A Morphometric, Densitometric, and Histomorphometric Study in Growing Rats. **Calcified Tissue International**, New York, nº.60, pag.200-03, Jul. 1997. Introdução
18. FARRIS FF *et al.* Physiological model for the pharmacokinetics of metal mercury in the growing rat. **Toxicology and Applied Pharmacology**, vol.119, pag.74-90, 1993. Introdução
19. FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL, I.; GRACIA, M. A. A.; PINGARRÓN, M. D. C.; JEREZ, L. B. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. **Med. Oral.** , v.11, p.47-51, 2006a.
20. FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL, I.; GRACIA, M. A. A.; PINGARRÓN, M. D. C.; JEREZ, L. B. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. **Med. Oral.** , v.11, p.51-57, 2006b.
21. FERREIRA JA. Efeitos do cloreto mercúrico sobre o tecido ósseo de ratos. 74f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas)** – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, 2008. Discussão
22. FROST HM; JEE WSS. On the Rat Model of Human Osteopenias and Osteoporosis. **Bone and Mineral**, vol.18, pag.227-36, 1992. Introdução
23. GIACHELLI CM; STEITZ S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. **Matrix Biol.** vol.19, pag.615–22 , 2000.

24. GRAEME KA; POLLACK CVJ. Heavy metal toxicity, part 1: arsenic and mercury. **Journal of Emergency Medicine**, vol.16, nº1, pag.45-56, Jan-Feb. 1998. Introdução
25. GRIEM, P. *et al.* Strain differences in tissue concentrations of mercury in inbred mice treated with mercury chloride. **Toxicology and Applied Pharmacology**, vol.144, pag.163-70, 1997. Introdução
26. GROSS J & LAPIERE CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. **Proc. Natl. Academic Science**. USA, vol.47, pag.1014-102, 1962. Introdução
27. HILL PA, *et al.* The effect of selected inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs) on bone resorption and the identification of MMPs and TIMP-1 in isolated osteoclasts. **Journal of Cell Science**, vol.107, pag.3055-3067, 1994. Introdução
28. HOUL *et al.* Matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) in osteoclasts: new lesson on the involvement of MMPs in bone resorption. **Bone**, vol.34, pag.37-47, 2004.
29. JIN GB *et al.* Induction of anti-metallothionein antibody and mercury treatment decreases bone mineral density in mice. **Toxicol Appl Pharmacol**, vol.185, n.2, pag.98-110, 2002. Introdução
30. KALU DN *et al.* The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. **Endocrinology**, vol.124, nº1, pag.7-16, 1989. Introdução
31. KARIMI A *et al.* Mercury exposure among residents of a building block in Shiraz, Iran. **Environmental Research Section A**, vol.88, pag.41-3, 2002. Introdução

32. KEENAN, M.J. et al. Comparison of bone density measurement techniques: DXA and Archimedes' Principle. **Journal of bone and mineral research**, vol.12, n.11, pag.1903-07, 1997. Resultados
33. LACERDA LD. Evolution of mercury contamination in Brazil. **Water, Air and Soil Pollution**, vol.97, pag.247-255, 1997. Introdução
34. MAGOS L. Physiology and Toxicology of Mercury. **Metal ions in biological systems**, vol.34, pag.321-370, Jan. 1997. Introdução
35. MACKIE EJ. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, vol.35, pag.1301-05, 2003. Introdução
36. MCCAWE AP; EWALD JE; WERB Z. Matrix metalloproteinases and regulation tissue remodeling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, vol.8, nº3, pag.221-33, Mar. 2007. Introdução
37. MARCUS R; FIELDMAN D; KELSEY J. Osteoporosis. **The Bone Organ System**, pag. 3-22 Academic Press. San Diego USA. T.A Einhorn, 1996. Introdução
38. MARQUETI RC; PRESTES J; STOTZER US; PASCHOAL M; LEITE RD; PEREZ SE; SELISTRE DE ARAUJO HS. MMP-2, jumping exercise and nandrolone in skeletal muscle. **Int J Sports Med.**, vol.29(7), pag.559-63, Jul. 2008. Resultados
39. MIYAMOTO, M.D. Hg²⁺ causes neurotoxicity at an intracellular site following entry through Na⁺ and Ca⁺⁺ channels. **Brain Research.**, vol. 267, pag. 375-379, 1983.

40. MOTT JD; WERB Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. **Current Opinion in Cell Biology.**, vol.16, Issue 5, pag. 558-564, Oct. 2004. Discussão
41. MUNDY GR. Cellular and Molecular Regulation of Bone Turnover. **Bone**, vol. 24, Issue 5, Supp.1, pag.35S-38S, May 1999. Introdução
42. NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM WORKING GROUP. Toxicology and carcinogenesis studies of mercuric chloride in F344 rats and B6C3F1 mice (gavage studies). **Natl Toxicol Prog Tech Report Series.** pag.408: 260, 1993. Discussão
43. NETO AMP *et al.* Consenso Brasileiro de Osteoporose. **Revista Brasileira de Reumatologia**, vol.42, nº 6, Nov./DEZ., 2002. Introdução
44. NGUYEN TV *et al.* Genetic determination of bone mineral density: evidence for a major gene. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, vol. 88, nº 8, pag.3614-620, Aug. 2003. Introdução
45. ORTEGA N; BEHONIC DJ, WERB Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. **Trends. Cell Biology**, vol.14(2), pag.86-93, 2004. Introdução
46. PARFITT AM; CHIR B. Bone Remodeling and bone loss: understanding the pathophysiology of osteoporosis. **Clinical obstetrics and Gynecology**, New York, vol.30, nº 4, pag.789-811, Dec. 1987. Introdução
47. PENG, Z.; TUUKKANEN, J.; ZHANG, H.; JÄMSÄ, T.; VÄÄNÄNEN, H. K. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. **Bone**, vol.15, pag.523-532, 1994. Resultados

48. PIVONKA P. *et al.* Model structure and control of bone remodeling: A theoretical study. **Bone**, vol.43, pag.249–63, 2008. Introdução
49. RAISZ LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. **Clinical Chemistry**, vol.45, nº8, pag.1353-58, 1999. Introdução
50. RALSTON SH; CROMBRUGGHE B. Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. **Genes and Development**, vol.20, pag.2492-506, 2006. Introdução
51. RAMALINGAM V, VIMALADEVI V. Effect of mercuric chloride on membrane-bound enzymes in rat testis. **Asian J Androl.**, vol.4, n.4, pag.309-311, 2002.
52. ROTHSCHILD RFN; DUFFY LK. Mercury concentration in muscle, brain and bone of western Alaskan waterfowl. **Science of the Total Environment.**, vol. 349, pag.277-83. 2005. Introdução
53. SANTOS E. *et al.* Avaliação dos níveis de exposição ao mercúrio entre índios Pakaanóva, Amazônia, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, vol.19, nº1, pag.199-206, Fev. 2003. Introdução
54. SCHIRRMACHER K. *et al.* Effects of Lead, Mercury, and Methyl Mercury on Gap Junctions and $(Ca^{+2})_i$ in Bone Cells. **Calcified Tissue International**, New York, nº63, pag.134-39, Oct. 1998. Introdução
55. STEINLICHT MD; WERB Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol.17, pag.463-516, 2001. Introdução
56. 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, vol. 22, pag.439-46, 2004.

Introdução

57. TALLANT C, MARRERO A, GOMIS-RÜTH FX. Matrix metalloproteinases: Fold and function of their catalytic domains. **Biochimica et Biophysica Acta**, pag.1803:20–28, 2010. Discussão
58. TEITELBAUM SL. Bone Resorption by Osteoclasts. **Science**, vol.289, n.5484, pag. 1504 -08, Sep. 2000. Introdução
59. THOMPSON DD. *et al.* FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. **Bone**, Groton, vol.17, n.4, pag.125s-133s, 1995.
60. TOIMELA T. A; TÄHTI H. Effects of mercuric chloride exposure on the glutamate uptake by cultured retinal pigment epithelial cells. **Toxicology in Vitro**, vol.15, Issue 1, pag.7-12, Feb. 2001. Introdução
61. TREBACZ, H. Disuse-induced deterioration of bone strength is not stopped after free remobilization in young adult rats. **Journal of Biomechanics**, v.34, p.1631-636, 2001. Resultados
62. VAANANEN HK. Pathogenesis of Osteoporosis. **Calcified Tissue International**, Kajaanintie, vol.49, pag.S11-S14, 1991. Introdução
63. VIEIRA JLF; PASSARELLI MM. Determinação de mercúrio total em amostras de água, sedimento e sólidos em suspensão de corpos aquáticos por espectrofotometria de absorção atômica com gerador de vapor a frio. **Revista de Saúde Pública**, vol.30, n.3, pag.256-260, Jun. 1996. Introdução

64. VU TH; WERB Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes Development**. vol.14, n.17, pag.2123-33, Sep. 2000. Introdução
65. YAMAMOTO N; JEE WSS; YAN FM. Bone Histomorphometric Changes in the Femoral Neck of Aging and Ovariectomized Rats. **The Anatomical Record**, n.243, pag.175-185, 1995. Introdução
66. YAN C; BOYD DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. **J Cell Physiol.**, vol.211(1), pag.19-26. Apr. 2007
67. YONAGA T, *et al.* Effect of organic and inorganic mercury compounds on the growth of incisor and tibia in rats. **Anat. Anz.**, vol.159, n.1-5, pag.373-383, 1985.
68. ZALUPS R.K. Molecular Interactions with Mercury in the Kidney. **Pharmacological Reviews**, vol.52, n.1, pag.113-44, Mar. 2000. Resultados
69. ZALUPS RK, AHMAD S. Homocysteine and the renal epithelial transport and toxicity of inorganic mercury: role of basolateral transporter organic anion transporter 1. **J Am Soc Nephrol.**, vol.15(8), pag.2023-31. Aug. 2004. Discussao
70. 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**, vol.9, n.2, pag.117-129, Jun. 1993. Introdução