

SÓCRATES CALVOSO PENNA

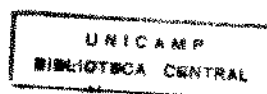
**NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA E ATIVIDADE DA CATALASE,
SUPERÓXIDO DISMUTASE E GLICOSE-6-FOSFATO
DESIDROGENASE EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS AO VAPOR DE
MERCÚRIO**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sara T. O. Saad

Dissertação apresentada ao Departamento de
Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em Farmacologia

CAMPINAS

1995



Reservados todos os direitos.

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	P381n
V.	Ex.
TOMBO BC	23097
PROC.	667/96
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	20/03/96
N.º CPD	C.M.00025357-5

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DE FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

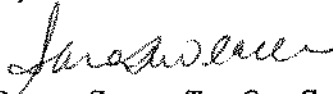
P381n Penna, Sócrates Calvoso
Níveis de glutathiona reduzida e atividade da catalase, superóxido dismutase e glicose-6-fosfato desidrogenase em indivíduos expostos ao vapor de mercúrio / Sócrates Calvoso Penna. Campinas, SP : [s.n.], 1995.

Orientador : Sara Terezinha Ollala Saad
Tese (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

I. Eritrócitos. 2. Toxicologia industrial. 3. Enzimas. I. Saad, Sara Terezinha Ollala. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Mestrado, apresentada a Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia do Biomédico Sócrates Calvoso Perna.

Campinas, 11 de dezembro de 1995



Profa. Dra. Sara T. O. Saad

- Orientadora -

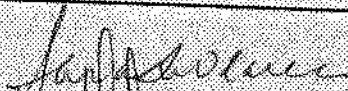
Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Sara Teresinha Oladillo Saad

Membros:

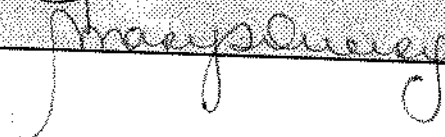
1. Prof. Dr. Sara T. O. Saad



2. Prof. Dr. Benedito Baccareira



3. Prof. Dr. Mary d. S. Durazzo



Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 11/12/15

**Este trabalho dedico aos meus mestres e guias que por diferentes caminhos
trilham rumo ao tudo.**

AGRADECIMENTOS

A tudo e a todos que me ajudaram a chegar, ficar e a continuar.

Aos meus pais Dito e Ziba que além de todo o apoio me ensinaram a sonhar e a ver que a vida é a continuação da imaginação através da realização.

Bença Pai, Bença Mãe.

Aos meus ancestrais.

A minha irmã Renata meu eterno amor e admiração.

A Princesa (Valter), Dennis e Danilo pelo carinho e amor.

A Kauê que depois de tanto correremos, nos encontramos.

... Que a vida não é só isso que se vê é um pouco mais. ... (Mestre Cartola)

Aos meus primeiros orientadores.

Henrique Couto Teixeira, Montchillo Russo, Jaime Sertie, Zulim Singer, Mario Mariano.

Aos amigos do Depto de Farmacologia e Hematologia da FCM.

A Luciana (beijão Lu), Wellington, Rodrigo, Marcelo, Moacir, Luis, Ana Olivia, Dilmara, Paulo, Simone, Rita, Marta, Soraia, Rita, Caudia, Aldete, Dora, Solange, Débora, Marlene, Gisleine (batatinha), Adilson, Gildo, Evandro, Miguel, Toninho (Taturana) e mais alguns.

Meu agradecimento especial a Tereza Salles que além do prazer do convívio pessoal, com paciência oriental, me ensinou tanto profissionalmente.

Agardeço ao apoio técnico e a santa paciência da Sandrinha, Malú, Silvana e Arlete.

Aos meus amigos e irmãos de outros aprendizados.

Luiz, Marcelo, Zé Ricardo, Leticia, Zé, Vado e uma lembrança especial à você Cika (fique com Deus).

Ao Dr. Eduardo Mello De Capitani e sua equipe.

Agradeço especialmente a Profª Drª Sara Saad (Sarita) pelo apoio e paciência.

SUMÁRIO

Resumo.....	.01
I. Introdução	04
II. Objetivos	13
III. Casuística e Métodos.....	15
Casuística.....	16
Lista de Material.....	17
Métodos.....	18
Determinação de mercúrio urinário.....	18
Hematimetria.....	18
Enzimas e Produto.....	19
Catalase.....	19
Superóxido Dismutase.....	21
Glutaciona Reduzida.....	23
G-6-PD.....	24
Corpúsculo de Heinz e Reticulócitos.....	25
Análise Estatística	26
IV. Resultados.....	27
Hematimetria	28
Catalase	32
Superóxido Dismutase.....	34
Glutaciona Reduzida	36
G-6-PD	38
V. Discussão.....	40

VI. Conclusões.....	.47
VII. Summary.....	.49
VIII. Referências Bibliográficas.....	.51
IX. Anexo	

LISTA DE ABREVIATURAS, TABELAS e FIGURAS

ABREVIATURAS

Hg	Mercúrio
Hg⁰	Mercúrio Metálico
Hg₂⁺⁺	Cátion Mercurioso
Hg⁺	Cátion Mercúrico
WHO	World Health Organization
OMS	Organização Mundial da Saúde
T	Tonelada
-SH	Grupo Sulfidril
S	Enxofre
SOD	Superóxido Dismutase
CAT	Catalase
GSH	Glutathiona reduzida
Fe⁺³	Cátion Ferrico
Fe⁺²	Cátion Ferroso
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio ou Água Oxigenada
OH⁻	Radical Hidroxila
OH[•]	Radical hidroxil
O₂⁻	Ânion Superóxido
Gpx	Glutathiona Peroxidase
GSSG	Glutathiona Oxidada
GR	Glutathiona Redutase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
6-PGA	Fosfogluconato
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
G-6-PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
LTB	Limite de tolerância Biológica
Hb	Hemoglobina
Ht	Hematócrito

VCM	Volume Corpuscular Médio
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
ATP	Adenosina trifosfato
G-6-P	Glicose -6-fosfato
q.s.p.	Quantidade Suficiente Para

TABELAS

Hematimetria

- Tabela 1: Dados hematológicos do grupo controle..... 29
- Tabela 2: Dados hematológicos do grupo afastados 30
- Tabela 3: Dados hematológicos do grupo expostos 31

Catalase

- Tabela 4: Concentração da Catalase nos grupos afastados, normais e expostos..... 32

SOD

- Tabela 5: Concentração da SOD nos grupos afastados, normais e expostos 34

GSH

- Tabela 6: Concentração da GSH nos grupos afastados, normais e expostos 36

G-6-PD

- Tabela 7: Concentração da G-6-PD no grupo exposto 38

RESULTADO GERAL

- Tabela 8: *Idade, tempo de exposição, concentração de Hg urinário, CAT, SOD, GSH, G-6-PD e % de reticulócitos dos indivíduos expostos* 39

FIGURAS

• Fig. 1: Ciclo Natural do Mercúrio	5
• Fig. 2: Sistema Antioxidativo Eritrocitário	8
• Fig 3: Estrutura da Glutathione Reduzida	9
• Fig. 4: Estrutura da Glutathione Oxidada	10
• Fig. 5: Concentração da Catalase nos grupos expostos normais e afastados.....	33
• Fig. 6: Concentração da SOD nos grupos expostos normais e afastados	35
• Fig. 7: Concentração da GSH nos grupos expostos normais e afastados	37

RESUMO

O mercúrio (Hg) é empregado em diversas atividades humanas. A exposição primária ao metal ocorre através da alimentação contaminada e da liberação de mercúrio pelo amálgama dentário. A exposição ocupacional ao vapor de mercúrio, substância inodora e incolor, é hoje a via mais freqüente de intoxicação. O Hg associa-se fortemente aos grupamentos sulfidrilas (SH) presentes nas proteínas da membrana plasmática, enzimas, substâncias de baixo peso molecular, como a cisteína e glutatona, também pode formar ligações covalentes com o enxofre. Quando se liga aos eritrócitos, atua como um agente oxidante.

O presente estudo teve o objetivo de avaliar o sistema antioxidativo eritrocitário através da medida da atividade da Superóxido Dismutase, Catalase e Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase e da concentração da Glutaciona Reduzida nos seguintes grupos de trabalhadores:

Grupo 1 (Expostos) - 16 trabalhadores, sendo 14 do sexo masculino e 2 do feminino, expostos ao vapor de Hg por um período variável de 0.5 a 8 anos (3.37 ± 2.40) na faixa etária de 18 a 48 anos (32 ± 8.86), e que apresentaram concentração urinária de Hg de 1.6 a 35 (10.73 ± 9.88) $\mu\text{g/g}$ creatinima.

Grupo 2 (Afastados) - 7 trabalhadores do sexo masculino(M) trabalhadores com idade variando de 42 a 61 (46.42 ± 8.61) anos afastados da exposição ocupacional há pelo menos 6 meses e que ficaram expostos ao metal por um período de 4 a 10 anos, apresentaram uma concentração urinária do metal 5.0 -19.1 $\mu\text{g/g}$ creatinima.

Grupo 3 (controle Normais) - constituídos de 8 técnicos e alunos (6 do sexo masculino e 2 do sexo feminino) do Departamento de Hematologia e Farmacologia da FCM-UNICAMP, com idade variando de 22 a 45 anos, possuidores de próteses dentárias contendo Hg , não expostos ocupacionalmente ao metal. Nestes indivíduos não foi avaliada a concentração urinária do Hg.

Em todos os grupos foi realizado hemograma completo e no G1 também levamos a efeito a análise da presença de corpos de Heinz.

Nossos resultados demonstram que a atividade da SOD do G1 e G2 apresentou-se igual à do grupo G3. Por outro lado, a atividade da Catalase do G1 está aumentada significativamente quando comparada ao G2 e teve uma forte tendência de aumento quando comparada ao G3. Já os níveis de GSH estiveram reduzidos significativamente no grupo G1, mas normal no G2, quando comparados ao G3.

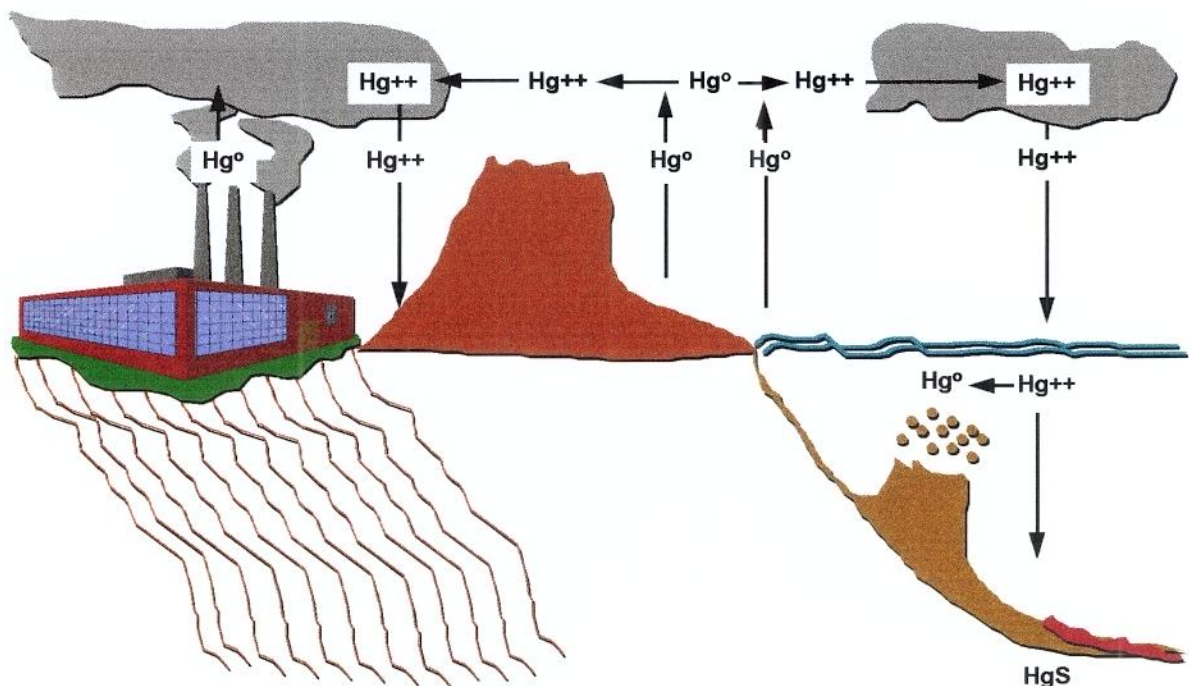
Assim os resultados apresentados neste trabalho indicam que níveis urinários de mercúrio dentro do Limite de Tolerância Biológica podem comprometer o sistema antioxidante entrocitário.

I. INTRODUÇÃO

Para que ocorresse o desenvolvimento da vida, o primeiro ser vivo teve que estar apto a conviver com o meio que o cercava. Interrelacionava-se com inúmeros elementos, como: Hidrogênio, Oxigênio, Sódio, Cloro, Fosfato, Enxôfre, Amônia e outros, associados em maior ou menor concentração. Enquanto alguns são substâncias constitucionais de diferentes sistemas fisiológicos, outros são tóxicos.

O Mercúrio(Hg) é um destes agentes nocivos. Metal pesado, presente naturalmente no meio ambiente, é encontrando desde o magma até a atmosfera. Nas condições normais de pressão e temperatura apresenta-se no estado líquido. Classificado na família 6 A, possui massa relativa de 200.59 e tem distribuição energética P^2 . Na forma inorgânica o mercúrio existe em três diferentes estados : Metálico (Hg^0), Mercurioso (Hg_2^{++}) e Mercúrico (Hg^+). Pode também complexar-se, formando compostos organometálicos (WHO; 1980, 1991). É liberado naturalmente para a atmosfera na forma gasosa através da crosta terrestre e pelos vulcões, sendo esta descarga estimada em 2700-6000 T/ano (LINDEBERG e cols, 1987). O vapor de mercúrio é precipitado com as chuvas, absorvido e convertido à metilmercúrio pelos organismos aquáticos, contaminando assim a base da cadeia alimentar (BERNHARD e cols, 1982) (Figura 1).

Fig. 1: Ciclo Natural do Mercúrio



O contacto do homem com este metal teve seu incremento a partir do desenvolvimento do processo de extração da prata por amalgamação desenvolvido por Bartolomeu de Medina em 1557 "opea" (ATTA e cols, 1992).

Hoje, o Hg é empregado em indústrias como as de cloro-soda, lâmpadas fluorescentes, farmacêutica, cosméticos, cimento, tintas, ar refrigerado, inseticidas, empresas de mineração de ouro e prata; próteses dentárias e em diversas outras atividades humanas (WHO, 1976). Acrescentamos ao meio ambiente 3000 T/ano deste metal (PACYANA, 1987). Esta emissão se faz por intermédio de sua liberação na queima de combustível fóssil, incineração do lixo, pulverização de agrotóxicos e outras fontes.

A exposição primária ao Hg ocorre através da alimentação contaminada, principalmente peixes, e pela liberação de mercúrio pelo amálgama dentário. Aproximadamente 70% de uma obturação odontopediátrica é constituída de Hg e sua liberação ocorre devido ao atrito ou por ação direta da saliva (SOS, 1987). O mercúrio, quando ingerido, sofre uma transformação para metilmercúrio por intermédio de interações com compostos metilcobalamínicos (análogos da vitamina B12) provenientes do metabolismo bacteriano da flora intestinal é então absorvido e distribuído por todo o organismo (ROWLAND e cols, 1975; HEINTZE e cols, 1983).

A exposição ocupacional ao vapor de mercúrio, substância inodora e incolor, é hoje a via mais freqüente de intoxicação. Vai aos pulmões, passa pelos alvéolos, liga-se aos eritrócitos e toma a corrente circulatória. A maior parte do mercúrio absorvido circula na sua forma elementar, depositando-se nos órgãos e tecidos após sofrer ionização (HURSH e cols, 1988). Aproximadamente 80% do Hg inalado fica retido no organismo (HURSH e cols, 1976b). Possui uma vida média estimada de 58 dias, embora este tempo varie de acordo com o órgão de deposição (CLARKSON e cols, 1988). É excretado principalmente pelas fezes e urina (WHO, 1976).

O Hg associa-se fortemente aos grupamentos sulfidríla (SH) presentes nas proteínas, membrana plasmática, enzimas, substâncias de baixo peso molecular como a cisteína e o glutatión; também pode formar ligações covalentes com o enxofre (VALLE e ULMER., 1972).

Os órgãos alvos para a ação deletéria deste metal são o cérebro e os rins. As manifestações clínicas características da intoxicação mercurial são: tremor bilateral dos dedos, pálpebras e lábios, agitação, fadiga e eretismo caracterizado por um comportamento anormal e perda de memória

(ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA, 1976). A presença de N-acetil-b-glicosaminidase na urina é indicador de dano renal (MEYER e cols, 1984); as lesões renais são progressivas e detêm-se principalmente a nível de túbulo proximal (SCHREINER e NAHER, 1965; MOLIN e cols, 1991).

Alguns trabalhos experimentais demonstraram a presença de reações linfoproliferativas (HULTMAN e JOHANSON, 1991), hipergamaglobulemia (NEWCOMBE e cols, 1992) e de autoanticorpos antinúcleo (WEENING e cols, 1981), evidenciando uma indução do mercúrio à autoimunidade. "In vitro", também se observou que a exposição a baixas concentrações deste metal reduz a aderência, quimiotaxia e potencializa a formação de peróxido de hidrogênio por parte de células polimorfonucleares (CONTRINO e cols, 1988).

Os padrões de exposição ao mercúrio, aceitos pela Organização Mundial de Saúde, correspondem a uma excreção urinária inferior a $50 \mu\text{g Hg/g}^{-1}$ de creatinina, entretanto, trabalho recente demonstra que indivíduos com concentração urinária inferior ao nível de tolerância biológica adotado pela OMS, apresentam alterações funcionais na migração de neutrófilos e na produção de derivados ativos do oxigênio (PERLINGEIRO e QUEIROZ, 1995).

A neutralização do oxigênio e seus derivados ativos é essencial para a manutenção da vida, tal qual conhecemos. Diferentes doenças, como: autismo, mongolismo, esquizofrenia, psicose maniaco-depressiva, porfiria aguda intermitente, β -talassemia, saturnismo, metemoglobinemia induzida por poluentes e fármacos, infecções bacterianas, esclerose múltipla, etc, estão relacionadas à oxidação de diferentes sistemas (LESSI e cols, 1986).

O Hg age sobre o eritrócito como um agente oxidativo. Esta célula, devido à exposição ao oxigênio e seus derivados ativos, possui um grande arsenal bioquímico antioxidativo, composto de: Catalase (CAT), Glutathiona (GSH) e Superóxido Dismutase (SOD). Este sistema visa reduzir os efeitos degenerativos induzidos pelo H_2O_2 , OH^* e O_2^- (DIGUISEPPI e FRIDOVICH, 1984) (Figura 2).

As vias predominam dependendo da concentração de H_2O_2 no meio (CHANGE e cols, 1979).

A especificidade da catalase para peróxidos demonstra-se maior para o peróxido de Hidrogênio, Metil e Etil-hidroperóxido, entretanto não transforma o T-butilperóxido.

Indivíduos com deficiência da catalase (acatalasêmicos ou hipocatalasêmicos) apresentam uma maior formação de metemoglobina, lipoperoxidação da membrana celular, deformidade e alteração de permeabilidade da hemácia (JAIN, 1988).

A degradação do T-butilperóxido é realizada pelo sistema das glutathionas. Este complexo enzimático é formado pela Glutathiona Oxidada (GSSG), pelas enzimas Glutathiona Redutase (GR), Glutathiona Peroxidase (GPx) e pelo produto da redução da GSSG, a Glutathiona Reduzida (GSH), que mantém uma relação 2:1 com a fonte geradora.

A glutathiona (GSH) eritrocitária possui um papel de maior relevância que a catalase no que confere à degradação do H_2O_2 (FLOHÉ e BRAND, 1969). A GSH é um tripeptídeo formado por cisteína, glicina e glutamato e sua atividade química expressa-se através do grupamento sulfidríla (SH) (FIGURA 1).

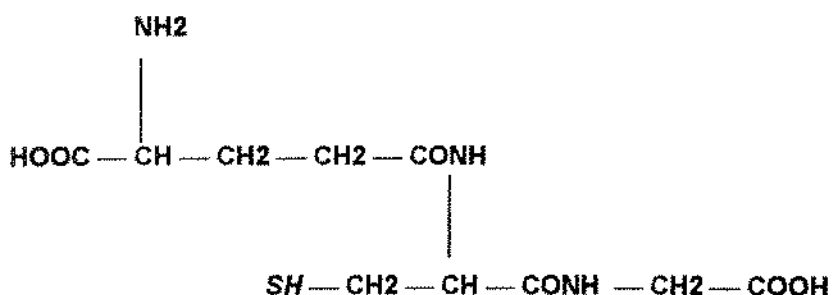


Fig. 3: ESTRUTURA da GLUTATIONA REDUZIDA

Possui uma vida média de 2 a 15 dias, diferindo intra-espécies (KURATA e cols, 1993)

A síntese de glutathiona ocorre no interior das hemácias, tanto jovens quanto maduras, necessitando, para isso, além de seus aminoácidos constitucionais, também das enzimas δ -glutamil

cisteína sintetase e glutatona sintetase. A principal função da glutatona eritrocitária é manter os grupos SH reativos na forma reduzida, grupamento este presente na hemoglobina e em várias outras proteínas que também possuem neles seus sítios ativos. A glutatona, uma vez oxidada, torna-se tóxica, formando pontes dissulfeto entre as duas moléculas e perde a capacidade de deixar o eritrócito (FIGURA 2).

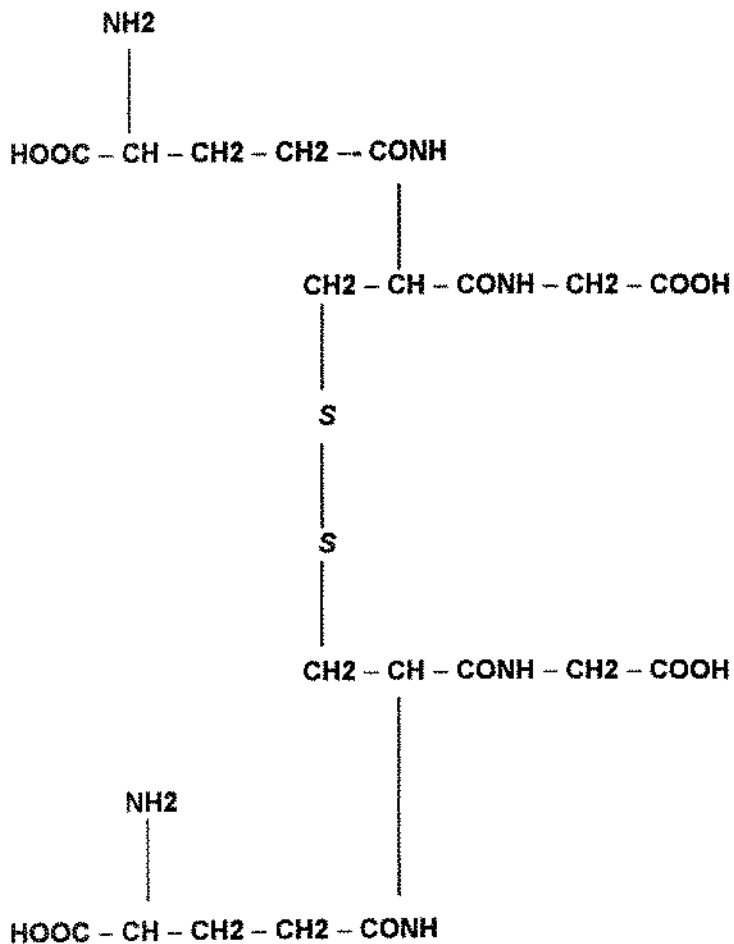


Fig. 4: ESTRUTURA da GLUTATIONA OXIDADA

A reversão para a forma reduzida ocorre através da enzima glutatona redutase, a qual é a catalisadora da redução da glutatona oxidada. Para a ação adequada da glutatona redutase, ela necessita de de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH), glutatona reduzida e flavina adenina dinucleotídeo (FAD). O NADPH é reduzido na via das pentoses pela glicose-6-fosfato

desidrogenase (G-6-PD). Já o FAD é produto da riboflavina e atua como grupo prostético da glutatona redutase.

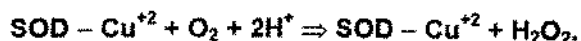
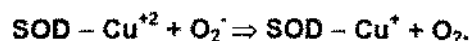
Indivíduos com deficiência de G-6-PD, Glutaciona redutase, com hemoglobinopatias, deficiência nutricional de Riboflavina ou cirrose hepática, apresentam uma redução nos níveis de GSH. Estes podem vir a apresentar quadros de anemia hemolítica, pancitopenia, trombocitopenia e leucopenia induzidas por drogas (BARRAVIERA e MACHADO, 1989; BARRAVIERA e cols, 1989); depleção na produção de anticorpos, atividade de células T-citotóxicas (UHLIG e WENDEL, 1992) e quimiotaxia de células polimorfonucleares (PERLINGEIRO e QUEIROZ, 1995).

A glutaciona pode oxidar-se facilmente por meio de diferentes agentes como ferricianeto de potássio, água oxigenada, oxigênio na forma molecular e por agentes tióis.

A neutralização do oxigênio na forma O_2^- é realizada pela enzima Superóxido Dismutase (SOD). A SOD é encontrada em todos os organismos aeróbicos e em alguns anaeróbicos (FRIDOVICH, 1961, 1974). A partir da descrição desta enzima os biólogos passaram a reconhecer a toxicidade do oxigênio e seus derivados ativos (McCORD e FRIDOVICH, 1969). Esta enzima pode ser encontrada associada ao Cobre-Zinco (Cu-Zn-SOD), ao Mangânes (Mn-SOD) e ao Ferro (Fe-SOD). Cu-Zn-SOD é a enzima característica de organismos eucariotos; a associada ao Fe ocorre em seres procariontes (MCCORD e cols, 1977) como bactérias (YOST, 1973) e a Mn -SOD é observada em pró e eucariotes (STEINMAN, 1982). A SOD eritrocitária está associada ao Cu (eritrocupreína), tipo enzimático também presente no cérebro, fígado e no espaço intermembranar das mitocôndrias (CHANGE e cols, 1979).

A Cu-Zn-SOD apresenta-se como um dímero, possui peso molecular de 31.000 - 33.000 (CALLOW, 1923) e seu sítio ativo está relacionado ao Cu (STEINMAM, 1982). Esta forma enzimática é sensível ao cianeto enquanto que a mitocondrial é insensível e está ligada ao manganês (FRIDOVICH, 1982). A retirada da porção metálica leva a uma inibição enzimática irreversível

A dismutação do ânion superóxido (O_2^-), leva à formação de O_2 e H_2O_2 .



Os derivados ativos do oxigênio alteram a hemoglobina, transformando-a em metemoglobina; esta forma não consegue carrear o oxigênio e precipita-se, formando os corpos de Heinz. Estes são observados como pequenos grumos citoplasmáticos. A reversão da forma férrica (Fe^{+3}) para a forma ferrosa (Fe^{+2}) é essencial para que a hemoglobina volte a transportar o O_2 (WILLIAMS e cols, 1976).

Assim conforme exposto, o mercúrio é um elemento cada vez mais presente no nosso ambiente e representa mais um agente estressante para as células vermelhas.

II. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram os de avaliar o sistema antioxidativo eritrocitário de indivíduos expostos a concentrações aceitáveis, pelas normas internacionais, de vapor de Hg, através da medida da concentração da Glutathiona Reduzida (GSH), e da atividade da CATALASE, Superóxido Dismutase (SOD) e Glicose-6-fosfato Desidrogenase (G-6-PD).

III. CASUÍSTICA E MÉTODOS

CASUÍSTICA

Dois grupos de trabalhadores foram estudados neste trabalho.

O grupo exposto (G1) foi constituído de 14 trabalhadores (12 M, 2 F) com idade média de $32,85 \pm 8,86$ (18-48) anos expostos por um período de $3,37 \pm 2,40$ (0,5-8) anos e com níveis urinário de mercúrio médio de $10,7 \pm 9,88$ (1,6-35,0), concentrações estas inferiores ao Limite de Tolerância Biológica. Estes são funcionários de uma fábrica onde é efetuado o reaproveitamento do mercúrio metálico liberado nos afluentes líquidos de indústrias de cloro-soda. Este processo se dá através da adição de sulfeto no tratamento da água e com isto o Hg precipita-se sob a forma de sulfeto de mercúrio. Esta água é filtrada em terra diatomita por processo de pressão, através da qual é purificada e liberada nos leitos d'água. Nesta indústria, a terra contendo sulfeto de mercúrio é processada por meios físico-químicos, que retém o mercúrio metálico puro.

Após à obtenção da história ocupacional completa, cada trabalhador foi submetido à um exame médico geral, incluindo sintomatologia referente à possível intoxicação pelo metal, assim como dados sobre a incidência de infecções (Anexo).

O grupo de indivíduos afastados (G2) é constituído de 7 trabalhadores com idade média de $46 \pm 8,61$ (42 - 61) e expostos pelo período de 4 a 10 anos, acahando-se afastados da exposição ocupacional pelo menos a 6 meses por prescrição médica, por apresentarem níveis urinários acima do Limite de Tolerância Biológica (LTB) e/ou quadro sintomatológico compatível com intoxicação por este metal.

Já o grupo controle foi formado por 8 indivíduos sadios, não expostos ocupacionalmente ao metal, com idade variando de 21-45 anos, portadores de próteses dentária contendo amálgama de mercúrio, colegas do Departamento de Hematologia e Farmacologia da Fac. Ciências Médicas-UNICAMP, os quais também preencheram o referido questionário.

Todos indivíduos consentiram espontaneamente na realização dos exames, após amplo esclarecimento sobre os procedimentos a serem empregados.

MATERIAL

REAGENTE	PROCEDÊNCIA	Nº CATALOGO
FOSFATO de POTÁSSIO BIBÁSICO $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$	MERCK	(5099)
FOSFATO de POTÁSSIO MONOBÁSICO KH_2PO_4	MERCK	(4873)
TITRIPLEX (EDTA)	MERCK	(21562)
β -MERCAPTOETANOL	MERCK	(805740)
PERHIDROL (H_2O_2) 30%	MERCK	(7210)
CELULOSE TYPE 50	SIGMA	(S - 5504)
α -CELULOSE	SIGMA	(C - 8002)
CLORETO de SÓDIO NaCl PA	MERCK	(6404)
PAPEL DE FILTRO 1	WHATMAN	
NITROBLUETETRAZOLUM (NBT)	SIGMA	(5514)
RIBOFLAVINA	SIGMA	(R 4500)
β -NADP NICOTINAMIDA ADENINA	SIGMA	(N 0505)
DINUCLEOTÍDEO FOSFATO		
CLORETO de MAGNÉSIO $MgCl_2$	MERCK	(21561)
D-G-6-P GLICOSE -6- FOSFATASE	SIGMA	(G 7250)
CIANETO de SÓDIO	ECIBRA	
ÁCIDO CÍTRICO	MERCK	(244)
DTNB (5-5'DITHIOBIS(2-NITROBENZOIC ACID)	SIGMA	(8130)
CLOROFORMIO	MERCK	(21506)
ETANOL ABSOLUTO	MERCK	(986)
ÁCIDO CLORÍDRICO FUMEGANTE (HCl)	MERCK	(314)

MÉTODOS

Determinação dos níveis de mercúrio na urina.

A avaliação do Hg urinário foi efetuada através da seguinte metodologia.

Utilizou-se um espectrofotômetro de absorção atômica (equipamento Varian AA175 com lâmpada de catodo ôco de mercúrio de absorção).

A amostra de urina foi mineralizada por processo de digestão, sob refluxo, com uma mistura de ácidos sulfúrico, persulfato de potássio e, permanganato de potássio em um recipiente de vidro. Este acondicionador possui um reservatório de condensação, no qual o material condensado pode ser devolvido ao frasco de digestão ou, alternativamente, ser eliminado do recipiente (RICHARDSON, 1976).

A concentração do metal foi determinada espectrofotometricamente, usando hidrato bórico de sódio como agente redutor, com sensibilidade de 0.1 µg/l (SHARMA e DAVIS, 1974).

Paralelamente, foi realizada a dosagem de creatinina urinária, com o objetivo de exprimir a concentração de Hg por grama de creatinina. Esta correção permite ajustar os níveis de eliminação de Hg⁺⁺ ao volume de água urinário. A concentração de creatinina urinária foi medida pelo método de Jaffé "opud" (TODD.e cols, 1989).

HEMATIMETRIA

A dosagem de hemoglobina e a contagem de glóbulos vermelhos foram obtidas através do contador eletrônico Coulter modelo SSr, pertencente ao Laboratório de Hematologia do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas-Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas HC-FCM UNICAMP.

ENZIMAS E PRODUTO

CATALASE (BEUTLER, 1975)

PRINCÍPIO

A catalase cataliza a reação de neutralização da água oxigenada de acordo com a reação:



A razão da decomposição do peróxido de hidrogênio pela catalase é medida espectrometricamente a 230 nm, onde o H_2O_2 absorve a luz.

SOLUÇÕES

O Tampão Fosfato é preparado a partir de duas soluções estoque: sol. A - $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (22.823 g/100 ml) e sol. B. KH_2PO_4 (6.804 g/50 ml). Toma-se 67.6 ml da sol A e adiciona-se aproximadamente 30.0 ml da sol. B.; os 2.4 ml restantes são utilizados para acertar o pH em 7.0. Realiza-se uma solução de Tris-HCl 1 M, EDTA 5 mM, pH 8.0. A solução estabilizante consiste de 5.0 μl de β -mercaptoetanol diluído em 1.0 ml de EDTA 0.27 M e qsp 100 ml de H_2O destilada. A solução de H_2O_2 deve ser preparada quando de sua utilização, na diluição 1/100.

TÉCNICA

1.0 ml do sangue coletado por venopuntura com Ácido Cítrico Citrato Destroxe ACD (1/5 de sangue) é passada por uma coluna (celulose microcristalina tipo 50 - α -celulose m/m suspensa em solução NaCl 0,9%) de 2.0 ml de altura, coluna esta empacotada em seringa de 5.0 ml a qual tem em sua base, um círculo de papel de filtro nº1 (WHATMAN). Esta coluna é lavada com 5.0 ml de salina 0.9% e as hemácias são coletadas em tubo cônico. Estas são lavadas e centrifugadas a 3500 rpm/15 min. por 3 vezes. Desta "papa de hemácias", é produzido um hemolisado 1:20, tomando-se 20 μl das hemácias, adicionando 380 μl da solução estabilizante; após homogeneização a mistura é congelada a -20°C.

Preparação do peróxido 10mM.

A Densidade Óptica D.O.1 é obtida em 230 nm, através da leitura de 0,9 ml de fosfato 1/10, utilizando-se água como branco.

Adiciona-se então 0.1 ml da H₂O₂ 30 volumes diluída 1/100, obtendo-se assim a D.O.2.

Considerando o coeficiente de extinção molar do Peróxido a 230nm (0.071) e a diluição 1/10 do H₂O₂. A concentração do peróxido é acertada pelas seguintes operações:

$$a) D.O.2 - D.O.1 = \Delta D O \times 141 = X \text{ mM.}$$

X mM é a concentração de peróxido na solução 1% H₂O₂.

$$b) X \text{ mM H}_2\text{O}_2 \times Vd = 10 \text{ mM H}_2\text{O}_2 \times 1000 \mu\text{l}$$

$$Vd = 10000 \div X$$

Vd = o volume do peróxido a ser diluído em qsp 1.0 ml para obter-se a concentração de 10 mM.

Do hemolisado, 0.1ml são diluídos em 9.9 ml de H₂O destilada (hemolisado 1/2000) e desta solução retira-se uma alíquota de 1.0 ml e adiciona-se 20 μ l de etanol puro, produzindo-se assim uma solução que contém a enzima que será ensaiada.

Em duas cubetas limpas, adiciona-se 50 μ l de Tris a 900 μ l de H₂O₂ 10 mM e a 30 μ l de H₂O dest. Incuba-se a 37°C por 10 min. Adiciona-se 20 μ l do hemolisado 1:2000 às cubetas e imediatamente toma-se a leitura espectrometricamente a 230 nm, minuto a minuto, enquanto há linearidade na reação.

Calcula-se a média das diferenças das diversas D.O., até o quarto minuto.

O cálculo da quantificação enzimática (UI/gHb) seguiu a equação:

$$A = (\Delta D.O. / T) \times 10^7 \text{ (diluições)} \div Hb \times Vol \text{ hemol.} \times 0,071 \text{ (coeficiente de extinção molar do peróxido a 230 nm).}$$

A = unidades ativas da enzima por grama de hemoglobina.

$\Delta D.O.$ = Média aritmética da D.O.

T = Tempo considerado, para leitura da densidade óptica.

Hb = concentração de hemoglobina no hemolisado 1:20.

Vol hemol. = vol hemolisado 1/2000.

SUPERÓXIDO DISMUTASE (WINTERBOURN e cols, 1975)**PRINCÍPIO**

A SOD catalisa a redução do anion superóxido (O_2^-) de acordo com a seguinte reação.



Baseia-se na capacidade da Superóxido dismutase em inibir a redução do Nitrobluetetrazolium (NBT) ocasionada pela fotorredução da riboflavin e O_2 .

MATERIAL

Nitrobluetetrazolium - 1.5 mM (12.3 mg/10 ml).

Riboflavina - 0.12 mM (4.5 mg/100ml).

Tampão Fosfato (M/15 pH 7.8) é produzido a partir da mistura das seguintes diluições:

a- $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (15.20012 g/1000 ml)

b- KH_2PO_4 (0.90636 g/100 ml);

Tampão - 915 ml (a) + 80 ml (b), acertar o pH em 7.8 com o restante de (b).

EDTA 0.1 M contendo NaCN 1.5 mg/10 ml.

TÉCNICA

Cerca de 5.0 ml de sangue é coletado e depositado em recipiente contendo Heparina (10 U/ml), lavado com salina NaCl 0.9% e centrifugado a 3500 rpm/10 min., os leucócitos são aspirados com pipeta Pasteur. Este procedimento é repetido até que visualmente não se note a presença de glóbulos brancos. O hemolisado é preparado a partir de 500 μ l de hemácias que são diluídas em 1,5 volume de água gelada e vigorosamente agitado. A concentração de hemoglobina é determinada no hemolisado, e ajustada para 10 g/dl.

A SOD é extraída adicionando-se, em um tubo cônico, 3.5 ml de água gelada a 0.5 ml do hemolisado e a 1.0 ml de Etanol. Após homogeneização, acrescenta-se 0.6 ml de clorofórmio ao extrato, o qual apresentará uma coloração achocolatada devido à agitação brusca. Após centrifugação a fase superior que contém a enzima é transferida para um tubo de ensaio mantido em banho de gelo. Procede-se a reação à temperatura ambiente, pipetando-se em 7 tubos de ensaio 10, 20, 40, 60, 80, 200

e 500 μ l do extrato e adiciona-se, a cada um dos tubos, uma solução contendo 200 μ l de EDTA/NaCN; 100 μ l de NBT 1.5 mM e 50 μ l de Riboflavina 0.12mM. Completa-se o volume para 3.0 ml com fosfato pH 8.0. Os controles "brancos" são obtidos pela adição apenas da solução na ausência do extrato.

Com o objetivo de promover a redução do NBT, as amostras são levadas à uma iluminação uniforme, feita por lâmpada fluorescente, em uma caixa adaptada que visa impedir a entrada de luz proveniente do meio externo. A exposição é feita por 12 min.

Procede-se então à leitura a 560 nm e a concentração da SOD é obtida com a fórmula

$$A = Hb/I \text{ max. onde}$$

A = concentração da enzima na amostra.

Hb = concentração de hemoglobina final no extrato (10).

I max = percentual de inibição máxima da redução do NBT.

GLUTATIONA REDUZIDA (BEUTLER, 1975)

PRINCÍPIO

Praticamente todos os compostos não protéicos sulfidrílicos das células vermelhas permanecem estáveis devido à presença da GSH. O 5,5'-Dithiobis(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) é um composto dissulfídico que pode ser reduzido por compostos sulfidrílicos, vindo a originar uma substância amarelada. A densidade óptica desta substância é medida por espectrofotometria a 412 nm.

MATERIAL

Solução Precipitante - 1.67 g ácido metafosfórico glacial/ 100 ml.

TÉCNICA

O sangue é coletado e armazenado em um frasco contendo EDTA (1 gota/ml) a 4°C; deste, produz-se um hemolisado adicionando-se 0.4 ml de sangue a 3.6 ml de água destilada gelada. Uma porção de 3.0 ml do hemolisado é acrescida de 4.5 ml de uma solução precipitante, homogeneizada e filtrada em papel de filtro (WHATMAN) durante 5 min. O filtrado é recolhido e 2.5 ml do filtrado são adicionados a 10 ml de Na₂HPO₄ 0.3 M; desta solução, 10 ml são separados (alíquota A) e lê-se a D.O. dos 2.5 ml restantes a 412 nm (DO1). Para se estabelecer o zero espectrofotometricamente, produz-se uma mistura a partir de 3.0 ml da solução precipitante diluída 2:5, acrescida de 12.0 ml de Fosfato de Sódio 0.3 M. Retira-se desta 10.0 ml (alíquota B) e com os 2.5 ml restantes, encontramos o ponto zero. As alíquotas A e B são então acrescidas de 1.0 ml de DTNB, e procede-se à leitura (DO2).

avaliamos o hematócrito para expressarmos a concentração de GSH percentualmente.

A concentração do produto é então calculada a partir da seguinte equação:

$$DO2 = DO1 \times (31040/HT) = \text{mg\%}$$

DO1 = Densidade óptica da amostra antes da adição do DTNB.

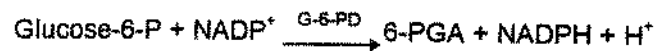
DO2 = Densidade óptica da amostra após a adição do DTNB.

31040 = Coeficiente de extinção molar do DTNB reduzido pela GSH (13600) multiplicado pelas diluições.

HT = Hematócrito.

G-6-PD (BEUTLER, 1975)PRINCÍPIO

A glicose-6-fosfato desidrogenase catalisa a oxidação da glicose-6-fosfato para 6-fosfogluconolactona, a qual rápida e espontaneamente se hidrolisa para 6-fosfogluconato.



A redução do NADP para NADPH é medida por espectrofotômetro a 340 nm.

MATERIAL

Solução precipitante - 7 mM de β -mercaptoetanol e 2,7 mM de EDTA sódica pH 7.0.

TÉCNICA

Após lavar as hemácias 3 vezes em solução salina, prepara-se o hemolisado adicionando-se as hemácias a uma solução estabilizadora 1:20. O material é homogeneizado e a hemólise obtida por congelamento e descongelamento.

Para a quantificação são necessários 2 tubos contendo, cada um, 580 μ l de água desionizada; 100 μ l de NADP 2mM; 100 μ l de tampão Tris-HCl 1.0 M pH 8.0 e 100 μ l de MgCl_2 0.1 M. Adiciona-se 20 μ l de hemolisado em cada tubo e incuba-se a 37°C por 10 min.. Em seguida acrescenta-se 100 μ l de G-6-P 6mM no tubo padrão e 100 μ l de água desionizada no "branco". Lê-se a densidade óptica a 37°C durante 10 min., em cubetas com percurso óptico de 1.0 cm, a $\lambda = 340\text{nm}$, em espectrofotômetro Beckman, modelo 25.

O cálculo dos resultados obedeceu à seguinte equação:

$$\text{ATIVIDADE (U.I.)}/\text{g Hb} = \frac{(\Delta \text{ D.O./min}) \times 10^5}{6.22(\text{Hb}) \times (\text{vol. enzima})}$$

$\Delta \text{ D.O./min.}$ = diferença da densidade óptica por min. obtida com a leitura dos primeiros 5 min., após estabilização da solução.

6.22 = coeficiente de extinção mM do NADPH

Hb = hemoglobina do hemolisado em g/dl.

vol. enzima = volume de hemolisado colocado nos tubos padrão e "branco".

CORPÚSCULO DE HEINZ E RETICULÓCITOS (DACIE e LEWIS, 1975).

Duas ou tres gotas de Azul cresil brilhante são aspiradas por pipeta Pauster 10 × 75 mm, são adicionadas a dois a quatro volumes de sangue coletado em EDTA , homogeneizado e incubado a 37°C por 15-20 min. As hemácias são levemente ressuspensas, colocadas sob lâminas de microscopia óptica e examinadas através de objetiva de imersão. Os reticulócitos são observados como filamentos azulados e expressos em % através da seguinte operação;

$$\frac{\text{Nº de reticulócitos contados em 10 campos}}{\text{Nº tot de células nos 10 campos}}$$

Os corpúsculos de Heinz são vistos como pequenos grumos densos.

ANÁLISE ESTATÍSTICA (programas TRUE EPISTAT copyrigh 1991 Epistat Service e MICROSTAT copyrigh 1984 Ecosoft. Inc.)

Para a comparação dos diversos grupos foi utilizado o método de Mann-Whitney.

As variáveis foram medidas no grupo normal, afastado e expostos.

Para as correlações dos níveis de mercúrio e tempo de exposição com os níveis de glutathione e atividade da catalase e SOD foi utilizado o coeficiente de Pearson.

IV. RESULTADOS

1 - HEMATIMETRIA

Quanto à hematimetria verificamos não ter havido diferença significativas entre os 3 grupos estudados.

Também não houve diferença significativa no número de reticulócitos e não observamos presença de corpúsculos de Heinz.

Os resultados estão expostos nas tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1: Dados hematológicos dos indivíduos do grupo controle participantes do estudo

Indivíduo	leucócitos	hemácias	Hb	Ht	VCM	HCM	MCHC
sexo	($\times 10^9/L$)	($\times 10^{12}/L$)	(g/dl)	(%)	(μ^3)	(pg)	(%)
D.C.F.U.(M)	9.7	4.74	14.0	41.9	88	29.6	33.5
D.F.(M)	7.0	5.44	15.9	45.2	83	29.3	35.3
S.C.P.(M)	6.3	4.82	15.0	43.9	91	31.1	34.2
T.M.R.(M)	6.3	5.00	15.4	43.0	85	30.4	35.7
T.O.(M)	9.7	4.60	14.1	42.0	91	30.7	33.7
V.D.H.(M)	7.5	4.60	14.0	40.7	88	30.3	34.3
Média	7.75	4.86	14.73	42.78	87.78	30.20	34.40
DP	1.57	0.31	0.81	1.60	3.20	0.67	0.87
EP	0.64	0.12	0.33	0.60	1.30	0.30	0.35
Mediana	7.25	4.78	14.55	42.5	88.0	30.3	34.3
S.D.P.(F)*	4.4	6.50	12.8	40.4	62	19.7	31.6
M.V.(F)	6.5	4.20	12.9	37.2	89	30.7	34.6

*Indivíduo portador de α -talassemia.

Tabela 2: Dados hematológicos dos indivíduos afastados da exposição mercurial

Indivíduo	Idade (anos)	tempo exposição (anos)	tempo afastado (anos)	CONC. HgU ($\mu\text{g/g creat.}$)	leucócitos ($\times 10^6/\text{L}$)	hemácias ($\times 10^{12}/\text{L}$)	Hb (g/dl)	Ht (%)	VCM (μ^3)	HCM (pg)	MCHC (%)
A.C.S. (M)	47	4	1.0	19.1	8.8	5.25	17.8	52.3	100	33.8	34.0
A.M.J. (M)	61	10	1.0	7.5	11.3	5.28	15.9	45.8	87	30.1	34.7
C.E.A. (M)	35	10	0.7	16	7.6	5.14	15.5	45.5	89	30.2	34.1
M.B.C. (M)	54	10	0.5	5.0	8.3	4.50	15.5	43.3	96	34.4	35.8
R.C. (M)	42	10	2.0	16.7	6.0	5.15	15.3	46.2	90	29.6	33.0
S.P.A. (M)	42	10	1.0	10.1	8.4	5.34	14.0	43.4	89	26.1	32.7
W.A.C. (M)	44	5	1.5	(-)	7.8	5.36	15.2	45.6	85	28.3	33.3
Média	46.42	8.42	1.1	10.00	8.82	4.99	15.1	44.6	85	30.10	33.7
DP	8.61	2.69	0.5	6.77	1.33	0.35	1.8	4.3	9.5	3.0	1.4
EP	3.25	1.02	0.2	2.76	0.5	0.13	0.7	1.6	3.4	1.13	0.5
Mediana	44.00	10.00	1.00	8.80	8.30	5.14	15.5	45.5	87	30.1	34.0

Tabela 3: Dados hematológicos dos indivíduos expostos ocupacionalmente ao mercúrio com índices de concentração urinária do metal inferiores ao LTB (50µg/g creatinina).

INDIVÍDUOS	IDADE (anos)	tempo exposição (anos)	CONC. HgU (µg/g creat.)	leucócitos ($\times 10^9/L$)	hemácias ($\times 10^{12}/L$)	Hb (g/dl)	Ht (%)	VCM (μ^3)	HCM (pg)	MCHC (%)	reticulócito (%)
A.L.V.(M)	36	8	3.4	10.5	4.64	14.0	40	87	30.0	34.8	0.7
C.D.(M)	23	3	12.7	10.1	3.37	14.9	42.6	90	31.5	35.0	0.6
C.S.(M)	48	4	2.4	6.8	5.60	16.3	46.5	83	29.0	34.9	1.3
E.R.C.(M)	41	4	3.0	6.2	5.38	16.9	47.7	89	31.4	35.4	(-)
F.R.S.(M)	33	7	35.0	5.6	5.16	15.6	47.2	91	30.3	33.1	0.6
G.F.S.(M)	25	2	23.0	7.2	5.21	14.6	42.4	89	30.0	34.4	0.7
J.C.P.(M)	27	2	10.0	6.7	5.51	16.6	48.2	87	30.1	34.4	(-)
J.M.L.M.(M)	46	5	9.0	7.1	5.24	16.1	47.1	90	30.8	34.3	(-)
P.D.S.(M)	38	0.8	8.3	9.0	5.02	15.4	46.5	93	30.7	33.2	(-)
S.B.(M)	38	1	4.2	5.2	4.09	14.7	42.8	105	36.0	34.4	0.9
V.O.S.(M)	29	3	24.0	6.7	4.98	14.0	40.5	80	27.7	34.6	0.2
V.G.O.(M)	18	0.5	7.8	7.0	5.11	17.1	46.6	91	33.4	36.6	0.6
Média	33.50	3.35	11.90	7.34	4.94	15.51	44.8	89.58	30.90	34.59	0.70
DP	9.31	2.38	10.20	1.65	0.63	1.08	2.9	6.05	2.11	0.92	0.31
EP	2.68	0.68	2.94	0.47	0.18	0.85	0.8	1.74	1.74	0.26	0.11
Mediana	34.50	3.00	8.65	6.45	5.13	15.50	46.5	89.5	30.5	34.34	0.65
M.E.B.(F)	33	6	1.6	5.2	3.80	13.3	39.2	93	31.6	33.9	0.3
M.S.S.(F)	25	1	5.9	4.5	3.61	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

2 - CATALASE

A tabela (4) e o figura (5) demonstram que os níveis desta enzima nos grupos afastados e expostos não diferiram significativamente do grupo controle normal $p = 0.4285$ e $p = 0.0546$ respectivamente (Mann Whitney). Entretanto, quando comparados os grupo afastados com expostos observamos uma diferença significativa $p = 0.0161$ (Mann Whitney).

Tabela 4: Medida da CATALASE intraeritrocitária de indivíduos afastados, normais e expostos ao vapor de mercúrio.

CATALASE (UI/g Hb)			
	AFASTADOS	NORMAIS	EXPOSTOS
	310897	388855	274914
	180272	221615	257490
	179664	174535	246862
	162961	160841	231985
	148630	144456	230596
	137842	139640	223880
	133955	132613	217479
	127151	129310	202429
	127151	125586	186567
	114045	112614	172302
	114045	91034	149931
	102385	87576	139622
	101682		131346
	96469		120425
			119094
			90228
Média	145511	159056	*187197
DP	54824	80988	56611
EP	14652	23379	14152
Mediana	130553	136127	194498

* Significativamente diferente ($p < 0.02$ Mann-Whitney) quando comparado ao grupo afastados
 Todos os voluntários expostos apresentam concentração mercurial urinária inferior ao LTB.

LTB: (50 mg/g creatinina).

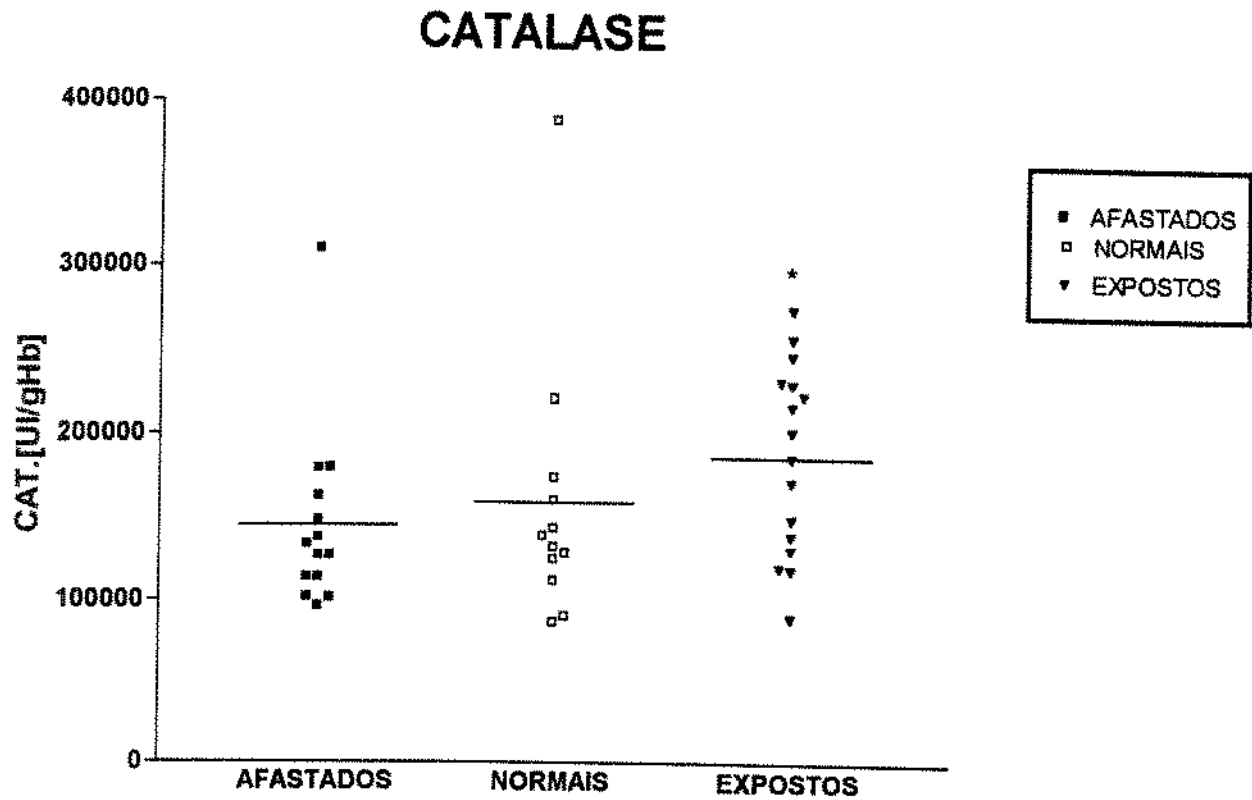


Fig. 5: Concentração da Catalase eritrocitária

ESTATÍSTICA (Mann Whitney) - Afastados x Cont. (P=0.4285)

Expostos x Cont. (P=0.0546)

*Expostos x Afastados (P=0.0161)

(Coeficiente de Pearson).

Não houve correlação entre a Catalase com o tempo de exposição e a Conc Hg urinária

($r = 0.2887$ e $r = 0.3753$) respectivamente.

3 - SUPERÓXIDO DISMUTASE

A tabela (5) e o figura (6) demonstram que os níveis desta enzima nos grupos afastados e expostos não diferenciam significativamente dos controles normais e tão pouco quando comparados entre si $p = 0.2160$, $p = 0.1576$ e $p = 0.1977$ respectivamente (Mann Whitney).

Tabela 5: Medida da Superóxido Dismutase intraeritrocitária de indivíduos afastados, normais e expostos ao vapor de mercúrio

	SOD (UI/g Hb)		
	AFASTADOS	NORMAIS	EXPOSTOS
	4545.0	4166.0	5050.0
	4166.0	3808.0	4590.0
	4166.0	3642.0	4208.0
	3785.0	3443.0	3991.0
	3333.0	3296.0	3975.0
	3062.0	3281.0	3923.0
	2710.0	3125.0	3643.0
	2710.0	3000.0	2250.0
	2631.0	2684.0	2173.0
	2631.0	2500.0	1724.0
	1851.0	2380.0	1562.0
		1612.0	
Média	3235.4	3078.0	3371.7
DP	835.9	700.0	1216.9
EP	252.0	202.0	366.9
Mediana	3062.0	3203.0	3923.0

Todos os voluntários expostos apresentam concentração mercurial urinária inferior ao LTB.

LTB: (50 mg/g creatinina).

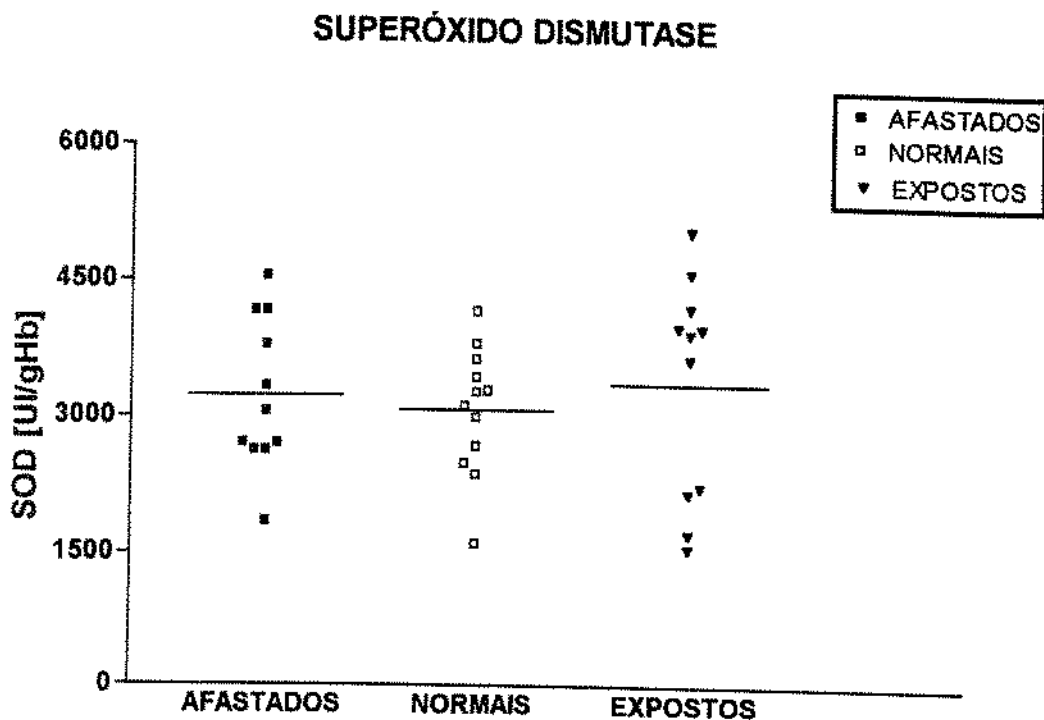


Fig.6: Concentração da Superóxido Dismutase

ESTATÍSTICA (Mann Whitney) - Afastados x Cont. (P=0.2160)

Expostos x Cont. (P=0.1576)

Expostos x Afastados (P=0.1977)

(Coeficiente de Pearson).

Não houve correlação entre a SOD com o tempo de exposição e a Conc Hg urinária (r = 0.252 e r = 0.3083) respectivamente.

4 - GLUTATIONA REDUZIDA

De acordo com a tabela (6) e figura (7), podemos observar que o nível deste elemento no grupo afastados não diferiu do grupo controle normal $p = 0.258$ (Mann-Whitney). Já os níveis apresentados pelos indivíduos expostos esteve significativamente diminuída quando comparada aos grupos controle normais e afastados, $p = 0.007$ e $p = 0.002$ (Mann-Whitney) respectivamente.

Tabela 6: Medida da Glutaciona Reduzida intraeritrocitária de indivíduos afastados, normais e expostos ao vapor de mercúrio

	GSH (mg)		
	AFASTADOS	NORMAIS	EXPOSTOS
	87.00	76.87	63.00
	80.50	70.10	59.75
	64.70	63.00	52.50
	58.20	62.35	44.25
	55.38	59.75	41.77
	54.42	58.90	39.32
	54.38	57.00	39.18
	44.00	52.95	36.91
	44.00	52.50	30.26
	40.35	46.49	25.70
		44.53	24.20
		41.70	23.91
		39.18	23.86
Média	60.28	55.12	**38.81
D.P.	14.8	12.2	13.4
E.P.	4.9	3.8	3.7
Mediana	55.38	54.97	39.18

**Significativamente diferente ($P < 0.01$ Mann-Whitney) quando comparado aos grupos normais e afastados.

Todos os voluntários expostos apresentam concentração mercurial urinária inferior ao LTB. LTB: (50 mg/g creatinina).

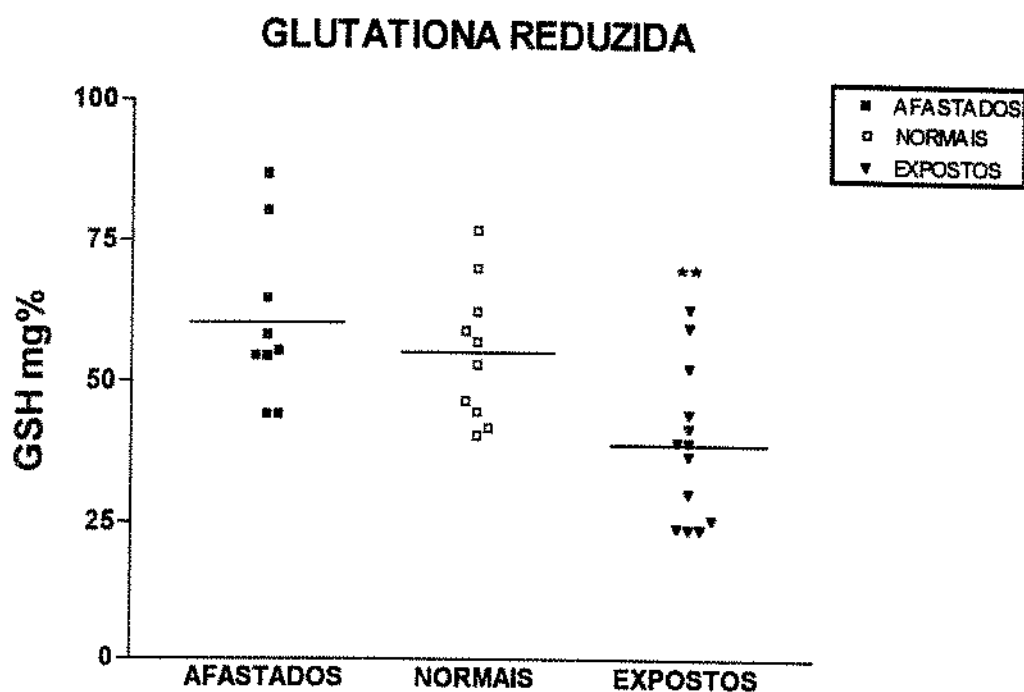


Fig. 7: Concentração da GSH

ESTATÍSTICA (Mann Whitney) - Afastados x Cont. (P=0.258)

Expostos x Cont. (P=0.007)

Expostos x Afastados (P=0.002)

(Coeficiente de Pearson).

Não houve correlação entre a GSH com o tempo de exposição e a Conc Hg urinária

($r = 0.1799$ e $r = 0.5041$) respectivamente.

5- QUANTIFICAÇÃO DA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE ERITROCITÁRIA

Na tabela (7), observamos não haver alterações significativas nos níveis desta enzima em nenhum dos voluntários. Concentração normal obtida em nosso laboratório $n = 50$ (12.3 ± 2.7 U.I/g Hb).

Tabela 7: Concentração da Glicose-6-Fosfato Desidrogenase eritrocitária de indivíduos expostos ao Hg

INDIVÍDUO sexo	IDADE (anos)	tempo exposição (anos)	conc.Hg urina ($\mu\text{g/g creat}$)	G6PD (UI/gHb)
A.L.V. (M)	36	8	3.4	*9.36
C.D.D. (M)	23	3	12.7	10.6
C.S. (M)	48	4	2.4	14.6
E.R.C. (M)	41	4	3	13.1
F.R.S. (M)	33	7	35	10.4
G.F.S. (M)	25	2	23	12.0
J.C.P. (M)	27	2	10	10.8
M.E.B. (F)	33	6	1.6	10.2
P.D.S. (M)	38	0.8	8.3	9.58
S.B. (M)	38	1	4.2	12.0
V.O.S. (M)	29	3	24	11.1
Média	33.72	3.70	11.59	11.24
DP	7.47	2.39	11.07	1.57
EP	2.25	0.72	3.39	9.47
Mediana	33.0	3.00	8.30	10.8

* Indivíduo portador de variante A⁺.

Todos os voluntários expostos apresentam concentração mercurial urinária inferior ao LTB.

LTB: (50 mg/g creatinina).

Coefficiente de Pearson - Não houve correlação entre a concentração da G-6-PD com o tempo de Exposição e com a concentração do metal na urina ($r = 0.125$ e $r = 0.3017$) respectivamente.

Tabela 8: Concentração de GSH, Catalase, SOD e G-6-PD eritrocitária de indivíduos expostos ao vapor de mercúrio.

INDIVÍDUO	IDADE (anos)	tempo exposição (anos)	conc. Hg urina (µg/g creat.)	GSH (mg%)	CATALASE (U/gHb)	SOD (U/gHb)	G6PD (U/gHb)
A.L.V.	36	8	3.4	44.25	246862	3975	9.36
C.D.D.	23	3	12.7	39.18	230596	(-)	10.6
C.S.	48	4	2.4	39.32	119095	3991	14.6
E.R.C.	41	4	3.0	25.70	149932	1562	10.4
F.R.S.	33	7	35.0	23.86	274914	4590	13.1
G.F.S.	25	2	23.0	36.91	172302	4208	12.0
J.C.P.	27	2	10.0	24.20	90229	3923	10.8
J.M.L.M.	46	5	9.0	63.00	263158	(-)	(-)
M.E.B.	33	6	1.6	59.75	120426	2173	10.2
M.S.S.	25	1	5.9	41.77	131346	1724	(-)
P.D.S.	38	0.8	8.3	30.26	223880	5050	9.5
S.B.	38	1	4.2	52.50	217480	3643	12.0
V.G.O.	18	0.5	7.8	(-)	139622	(-)	(-)
V.O.S.	29	3	24.0	23.91	186567	2250	11.1
Média	32.85	3.37	10.7	38.81	187197	3371.7	11.24
DP	8.86	2.40	9.88	13.4	56611	1216.9	1.57
EP	2.36	0.64	2.64	3.7	14152	366.9	9.47
Mediana	33	3.0	8.05	39.18	194498	3923.0	10.8

Todos os voluntários expostos apresentam concentração mercurial urinária inferior ao LTB (50 mg/g creatinina)

Não houve correlação de nenhuma das variáveis estudadas com o tempo de exposição ou com a concentração de Hg urinário

V. *DISCUSSÃO*

O índice de absorção do mercúrio inalado difere individualmente (HURSH e cols, 1976a). Os diferentes estados de apresentação ou complexação do Hg favorecem a sua diversidade na absorção e distribuição. Algumas evidências demonstram que a solubilidade deste e outros metais, pode ser aumentada através da ação de macrófagos residentes nos pulmões (MARANFANTE e cols, 1987) e reduzidas devido à presença de álcool ou herbicidas aminotriazolônicos (WHO, 1991). A absorção intestinal do composto metilmercúrio-glutationa é 1.5 vez maior do que a absorção do metilmercúrio-cisteína e metilmercúrio-cisteinaglicina após administração oral em ratos (URANO e cols, 1990).

Quanto à distribuição, Ogata e Meguro (1986) demonstraram que o vapor de mercúrio ultrapassa mais facilmente a barreira placentária que o cloreto de mercúrio. Este possui grande afinidade por células ectodérmicas, endodérmicas e glandulares (KHAYATA e DENCKER, 1984). Suzuki e colaboradores (1976) observaram uma razão de 1.5-2 no conteúdo de Hg em hemácia e plasma de indivíduos expostos a vapor de mercúrio, enquanto que esta razão eleva-se a 6 em trabalhadores de indústrias de cloroalquil. A concentração hepática de Hg em fetos e mães expostos ao vapor deste metal não é uniforme (YOSHIDA e cols, 1986). Sua excreção renal é igualmente influenciada, como a dos demais elementos excretados através desta via, por condições como pH, fluxo renal, havendo variabilidade intraespécies (YASUTAKE e HIRAYAMA, 1986).

Apesar das variações citadas na cinética comportamental do Hg a concentração urinária do mercúrio é utilizada como índice quantitativo da exposição e correlaciona-se com os níveis sanguíneos do metal (SKERFVING e BERLIN, 1985). Assim, a Organização Mundial de Saúde estabelece $50 \mu\text{g}$ de Hg/g^{-1} creatinina como o limite de tolerância biológica (L.T.B.). Entretanto alguns autores têm demonstrado que indivíduos expostos ao Hg, com concentração urinária inferiores ao L.T.B, apresentam alterações nas respostas imunológicas como aumento nos níveis séricos de imunoglobulinas IgG, IgA e IgM (QUEIROZ e cols, 1994), redução da capacidade lítica de células polimorfonucleares (PERLINGEIRO e QUEIROZ, 1994) e comprometimento da migração de neutrófilos (PERLINGEIRO e QUEIROZ, 1995).

A hemácia é uma célula aparentemente simples, mas requer que as relações entre membrana celular, hemoglobina, enzimas do metabolismo energético e do sistema antioxidativo, mantenham se em

equilíbrio. A energia necessária para seu funcionamento é obtida através da utilização da glicose. Aproximadamente 90% da glicose é metabolizada pela via de Embden-Meyerhof, onde se produz ATP que fosforila as proteínas da membrana plasmática, e NADH, importante para manter o potencial redutor intracelular. O restante da glicose é transformada por meio da via oxidativa direta ou pelo ciclo da pentose-fosfato, cuja reação inicial é catalisada pela glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD). Esta via metabólica desempenha importante papel na geração de nicotina adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH), substância redutora capaz de opor-se à oxidação da hemoglobina, à proteção de lípidos da membrana contra peroxidação e essencial à manutenção da glutatona em estado reduzido (GSH) (JANDL e ALLEN, 1960). Esta após ser oxidada é revertida a sua forma reduzida através da ação da glutatona redutase, necessitando para tanto de níveis adequados de NADPH e Flavina-Adenina-Dinucleotídeo (FAD). A membrana eritrocitária pode ser o primeiro sítio de ataque dos metais pesados (AZEVEDO, 1989), os quais induzem alterações na permeabilidade a alguns nutrientes (BLAZKA e SHAIKH, 1992).

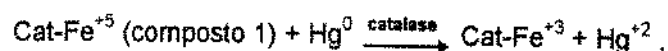
Neste trabalho estudamos o sistema antioxidativo eritrocitário através da medida da Catalase, Superóxido Dismutase, Glutaciona Reduzida e da Glicose-6-Fosfato Desidrogenase em indivíduos com níveis de Hg urinário dentro dos Limites de Tolerância Biológica.

Nossos resultados demonstraram um aumento significativo da atividade da Catalase no grupo expostos em relação ao grupo afastados ($p < 0.02$ mann-Whitney) e os níveis desta enzima no grupo expostos demonstraram uma forte tendência de aumento ($p = 0.0546$) quando comparadas ao grupo controle. Por outro lado uma redução significativa nos níveis de Glutaciona Reduzida dos indivíduos expostos quando comparados aos grupos controle e afastados ($p < 0.01$ Mann-Whitney) foi observada. Já as concentrações de G-6-PD e SOD não se apresentaram alteradas em nenhum dos grupos, como também não foram detectadas alterações quanto aos padrões hematimétricos, número de reticulócitos ou a presença de corpúsculos de Heinz.

Quanto a SOD nossos resultados são compatíveis com os de Barregard (1990) que demonstrou em trabalhadores expostos ao vapor de Hg uma concentração normal de SOD plasmática e sangüínea. Entretanto, foi observado que ratos sujeitos a este mesmo tipo de exposição, apresentam uma redução da enzima a nível pulmonar (LIVARDJANI e cols, 1991). Quando se avaliou a lipoperoxidação renal em

ratos pré-tratados com SOD 24 horas após administração de cloreto de mercúrio, observou-se que a enzima exerceu uma ação protetora (GIRARDI e ELIAS, 1995). Por outro lado, Benov e cols (1990) demonstram que a inibição da SOD por agentes tióis aparentemente não acelera a lipoperoxidação renal. Assim, uma possível maior geração de O_2^- , devido a provável ligação Hg-Hb (RIBAROV e cols, 1983), não foi suficiente para aumentar a produção da SOD.

O Hg^0 , após ligar-se à membrana eritrocitária, sofre ação da catalase. Esta enzima oxida o mercúrio através de sua via peroxidativa (SICHAK e DOUNCE, 1986).



Estudos experimentais demonstram que a injeção de mercúrio metálico em camundongos normais ou acatalasêmicos determina significativa concentração cerebral e hepática do metal nos animais deficientes (OGATA e AIKOH, 1984). Nesse sentido, a redução ou ausência desta enzima em camundongos, os quais tiveram seus eritrócitos tratados com vapor de mercúrio radioativo, implicou um aumento dos efeitos deletérios do metal sobre estas células (YAMAMOTO e cols, 1992).

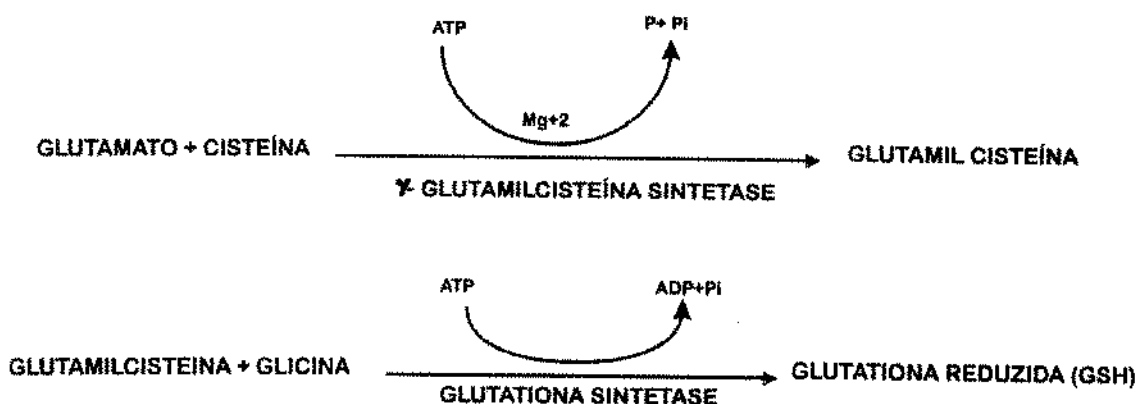
É interessante ressaltar que Bjorkman e cols. (1991) trataram com Selenium 36 trabalhadores expostos ao vapor de Hg, 14 indivíduos com hipersensibilidade ao metal e 17 com sintomas de intoxicação devido à prótese dentária e demonstraram não haver diferença na concentração da catalase em nenhum dos grupos, quando comparados ao grupo controle, constituído por indivíduos portadores de obturações à base de Hg e não expostos ocupacionalmente ao metal. Entretanto, o tratamento com Se pode promover por si só uma captura do Hg reduzindo a concentração do metal ligado à hemácia e conseqüentemente normalizando o nível da enzima. Assim, um aumento dos níveis da catalase observado neste estudo sugere uma compensação decorrente da metabolização do Hg por esta enzima.

Outro sítio de ligação do Hg é a hemoglobina, estudos "in vitro" com o uso de ressonância magnética nuclear demonstraram que o cloreto de mercúrio associa-se à hemoglobina (Hb) e à glutationa, formando o complexo Hb-GSH-Hg (RABSTEIN e ISAB, 1982). Este metal associado à Hb pode induzir à produção de H_2O_2 (RIBAROV e cols, 1985), esta produção também foi observada após o

tratamento "in vitro" de mitocôndrias renais com mercúrio metálico (LUND e cols, 1991). O peróxido de hidrogênio pode vir a reagir com o ferro (Fe^{+2}), formando OH^{\bullet} e Ferro Férrico (reação de Fenton).



A diminuição nos níveis de GSH nos trabalhadores expostos ao vapor de Hg pode ser explicada, pelo menos em parte, pela interferência direta do mercúrio no metabolismo da glutatona. Associa-se à L-cisteína, possivelmente por se ligar ao enxofre da molécula sulfidríla (SH) (IWATA e cols, 1982). Este aminoácido forma pontes dissulfeto, as quais mantêm a estabilidade das estruturas protéicas (HARPER e cols, 1977). O Hg também induz uma redução da atividade da γ -glutamilcisteína renal (CHUNG e cols, 1992), enzima que promove a ligação entre os aminoácidos glutamato e cisteína, através de uma reação dependente de ATP e Magnésio (Mg^{+2}) que origina a glutamil-cisteína. A glutamil-cisteína, por sua vez, associa-se com a glicina, através da enzima Glutaciona Sintetase, também dependente de ATP, originando então a Glutaciona Reduzida (GSH) (BARRAVIERA e MACHADO, 1989).



A via da Glutaciona Reduzida é importante para a desintoxicação de diversos poluentes ambientais (NAGANUMA e cols, 1982). A concentração desta metaloproteína interfere diretamente na distribuição do Hg e provavelmente de outros agentes tóxicos que se conjuguem com a GSH. Quando da administração intravenosa em ratas do composto CH_3HgCl , complexado previamente com glutaciona ou cisteína, observou-se uma menor concentração renal e hepática deste elemento (ALEXANDER e AASETH, 1982). Já o tratamento de ratas com cisteína ou GSH, potencializou a excreção do Hg,

embora não tenha havido correlação entre estes, provavelmente devido à redistribuição do metal (BALLATORI e CLARKSON, 1984). Já a infusão de cisteína ou GSH em ratas prenhas por 1, 2 ou 3 dias, com posterior administração de Hg^{203} , induziu uma maior deposição cerebral do metal nos fetos onde as mães receberam cisteína, enquanto que no grupo que recebeu a glutathione verificou-se o efeito oposto (ASCHNER e CLARKSON, 1988).

Almar e Dierickx (1990) reportam que há uma conjugação espontânea entre os metais pesados com a glutathione e a cisteína, por intermédio da glutathione transferase. A excreção biliar e a circulação enterohepática do mercúrio inorgânico e metilmercúrio em ratos, para posterior eliminação fecal, é realizada através desta conjugação (NAGANUMA e IMURA, 1985). O Hg em concentrações baixas, liga-se à GSH na razão 1:2 molar (WOODS e cols, 1990).

Chung e cols (1992) demonstraram que ratos tratados com cloreto de mercúrio sub-cutaneamente apresentam uma redução tempo-dependente da glutathione oxidada (GSSG) e da glutathione reduzida (GSH) renais. Esta depressão parece ser também dose-dependente. Doses de 5 ppm de metil-cloreto-mercúrico, sobre eritrócitos em cultura, aumenta a atividade da GSH-Px enquanto que a partir de 20 ppm, passa a reduzir a atividade desta enzima. Foi também observada a redução da glutathione peroxidase e das glutathiones totais em eritrócitos de ratos tratados com hidróxido de metilmercúrio (MEYDANI e cols, 1984). Relata-se também uma diminuição da atividade da glutathione redutase (GSHr) em hemácias incubadas com Hg^{+2} (RIBAROV e BENOVA, 1985).

Outra possibilidade seria uma diminuição na atividade da G-6-PD, devido sua ligação com Hg, fonte geradora de NADPH. O Hg^{+2} reduz os níveis da glicose-6-fosfatase (HAYES 1983), da glutathione reduzida e glicose-6-fosfato desidrogenase de hemácias tratadas "in vitro" mas, aparentemente, não há correlação entre os níveis da GSH e G-6-PD (RIBAROV e BENOVA 1985). Uma diminuição da G-6-PD placentária foi também verificada quando da exposição "in vitro" deste tecido ao $HgCl_2$ (SUDA e cols, 1991 ; BOADI e cols, 1992).

Neste estudo entretanto verificamos que a atividade da G-6-PD dos trabalhadores expostos ao vapor de Hg esteve dentro dos padrões de normalidade.

Os níveis da Glutathione Reduzida podem estar diminuídos também devido a ligação do Hg à porção nicotinamida do NADPH (MARSHALL e cols, 1984), a glutathione redutase (GSHr) ao FAD (FOX e

WALSH, 1982), ou a uma redução da ingestão de Riboflavina (BARRAVIERA e cols, 1989), o que viria a manter a glutathiona na forma oxidada GSSG.

Assim, a redução da GSH observada no grupo exposto, no presente trabalho, pode ter sido ocasionada por: uma diminuição da concentração de Cisteína e/ou da γ -glutamilcisteína sintetase, devido à sua ligação ao Hg, inibindo assim, a síntese de GSH; uma redução da glutathiona redutase por uma interação energética entre o Hg e a porção nicotinamida do NADPH, ao FAD ou a Riboflavina, inibindo a conversão da forma oxidada para reduzida.

Observamos também que no grupo de trabalhadores afastados houve uma normalização no nível da GSH, demonstrando que esta alteração é reversível.

Este fato demonstra claramente que a exposição ao vapor de mercúrio, embora abaixo do LTB não representa uma isenção de efeito no sistema antioxidativo eritrocitário.

VI. CONCLUSÕES

O presente estudo a respeito da ação do mercúrio sobre o sistema antioxidativo eritrocitário de indivíduos expostos ocupacionalmente ao mercúrio metálico permite concluir que:

Concentrações urinárias de Hg dentro do limite de tolerância biológica:

- 1- Não altera os padrões hematiméticos.
- 2- Não altera a concentração da Superóxido Dismutase.
- 3- Não altera a concentração da Catalase embora demonstre uma forte tendência de aumento.
- 4- Reduz a concentração da Glutathione Reduzida eritrocitária.
- 5- Não induz à hemólise ou à formação de corpúsculos de Heinz.

VII. SUMMARY

Mercury (Hg) is used in different human activities. The primary exposition to this metal has its origin from the ingestion of contaminated food and odontologic amalgam. The occupational exposure is the most frequent via in contamination. Mercury tightly binds to sulfidric groups (SH) presenting cell membrane proteins, enzymes, and low molecular weight substances such as cistein and glutathion. It can form covalent bonds with sulphur and acts as an oxidant agent when it binds to erythrocytes

The purpose of this study is to investigate the erythrocyte antioxidative system by measurement of Catalase, Superoxide Dismutase (SOD), Gluthation (GSH) and Glicose-6-Phosphate Dehydrogenase activities in the following groups:

Group 1 (EXPOSED)- 16 workers, 14 men and 2 women, exposed to mercury vapors over a period of 0.5 - 8 (3.37 ± 2.40) years. These individuals had 18-48 (32 ± 8.86) years and presented urinary concentrations of mercury lower than the Limit of Biological Tolerance (LBT) 35 - 1.6 (10.73 ± 9.88) $\mu\text{g/g}$ creatinin.

Group 2 (No-EXPOSED)- 7 (M) workers with 42 - 61 (46.42 ± 8.61) years without occupational exposed over a period of 6 months. They were previously exposed to Hg for 4 to 10 years and presented urinary concentration of mercury of 5.0-19.1 $\mu\text{g/g}$ creatinin.

Group 3 (Normal controls)- composed by technicians and students, 6 men and 2 women, from the Department of Hematology and Pharmacology of the State University of Campinas, with 22 - 45 years. They had dental prothesis containing Hg and were not occupationally exposed to this metal. There were no urinary concentrations of mercury in these individuals.

Hematologic analysis was carried out in all the previous groups besides the detection of Heinz bodies.

Our results demonstrate that the activity of SOD in exposed and non-exposed individuals presented the same values of the control group. Conversely the Catalase activity demonstrated an increasement in group 1 when compared with group 3 and a significantly augmented when compared to group 2. The levels of GSH were significantly reduced in group 1 and normal in group 2.

We conclude that the urinary levels of mercury inside the Limit of Biological Tolerance can affect the erythrocyte antioxidant system.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, J.; AASETH, J. Organ distribution and cellular uptake of methyl-mercury in the rat as influenced by the intra-and extracellular glutathione concentration. *Biochem-Pharmacol.* 1; 31: 685-90, 1982.
- ALLEN, D. W.; CADMAN, S.; McCANN, S. F.; FINKEL, B..Increased membrane binding of erythrocyte catalase in hereditary spherocytosis and in metabolically stressed normal cells. *Blood* 49: 113-123. 1977.
- ALMAR, M. M.; DIERICKX, P. J. In vitro interaction of mercury, cooper (II) and cadminium with human glutathione transferase pi. *Res. Commum. Chem. Pathol. Pharmacol* 69: 99-102, 1990.
- ASCHNER., M.; CLARKSON. T.W- Distribution of mercury 203 in pregnant rats and their fetuses folowing systemic infusions with thiol-containing amino acids and glutathione during late gestation. *Teratology* 38: 145-155, 1988.
- ATTA, J. R.; FAINTUCH, J. J.; NASCIMENTO, L. O. T.; ROCHA, A. S. Intoxicação aguda letal por vapor de mercúrio. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo* 47: 34-37, 1992.
- AZEVEDO, F. A. Algumas bases bioquímicas da toxicodinâmica do mercúrio. *Rev. Soc. Bras. Toxicol.* 2:1-7, 1989.
- BALLATORI, N.; CLARKSON, T.W.. Dependence of biliary of inorganic mercury on the biliary transport of glutathione. *Biochem-Pharmacol.* 33: 1093-1098, 1984.
- BARRAVIEIRA, B.; MACHADO, P. E. de A. Glutathione redutase e grupos SH reativos intra-eritrocitários. *Arq. Bras. Med* 63: 131-136, 1989.
- BARRAVIERA, S. R. C. S.; BARRAVIERA, B.; MACHADO, P. E. A. M.; HABERMANN, M. C.; STOLF, H. O.; GONZAGA, H. F. S. G. Uso da riboflavina no tratamento da hemólise pela sulfona em doente com dermatite herpetiforme de Duhring-Brocq deficiente em glutathione redutase. *An. bras. Dermatol.* 64 (4): 231-233, 1989.
- BARREGARD, L.; THOMASSEN, Y.; SCHUTZ, A.; MARKLUND, S.L. Levels of selenium and antioxidative enzymes following occupational exposure to inorganic mercury. *Sci. Total. Enviorn.* 99: 37-47, 1990.
- BENOV, L. C.; BENCHEV, I. C.; MONOVICH, O. H. Thiol antibodies on lipid peroxidation in mercury-poisoned rats. *Chem. Biol. Interact.* 76:321-332, 1990.
- BERNHARD, M.; BUFFONI, R.; RENZONE, A. Mercury in Mediterranean tuna. Why is their levels higher than in Atlantic tuna? *Thalassia* 18: 231-243, 1982.

- BEUTLER, E. Red cell metabolism A manual of biochemical methods Second edition, Grune & Stratton New York, 1975.
- BJORKMAN, L.; LANGWORTH, S.; LIND, B.; ELINDER, C. G.; NORDBERG, M. Activity of antioxidative enzymes in erythrocytes and concentration of selenium in plasma related to mercury exposure. *J. Trace Elem Electrolytes Health Dis.* 7: 157-64, 1991.
- BLAZKA, M. E.; SHAIKH, Z. A.. Cadmium and mercury accumulation in rat hepatocytes: interactions with other metal ions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 113: 118-125, 1992.
- BOADI, W.Y.; URBACH, J.; BRANDES, J. M.; YANNAI, S. In vitro effect of mercury on enzyme activities and its accumulation in the first-trimester human placenta. *Environ. Res.* 57: 96-106, 1992.
- CALLOW, A. B. On catalase in bacteria and its relation to anaerobiosis. *J. Pathol. Bacteriol.* 26: 320-325, 1923.
- CHANGE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59: 527-605, 1979.
- CHANGE, B.; WILLIAMS, G. R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol.* 17: 65-134, 1956.
- CHUNG, A.S.; MAINES, M.D.; REYNOLDS, W.A. Inhibition of the enzymes of glutathione metabolism by mercuric chloride in the rat kidney: reversal by selenium. *Biochem-Pharmacol.* 31: 3093-3100, 1992.
- CLARKSON, T.W, FRIBERG, L; HURSH, J.B.; NYLANDER, M. The prediction of intake of mercury vapor from amalgams. in: Clarkson, T.W., Friberg, L., Norberg, G.F., & Sage, P., ed. Biological monitoring of metals, New York, London, Plenum Press, pp. 247-264. 1988.
- CONTRINO, J.; MARUCHA, P.; RIBAUDO, R.; FERENC, R.; BIGAZZI, P.E.; KREUTZER, L Effects of mercury on human polymorphonuclear leukocyte function in vitro. *Am. J. Pathol.* 132:110-118, 1988.
- DACIE, J. V.; LEWIS, S. M. Practical Haematology 5^a ed. CHURCHILL LIVINGSTONE pp79 - 82, 1975.
- DEDUVE, C.; BAUDHUIN, P. Peroxisomes (micro-bodies and related particles). *Physiol. Rev.* 46: 323-357, 1966.
- DIGUISEPPI, J. AND FRIDOVICH, I. The toxicity of molecular oxygen. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 12:315-342, 1984.
- ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA L-mercury world Health Organization Geneva, 1976.

- FLOHÉ, L.; BRAND, I. Kinetics of glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 191, 541-549. 1969.
- FOX, B.; WALSH, C. T. Mercury reductase. Purification and characterization of transposon-encoded flavoprotein containing an oxidation-reduction-active disulfide. *J. Biol. Chem.* 10, 257: 2498-2503, 1982.
- FRIDOVICH, I. ; HANDLER, P. Detection of free radicals generated during enzymic oxidation by the initiation of sulfite oxidation. *J. Biol. Chem.* 236:1836-1840, 1961.
- FRIDOVICH, I. Superoxide and evolution *Horizons Biochem. biophys.* 1: 1-37. 1974.
- FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase - Superoxide Dismutases: Protein Chemistry and Structure-Function Relationships Ed. Larry W. Oberley, CRC press Inc. Boca Raton, Florida I pp11-58, 1982.
- GIRARDI, G.; ELIAS, M. M. Mercury chloride effects on rat renal redox enzymes activities: SOD protection. *Free Radic. Biol. Med.* 18: 61-66. 1995.
- GREGORY, E. M.; FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity and superoxide dismutase. *J. Bacteriol.* 114: 1193-1197, 1973.
- HARPER, H. A.; RODWELL, V. W. and MAYES, P.A. Manual de Química Fisiológica. 5ª ed. Atheneu Ed. São Paulo LTDA. 1977.
- HAYES, J. A. Metal toxicity. A guide to general toxicology. Basel, New York, Karger, pp 232-233. 1983.
- HEINTZE, U.; EDWARDSSON, S.; DERAND, T.; BIRKHED, D.. Methylation of mercury from dental amalgam and mercuric chloride by oral streptococci in vitro. *Scand. J. dent. Res.* 91: 150-152, 1983.
- HULTMAN, P.; JOHANSSON, U. Strain differences in the effect of mercury on murine cell-mediated immune reactions. *Fd. Chem. Toxic.*, 29:633-638, 1991.
- HURSH, J. B.; CLARKSON, T. W.; ALLEN, J.; DEMUTH, S. The effect of ethanol on the fate of mercury inhaled by human subjects. *Arch. envir. health*, 31: 302-309, 1976a.
- HURSH, J. B.; CLARKSON, T. W.; ALLEN, J.; DEMUTH, S.. In vitro oxidation of mercury by blood. *Pharmacol. Toxicol.*, 63: 266-273, 1988.
- HURSH, J.B.; CLARKSON, T.W.; CHERIAN, M.G.; VOSTAL, J.V.; MALLE, R.V. Clearance of mercury (Hg-197, Hg-203) vapor inhaled by human subjects. *Arch. Envir. Health* 31: 302-309, 1976b.
- IWATA, H.; MASUKAWA, T.; KITO, H.; HAYASHI, M.. Degradation of methylmercury by selenium. *Life-Sci.* 31: 859-66, 1982.

- JAIN, S. K. Evidence for membrane lipid peroxidation during the in vivo aging of human erythrocytes. *Biochim. biophys. Acta.* 937, 205-210, 1988.
- JANDL, J. H.; ALLEN, D.W. Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin. Heinz body anemia as an accelerated form of red cell aging. *J. Clin. Invest.* 39: 1000-1008, 1960.
- KHAYAT, A.; DENCKER, L. Organ and cellular distribution of inhaled metallic mercury in the rat Marmoset monkey (*Callithrix jacchus*): influence of ethyl alcohol pretreatment. *Acta Pharmacol Toxicol.* 55: 145-52, 1984.
- KURATA, M.; SUZUKI, M.; AGAR, N.S. Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals. *Comp. Biochem. Phusiol.* 3: 477-487, 1993.
- LESSI, R.A.; GONÇALVES, S.L. ; BECHARA, E.J.H. Superóxido dismutase como antiinflamatório em Endodontia. *Rev. ass. paul. Cirurg. Dent.*,40:156-162, 1986.
- LINDERBERG, S.; STOKES, P.; GOLDBERG, E.; WREN, C. Group Report: Mercury in Hutchinson, T. W. & Meemz, K. M. ed. Lead, mercury, cadmium and arsenic in the environment, New York, John Wiley & Sons, pp 17-34, 1987.
- LIVARDJANI, F.; LEIDIG, M.; KOPP, P.; DAHLET, M.; LEROY, M.; JAEGER, A. Lung and blood superoxide dismutase activity in mercury vapor exposed rats: effect of N-acetyl-cysteine treatment. *Toxicology*, 66: 289-295, 1991.
- LUND, B. O.; MILLER, D. M.; WOODS, J.S. Mercury-induced H₂O₂ production and lipid peroxidation in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem. Pharmacol*, 42: 181-187, 1991.
- MARAFANTE, E.; LUNDBORG, M.; VAHTER, M.; CAMNER, P. Dissolution of two arsenic compounds by rabbit alveolar macrophages in vitro. *Fundam. appl. Toxicol.*, 8: 382-388. 1987.
- MARSHAL, J.L.; BOOTH, J.E.; WILLIAMS, J.W. Characterization of the covalent mercury (II)-NADPH complex. *J. Biol. Chem.* 259: 3033-3036, 1984.
- MCCORD, J. M. and FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol Chem.* 224: 6049-6055. 1969.
- MCCORD, J. M.; BOYLE, J. A.; DAY, E. D.; RIZZOLO, L. J.; SALIN, M. L. A manganese-containing superoxide dismutase from human liver. In *Superoxide and Superoxide Dismutase* Edited by Michelson A. M., McCord J. M. and Fridovich I., pp 129-138. Academic Press, London. 1977.
- MCLEOD, J. W. AND J. GORDON. "The problem of intolerance of anaerobic bacteria. *J. Pathol. Bacteriol.* 26: 332-342, 1923.

- MEYDANI, M.; MEYDANI, S.N.; HATHCOCK, J.N.. Effects of dietary methionine, methylmercury and atrazine on ex-vivo synthesis of prostaglandin E1 and thromboxane B2. *Prostaglandins Leukot Med.* 14: 267-278, 1984.
- MEYER, B.R.; FISCHBEIN, A.; ROSENMAN, K.; LERMAN, Y.; DRAYER, D.E.; REIDENBERG, M.M. Increased urinary enzyme excretion in works exposed to nephrotoxic chemicals. *Am. J. Med.*, 76:989-998, 1984.
- MOLIN, M.; SCHUTZ, A.; SKERFVING, S.; SALLSTEN. Mobilized mercury in subjects with varying exposure to elemental mercury vapor. *Int. Arch. Occup. Envir. Health.* 63:187-192, 1991.
- NAGANUMA, A.; IMURA, N. Species difference in biliary excretion of methylmercury. *Biochem. Pharmacol.* 15, 33: 679-82 1985.
- NAGANUMA, A.; TABATA, J.; IMURA, N.A. Reaction product from mercuric mercury, selenite and reduced glutathione. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 38: 291-299. 1982.
- NEWCOMBE, D.S.; ROSE, N.R.; BLOOM, J.C. Clinical immunotoxicology Raven Press, New York, 1992.
- NOVIKOFF, A. B.; NOVIKOFF, P. N.; QUINTANA, N.; DAVIS, D. Studies on microperoxisomes. IV. Interrelations of microperoxisomes, endoplasmatic reticulum and lipofuscin granules. *J. Histochem. Cytochem.* 21: 1010-1020, 1973.
- OGATA, M.; AIKOH, H. Mercury concentration in the blood and organs of normal and acatalasemic mice after intraperitoneal injection of metallic mercury ($^{203}\text{Hg}^0$). *Physiol Chem Phys Med NMR.* 16: 71-73, 1984.
- OGATA, M.; MEGURO, T. Foetal distribution of inhaled mercury vapor in normal and acatasaemic mice. *Physiol Chem Phys Med NMR.* 18: 165-170, 1986.
- PACYANA, J. M. Atmospheric emissions of arsenic, cadmium, lead and mercury from high temperature processes in power generation and industry. In: Hutchinson, T. C. & Meema, K. M., ed. Lead, Mercury, Cadmium and Arsenic in the environment, New York, John Wiley & Sons, pp. 69-88 1987.
- PERLINGEIRO R. C. R.; QUEIROZ, M. L. S. Measurement of respiratory burst and chemotaxis in polymorphonuclear leukocytes from mercury-exposed workers. *Human & Experim. Toxicol.* 14, 281-286, 1995.
- PERLINGEIRO, R.C.R.; QUEIROZ, M.L.S. Polymorphonuclear phagocytosis and killing in workers exposed to inorganic mercury. *Int.J. Immunopharmac.* 12: 1011-1017, 1994.

- QUEIROZ, M.L.S; PERLINGEIRO, R.C.R.; DANTAS, D.C.M.;BIZZACCHI J.M.A.; DE CAPITANI, E.M. Immunoglobulin levels in workers exposed to inorganic mercury. *Pharmacology & Toxicology*, 74: 72-75, 1994.
- RABESTEIN. D.L.; ISAB, A.A. A proton nuclear magnetic resonance study of the interaction of mercury with intact human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 721: 378-84. 1982.
- RIBAROV, S. R.; BENOVA, L. C.; BENCHEV, I. C. HgCL₂ increases the methemoglobin prooxidant activity. possible mechanism of Hg⁺². Induced lipid peroxidation in erythrocytes *Chem. Biol. Interact* 50: 111-119, 1984.
- RIBAROV, S. R.; BENOVA, L. C.; MARCOVA, V. I.; BENCHEV, I. C. Hemoglobin-catalyzed lipid peroxidation in presence of mercuric chloride. *Chem. Biol. Interact* 45: 105-112, 1983.
- RIBAROV, S.R.; BENOVA, L.C. Glutathione reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in erythrocytes treated with heavy metals. *Acta-physiol-Pharmacol-Bulg.* 11: 51-54, 1985.
- RICHARDSON, R.A. Automated method for determination of mercury in urine. *Clin. Chem.* 22: 1604-1607, 1976.
- ROWLAND, L. R.; GRASSO, P.; DAVIS, M. J. The methylation of mercury chloride by human intestinal bacteria. *Experientia* 31: 1064-1065, 1975.
- SCHREINER, G. E.; NAHER, J. F. Toxic nephropathy. *Am. J. Med.*, 38: 409-411, 1965.
- SHARMA,D.C.; DAVIS, P.S. Direct determination of mercury in blood by use of sodium borohydride reduction and atomic absorption spectrophotometry. *J Adv. Enzymol.* 41: 35-97. 1974.
- SICHARK. S.P.; DOUNCE. A. L. Analysis of the peroxidatic of action of catalase. *Arch Biochem Biophys.* 249: 286-295, 1986.
- SKERFVING, S.; BERLIN, M. Nordic expert group for limit value documentation 59 Inorganic mercury, Solma, National Institute of Occupational Health 59 pp 80. 1985.
- SOS Mercury/Amalgam - Health risks. Stockholm, National Board of Health and Welfare (reported by the LEK-Committee), 1987.
- STEINMAN, H. Superoxide dismutases: protein chemistry and structure-function relationships. In Superoxide Dismutase Ed. Larry W. Oberley, CRC press Inc. Boca Raton, Florida II pp11-68, 1982

- SUDA, I.; TOTOKI, S.; TAKAHASHI, H. Degradation of methyl and ethyl mercury into inorganic mercury by oxygen free radical-producing systems: involvement of hydroxyl radical. *Arch. Toxicol* 65: 129-134, 1991.
- SUZUKI, T.; SISHIDO, S.; ISHIHARA, N. Interaction of inorganic to organic mercury in their metabolism in human body. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 38: 103-113, 1976.
- THEORELL, H. The iron-containing enzymes B. Catalases and peroxides. Hydroperoxides. In: The Enzymes, edited by J. B. Sumner and K. Myback. New York, vol. II, p. 397-427, 1951.
- TODD; SANFORD & DAVIDSOHN Diagnósticos clínicos e conduta terapêutica por exames laboratoriais. 16ª edição, volume.1 e 2, Ed.Manole, São Paulo-SP, 1989.
- UHLIG, S.; WENDEL, A. The physiological consequences of glutathione variations. *Life Sciences*, 51: 1083-1094. 1992.
- URANO, T.; IWASAKI, A.; HIMENO, S.; NAGANUMA, A.; IMURA, N. Absorption of methylmercury compounds from rat intestine. *Toxicol. Lett.* 50:159-64., 1990.
- VALLE, B.L.; ULMER, D.D. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Ann. Rev. Biochem.*, 41:91-128, 1972.
- WEENING, J.J.; HOEDEMAEKER, J.; BAKKER, W.W Immunoregulation and anti-nuclear antibodies in mercury-induced glomerulopathy in the rat. *Clin. Exp. Immunol.*, 45:64-71, 1981.
- WHO Environmental Health Criteria 1: Mercury, Geneva, World Health Organization, pp 131, 1976.
- WHO Inorganic Mercury, Environmental Health Criteria 118, Geneva, World Health Organization, pp 168, 1991.
- WHO Recommended health-based limits in occupational exposure to heavy metals. Report of a WHO Study Group, Geneva (World Health Organization) pp 116 (WHO Technicals Report Series, N 647), 1980.
- WILLIAMS, W. J.; BEUTLER, E.; ERSLEV, A. J.; RUNDLES, R. W. Hematologia Ed. Guanabara Koogan pp 50-119, 1976.
- WINTERBOURN, C. C.; HAWKINS R. E.; BRIAN, M.; CARREL, R.W. The estimation of red cell superoxido dismutase activity. *J. Lab. Clin. Med.* 337-341 1975

- WOODS, J. S.; CALAS, C.A.; AICHER, L.D. Stimulation of porphyrinogen oxidation by mercuric ion. II. Promotion of oxidation from the interaction of mercuric ion, and mitochondria-generated hydrogen peroxide. *Mol. Pharmacol* 38: 261-266, 1990.
- YAMAMOTO, H.; ISHII, K.; MEGURO, T.; TAKETA, K.; OGATA, M. Impaired in vitro accumulation of mercury in erythrocytes of acatalasemic mice. *Acta Med Okayama* 46: 67-73, 1992.
- YASUTAKE, A.; HIRAYAMA, K.; IONOUE, M. Mechanism of urinary excretion of methylmercury in mice. *Arch. Toxicol.*, 63: 479-483. 1989
- YOSHIDA, M.; YAMAMURA, Y.; SATO, H. Distribution of mercury in guinea-pig offspring after in utero exposure to mercury vapor during late gestation. *Arch. Toxicol.*, 58: 225-228. 1986.
- YOST, F. J. An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 248: 4905-4908. 1973.

ANEXO

QUESTIONÁRIO

NOME:

IDADE:..... SEXO: ()M ()F

TEMPO DE EXPOSIÇÃO:..... FUNÇÃO:

AFASTADO ALGUMA VEZ: ()SIM ()NÃO TEMPO:.....

CONCENTRAÇÃO DE Hg URINÁRIO:

USO de MEDICAMENTOS:.....

INGESTÃO DE ÁLCOOL: ()SIM ()NÃO

QUAL?..... DOSE DIÁRIA:.....

FUMANTE: ()SIM ()NÃO QUANTOS CIGARROS/DIA:.....

OBTURAÇÃO DENTÁRIA: ()SIM ()NÃO

QUEIXAS:.....