

**BC/25950**  
**IB/80400**



**UNICAMP**

T/UNICAMP

Ag93<sub>e</sub>

80490

DAVID ENRIQUE AGUILAR RODRIGUEZ

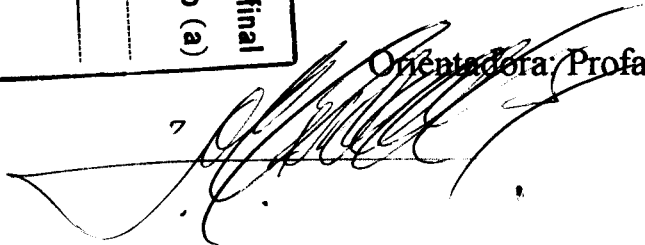
**Estudo Cromossômico em Indivíduos com Exposição  
Ocupacional ao Mercúrio**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia  
da Universidade Estadual de Campinas,  
para a obtenção do título de Mestre em  
Ciências Biológicas, Área de Genética.

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato(a)  
David Enrique Aguilar  
Rodriguez  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

26/06/95

Orientadora: Profa. Dra. CHRISTINE HACKEL



Campinas  
1995

26/06/95

UNIDADE	IB
N.º GABINETE:	
T. UNICAMP	
Qa 93 e	
V. 0	E. 1
T. 25950	
PREC. 432,95	
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO R\$ 11,00	
DATA 20/10/95	
N.º CPD	

CM-00078779-3

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA CENTRAL - UNICAMP

Ag93e      Aguilar Rodrigues, David Enrique  
Estudo cromossômico em indivíduos com exposição ocupacional  
ao mercúrio / David Enrique Aguilar Rodriguez. - - Campinas,  
SP : [s.n.], 1995.

Orientador: Christine Hackel.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,  
Instituto de Biologia.

1. Mercúrio. 2. Contaminação. 3. Cromossomo. I. Hackel,  
Christine. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de  
Biologia. III. Título.

**Dedico este trabajo a mis padres  
Pelayo y Ines, por el amor y cariño con  
que me criaron.**

**À Cidinha e Jaqueline, as duas paixões  
que deram um rumo especial a minha  
vida.**

*In memoriam*, a mis tios Oswaldo  
Pedreros y Olivo Gomes, que siempre  
confiaron en mi.

## ***AGRADECIMENTOS***

### **Aos professores:**

- Dra. Christine Hackel, pela sua orientação, amizade e consideração no decorrer de minha formação como pesquisador.
- Dr. Bernardo Beiguelman, pela amizade e o apoio recebidos, além do incentivo na minha formação pelo grande exemplo que ele representa.
- Dr. Walter Pinto Jr., pela oportunidade que me foi oferecida dentro do Departamento da Genética Médica no qual ele é o chefe.
- Dra. Mary Luci Souza de Queiroz, por ter dado a oportunidade de trabalhar em conjunto para desenvolver meu trabalho de investigação.
- Dra. Yoko Bomura Rosato, pelo apoio dado no início do curso quando ela era a coordenadora da Sub-Comissão de Pós-Graduação em Genética e pela sua amizade.
- Dr. Aquiles Eugênio Piedrabuena, pela colaboração estatística e sugestões no meu trabalho e pela sua amizade.
- Dra. Maricilda Palandi de Mello, pela atenção e contribuição dispensada a minha formação.
- Dra. Solange Bento Farah, pelo seu exemplo no desempenho da investigação.
- Dra. Denise Cavalcanti, pela colaboração e amizade no decorrer do meu trabalho.
- Dra. Carmen Silvia Bertuzzo, Dra. Antonia Paula Marques-de-Faria, Dra. Yvone Denise Janovitz, Dra. Andréa Trevas Maciel-Guerra, Dr. Luiz Alberto Magna, Dr. Antônio Sérgio Ramalho, pela amizade e apreço recebido de todos.

### **As Instituições:**

- Ao Departamento da Genética Médica do Hospital das Clínicas, por ter-me sedido suas instalações para desenvolver minha pesquisa.
- Ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), por ter-me aceitado no curso de Pós-graduação em Genética.
- Ao Laboratório de Cultura de Tecidos da Disciplina de Hematologia e funcionários, pela colaboração no desenvolvimento de meu trabalho de investigação.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) do Ministério de Educação, por ter-me aceitado no Programa de Estudante Convênio (PEC/PG) (Peru-Brasil) e pelo auxílio financeiro.
- Ao Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa (FAEP), pelo auxílio financeiro na fase final de meu trabalho de investigação.



### **Agradecimentos especiais:**

- À Dra. Christine Hackel, não só pela orientação e conhecimentos transmitidos desde o início do curso, como também pela amizade e paciência com que sempre me incentivou a descobrir o caminho da pesquisa.
- À Cidinha, pelo amor e carinho que me deu sempre e também por ter-me dado a Jaqueline tornando minha vida mais feliz.
- À Miguel Lizarraga Espinosa, pela sua amizade e pelo apoio que me tem dado em todo momento desde o primeiro dia que eu cheguei ao Brasil.
- À Mônica de Almeida, pelo apoio com o qual me brindou no decorrer de meu trabalho quando ela era funcionária do “Laboratório de Cultura de Tecidos” do Departamento de Hematologia.
- À minha amiga Cristina Iatauro, por ter colaborado com o desempenho de minha tese quando eu mais precisava de um computador.
- À Regina Tralli, Regina Nogueira e Ana Maria Mendes, boas amigas que sempre estiveram dispostas a colaborar comigo e minha família nos momentos mais difíceis de minha vida.
- À Silvia Gudwin, pela colaboração na correção do meu resumo em inglês.

**Aos amigos do Departamento da Genética Médica:**

- Henry, Toninho, Nilma, Andreinha, Carlos André, Patrícia, Heliane, Iara, Eneida, Daniela, Paulinho, Inara, Claudia, Jossimar, Sônia, Elisângela, Marilza, Teresa, Lúcia, Luciana, Veruska, Gloria, Tânia, Roberta, Edi, Roberto, João Ivanildo, Carlos Steiner, Verinha, Edwal de Freitas e Rui, que colaboraram de uma ou outra forma na minha estadia no Departamento.

## ***SUMÁRIO***

<b>I</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
	- O mercúrio e o meio ambiente.....	2
	- Comportamento do mercúrio no organismo humano.....	8
	- Avaliação do efeito de agentes mutagênicos em cultura de mamíferos....	14
	- Efeitos citogenéticos da exposição ao mercúrio.....	22
	A) Estudos <i>in vitro</i> em células de origem humana.....	23
	B) Estudos <i>in vivo</i> na espécie humana.....	25
<b>II</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>30</b>
<b>III</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
	- Seleção da população em estudo.....	33
	- Preparação das amostras.....	34
	- Cultura de linfócitos para análise de cariótipo.....	36
	- Análise de lâminas.....	37
	- Análise estatística.....	38
<b>IV</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>V</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>VI</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>VII</b>	<b>RESUMO.....</b>	<b>71</b>
<b>VIII</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>74</b>
<b>IX</b>	<b>RESUMEN.....</b>	<b>77</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>80</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>81</b>

## I-INTRODUÇÃO

O mercúrio desde a antigüidade despertou a preocupação de filósofos e cientistas. Os registros mostram que esse elemento químico e seus compostos eram usados então como cosméticos e para fins medicinais (\*HUGUNIN & BRADLEY, 1975).

Por vários fatores, a relação entre o consumo via cadeia alimentar de compostos metálicos e toxicidade é muito complexa, devido a que alguns metais são considerados essenciais para o metabolismo humano, mas tóxicos quando ingeridos em quantidades ligeiramente maiores das necessárias (NASCIMENTO *et al.*, 1990).

Atualmente o mercúrio é usado na forma metálica ou de compostos, principalmente como agente antifúngico protetor de semente na agricultura; nos processos que envolvem amálgamas, como catalisador, nas preparações de restaurações odontológicas, na manufatura do papel, nos processos eletrolíticos para a obtenção de cloretos e de soda cáustica, nas instalações elétricas, além de ter largo emprego na indústria farmacêutica e cosmética. Esse amplo uso do mercúrio favorece uma maior dispersão na natureza e, evidentemente, uma poluição ambiental (PREGNOLATTO *et al.*, 1979).

---

\* HUGUNIN, A.G. & BRADLEY JR., R.L. apud PREGNOLATTO, W.; TOLEDO, M. & SANTESSO, N. - Teor de mercúrio em águas da baixada santista, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39: 5-15, 1979.

- ***O MERCÚRIO E O MEIO AMBIENTE***

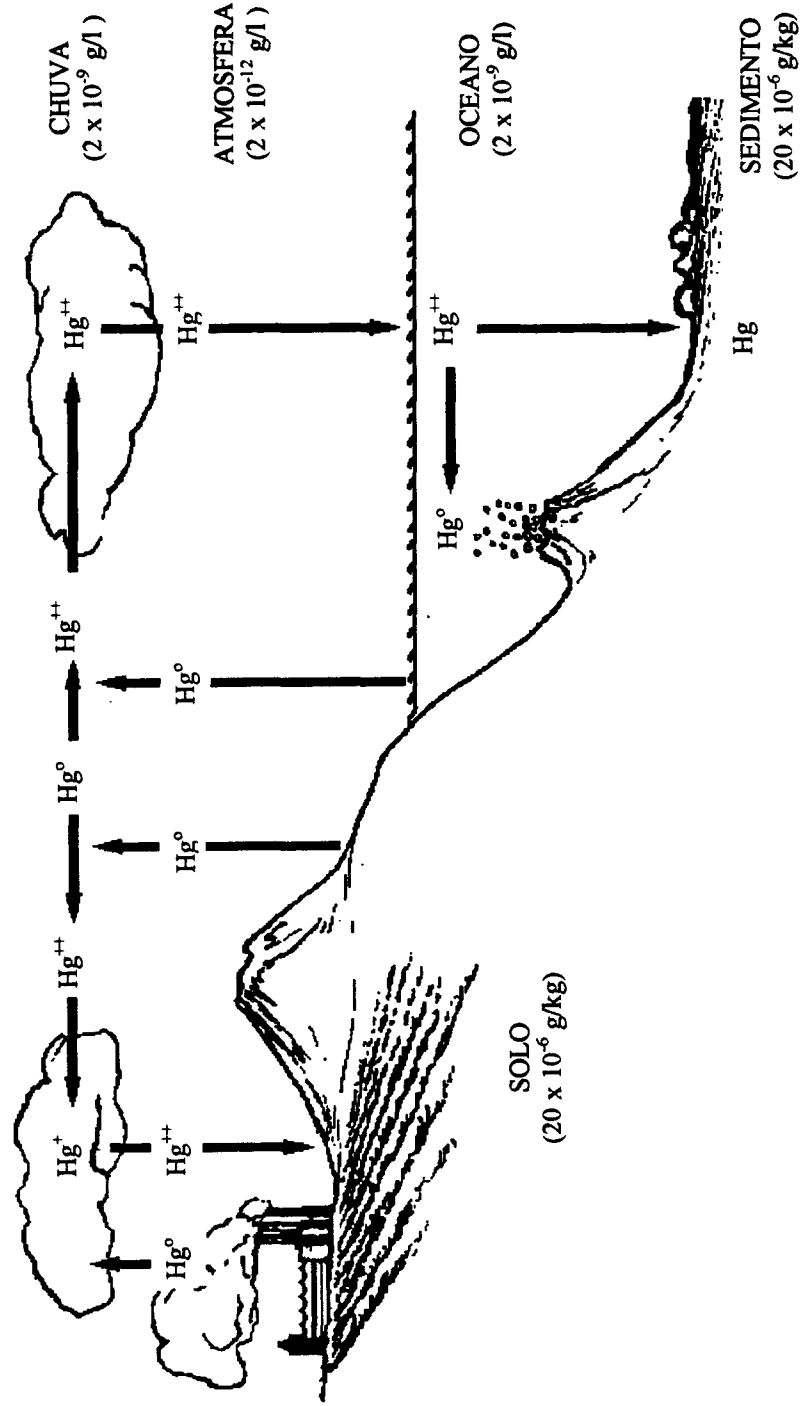
O mercúrio como elemento químico existe em três estados: metálico ( $\text{Hg}^{\circ}$ ), mercurioso ( $\text{Hg}_2^{++}$ ) e mercúrico ( $\text{Hg}^{++}$ ), sendo que os estados mercurioso e mercúrico podem formar diferentes compostos inorgânicos e orgânicos. As formas orgânicas se originam a partir do ataque covalente de pelo menos um átomo de carbono a um íon de mercúrio (WHO, 1991).

Esse elemento é encontrado em jazidas e em outros depósitos geológicos, principalmente sob a forma de cinábrio ( $\text{HgS}$ ). O mercúrio participa de reações químicas na natureza e sofre reciclagem: os sais mercuriais depositados nas áreas de atividade vulcânica, a poucas centenas de metros da superfície da terra, são naturalmente reduzidos a mercúrio metálico que, por ser volátil, aflora à superfície, onde pode reagir com o enxofre e ser fixado sob a forma de sulfeto (PREGNOLATTO *et al.*, 1979).

Outra fonte de emissão de mercúrio na atmosfera é a partir da sua evaporação das massas aquáticas naturais (WHO, 1991). Os vapores de mercúrio são convertidos em formas solúveis inorgânicas (ex.: cloreto mercúrico) e orgânicas (ex.: cloreto de metil-mercúrio), sendo depositados pela chuva no solo e na água (WHO, 1990). Portanto esse elemento químico pode ser naturalmente disseminado, transportado pelo vento e depositado pelas intempéries (Fig. I.1). Na atmosfera das áreas de jazidas e arredores, os níveis de concentração desse metal são maiores do que na do ambiente marinho (PREGNOLATTO *et al.*, 1979).

A transformação das formas inorgânicas de mercúrio em formas metiladas pode ocorrer através da ação microbiana ou por processos não-enzimáticos, tais como a metilação do  $\text{Hg}^{++}$  por compostos de metil-cobalamina (análogo da vitamina  $\text{B}_{12}$ ) em organismos vivos.

Figura I.1 - Ciclo do Mercúrio



(adaptado de WHO, 1990)

Assim, o metil-mercúrio entra na cadeia alimentar de espécies predadoras, onde pode vir a ser convertido novamente em mercúrio inorgânico e depositar-se nos tecidos (WHO, 1990).

Segundo <sup>\*</sup>PEAKALL & LOVETT (1972), os organismos terrestres são capazes de assimilar e concentrar o mercúrio em quantidades de 2 a 3 vezes maiores que a do ambiente que as circunda, e os organismos aquáticos o concentram de 100 a milhares de vezes em comparação com o ambiente.

GOLDWATER (1971), que estudou o mercúrio e meio ambiente, resumiu a sua relação com a cadeia alimentar marinha: plantas como as algas, absorvem-no e concentram-no em altos níveis; peixes que consomem essas algas e vivem nesse mesmo ambiente concentram-no em níveis ainda maiores.

A concentração média de mercúrio natural sobre a crosta terrestre é de 0,5 ppm (PREGNOLATTO *et al.*, 1979). Segundo os dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1991) a estimativa mais recente sobre a emissão natural de mercúrio na atmosfera é da ordem de 2700 - 6000 toneladas/ano. Do produto da mineração de mercúrio estima-se uma produção mundial ao redor de 10.000 toneladas/ano, existindo uma perda de mercúrio que é descarregada diretamente na atmosfera. Outras fontes de mercúrio na atmosfera são a utilização de combustíveis fósseis, a refinação do ouro, a produção de cimento, a incineração de lixo e a aplicação industrial desse metal. Nas indústrias de compostos alcalinos de cloro tem-se uma emissão de aproximadamente 450 g de mercúrio por cada tonelada de soda cáustica produzida. A descarga mundial de mercúrio na atmosfera em decorrência das atividades humanas é de 3000 toneladas/ano (WHO, 1991). Assim torna-se

---

<sup>\*</sup> PEAKALL, D.B. & LOVETT, R.J. apud PREGNOLATTO, W.; TOLEDO, M. & SANTESSO, N. - Teor de mercúrio em águas da baixada santista, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39: 5-15, 1979.



evidente que o uso dos compostos mercuriais pelo homem pode alterar quantitativamente a sua presença no solo e na água.

A concentração do mercúrio total na atmosfera foi recentemente estimada pela OMS em 2 ng/m<sup>3</sup> no hemisfério norte, caindo à metade no hemisfério sul. Logicamente, os valores em áreas urbanas são usualmente mais elevados do que em áreas rurais. Cerca de 75% do mercúrio está presente na atmosfera sob a forma de vapor de mercúrio elementar, 20% como metil-mercúrio e 5% como compostos inorgânicos de mercúrio (WHO, 1990).

A poluição do ambiente pelo mercúrio pode fazer com que esse elemento atinja níveis extremamente elevados: na baía de Minamata (Japão), próximo ao canal de descarga de uma indústria, \*KITAMURA (1968) chegou a detectar 2010 ppm de mercúrio nos sedimentos de um rio, quantidade essa que diminuía em função da distância deste canal. \*\*KONRAD (1972) detectou 684 ppm desse elemento no sedimento de um rio em Wisconsin, também perto de uma indústria de hidróxido de sódio que usava o mercúrio como catalisador; a 1,5 Km, rio abaixo, o nível encontrado foi de 12 ppm.

No Brasil, a primeira evidência de poluição por mercúrio por uso inadequado de pesticidas organomercuriais se deu em 1966. Na ocasião, pesquisadores do Instituto Biológico e Adolfo Lutz, em São Paulo, detectaram teores de mercúrio acima de 0,005 ppm em cerca de 21,7% das amostras de alimentos de origem vegetal analisados (PREGNOLATTO *et al.*, 1979).

---

\* KITAMURA, S. apud PREGNOLATTO, W.; TOLEDO, M. & SANTESSO, N. - Teor de mercúrio em águas da baixada santista, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39: 5-15, 1979.

\*\* KONRAD, J.G. apud PREGNOLATTO, W.; TOLEDO, M. & SANTESSO, N. - Teor de mercúrio em águas da baixada santista, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39: 5-15, 1979.

Nós últimos anos, tem se verificado uma larga contaminação do meio ambiente por mercúrio por garimpagem do ouro, nos Estados de Mato Grosso, Goiás, Tocantins, Rondônia, Pará e Rio de Janeiro (AZEVEDO, 1989 e FERRARI *et al.*, 1992a). Nesse sentido, os garimpeiros estão sujeitos a um risco específico adicional, pois, além de compartilhar com a população local a contaminação por ingestão de peixes portadores das formas orgânicas do mercúrio, aspiram diretamente as emanações do metal.

- ***COMPORTAMENTO DO MERCÚRIO  
NO ORGANISMO HUMANO***

As distintas formas físicas e químicas do mercúrio são tóxicas, não se conhecendo nenhuma função fisiológica benéfica deste elemento no organismo humano (AZEVEDO, 1989).

A população em geral está exposta aos compostos de mercúrio por inalação ou por ingestão (PREGNOLATTO *et al.*, 1979). Em indivíduos sem exposição ocupacional ao mercúrio, estima-se que, do mercúrio presente na atmosfera, absorvem-se 40 ng por dia. Do consumo de água, são absorvidos cerca de 50 ng de mercúrio por dia (WHO, 1990). Na dieta diária é mais difícil calcular a absorção de compostos mercuriais, mas o consumo de peixe é uma das fontes principais de exposição humana ao metil-mercúrio (tabela I.1). Além disso, demonstrou-se que o vapor de mercúrio é liberado das amálgamas de restaurações dentárias e que a taxa de liberação aumenta com a mastigação (WHO, 1991). Assim os compostos mercuriais são absorvidos pelo organismo e por disseminação sanguínea, alcançam todos os tecidos e podem ser metabolicamente transformados dentro do organismo.

Na espécie humana, 80% dos vapores de mercúrio metálico inalados são retidos pelo organismo, e menos de 1% do mercúrio metálico líquido é absorvido no trato intestinal. A meia-vida biológica dura só poucos dias ou semanas para a maior parte absorvida, porém para uma pequena parte pode ser extremamente longa, talvez anos (WHO, 1990).

O rim é o principal órgão de depósito de compostos de mercúrio, podendo haver acúmulo no cérebro e em tecidos fetais. O tecido do sistema nervoso é o principal alvo dos efeitos do metil-mercúrio nos adultos. As funções sensoriais, visuais e auditivas ao mesmo tempo que áreas do cérebro tais como o cerebelo são as mais comumente afetadas (WHO, 1991).

**Tabela I.1-** Média diária estimada da ingestão ( I ) e retenção ( R ) em  $\mu\text{g}/\text{dia}$  do mercúrio total e compostos mercuriais de populações sem exposição ocupacional ao mercúrio.

Elemento	Vapor de Hg <sup>o</sup>		Compostos de Hg inorgânicos		Metil-mercúrio	
	I	( R )	I	( R )	I	( R )
Ar	0,030	(0,024)	0,002	(0,001)	0,008	(0,0064)
Alimento						
com Peixe	0		0,600	(0,042)	2,4	(2,3)
sem Peixe	0		3,6	(0,25)	0	
Consumo de Água	0		0,050	(0,0035)	0	
Amálgamas dentárias	3,8-21	(3-17)	0		0	
<b>Total</b>	<b>3,9-21</b>	<b>(3,1-17)</b>	<b>4,3</b>	<b>(0,3)</b>	<b>2,41</b>	<b>(2,31)</b>

(adaptado de WHO, 1990).

Nos pacientes com intoxicação crônica, a desintegração cortical leva à cegueira, à perda da acuidade auditiva, à ataxia, às contraturas e mioclonias (FAINTUCH & ROCHA 1990). Considera-se que a exposição subaguda pode dar origem a reações psicóticas, alucinações e tendências suicidas (WHO, 1991). O vapor de mercúrio é incolor e inodoro e a inalação aguda, quando leve, pode causar sintomatologia gripal, não sendo facilmente diagnosticada sem apoio laboratorial (\*AGUADO *et al.*, 1989).

\* AGUADO *et al.* apud FAINTUCH, J.J. & ROCHA, A.S. Intoxicação por mercúrio no Brasil. *Rev. Bras. Med.*, 47: 505- 509, 1990.

A exposição aguda por inalação de vapores de mercúrio pode ser seguida por vômitos, diarreia, febre, tosse, dor torácica, dispnéia, hemoptise e, às vezes, por pneumonites intersticiais que podem provocar a morte (WHO, 1991 e ATTA *et al.*, 1992).

Tanto os vapores de mercúrio metálico como os compostos de mercúrio podem dar origem a dermatites de contato e gerar reações eczematozas em tatuagens com o corante vermelho “Cinnabar”, à base de mercúrio (MAIA *et al.*, 1988 e WHO, 1991).

A principal característica de um transtorno funcional decorrente da exposição ocupacional ao mercúrio é o eretismo (extrema irritabilidade física). Se a exposição prossegue, apresentam-se tremores finos, que no princípio afetam as mãos. Nos casos mais leves, o eretismo e os tremores desaparecem pouco a pouco ao longo de vários anos depois da interrupção da exposição (WHO, 1991). O envenenamento ocupacional através de inalação de vapor de mercúrio caracteriza-se usualmente por gengivite, estomatite com sialorréia, tremor fino, irritabilidade e insônia (FAINTUCH & ROCHA, 1990).

Embora a exposição da população em geral seja geralmente reduzida, ocasionalmente pode elevar-se até níveis de exposição ocupacional, podendo inclusive ser tóxica. Assim, a manipulação incorreta de mercúrio líquido tem dado origem a casos graves de intoxicação (NASCIMENTO *et al.*, 1990).

A eliminação do mercúrio orgânico é realizada predominantemente pelas vias urinárias e intestinal. Os níveis de mercúrio no sangue ou urina podem ser usados como indicadores de exposição, desde que a mesma seja recente e relativamente constante em períodos diários prolongados. Níveis de excreção de até 5 µg de Hg/g de creatinina na urina são considerados normais, decorrentes da exposição ao mercúrio de fontes naturais ou

presentes na dieta e em amálgamas dentárias. Uma exposição correspondente de 30 até 100  $\mu\text{g}$  de mercúrio/g de creatinina aumenta a incidência de alguns efeitos tóxicos menos graves que não provocam manifestações clínicas evidentes (WHO, 1991).

Em indivíduos com exposição ocupacional ao mercúrio, níveis urinários acima do limite de tolerância biológica (50  $\mu\text{g}/\text{g}$  de creatinina) causam preocupação, pois em níveis de excreção de 100  $\mu\text{g}$  de mercúrio/g de creatinina há uma probabilidade muito alta de que apareçam os sinais neurológicos clássicos de intoxicação por mercúrio (tremor, eretismo) e proteinúria (WHO,1991).

A urina é considerada um bom indicador de exposição a longo prazo ao vapor de mercúrio inalado e o cabelo seria um indicador mais prático para avaliar a sobrecarga corporal de metil-mercúrio, considerando-se que o cabelo da cabeça apresenta níveis totais mais elevados que as unhas das mãos e pés. Uma vez que o processo de distribuição do mercúrio está completo, existe uma relação constante entre a concentração do cabelo e a do sangue, sendo a concentração do organometal no cabelo um múltiplo da do sangue 250 vezes (FAINTUCH & ROCHA, 1990).

No Brasil, estudos feitos por SALGADO (1986) revelaram que 50% dos cirurgiões dentistas, que utilizam o mercúrio elementar no preparo das amálgamas, apresentam níveis urinários de mercúrio superiores a 5  $\mu\text{g}/\text{g}$  de creatinina e 1,6% acima de 30  $\mu\text{g}/\text{g}$  de creatinina.

Em trabalhadores de uma indústria do interior paulista de reaproveitamento de mercúrio, QUEIROZ *et al.* (1994) observaram uma concentração urinária média de 24,7  $\mu\text{g}$  de mercúrio por g de creatinina. Em 8% dos casos, os valores de mercúrio na urina estavam

acima do limite de tolerância biológica. A adoção de medidas de higiene e consequente melhoria das condições de trabalho nessa firma resultou numa redução significativa desses níveis em dosagens realizadas após o intervalo de seis meses nos mesmos indivíduos.

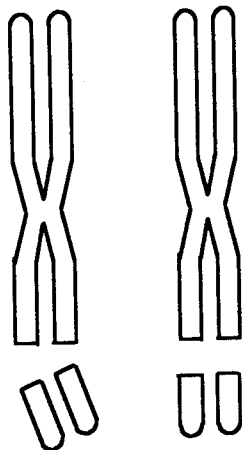
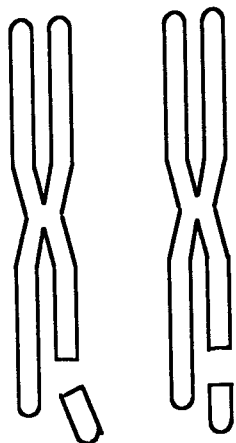


- ***AVALIAÇÃO DO EFEITO DE AGENTES MUTAGÊNICOS EM CULTURAS DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS.***

Os ensaios biológicos desenvolvidos por citogeneticistas em culturas de células de mamíferos permitem identificar substâncias mutagênicas que produzem aberrações cromossômicas estruturais - denominadas agentes clastogênicos - e substâncias que interferem no fuso acromático, alterando a distribuição dos cromossomos durante a divisão celular (RABELLO-GAY *et al.*, 1991).

O método clássico de avaliação do dano citogenético baseia-se na análise do complemento cromossômico em preparações de células metafásicas, sendo de grande utilidade quando se quer investigar a ação clastogênica de qualquer agente químico, físico ou biológico (MOORHEAD *et al.*, 1960; GEBHART, 1981 e FERRARI, 1991). Em nível molecular, admite-se atualmente que quebras em fitas duplas na cadeia de DNA constituem as lesões responsáveis pela formação de aberrações cromossômicas. No caso de agentes que induzem quebras em fita simples do DNA, acredita-se que as endonucleases capazes de reconhecerem essas lesões, convertem-nas em quebras duplas da cadeia de DNA (NATARAJAN & OBE, 1984). Evidentemente, a célula pode reparar corretamente essas quebras, bem como não realizar esse processo de reparo, ou ainda fazê-lo de maneira incorreta.

Em nível citológico, dependendo do momento de indução das lesões e na ausência de reparo de DNA, as aberrações resultantes podem ser do tipo **cromossômico** (ou **isocromatídico**) quando ambas as cromátides são afetadas ou do tipo **cromatídico**, quando apenas uma das cromátides é afetada (BEIGUELMAN, 1982). As aberrações do tipo cromossômico são classificadas como **quebras** quando as descontinuidades ao longo dos cromossomos apresentam uma extensão maior que a espessura de uma cromátide ou quando os fragmentos distais acham-se deslocados em relação ao eixo do cromossomo. (Figura I.2),

**Figura I.2 - Lesões Cromossômicas Estruturais.****I. Quebras cromossômicas ou isocromatídicas:****II. Quebras cromatídicas:**

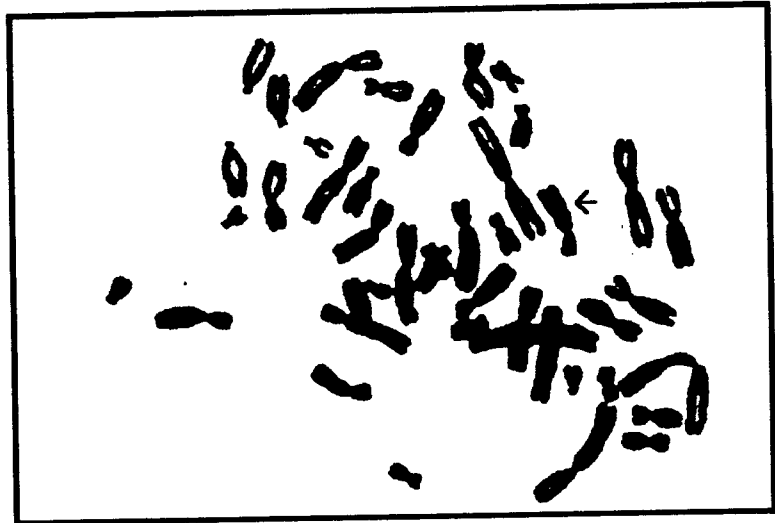
As **falhas** são definidas por descontinuidades cromossômicas com largura inferior à espessura de uma cromátide, com as extremidades proximal e distal alinhadas na mesma direção (lesões acromáticas) ou descontinuidades com material cromatídico visível conectando a parte proximal à distal do fragmento, independentemente de seu diâmetro (NICHOLS, 1972). (Figura I.3) A classificação das aberrações do tipo cromatídico em quebras ou falhas obedece os mesmos critérios acima descritos para as aberrações do tipo cromossômico. Para fins práticos, considera-se que, em culturas de linfócitos humanos feitas *in vitro*, observa-se, normalmente, até 2% de metáfases com quebras e até 4,5% de falhas (BEIGUELMAN, 1982).

É provável que muitas quebras se ressoldem na posição original ou com outras regiões fraturadas do próprio cromossomo ou ainda de outros cromossomos. Tais rearranjos podem originar aberrações estruturais estáveis tais como as inversões, translocações e duplicações cromossômicas. Por outro lado, a perda de fragmentos cromossômicos pode dar origem a cromossomos estáveis portadores de deficiências parciais ou a aberrações estruturais instáveis tais como cromossomos em anel, cromossomos dicêntricos e fragmentos acêntricos que se perdem após um número variável de divisões celulares (BEIGUELMAN, 1982 e RABELLO-GAY, 1991a).

Um método que apresenta a vantagem de ser mais rápido do que a análise cromossômica e que pode servir como um indicador do efeito de agentes mutagênicos ao nível nuclear é o teste do micronúcleo, desenvolvido por HEDDLE, 1973, e considerado como um sistema potencialmente sensível para o monitoramento biológico de dano ao DNA. (HEDDLE *et al.*, 1983).

**Figura I.3- Lesões Cromossômicas Estruturais.**

**I. Falhas cromossômicas ou isocromatídicas:**

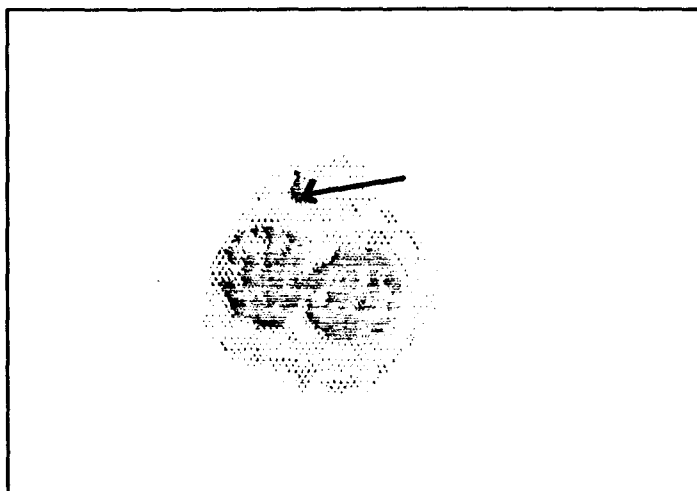


**II. Falhas cromatídicas:**



Os micronúcleos originam-se a partir de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos que não foram incorporados ao núcleo das células filhas durante a divisão celular e que podem ser visualizados em preparações citológicas com citoplasma preservado de linfócitos, de células de medula óssea e de células esfoliadas de tecido epitelial (FERRARI, 1991; RABELLO-GAY, 1991b e RIBEIRO, 1991). (Figura I.4)

**Figura I.4 - Micronúcleo**



Assim, a determinação da frequência de micronúcleos pode ser utilizada para detectar tanto os eventos clastogênicos como defeitos no fuso da célula, embora falhe em detectar falta de disjunção mitótica sem perda de cromossomos na anáfase e aberrações estruturais decorrentes de rearranjos cromossômicos que não geram, necessariamente, fragmentos acêntricos, tais como as translocações e inversões (FERRARI, 1991).

Outro ensaio de grande utilidade para a estimativa do potencial mutagênico de uma substância baseia-se na avaliação da frequência de intercâmbios entre segmentos de

cromátides-irmãs [ISCI] (BEIGUELMAN, 1982 e VARELLA-GARCIA, 1991). A existência desse fenômeno, que é resultante de quebras que ocorrem no mesmo loco das duas cromátides de um cromossomo, foi evidenciada de maneira inequívoca por TAYLOR e colaboradores em 1957 em células de raízes de *Vicia faba* cultivadas por um ciclo em meio contendo desoxitimidina triciada, subseqüentemente expostas a uma solução de colquicina desprovida do desoxinucleosídeo radiativo por mais 1, 2 ou 3 ciclos celulares. Além de demonstrar que o DNA dos cromossomos se duplica de modo semiconservador, tais autores observaram, por autorradiografia, cromátides marcadas em apenas uma parte de sua extensão e na porção complementar de sua cromátide irmã, ou seja, os segmentos trocados tinham tamanho e posição similares.

Com a descoberta de que um análogo da desoxitimidina, a 5-Bromo-2'-desoxiuridina [BrdU] poderia substituir o uso da desoxitimidina triciada na demonstração de ISCI, em virtude das propriedades tintoriais diferentes exibidas por cromátides com DNA constituído por uma ou por duas cadeias substituídas pela BrdU (ZAKHAROV & EGOLINA, 1972), o estudo de ISCI passou a ser desenvolvido em vários laboratórios. Graças à duplicação semiconservativa do DNA, a marcação diferencial das cromátides irmãs é obtida após o cultivo das células em meio contendo BrdU, por dois ciclos consecutivos. Ao final do primeiro ciclo, ambas as cromátides contém uma das fitas de DNA contendo BrdU, exibindo coloração intensa quando coradas pelo Giemsa. Ao final do segundo ciclo, os cromossomos metafásicos são constituídos por uma cromátide onde apenas uma das fitas de DNA contém a BrdU, enquanto que na outra a BrdU está presente em ambas as fitas. Esta última exhibe uma menor afinidade pelo corante, o que resulta em uma coloração mais clara, bem distinta de sua cromátide-irmã, facilitando sobremaneira a visualização dos segmentos trocados.

Muito embora os mecanismos moleculares envolvidos na produção desses intercâmbios ainda não estejam bem definidos, essa técnica permitiu demonstrar que a luz ultra-violeta e a maioria dos agentes químicos são potentes indutores de ISCI. Para certos compostos, a análise de ISCI é sensível a concentrações que não chegam a causar aberrações cromossômicas (PERRY & EVANS, 1975). Por outro lado, esse teste não fornece necessariamente uma estimativa quantitativa ou qualitativa de aberrações cromossômicas grosseiras, devendo por esse motivo ser considerado como complemento e não substituto dos outros ensaios para avaliação de clastogenicidade (VARELLA-GARCIA, 1991).

Quanto às substâncias que interferem com as fibras do fuso no processo de divisão celular, pode-se observar a formação de C-mitoses, à semelhança do que ocorre em células tratadas com colquicina. Defeitos no fuso ou a sua ausência impedem a organização da placa metafásica, fazendo com que os cromossomos fiquem dispersos no interior da célula. Após a divisão dos centrômeros, esses cromossomos podem ser reunidos em um único núcleo de restituição, agora tetraplóide, ou em micronúcleos de tamanho variável, incapazes de dividir-se posteriormente. O fenômeno de C-mitose é extremamente raro em células normais na ausência de tratamento com colquicina, mas é freqüentemente descrito em células de câncer de mama, provavelmente em consequência de anoxia e degeneração do tecido (THERMAN, 1986).



- ***EFEITOS CITOGENÉTICOS DA EXPOSIÇÃO AO MERCÚRIO***

O primeiros estudos citológicos realizados em raízes de *Allium sp.* demonstraram que diferentes compostos organomercuriais, tais como metil-, etil-, butil-, fenil- e metoxietil-mercúrio, induzem C-mitoses, poliploidia e aneuploidia (RAMEL, 1969 e FISKEJÖ, 1969). O metil- e o fenil-mercúrio também foram capazes de induzir fragmentação cromossômica nessas células (RAMEL, 1969). Em ovos de drosophila, RAMEL e MAGNUSSON (1969), detectaram a ocorrência de falta de disjunção do cromossomo X depois do tratamento com esses compostos. Esses achados sugerem que essas substâncias poderiam inativar as fibras do fuso tanto na mitose quanto na meiose, levando a uma segregação anormal dos cromossomos.

#### A) ESTUDOS *IN VITRO* EM CÉLULAS DE ORIGEM HUMANA.

O fenômeno de C-mitose foi observado em células HeLa tratadas com vários organomercuriais (UMEDA *et al.*, 1969), em linfócitos humanos expostos *in vitro* ao metil- e ao cloreto de metóxi-mercúrio (FISKEJÖ, 1970) e em fibroblastos humanos tratados com cloreto de metil-mercúrio (OCHI & TONOMURA, 1975).

ROZYNKOWA e RACKIEWICZ (1977) verificaram o efeito de indução de C-mitose em linfócitos humanos expostos *in vitro* a diferentes concentrações de cloreto de metil-mercúrio, relacionando o efeito-dose à proliferação celular. Na concentração mais elevada (40 µg/ml de meio), o cloreto de metil-mercúrio inibe completamente a mitose com intensa destruição da cromatina. Entretanto, a indução de C-mitoses por este composto foi 100 vezes menos eficiente do que a induzida pela concentração padrão de Colcemid (0,2 µg/ml de meio).

Em estudos realizados *in vitro*, VERSCHAEVE *et al.* (1985) observaram

uma inibição da atividade das regiões organizadoras de nucléolo em linfócitos humanos expostos ao mercúrio, inibição esta mais acentuada para o mercúrio inorgânico (cloreto de mercúrio) do que para o orgânico (cloreto de metil-mercúrio). Por outro lado, esses autores constataram que as formas orgânicas são mais eficientes que as formas inorgânicas na indução de C-mitoses e de erros de segregação cromossômica. A exposição de linfócitos humanos a diversas concentrações desses compostos de mercúrio durante fases limitadas ao período que antecede a síntese de DNA (G1-S) ou a partir desse estágio até a mitose (G1-M) resultou na observação de efeitos clastogênicos importantes, bem como no aumento da frequência de dissociação dos cromossomos acrocêntricos.

BETTI *et al.* (1992) avaliaram o efeito genotóxico do cloreto de metil-mercúrio (CMM) e do dimetil-mercúrio (DMM) em linfócitos humanos *in vitro* expostos a esses compostos orgânicos por 24 horas. As aberrações cromossômicas numéricas e estruturais foram analisadas para avaliar o efeito clastogênico, e a toxidez celular foi estudada por intermédio da variação do índice mitótico. Determinou-se que ambos os compostos induzem aberrações estruturais em proporções significativamente mais elevadas do que aberrações numéricas. O CMM foi 6 vezes mais eficiente do que o DMM na indução de aberrações estruturais em doses equivalentes, ao passo que ambos foram igualmente eficientes na indução de aberrações numéricas. Com base nesses resultados, os autores concluíram que o CMM foi muito mais clastogênico do que o DMM e que os distúrbios do fuso mitótico foram igualmente induzidos por ambos os compostos.

Em 1993, BETTI *et al.* estudaram a ação do CMM sobre linfócitos humanos em repouso (G0), observando a formação de lesões cromatídicas e cromossômicas e a indução de aneuploidias em metáfases da segunda geração. Tais autores sugerem que o CMM produz danos estáveis que resultam em erros na segregação dos cromossomos e que o

armazenamento das células em suspensão líquida por 48 horas, após o tratamento com o CMM e antes da proliferação, não melhora a capacidade de reparo do dano celular induzido.

## B) ESTUDOS *IN VIVO* NA ESPÉCIE HUMANA

SKERFVING *et al.* (1970) observaram uma relação estatisticamente significativa entre a frequência de células com quebras cromossômicas e a concentração de mercúrio no sangue em nove indivíduos com níveis cerca de 2 a 40 vezes mais elevados do que em não expostos. Quatro anos depois, SKERFVING *et al.* (1974) observaram a mesma relação ao estudarem citogeneticamente 23 indivíduos expostos ao mercúrio através do consumo de peixe de águas contaminadas, de diferentes áreas da Suécia. Resultados semelhantes foram observados por KATO *et al.* (1976) em pacientes com a doença de Minamata, no Japão.

Na Bélgica, VERSCHAEVE *et al.* (1976) analisaram linfócitos de 28 indivíduos com exposição ocupacional a diferentes compostos de mercúrio, encontrando uma diferença significativa na frequência de células aneuplóides entre os indivíduos expostos e não expostos, para todos os compostos mercuriais. Por outro lado, embora as frequências de células com aberrações cromossômicas estruturais sejam mais elevadas nos expostos do que nos controles, uma diferença estatisticamente significativa foi encontrada somente no grupo de indivíduos expostos ao etil-mercúrio. Tais autores sugeriram então que o aparato mitótico seria mais sensível do que os cromossomos aos agentes mercuriais.

Para investigar a hipótese de que os derivados do mercúrio poderiam afetar a distribuição dos cromossomos na placa metafásica, em consequência de distúrbios do fuso mitótico, VERSCHAEVE *et al.* (1978) analisaram as posições relativas dos cromossomos metafásicos em linfócitos de sangue periférico de indivíduos expostos ao acetato de fenil-

mercúrio, sem sinais de intoxicação e sem níveis elevados de mercúrio no sangue, e de indivíduos controles. Esses autores sugerem que o acetato de fenil-mercúrio pode influenciar a posição de alguns cromossomos, em especial os acrocêntricos do grupo D, que estão envolvidos na organização do nucléolo. Entretanto, os resultados apresentados não permitem conclusões definitivas a esse respeito, argumentando-se que talvez o nível de exposição seja muito baixo para a observação de qualquer efeito.

POPESCU *et al.* (1979) em um estudo realizado na Romênia com 22 indivíduos expostos a vapor de mercúrio metálico ou mercúrio orgânico, encontraram uma frequência significativamente elevada de células com fragmentos acêntricos quando comparados aos controles, ao passo que não foram observadas diferenças significativas quanto às frequências de falhas, de quebras cromatídicas, de aneuploidias ou de poliploidias. Os indivíduos expostos ao mercúrio trabalhavam em áreas onde as concentrações desse elemento químico excediam os valores máximos permitidos. Embora tais indivíduos não apresentassem evidências de envenenamento, em todos os casos os níveis de mercúrio na urina achavam-se extremamente elevados. A comparação entre as frequências de aberrações cromossômicas observadas no grupo exposto ao vapor de mercúrio metálico e no grupo exposto aos organomercuriais, não revelou diferenças significativas.

Estudos citogenéticos foram realizados por MABILLE *et al.* (1984) em linfócitos de sangue periférico de indivíduos com exposição ocupacional ao mercúrio em duas fábricas belgas: a primeira delas, de produção de amálgamas com zinco e a segunda, de cloro-soda. Esses autores verificaram que não houve um aumento significativo de aberrações cromossômicas nas células dos indivíduos expostos aos vapores de mercúrio em ambas as situações, concluindo que a análise cromossômica de linfócitos nem sempre representa um bom indicador biológico de danos genéticos produzidos por agentes químicos.

Na Suécia, BARREGARD *et al.* (1991) estudaram a frequência e a distribuição de tamanho dos micronúcleos de linfócitos T e B de 26 indivíduos expostos ao mercúrio inorgânico de uma fábrica de cloro-soda, com tempo médio de exposição de 10 anos. Não foram observadas diferenças significativas na frequência ou no tamanho dos micronúcleos dos indivíduos expostos quando comparados com seus controles, nem correlações dessas variáveis com os níveis de mercúrio na urina, no plasma, ou nos eritrócitos, avaliados na ocasião do estudo. Entretanto, notaram-se correlações positivas significativas entre o índice de exposição acumulada ao mercúrio, tempo de exposição, número de picos de dosagem elevada de mercúrio e a frequência de micronúcleos do grupo exposto, em linfócitos estimulados pela fitohemaglutinina, mas não pelo mitógeno "pokeweed". Segundo os autores, essas associações persistem mesmo quando são considerados os efeitos da idade e do fumo, podendo refletir um acúmulo de efeitos citogenéticos nos linfócitos T.

No Brasil, a instabilidade cromossômica associada à exposição ao mercúrio foi relatada por AMORIN *et al.* (1991) em dois pacientes procedentes de áreas de impacto ambiental da Amazônia, um deles com anemia indeterminada e o outro, com leucemia linfoblástica aguda. A análise citogenética de células de medula óssea revelou alterações cromossômicas tais como a hipodiploidia, quebras, pequenos duplos, fragmentação, pulverização e poliploidia, em frequências acima das normalmente observadas nesse tipo de tecido. Estudos citogenéticos mais abrangentes foram realizados por FERRARI *et al.* (1992b) em garimpeiros da Amazônia legal, os quais estavam expostos tanto aos vapores de mercúrio oriundos do processo extrativo do ouro, como pelo consumo de peixes contaminados com a forma orgânica do metal. Esses autores analisaram a frequência de aberrações cromossômicas em linfócitos e de micronúcleos em células esfoliadas de mucosa oral, concomitantemente com análises dosimétricas do metal no sangue, no cabelo e na

urina, mas observaram apenas uma correlação negativa significativa entre a concentração do metal no cabelo e a frequência de quebras cromatídicas.

AL-SABTI *et al.* (1992), na Eslovênia, realizaram estudos citogenéticos em linfócitos humanos de trabalhadores de minas de mercúrio, de carvão, de usina nuclear e de um centro radiológico hospitalar, e observaram que os indivíduos com maior tempo de atividade profissional tendem a apresentar frequências mais elevadas de células com aberrações cromossômicas e cromatídicas, de micronúcleos e, especialmente, de intercâmbio de segmentos entre cromátides irmãs, quando comparados a um grupo controle de trabalhadores de áreas administrativas.

Na Noruega, HANSTEEN *et al.* (1993) analisaram aberrações cromossômicas e micronúcleos em linfócitos de 29 indivíduos do sexo masculino de uma indústria de cloro-soda e de dois grupos de referência constituídos por 29 trabalhadores de indústria de fertilizantes à base de nitratos e de 29 fiscais e policiais. Foram realizadas culturas de sangue total sem e com hidroxauréia e cafeína para inibir a síntese de DNA e o reparo, respectivamente, não sendo constatadas diferenças significativas nas frequências de micronúcleos e de aberrações cromossômicas, para qualquer grupo estudado. Entretanto, os autores referem o achado de um aumento, embora não significativo, na frequência de quebras cromossômicas e de dicêntricos em indivíduos com altos níveis de pico de dosagem de Hg na urina, ou com alta exposição acumulada, mas concluem que os métodos utilizados não revelam efeitos citogenéticos evidentes da exposição ao mercúrio.

O estudo da frequência de micronúcleos em trabalhadores de um hospital da cidade de São Paulo, realizado por SOARES-VIEIRA *et al.* (1993), revelou um número

significativamente maior de micronúcleos nos expostos ao mercúrio, quando comparados com controles, constituídos por funcionários do mesmo hospital, não expostos ao mercúrio.

Em pescadores do Mar Mediterrâneo, consumidores de peixes de áreas altamente poluídas, FRANCHI *et al.* (1994) observaram uma associação positiva e significativa entre a frequência de micronúcleos e a concentração total de mercúrio no sangue desses indivíduos, além de uma correlação significativa positiva entre a frequência de micronúcleos e a idade.



## ***II - OBJETIVO***

A exposição ocupacional ao vapor de mercúrio metálico e a ingestão de metil-mercúrio via cadeia alimentar são as duas formas mais freqüentes de exposição humana ao mercúrio (FAINTUCH & ROCHA, 1990). O estudo citogenético de indivíduos expostos ocupacionalmente apresenta interesse especial na monitorização biológica, tendo em vista as conseqüências desastrosas relatadas na literatura da ingestão de mercúrio pela espécie humana.

Tendo em vista o exposto, o presente trabalho teve como objetivo, investigar o efeito clastogênico do mercúrio em trabalhadores de uma fábrica de reaproveitamento desse metal, situada na região de Paulínia, SP, onde estes indivíduos apresentavam níveis de mercúrio na urina dentro dos limites de tolerância biológica.

Esses trabalhadores vêm sendo assistidos junto aos Departamentos de Clínica Médica e Medicina Ocupacional da Unicamp, onde se realizam estudos e controles periódicos visando avaliar alterações imunológicas subclínicas ao nível celular.

### ***III - MATERIAL E MÉTODOS***

## **1. Seleção da população em estudo:**

Os indivíduos incluídos nesse estudo são funcionários de uma firma onde se efetua o reaproveitamento do mercúrio metálico liberado nos afluentes líquidos de indústrias de cloro-soda. A adição de sulfeto a esses afluentes promove a formação de depósitos insolúveis de sulfeto de mercúrio. Os afluentes assim tratados, são então filtrados em diatomito\* por um processo de pressão. A terra diatomito contendo o sulfeto de mercúrio passa por vários processos físico-químicos que facilitam a obtenção do mercúrio metálico.

Esses indivíduos responderam ao questionário (Anexo I) aplicado pela equipe do Laboratório de Cultura de Tecidos da Disciplina de Hematologia. Os valores da dosagem de mercúrio na urina foram fornecidos pelos pesquisadores desse laboratório.

O grupo controle foi constituído por doadores de sangue que vem ao Hemocentro da Unicamp, e de voluntários de setores administrativos do Hospital das Clínicas da Unicamp, clinicamente normais, sem história de exposição ocupacional ao mercúrio, sendo todos do sexo masculino e de idades próximas às dos indivíduos expostos.

Nenhum dos indivíduos selecionados havia se submetido à radiação ionizante ou ao tratamento quimioterápico nos últimos 6 meses e nenhum se referiu ao consumo de álcool além do esporádico, registrando-se, no entanto, o consumo de cigarros em alguns casos.

Optou-se por sempre analisar indivíduos de sexo masculino, já que estes constituíam a grande maioria dos trabalhadores no local, não considerando pessoas do sexo feminino por

---

\* diatomito - Rocha sedimentar constituída essencialmente de carapaças silicosas de diatomáceas.

apresentarem um segundo cromossomo X, o qual, em função do seu tamanho, poderia ter uma probabilidade maior de apresentar lesões em comparação com o cromossomo Y.

Para cada três indivíduos expostos que compareciam à coleta de sangue para diversos exames, realizou-se a coleta de material de um indivíduo do grupo controle.

## **2. Preparação das Amostras:**

As amostras foram inicialmente processadas no Laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Hematologia, do Hospital das Clínicas, segundo o procedimento que se segue abaixo:

a) Colheita de Sangue: Retirar assepticamente 10 ml de sangue venoso de cada um dos indivíduos com auxílio de seringa estéril heparinizada (Liquemine ROCHE, 5000 U/ml).

b) Separação de Linfócitos: Na capela de fluxo laminar, transferir o conteúdo da seringa para um tubo de ensaio de 20 ml (15 x 125 mm) e diluir em solução salina tamponada (PBS), na proporção 1:1 (Solução Sangüínea). Distribuir 2,5 ml de Ficoll-Hypaque (PHARMACIA-WINTHROP) em três tubos de ensaio de 10 ml (15 x 100 mm), adicionar 6,5 ml da solução sangüínea, inclinando o tubo e deslizando delicadamente a solução sangüínea pela parede do tubo para não modificar o gradiente de densidade do Ficoll-Hypaque. Selar os tubos com rolhas estéreis e fita de Parafilm. Centrifugar a 1500 rpm por 30 minutos à temperatura ambiente.

Na capela de fluxo laminar, recuperar a camada de células (Nuvem Linfocitária) com ajuda de uma pipeta PASTEUR estéril, transferindo-as para um único tubo de ensaio de 8 ml (13 x 100 mm). Adicionar 3 ml de meio de cultura RPMI 1640 (SIGMA), selar com rolha estéril e Parafilm. Centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos, à temperatura ambiente, eliminar o sobrenadante por inversão dentro do fluxo em um copo descartável, ressuspender em 3 ml de meio RPMI 1640, selar com rolha estéril e Parafilm. Centrifugar novamente a 1500 rpm por 10 minutos, à temperatura ambiente, repetindo o mesmo processo por três vezes. Eliminar o sobrenadante por inversão, ressuspender e adicionar 1 ml de meio de cultura RPMI 1640 (Suspensão celular).

c) Viabilidade das células: observar a viabilidade na câmara de NEUBAUER, colocando num tubo de ensaio de 5 ml (10 x 75 mm), 10 µl da solução de AZUL DE TRIPAN mais 10 µl da suspensão celular. Aplicar na câmara de NEUBAUER e examinar ao microscópio (40x), onde as células viáveis são transparentes e as que não são viáveis são azuis e destruídas.

d) Ajustar a concentração celular: Avaliar a concentração da suspensão celular na câmara de NEUBAUER, colocando num tubo de ensaio de 5 ml (10 x 75 mm), 380 µl da solução de TURK mais 20 µl da suspensão celular (diluição 1/20). Aplicar 10 µl da diluição na câmara de NEUBAUER e contar ao microscópio (40x) a quantidade de células presentes nos quatro quadrantes externos. A concentração é calculada a partir da média de células ( $\bar{x}$ ) contidas num volume de 0,0001 ml ou  $10^{-4}$  ml por quadrante, usando a fórmula:

$$\text{Células/ml} = ( \bar{x} ) \times 10^{-4} / \text{ml} \times \text{fator de diluição.}$$

### 3. Cultura de Linfócitos para Análise de Cariótipo:

A técnica utilizada seguiu o protocolo proposto por MOORHEAD *et al.* (1960) com algumas modificações, atualmente empregadas na rotina no Departamento de Genética Médica da Unicamp (HACKEL *et al.*, 1988).

a) Meio de Cultura: O meio para o cultivo dos linfócitos é RPMI 1640 (INTERLAB) num volume de 5 ml por frasco, contendo 20% de soro fetal bovino (CULTILAB), 0,1 ml de fitohemaglutinina P (DIFCO) e antibióticos (Penicilina G potássica e gentamicina).

b) Semeadura: inocular cerca de  $1 \times 10^6$  cel/ml de Meio de cultura, sendo esta operação realizada em câmara asséptica ou fluxo laminar.

c) Período de incubação: As culturas foram submetidas a dois períodos de incubação: de 48 horas e de 72 horas a fim de verificar a freqüência de alterações cromossômicas em diferentes gerações de multiplicação celular "*in vitro*".

d) Interrupção da cultura: Adicionar 0,1 ml de colquicina (SIGMA)  $4 \times 10^{-5}$  M duas horas antes do final do período de incubação de 48 horas, e uma hora antes do final das culturas de 72 horas. Ao término dos períodos de incubação, retirar os frascos da estufa, agitá-los levemente e transferir o seu conteúdo para tubos cônicos de vidro de 15 ml (15 x 123 mm). Centrifugar por 5 minutos a 900 rpm e retirar o sobrenadante.

e) Hipotonia.- Utilizar solução hipotônica de KCl 0.075 M aquecida a 37 °C. A hipotonia é feita de forma progressiva, acrescentando 1 ml de solução a cada 10 minutos,

ressuspensão delicadamente o sedimento com pipeta PASTEUR. Após 50 minutos, interromper a hipotonia acrescentando 0,5 ml de fixador (metanol-ácido acético glacial em uma proporção 3:1) recém preparado e ressuspender.

f) Fixação: Centrifugar o material por 5 minutos a 900 rpm. Retirar o sobrenadante, ressuspender o sedimento, acrescentar 4 ml de fixador em cada tubo, ressuspender o material com uma pipeta PASTEUR e centrifugar a 900 rpm por 5 minutos, retirar o sobrenadante e repetir o procedimento por mais três vezes. Após a última lavagem com fixador deixar uma quantidade do sobrenadante proporcional ao sedimento e refrigerar a -20°C por um período de, no mínimo, 1 hora. Retirar do refrigerador, deixar retornar à temperatura ambiente e continuar com a última lavagem, centrifugar, eliminar o sobrenadante deixando uma proporção igual ao sedimento e ressuspender.

g) Preparação das lâminas: Passar as lâminas limpas em álcool-éter e enxugar com papel absorvente. Pingar 3-4 gotas do material ressuspensionado sobre a lâmina levemente inclinada e deixar secar em estufa a 60 °C.

h) Coloração das lâminas: as lâminas são coradas pela coloração usual com Giemsa (GURR) a 6% diluído em tampão Sorensen, a pH 6,8 por 10 a 15 minutos.

#### **4. Análise de Lâminas:**

Na determinação das aberrações cromossômicas estruturais foram selecionadas metáfases em boas condições de análise, espalhadas e bem coradas. Foram analisadas células



com o conteúdo diplóide de 46 cromossomos ou mais, desprezando as metáfases com menos de 46 cromossomos. A análise foi feita sob lente de imersão de 100x e ocular de 10x.

As lâminas foram codificadas para análise em teste-cego. Sempre que possível, foram analisadas 50 metáfases por cultura de 48 e de 72 horas por indivíduo.

### **5. Análise Estatística:**

O teste de qui-quadrado de BRANDT-SNEDECOR (SNEDECOR, 1948) foi utilizado para comparar as proporções de metáfases com quebras e/ou falhas cromossômicas e cromatídicas observadas em cultura de 48 horas e de 72 horas nos indivíduos expostos e nos controles, onde os valores  $X^2$  calculados foram comparados com o valor de  $X^2$  crítico = 3,841 para 1 grau de liberdade e o  $X^2$  crítico = 7,815 para 3 graus de liberdade, ao nível de significância de 5%.

Para os resultados citogenéticos observados somente em culturas de 72 horas, realizou-se a comparação de proporções pelo teste do qui-quadrado ou, quando indicado, pelo teste exato de FISHER. Nesse caso, fez-se uso do programa Microstat (Ecosoft Inc. 1984).

Na análise de regressão simples foi empregada o teste de correlação de SPERMANN, admitindo-se o nível de significância de 5%, para avaliar a influência da idade, do tempo de exposição e da concentração de mercúrio na urina sobre as taxas de quebras e/ou de falhas cromossômicas e cromatídicas, também com o auxílio do programa Microstat.

#### ***IV - RESULTADOS***

Os dados apresentados nas tabelas IV.1 e IV.2, mostram as informações referentes à idade, ao tempo de trabalho na firma, o nível de mercúrio na urina e os achados citogenéticos do estudo das culturas de linfócitos dos indivíduos com exposição ocupacional ao mercúrio. Nas tabelas IV.3 e IV.4, encontram-se os valores referentes à idade e aos resultados do estudo citogenético dos indivíduos controles.

Das 27 amostras de sangue periférico processadas dos indivíduos expostos (Grupo E) 12 apresentaram crescimento satisfatório em ambos os tempos de cultura (subgrupo E.1), 12 apresentaram metáfases para análise apenas em culturas de 72 horas (subgrupo E.2) e 3 foram excluídas por não exibirem metáfases em nenhum dos tempos de cultivo. Nas 10 amostras coletadas dos indivíduos controles (Grupo C), em cinco casos obteve-se material suficiente para análise em ambos os tempos de cultura (subgrupo C.1) e nos cinco restantes, apenas em culturas de 72 horas (subgrupo C.2).

Com o auxílio do teste de BRANDT-SNEDECOR, foram comparados os parâmetros avaliados em culturas de 48 horas e de 72 horas de 12 indivíduos expostos (subgrupo E.1, amostras 1-12) e de 5 indivíduos controles (subgrupo C.1, amostras 1-5). Os resultados dessa análise estatística acham-se representados nas tabelas IV.5, IV.6 e IV.7.

TABELA IV.1 - ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS DOS INDIVÍDUOS EXPOSTOS EM CULTURA DE 48 HORAS

INDIVÍDUOS EXPOSTOS			ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS					DOSAGEM NA URINA
Registro DGM (Cód.)	Idade (anos)	Tempo de exposição (meses)	Quebras	Falhas	Nº de céls hiper-diploides	Nº de céls anormais	Nº total de metafases analisadas	Mercurio (µg/g. Creat.)
01. 6508 (01)	25	36	10	2	0	11*	44	05,2
02. 6810 (13)	39	46	0	0	0	0	50	19,9
03. 6904 (19)	34	01	1	1	0	2	50	15,4
04. 6905 (20)	30	01	2	0	0	2	50	29,8
05. 6979 (21)	43	29	2	1	0	3	50	09,2
06. 6977 (25)	33	72	1	1	0	2	50	14,1
07. 6978 (27)	27	13	1	2	0	3	50	39,9
08. 7007 (28)	25	28	1	0	0	1	50	27,4
09. 6417 (29)	32	18	0	1	0	1	50	25,0
10. 7462 (30)	23	29	1	0	0	1	50	15,8
11. 6507 (32)	24	24	1	0	0	1	50	10,2
12. 7496 (33)	28	48	0	0	0	0	50	05,6
<b>SUBGRUPO E.1</b>	$\bar{X} = 30,3$	$\bar{X} = 28,8$	<b>20</b>	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>27</b>	<b>594</b>	$\bar{X} = 18,1$ $s = 10,6$

\* 1 célula com 2 quebras.

TABELA IV.2 - ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS DOS INDIVÍDUOS EXPOSTOS EM CULTURA DE 72 HORAS

INDIVÍDUOS EXPOSTOS			ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS					DOSAGEM NA URINA
Registro DGM (Cód.)	Idade (anos)	Tempo de Fumante exposição (meses) (S/N)	Quebras	Falhas	Nº de céls hiper-diplóides	Nº de céls anormais	Nº total de metafases analisadas	Mercurio ( $\mu\text{g/g. Creat.}$ )
01. 6508 (01)	25	36 S	2	4	0	6	50	05,2
02. 6810 (13)	39	46 N	3	0	0	3	50	19,9
03. 6904 (19)	34	01 N	3	0	0	3	50	15,4
04. 6905 (20)	30	01 S	1	0	1	2	50	29,8
05. 6979 (21)	43	29 S	0	0	1	1	50	09,2
06. 6977 (25)	33	72 N	1	0	0	1	50	14,1
07. 6978 (27)	27	13 N	0	0	0	0	50	39,9
08. 7007 (28)	25	28 S	1	1	0	2	50	27,4
09. 6417 (29)	32	18 S	1	4	0	3*	50	25,0
10. 7462 (30)	23	29 N	0	0	0	0	50	15,8
11. 6507 (32)	24	24 N	0	1	1	2	50	10,2
12. 7496 (33)	28	48 N	0	0	0	0	50	05,6
<b>SUBGRUPO E.1</b>	$\bar{X} = 30,3$	$\bar{X} = 28,8$	12	10	3	23	600	$\bar{X} = 18,1$ $s = 10,6$

\* 1 célula com 3 falhas

Cont.

INDIVÍDUOS EXPOSTOS				ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS				DOSAGEM NA URINA	
Registro DGM (Cód.)	Idade (anos)	Tempo de exposição (meses)	Fumante (S/N)	Quebras	Falhas	Nº de céls hiper-diplóides	Nº de céls anormais	Nº total de metafases analisadas	Mercurio (µg/g. Creat.)
13. 6533 (05)	40	01	S	0	1	0	1	50	40,1
14. 6548 (06)	21	09	N	2	3	0	5	50	15,4
15. 6592 (08)	23	08	N	2	1	0	3	50	09,3
16. 6549 (09)	25	02	N	4	1	0	5	50	14,0
17. 6471 (10)	38	12	N	0	1	0	1	50	23,5
18. 6532 (03)	20	02	S	1	0	0	1	50	46,0
19. 6809 (12)	30	60	S	1	0	0	1	50	13,4
20. 6881 (14)	20	04	N	0	1	0	1	50	26,4
21. 6882 (15)	20	04	N	0	0	0	0	50	64,7
22. 6470 (17)	20	15	N	3	1	0	3*	50	16,4
23. 6937 (22)	41	48	S	5	1	0	6	50	30,0
24. 6938 (23)	46	72	N	3	0	0	3	50	05,3
<b>SUBGRUPO E.2</b>	$\bar{x} = 28,7$ $s = 09,9$	$\bar{y} = 19,8$ $s = 25,2$		21	10	0	30	600	$\bar{y} = 25,4$ $s = 17,4$
<b>TOTAL</b>	$\bar{x} = 29,5$ $s = 08,1$	$\bar{y} = 24,3$ $s = 22,8$		33	20	3	53	1200	$\bar{y} = 21,8$ $s = 14,6$

\* 1 célula com 2 quebras.

TABELA IV.3 - ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS DOS INDIVÍDUOS CONTROLES EM CULTURA DE 48 HORAS

INDIVÍDUOS CONTROLES		ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS					
Registro DGM (Cód.)	Idade (anos)	Fumante (S/N)	Quebras	Falhas	Nº de céls hiper-diplóides	Nº de céls anormais	Nº total de metafases analisadas
1. 6510 (02)	40	?	0	1	0	1	50
2. 7107 (07)	29	N	1	0	0	1	50
3. 6595 (26)	27	N	1	0	0	1	50
4. 7463 (31)	32	N	1	0	0	1	50
5. 7159 (34)	30	N	0	0	0	0	50
<b>SUBGRUPO C.1</b>	$\bar{x} = 31,6$ $s = 05,0$		3	1	0	4	250

TABELA IV.4 - ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS DOS INDIVÍDUOS CONTROLE EM CULTURA DE 72 HORAS

INDIVÍDUOS CONTROLES		ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS						
Registro DGM (Cód.)	Idade (anos)	Fumante (S/N)	Quebras	Falhas	Nº de céls hiper-diplóides	Nº de céls anormais	Nº total de metafases analisadas	
01. 6510 (02)	40	?	0	1	0	1	50	
02. 7107 (07)	29	N	1	3	0	4	50	
03. 6595 (26)	27	N	1	1	1	3	50	
04. 7463 (31)	32	N	0	0	0	0	50	
05. 7159 (34)	30	N	0	0	1	1	50	
<b>SUBGRUPO E.1</b>	$\bar{x} = 31,6$ $s = 05,0$		<b>2</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>9</b>	<b>250</b>	
06. 6483 (04)	40	?	0	2	1	3	50	
07. 6811 (11)	26	?	0	0	0	0	50	
08. 6883 (16)	30	N	1	1	0	2	50	
09. 6906 (18)	27	N	0	2	0	2	50	
10. 6940 (24)	24	S	1	0	0	1	50	
<b>SUBGRUPO E.2</b>	$\bar{x} = 29,4$ $s = 06,3$		<b>2</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>250</b>	
<b>TOTAL</b>	$\bar{x} = 30,5$ $s = 05,5$		<b>4</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	<b>17</b>	<b>500</b>	



**Tabela IV.5** - Distribuição do número de metáfases com quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas em culturas de linfócitos de 48 horas e de 72 horas, de 12 indivíduos com exposição ocupacional ao mercúrio (Subgrupo E.1) e 5 indivíduos controles (Subgrupo C.1).

Tempo de cultura	Indivíduos	Nº de metáfases com aberração estrutural (%)	Nº total de células analisadas	Qui-quadrado calculado
48 horas	Controle (C.1)	04 (1,6)	250	$X^2 = 4,6273^*$ ; 1 G.L. $0,02 < P < 0,05$
	Expostos (E.1)	27 (4,5)	594	
	Subtotal	31 (3,7)	844	
72 horas	Controle (C.1)	07 (2,8)	250	$X^2 = 0,1545$ ; 1 G.L. $0,50 < P < 0,70$
	Expostos (E.1)	20 (3,3)	600	
	Subtotal	27 (3,2)	850	
Cultura de 48 horas Vs. 72 horas				$X^2 = 0,3151$ ; 1 G.L. $0,50 < P < 0,70$
Total tabela				$X^2 = 5,0969$ ; 3 G.L. $0,10 < P < 0,20$

\* Significativo ao nível do 5 %.

A tabela IV.5, demonstra a distribuição do número de metáfases com quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas em cultura de linfócitos de 48 horas e de 72 horas, de indivíduos com exposição ocupacional ao mercúrio e indivíduos controles. Observou-se uma diferença estatística significativa na comparação dos indivíduos expostos (4,5%) versus os controles (1,6%) em culturas de 48 horas, não existindo, no entanto, diferença significativa entre expostos (3,3%) e controles (2,8%) em culturas de 72 horas. A comparação entre os valores totais referentes às culturas de 48 (3,7%) e de 72 (3,2%) horas também não revelou diferenças significativas.

**Tabela IV.6** - Distribuição do número de metáfases com quebras cromossômicas e cromatídicas em culturas de linfócitos de 48 horas e de 72 horas, de 12 indivíduos com exposição ocupacional ao mercúrio (Subgrupo E.1) e 5 indivíduos controles (Subgrupo C.1).

Tempo de cultura	Indivíduos	Nº de metáfases com quebras (%)	Nº total de células analisadas	Qui-quadrado calculado
48 horas	Controle (C.1)	03 (1,2)	250	$X^2 = 3,3750$ ; 1 G.L. $0,05 < P < 0,10$
	Expostos (E.1)	19 (3,2)	594	
	Subtotal	22 (2,6)	844	
72 horas	Controle (C.1)	02 (0,8)	250	$X^2 = 1,2212$ ; 1 G.L. $0,20 < P < 0,30$
	Expostos (E.1)	12 (2,0)	600	
	Subtotal	14 (1,6)	850	
Cultura de 48 horas Vs. 72 horas				$X^2 = 1,8750$ ; 1 G.L. $0,10 < P < 0,20$
Total tabela				$X^2 = 6,4712$ ; 3 G.L. $0,05 < P < 0,10$

Para os mesmos grupos, a análise da distribuição do número de metáfases com quebras cromossômicas e cromatídicas em culturas de linfócitos de 48 horas e de 72 horas, de indivíduos com exposição ocupacional ao mercúrio e indivíduos controles, apresentadas na tabela IV.6, não revelou uma diferença significativa na comparação dos indivíduos expostos com seus controles para as culturas de 48 horas e 72 horas, nem mesmo quando ambos tempos de culturas foram comparados entre si.

**Tabela IV.7** - Distribuição do número de metáfases com falhas cromossômicas e cromatídicas em culturas de linfócitos de 48 horas e de 72 horas, de 12 indivíduos com exposição ocupacional ao mercúrio (Subgrupo E.1) e 5 indivíduos controles (Subgrupo C.1).

Tempo de cultura	Indivíduos	Nº de metáfases com falhas (%)	Nº total de células analisadas	Qui-quadrado calculado
48 horas	Controle (C.1)	01 (0,4)	250	$X^2 = 1,1117$ ; 1 G.L. $0,20 < P < 0,30$
	Expostos (E.1)	08 (1,3)	594	
	Subtotal	09 (1,1)	844	
72 horas	Controle (C.1)	05 (2,0)	250	$X^2 = 0,6172$ ; 1 G.L. $0,30 < P < 0,50$
	Expostos (E.1)	08 (1,3)	600	
	Subtotal	13 (1,5)	850	
Cultura de 48 horas Vs. 72 horas				$X^2 = 0,1709$ ; 1 G.L. $0,30 < P < 0,50$
Total tabela				$X^2 = 2,5546$ ; 3 G.L. $0,30 < P < 0,50$

Na tabela IV.7, os resultados da análise da distribuição do número de metáfases com falhas cromossômicas e cromatídicas não revelaram diferenças significativas entre os indivíduos expostos e os controles, tanto para as culturas de 48 horas como para as de 72 horas, o mesmo acontecendo em relação a ambos tempos de culturas.

A partir da análise dos resultados das tabelas IV.5, IV.6 e IV.7, torna-se evidente que a diferença observada nas culturas de 48 horas entre controles e expostos (tabela IV.5) pode ser atribuída a um aumento do número de metáfases com alterações estruturais de

ambos os tipos (cromossômicas e cromatídicas) no grupo exposto. Entretanto, cabe ressaltar que esse aumento deixa de ser significativo quando cada tipo de alteração (somente quebras ou somente falhas) é analisado separadamente. Observou-se ainda que o aumento do número de metáfases com alterações estruturais pode ser atribuído a uma única amostra, correspondente ao indivíduo com número de registro 6508 (amostra N° 1), que apresentou uma elevada frequência de metáfases com alterações estruturais (11/44) em uma cultura onde não foi possível analisar as 50 metáfases preconizadas. Os dados relativos a essa amostra de 48 horas diferem significativamente dos demais ( $X^2 = 45,823$ ;  $P \lll 1$  para 1 G.L.) o que permite supor que pode ter havido algum problema de contaminação química ou biológica nos frascos onde esse material foi inoculado para cultura de 48 horas.

Tendo em vista essa última observação, os dados relativos a esse indivíduo foram excluídos e se realizou a análise comparativa entre os 11 indivíduos restantes do subgrupo E.1 e os controles (subgrupo C.1) pelo teste de Brandt-Snedecor. Nessas amostras, nas culturas de 48 horas foram observadas 1,8% de metáfases com quebras e 1,1% de metáfases com falhas nos expostos e 1,2% de metáfases com quebras e 0,4% de metáfases com falhas nos controles. Nas culturas de 72 horas foram observadas 1,8% de metáfases com quebras e 0,7% de metáfases com falhas nos expostos e 0,8% de metáfases com quebras e 2,0% de metáfases com falhas nos controles. Nessa situação, não existe diferença significativa entre o grupo exposto e o grupo controle, em relação à frequência de metáfases com alterações estruturais, quer em 48 horas ( $X^2 = 1,1847$ ;  $0,20 < P < 0,30$  para 1 G.L.) quer em 72 horas de cultura ( $X^2 = 0,0442$ ;  $0,80 < P < 0,90$  para 1 G.L.) ou quando se comparam ambos os tempos de cultura ( $X^2 = 0,0281$ ;  $0,80 < P < 0,90$  para 1 G.L.).

Para realizar a análise estatística dos resultados de todas as amostras de 72 horas, efetuou-se inicialmente a comparação entre os números de metáfases com aberrações

estruturais dos indivíduos expostos do subgrupo E.1 (amostras 1-12) e do subgrupo E.2 (amostras 13-24), não sendo detectadas diferenças significativas em relação a esses parâmetros, quer em conjunto (quebras e falhas), quer isoladamente. Os resultados da análise estatística pelo teste exato de FISHER acham-se representados na tabela IV.8.

Em relação aos dois subgrupos de indivíduos controles (C.1 e C.2), tais comparações não foram realizadas, tendo em vista que o número total de metáfases com aberrações estruturais foi idêntico em ambos os casos, para o mesmo número de metáfases analisadas.

Realizou-se então a comparação entre o número de metáfases com aberrações estruturais para todas as amostras de 72 horas dos indivíduos expostos (n=24) e dos controles (n=10). Foram observadas 2,7% de metáfases com quebras e 1,5% de metáfases com falhas no grupo exposto e 0,8% de metáfases com quebras e 2,0 % de metáfases com falhas no grupo controle. Os resultados dessa análise segundo o teste exato de FISHER (tabela IV.9), revelam diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação ao número de metáfases com quebras cromatídicas e cromossômicas entre expostos e controles. No entanto não foram constatadas diferenças significativas em estas amostras quando os dados são analisados em conjunto (quebras + falhas), o mesmo sendo verdadeiro para a comparação entre o número de metáfases com falhas.

Com o objetivo de avaliar se o maior número de metáfases com alterações cromossômicas nos indivíduos expostos podia ser decorrente do hábito do tabagismo, realizou-se a comparação dos dados relativos aos fumantes (n=9) e não fumantes (n=15) expostos em cultura de 72 horas. Verificou-se não existirem diferenças significativas quer

**Tabela IV.8** - Número de metáfases com aberrações estruturais em cultura de linfócitos de 72 horas, entre os indivíduos expostos do subgrupo E.1 com cultura de 48 horas e indivíduos expostos do subgrupo E.2 sem cultura de 48 horas.

<b>Subgrupo Amostras</b>	<b>N° de céls. com aberraç. estrutural</b>	<b>N° de céls. sem aberraç. estrutural</b>	<b>N° total de células analisadas</b>	<b>Probabilidade exata de FISHER</b>
--------------------------	--	--	---------------------------------------	--------------------------------------

<b>A) Quebras e Falhas:</b>				
E.1. (01 - 12)	20	580	600	P = 0,1521
E.2. (13 - 24)	30	570	600	
<b>Total</b>	<b>50</b>	<b>1150</b>	<b>1200</b>	

<b>B) Quebras</b>				
E.1. (01 - 12)	12	588	600	P = 0,1573
E.2. (13 - 24)	20	580	600	
<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>1168</b>	<b>1200</b>	

<b>C) Falhas:</b>				
E.1. (01 - 12)	08	592	600	P = 0,6453
E.2. (13 - 24)	10	590	600	
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>1182</b>	<b>1200</b>	

**Tabela IV.9** - Número de metáfases com aberrações estruturais para todas as amostras com cultura de linfócitos de 72 horas dos indivíduos expostos (Grupo E, n=24) e indivíduos controles (Grupo C, n=10).

Indivíduos cult. 72 h.	Nº de céls. com aberraç. estrutural	Nº de céls. sem aberraç. estrutural	Nº total de células analisadas	Probabilidade exata de FISHER
------------------------	-------------------------------------	-------------------------------------	--------------------------------	-------------------------------

**A) Quebras e Falhas:**

Controles	14	486	500	P = 0,1762
Expostos	50	1150	1200	
Total	64	1636	1700	

**B) Quebras**

Controles	4	496	500	P = 0,0102*
Expostos	32	1168	1200	
Total	36	1664	1700	

**C) Falhas:**

Controles	10	490	500	P = 0,4627
Expostos	18	1182	1200	
Total	28	1672	1700	

\* Significativo ao nível de 1 %.

em relação ao número de metáfases com quebras ( $X^2 = 0,019$ ;  $P = 0,8912$  para 1 G.L.), falhas ( $X^2 = 2,658$ ;  $P = 0,1031$  para 1 G.L.) ou com hiperdiploidia ( $X^2 = 1,092$ ;  $P = 0,2961$  para 1 G.L.).

Realizou-se ainda uma análise comparativa entre os tipos de lesões cromossômicas e cromatídicas, tanto para culturas de 48 horas representados por 11 indivíduos expostos ocupacionalmente ao mercúrio e 5 indivíduos controles, como para culturas de 72 horas representados por 24 indivíduos com exposição ocupacional ao mercúrio e 10 indivíduos controles. Observou-se que para as culturas de 48 horas não existe uma diferença significativa entre os tipos de lesões cromossômicas e cromatídicas entre expostos e controles (tabela IV.10) e nas culturas de 72 horas (tabela IV.11), constatou-se um excesso de lesões do tipo cromossômico, significativo ao nível de 1 %.

De uma forma ilustrativa, as tabelas IV.12 e IV.13 apresentam a distribuição das quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas segundo o grupo cromossômico, para as culturas de 48 e 72 horas. O predomínio das lesões nos grupos A, B e C pode ser facilmente explicado, tendo em vista que se tratam dos grupos cromossômicos de maior tamanho ou de cromossomos de tamanho médio presentes em maior número no cariótipo humano (15 cromossomos do grupo C), nos quais é mais fácil detectar visualmente as alterações.

Os resultados da análise estatística pelo teste de correlação de SPERMANN dos parâmetros avaliados em culturas de linfócitos de 48 horas e 72 horas, acham-se representados nas tabelas IV.14 e IV.15.



**Tabela IV.10** - Distribuição das lesões cromossômicas e cromatídicas observadas em cultura de linfócitos de 48 horas, de 11 indivíduos com exposição ocupacional ao mercúrio e de 5 indivíduos controles.

Tipo de lesão	Natureza	Número de lesões	
		expostos	controle
C R O M O S S Ô M I C A S	Quebra	5	3
	Falha	4	0
	Subtotal	9	3
C R O M A T Í D I C A S	Quebra	5	0
	Falha	2	1
	Subtotal	7	1
TOTAL		16	4

$$X^2 = 0,469; \quad 1 \text{ G. L.}; \quad P = 0,4936$$

$$P \text{ (Fisher)} = 0,5676$$

**Tabela IV.11** - Distribuição das lesões cromossômicas e cromatídicas observadas em cultura de linfócitos de 72 horas, de 24 indivíduos com exposição ocupacional ao mercúrio e de 10 indivíduos controle.

Tipo de lesão	Natureza	Número de lesões	
		expostos	controle
C R O M O S S Ô M I C A S	Quebra	26	3
	Falha	18	4
	Subtotal	44	7
C R O M A T Í D I C A S	Quebra	7	1
	Falha	2	6
	Subtotal	9	7
TOTAL		53	14

$$X^2 = 6,642^* \quad 1 \text{ G. L.}; \quad P = 0,00996$$

$$P (\text{Fisher}) = 0,0189$$

\* Significância ao nível do 1 %.

**Tabela IV.12** - Distribuição das quebras e das falhas cromossômicas e cromatídicas segundo o grupo cromossômico de 11 indivíduos com exposição ocupacional ao mercúrio e 5 indivíduos controles em culturas de linfócitos de 48 horas

A) Indivíduos Expostos: (n=11)

Grupos Cromossômicos	Quebras	Falhas	Total	
			N	%
A	5	4	9	56,25
B	0	1	1	06,25
C	4	1	5	31,25
D	1	-	1	06,25
E	-	-	-	-
F	-	-	-	-
G	-	-	-	-
<b>TOTAL</b>	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>16</b>	<b>100</b>

A) Indivíduos Controles: (n=5)

Grupos Cromossômicos	Quebras	Falhas	Total	
			N	%
A	1	-	1	25,0
B	-	-	-	-
C	2	-	2	50,0
D	-	1	1	25,0
E	-	-	-	-
F	-	-	-	-
G	-	-	-	-
<b>TOTAL</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>100</b>

**Tabela IV.13** - Distribuição das quebras e das falhas cromossômicas e cromatídicas segundo o grupo cromossômico de 24 indivíduos com exposição ocupacional ao mercúrio e 10 indivíduos controles em culturas de linfócitos de 72 horas

A) Indivíduos Expostos: (n = 24)

Grupos Cromossômicos	Quebras	Falhas	Total	
			N	%
A	12	8	20	40
B	5	2	7	14
C	10	9	19	38
D	-	-	-	-
E	3	1	4	8
F	-	-	-	-
G	-	-	-	-
<b>TOTAL</b>	<b>30</b>	<b>20</b>	<b>50</b>	<b>100</b>

A) Indivíduos Controles: (n = 10)

Grupos Cromossômicos	Quebras	Falhas	Total	
			N	%
A	2	7	9	64,3
B	-	1	1	07,1
C	2	2	4	28,6
D	-	-	-	-
E	-	-	-	-
F	-	-	-	-
G	-	-	-	-
<b>TOTAL</b>	<b>4</b>	<b>10</b>	<b>14</b>	<b>100</b>

**Tabela IV.14** - Resultados da análise de correlação entre as variáveis idade, tempo de exposição, dosagem de mercúrio urinário e a frequência de alterações estruturais (quebras, falhas e quebras mais falhas) em culturas de 48 horas, relativas aos 11 indivíduos com exposição ocupacional ao mercúrio.

x	$r_{(s)}$	$t_{(10)}$	P
<b>y = QUEBRAS</b>			
Idade	0,0201	0,060	0,9532
Tempo	-0,3483	1,115	0,2938
Mercúrio	0,0905	0,272	0,7914
<b>y = FALHAS</b>			
Idade	0,4077	1,340	0,2132
Tempo	-0,2304	0,710	0,4955
Mercúrio	0,1274	0,385	0,7089
<b>y = QUEBRAS + FALHAS</b>			
Idade	0,2502	0,775	0,4581
Tempo	-0,4173	1,378	0,2016
Mercúrio	0,2030	0,622	0,5495

A frequência de alterações estruturais em culturas de 48 horas dos indivíduos expostos não apresentou correlação significativa com a idade dos trabalhadores, com o tempo de exposição ou com a dosagem de mercúrio na urina. (tabela IV.14).

**Tabela IV.15** - Resultados da análise de correlação entre as variáveis idade, tempo de exposição, dosagem de mercúrio urinário e a frequência de alterações estruturais (quebras, falhas e quebras mais falhas) em culturas de 72 horas, de 24 indivíduos com exposição ocupacional ao mercúrio.

x	$r_s$	t (22)	P
<b>y = QUEBRAS</b>			
Idade	0,1491	0,707	0,4868
Tempo	0,1052	0,496	0,6246
Mercúrio	-0,2048	0,977	0,3390
<b>y = FALHAS</b>			
Idade	-0,2066	0,990	0,3328
Tempo	-0,1558	0,740	0,4672
Mercúrio	-0,0443	0,208	0,8370
<b>y = QUEBRAS + FALHAS</b>			
Idade	0,1345	0,637	0,5310
Tempo	0,0183	0,086	0,9324
Mercúrio	-0,2806	1,371	0,1842

Também não foram significativas as correlações entre essas mesmas variáveis, para cultura de 72 horas dos indivíduos expostos. (tabela 15).

Em relação aos indivíduos controles, não foram constatadas correlações significativas entre as metáfases com aberrações estruturais e a idade, nesse grupo de indivíduos, quer em cultura de 48 horas ( $r_s = 0$ ), quer em cultura de 72 horas ( $r_s = 0,0750$ ;  $t = 0,213$ ;  $P = 0,8368$ ).

## ***V - DISCUSSÃO***

As várias ações dos compostos mercuriais em nível celular dependem essencialmente da concentração final dessas substâncias na célula, do tempo de exposição e de suas interações com radicais sulfidríla e dissulfetos disponíveis no microambiente celular (ROZYNKOWA & RACZKIEWICZ, 1977). Os vapores de mercúrio metálico, inodoros e incolores, são rapidamente absorvidos pela via respiratória. Em nível celular, o mercúrio metálico é oxidado a íon mercúrico ( $Hg^{++}$ ) por enzimas do sistema catalase-peroxidase. Esse íon, por sua vez, liga-se com relativa facilidade aos grupos sulfidríla de proteínas, enzimas e de moléculas menores tais como a coenzima A, interferindo assim no metabolismo e alterando a permeabilidade da membrana celular (CANTONI & COSTA, 1983; AZEVEDO, 1989).

*In vitro*, os efeitos genotóxicos desse metal pesado parecem estar relacionados à sua interação com grupos sulfidríla das tubulinas, (proteínas do fuso mitótico), alterando a divisão celular e a segregação dos cromossomos (VERSCHAEVE *et al.*, 1985; BETTI *et al.*, 1992). Esse fenômeno, que pode resultar num aumento de células com aberrações numéricas dos cromossomos, é mais evidente para compostos orgânicos de mercúrio do que para seus derivados inorgânicos (DE FLORA *et al.*, 1994).

Dentre os estudos *in vivo* previamente relatados na literatura, o aumento na frequência de células aneuplóides foi relatado por SKERFVING *et al.* (1974) em indivíduos que consumiram peixe contaminado com metil-mercúrio e por VERSCHAEVE *et al.* (1976) em trabalhadores expostos, em sua maioria, aos compostos orgânicos de mercúrio. Além disso, em ambos os trabalhos os indivíduos exibiam sinais ou sintomas de intoxicação pelo mercúrio.



Já no trabalho relatado por POPESCU *et al.* (1979) onde foram analisadas células de trabalhadores expostos aos vapores metálicos de mercúrio (grupo I) ou ao mercúrio orgânico (grupo II), não se observou aumento na frequência de aneuploidias, apesar de todos os indivíduos examinados apresentarem concentrações muito elevadas de mercúrio na urina. De modo semelhante, MABILLE *et al.* (1984) não detectaram aumento na frequência de células aneuplóides em trabalhadores com exposição ao mercúrio metálico, nos quais as dosagens de mercúrio urinário variaram de 8,2 a 286 µg/g de creatinina, em torno de um valor médio de 117 µg/g de creatinina.

No presente trabalho, a ausência de células hiperdiplóides ( $2n \geq 47$ ) em culturas de 48 horas e o pequeno número observado em cultura de 72 horas (3/1200 células) dos indivíduos expostos permite concluir que nesses trabalhadores os níveis de exposição ao mercúrio não exercem efeito significativo sobre o fuso mitótico, no que diz respeito à indução de falta de disjunção.

Para a avaliação do efeito clastogênico de agentes genotóxicos, o estudo dos linfócitos de sangue periférico em culturas de curta duração é aplicado em programas de monitoramento populacional, tendo em vista a relativa facilidade de obtenção das amostras (AL-SABTI *et al.*, 1992).

De acordo com NATARAJAN e OBE (1984), em situações de exposição ocupacional, ocorre geralmente uma baixa e constante exposição ao agente ao longo de meses ou anos. Durante o período de exposição, um processo contínuo de reparo de DNA deve estar ativado, eliminando ao menos parte das lesões induzidas no DNA. Consequentemente, somente as lesões residuais não reparadas poderiam dar origem às aberrações cromossômicas estruturais. Por esse motivo, recomenda-se, nesse tipo de estudo,

que o tempo de cultura seja de 48 horas para que as células sejam observadas logo após a primeira divisão *in vitro*. As culturas de 72 horas apresentam melhor rendimento, mas cerca de 70 a 75% de células acham-se em segunda ou terceira divisão, o que pode provocar a eliminação de muitas aberrações (RABELLO-GAY, 1991c).

No presente trabalho, houve dificuldade em se obter um bom crescimento celular nas culturas de 48 horas, o que resultou na exclusão de 50% das amostras de cada grupo. Dessa maneira, a análise dos dados referentes às culturas de 48 horas acha-se prejudicada, tendo em vista o pequeno número amostral.

Todavia, a indicação de que a exposição ocupacional ao mercúrio pode ser clastogênica em linfócitos desses trabalhadores advém dos resultados observados em culturas de 72 horas, quando foi possível analisar um maior número de amostras (n=24). Nessa situação, verificou-se um excesso significativo do número de metáfases com quebras cromatídicas e cromossômicas no grupo exposto em relação ao grupo controle (tabela IV.9), além de um predomínio de aberrações do tipo cromossômico sobre as de tipo cromatídico no grupo exposto (tabela IV.11).

Resultados similares aos acima descritos foram relatados por POPESCU *et al.* (1979), que observaram um aumento significativo de quebras cromossômicas, representadas por fragmentos acêntricos, em culturas de 52 horas de linfócitos de indivíduos expostos aos vapores de mercúrio ou a seus derivados orgânicos, ao passo que a frequência de células com falhas ou quebras do tipo cromatídico não diferiu da dos controles.

Já no estudo realizado por MABILLE *et al.* (1984), as aberrações estruturais mais freqüentemente observadas, em culturas de linfócitos de 48 horas de trabalhadores de

indústrias de cloro-soda ou de produção de amálgamas de mercúrio com zinco, foram as falhas cromatídicas, não se constatando diferenças significativas entre os expostos e os controles. Tais autores consideram que a intensidade de exposição ao mercúrio nos trabalhadores acima examinados era muito menor do que a verificada no trabalho de POPESCU *et al.* (1979), o que explicaria a discordância de resultados entre esses dois trabalhos. Finalmente, MABILLE *et al.* (1984) concluem que os parâmetros citogenéticos não seriam adequados para a avaliação da genotoxicidade do mercúrio em exposições dentro dos limites de tolerância biológica.

No estudo realizado por AL-SABTI *et al.* em 1992, em culturas de 48 horas de linfócitos de trabalhadores de mina de mercúrio, as observações são essencialmente as mesmas que as relatadas por POPESCU *et al.* (1979) e as do presente trabalho, em relação ao efeito clastogênico do mercúrio.

Em indivíduos que já se achavam afastados da exposição ocupacional ao mercúrio há pelo menos dois anos, HANSTEEN *et al.* (1993) apontam um aumento na frequência de metáfases com cromossomos dicêntricos e de quebras cromossômicas em culturas de 48 horas de linfócitos de indivíduos com níveis elevados de mercúrio na urina ou com alta exposição acumulada. Embora as diferenças observadas entre expostos e controles não tenham sido significativas, tais observações sugerem que o mercúrio pode atuar como agente indutor de quebras cromossômicas mesmo após um longo intervalo de tempo após a exposição.

As aberrações do tipo cromossômico tem sua origem, muito provavelmente, em alterações cromatídicas presentes nos linfócitos circulantes que não foram reparadas na fase S após o estímulo da fitohemaglutinina. O efeito clastogênico do mercúrio pode estar

relacionado à sua capacidade de induzir quebras no DNA *in vitro*, como demonstrado por CANTONI e COSTA (1983). Tais autores propõem que o efeito desse metal pesado sobre o DNA seja mediado pela geração de radicais superóxido  $O_2^{\cdot-}$  e que a persistência do íon  $Hg^{++}$  na célula poderia inibir o reparo dessas lesões. Com efeito, ROBINSON *et al.* (1984) demonstraram que a persistência do mercúrio bivalente em culturas de células de ovário de hamster chinês pode inibir a atividade de reparo de DNA. Esses autores também observaram que o mercúrio é um indutor de lesões no DNA mais potente do que o cromo ou o níquel, exercendo efeito equivalente tanto em DNA isolado quanto em DNA extraído de células previamente expostas ao  $Hg^{++}$ .

Estudos recentes demonstram que em nível citológico, a habilidade desigual da função de fagocitose dos neutrófilos para reduzir corantes NBT (nitroblue tetrazolium) é refletido na geração diminuída de radicais superóxido e as alterações nas funções quimiotáticas dos neutrófilos pode ser explicado em parte, pela afinidade do mercúrio por grupos sulfidrilos os quais estão relacionados com proteínas estruturais como actina e tubulina, leucócitos com deficiência de microtubulinas apresentam diminuição na capacidade locomotiva da célula *in vivo* e *in vitro* (PERLINGEIRO *et al.*, 1995).

Segundo NATARAJAN (1984), os trabalhadores expostos a agentes genotóxicos geralmente exibem um aumento na frequência de aberrações cromossômicas de diversos tipos. Entretanto, quando as medidas de higiene industrial são implementadas, o nível de exposição passa a ser menor. Nesses casos, os estudos de literatura indicam que as frequências de aberrações nesses trabalhadores são semelhantes aos controles, ou se situam pouco acima desses últimos, o que não necessariamente significa que se tratam de níveis "seguros" de exposição.

Sob esse aspecto, é importante mencionar o estudo realizado por PERLINGEIRO (1993), em 51 trabalhadores expostos ao mercúrio, dentre os quais se incluíam dezessete dos que participaram do presente estudo citogenético. Essa autora constatou uma redução na atividade quimiotática dos neutrófilos desses trabalhadores e a existência de uma correlação linear entre a redução da atividade lítica e o tempo de exposição. Além disso, não houve alteração na capacidade proliferativa de linfócitos em resposta à fitohemaglutinina em presença de soro AB normal, mas uma redução significativa dessa capacidade é observada quando os linfócitos são incubados em soro autólogo. Esses últimos resultados sugerem a presença de um fator inibidor, que pode ser o próprio íon  $Hg^{++}$ , no soro dos indivíduos expostos.

A ativação dos polimorfonucleares dependem da enzima NADPH-oxidase e da presença de NADPH (fostato dinucleotideo adenina nicotinamida) como substrato, o mercúrio liga-se aos anéis de nicotinamida do NADPH formando um composto covalente, limitando a utilização de nucleotideos piridina reduzidos por enzima NADP(H)-dependentes como NADPH-oxidase, interferindo deste modo com a capacidade proliferativa dos polimorfonucleares e na redução da atividade lítica dos trabalhadores expostos ao mercúrio (PERLINGEIRO *et al.*, 1994).

No presente estudo, os linfócitos de trabalhadores expostos e controles foram extensivamente lavados antes de serem inoculados em meio de cultura contendo soro bovino fetal. Desse modo, o efeito clastogênico detectado pode, presumivelmente, estar relacionado à persistência intracelular do íon  $Hg^{++}$  ou ser consequência de alterações previamente induzidas em nível molecular.

No presente trabalho, não foi evidenciado associação estatística significativa entre os achados citogenéticos e o tempo de exposição. Resultados similares foram descritos por HANSTEEN *et al.* (1993), mas, nos indivíduos por eles investigados, a exposição ocupacional havia cessado há dois anos. Os estudos realizados por POPESCU *et al.* (1979) e MABILLE *et al.* (1984) não relacionaram esses parâmetros. Apenas AL-SABTI *et al.* (1992) referem o achado de uma associação não significativa entre o aumento da frequência de células com fragmentos acêntricos e o aumento do tempo de exposição, que não é observada para aberrações do tipo cromatídico.

Tal como em estudos anteriores (VERSCHAEVE *et al.*, 1979 e MABILLE *et al.*, 1984), no presente trabalho não se constatou nenhuma correlação significativa entre as alterações cromossômicas e a dosagem de mercúrio na urina. O trabalho relatado por WAGIDA e GABAL (1990), também revela ausência de correlação significativa entre a frequência de micronúcleos e os níveis de mercúrio na urina. Segundo FRANCHI *et al.* (1994), tais observações sugerem que a urina não é um material biológico adequado para monitorar o nível de exposição, pois os indivíduos que excretam maiores quantidades de mercúrio na urina não necessariamente estão sujeitos a uma maior exposição, mas podem estar excretando esse metal de forma mais eficiente.

Sobre esse aspecto, os estudos realizados em populações cronicamente sujeitas ao consumo de peixes contaminados com metil-mercúrio demonstram que existe uma boa correlação entre a quantidade de mercúrio ingerido e a sua concentração no sangue

---

<sup>\*</sup>VERSCHAEVE *et al.*, apud FRANCHI, E.; LOPRIENO, G.; BALLARDIN, M.; PETROZZI, L.; & MIGLIORE, L. - Cytogenetic monitoring of fishermen with environmental mercury exposure. *Mut. Res.*, 320: 23-29, 1994.

<sup>\*\*</sup>WAGIDA & GABAL apud FRANCHI, E.; LOPRIENO, G.; BALLARDIN, M.; PETROZZI, L.; & MIGLIORE, L. - Cytogenetic monitoring of fishermen with environmental mercury exposure. *Mut. Res.*, 320: 23-29, 1994.

(SHERLOCH *et al.*, 1984). Assim é que, nos estudos realizados por SKERFVING *et al.* (1970 e 1974), foram encontrados correlações positivas significativas entre a concentração de mercúrio no sangue e as frequências de células com aberração cromatídica e cromossômica e aneuploidias. De modo semelhante, no estudo realizado por FRANCHI *et al.* (1994), observou-se uma correlação positiva significativa entre a frequência de micronúcleos e a dosagem de mercúrio no sangue em pescadores de mar Mediterrâneo, em dois anos de monitoramento citogenético.

Desta forma, a ausência de correlação dos achados citogenéticos como o tempo de exposição ou como a dosagem de mercúrio urinário sugere que a avaliação cromossômica não é um bom indicador de risco relacionado ao tempo de exposição, ao menos sob condições adequadas e controladas, dentro dos limites de tolerância biológica.

---

<sup>3</sup>SHERLOCH *et al.*, apud FRANCHI, E.; LOPRIENO, G.; BALLARDIN, M.; PETROZZI, L.; & MIGLIORE, L. - Cytogenetic monitoring of fishermen with environmental mercury exposure. *Mut. Res.*, 320: 23-29, 1994.

## ***VI - CONCLUSÃO***



Os resultados apresentados neste trabalho de investigação permitiram concluir que:

1.- A exposição desses trabalhadores ao mercúrio metálico ao vapor de mercúrio não induziu a formação de células com aberrações numéricas dos cromossomos em proporção significativa, tendo em vista a ausência de células hiperdiplóides em culturas de 48 h e o pequeno número observado nas culturas de 72 h.

2.- O mercúrio exerceu efeito clastogênico em linfócitos dos trabalhadores dessa fábrica, evidenciado pelo aumento significativo do número de metáfases com quebras cromossômicas e cromatídicas no grupo exposto em relação ao grupo controle, observando-se um predomínio das lesões de tipo cromossômico sobre as de tipo cromatídico.

3.- A ausência de correlação dos achados citogenéticos com o tempo de exposição ou com a dosagem de mercúrio urinário sugere que a avaliação cromossômica não é um bom indicador de risco relacionado ao tempo de exposição, ao menos sob condições adequadas e controladas de trabalho, dentro dos limites de tolerância biológica.

Assim os dados obtidos permitem verificar a importância de estudos na monitorização biológica na espécie humana para que de uma ou outra forma poder medir o risco de exposição ocupacional ao nível genético.

***VII - RESUMO***

Os estudos citogenéticos em trabalhadores expostos aos vapores de mercúrio apresentam interesse especial em monitorização biológica, tendo em vista as consequências desastrosas da ingestão de mercúrio observadas na espécie humana. Nesse trabalho foram avaliados os efeitos clastogênicos da exposição ocupacional ao mercúrio, em culturas de linfócitos de sangue periférico de indivíduos que trabalham no reaproveitamento do mercúrio liberado nos afluentes líquidos de uma indústria de cloro-soda, com níveis de mercúrio urinário dentro dos limites de tolerância biológica.

Para 11 indivíduos expostos e 5 controles, realizou-se a análise cromossômica em culturas de 48 e de 72 horas. Nas culturas de 48 horas observaram-se 1,8% de metáfases com quebras e 1,1% de metáfases com falhas nos expostos e 1,2% de metáfases com quebras e 0,4 % de metáfases com falhas nos controles. Nas culturas de 72 horas observaram-se 1,8% de metáfases com quebras e 0,7% de metáfases com falhas nos expostos e 0,8% de metáfases com quebras e 2,0% de metáfases com falhas nos controles. Para a análise estatística desses resultados aplicou-se o teste de  $X^2$  de Brandt-Snedecor, na comparação da frequência de metáfases com alterações cromossômicas nos indivíduos expostos e controles, em ambos os tempos de cultura. Não foram encontradas diferenças significativas para esses parâmetros nessas amostras.

A indicação de que a exposição ocupacional ao mercúrio pode ser clastogênica em linfócitos desses trabalhadores advém dos resultados observados em culturas de 72 horas, quando foi possível analisar um maior número de amostras ( $n=24$ ). Foram observadas 2,7% de metáfases com quebras e 1,5% de metáfases com falhas no grupo exposto e 0,8% de metáfases com quebras e 2,0% de metáfases com falhas no grupo controle ( $n=10$ ). Foram reveladas diferenças significativas em nível de 1% pelo teste exato de Fisher na frequência de metáfases com quebras cromossômicas dos expostos em relação aos controles.

A exposição desses trabalhadores ao mercúrio metálico ao vapor de mercúrio não induziu a formação de células com aberrações numéricas dos cromossomos em proporção significativa, tendo em vista a ausência de células hiperdiplóides em culturas de 48 h e o pequeno número observado nas culturas de 72 h.

A análise de correlação pelo coeficiente de Spermann não evidenciou associações significativas entre os achados citogenéticos e a dosagem de mercúrio urinário, o tempo de exposição e a idade. Esses resultados sugerem que a avaliação cromossômica não é um bom indicador de risco relacionado com o tempo de exposição, dentro dos limites de tolerância biológica.

***VIII - SUMMARY***

Cytogenetic studies in subjects occupationally exposed to mercury vapor have special interest in biological monitorization, because of the disastrous consequences of the mercury ingestion observed in the human species. In this study, clastogenic effects of occupational exposure to mercury were evaluated in peripheral blood lymphocyte cultures of subjects that work with the reutilization of the mercury discharged in the liquid effluents of a chloralkali plant, when an urinary mercury level was within the range of biological tolerance.

Chromosome analyses were performed in 48 and 72 hours lymphocyte cultures from 11 exposed and 5 controls individuals. In the 48 h cultures of the exposed individuals 1.8% of the metaphases presented breaks and 1.1% of metaphases presented gaps. In the control group 1.2% of the metaphases presented breaks and 0.4% of the metaphases presented gaps. In the 72 h cultures of the exposed individuals 1.8% of the metaphases showed breaks and 0.7% of the metaphases showed gaps. In the control group 0.8% of the metaphases showed breaks and 2.0% of the metaphases showed gaps. The  $X^2$  test of Brandt-Snedecor was applied for statistical analysis of the results. This was useful to compare between the frequency of metaphases bearing chromosomal aberrations in the exposed to controls individuals, in both culture times. No significant differences were determined.

The indication that occupational exposure to mercury can be clastogenic at the lymphocyte level became evident from the results observed in the 72 h lymphocytes cultures, where it was possible to analyze larger number of samples (n=24). There were 2.7% of metaphases bearing breaks and 1.5% of metaphases bearing gaps in exposed individuals and 0.8 % of metaphases bearing breaks and 2.0% of metaphases bearing gaps in control individuals (n=10). Significant difference revealed by the use of the exact Fisher test, was found at level of 1% in the frequency of metaphases with chromosomal breaks between exposed and controls individuals.

The exposition to metallic mercury or mercury vapor in those workers did not induce the formation of numerical chromosomal aberrations, once hiperdiployd cells were not observed in 48 h cultures and only a small number was seen in the 72 h cultures.

The correlation analysis performed by using the of Spermann coefficient did not reveal significant associations between the cytogenetic findings and the dose of urinary mercury, the exposure time and the age. These results indicate that the chromosomal evaluation can not be considered a good indicator of risk for the exposure time, within the range of biological tolerance.

***IX - RESUMEN***



Estudios citogenéticos en trabajadores expuestos a los vapores de mercurio tienen especial interés en monitoramiento biológico, debido a las desastrosas consecuencias de la ingestión de mercurio observada en el hombre. En el presente trabajo fueron evaluados los efectos clastogénicos de la exposición ocupacional al mercurio, a través de cultivos de linfocitos de sangre periférico, extraída de individuos que trabajan en la reutilización del mercurio liberado en los afluentes líquidos de una fábrica de cloro-soda, los sujetos presentaron niveles de mercurio urinario dentro de los límites de tolerancia biológica.

Se realizó el estudio cromosómico de 48 y 72 horas para 11 individuos expuestos y 5 controles. En los cultivos de 48 horas fue observado 1.8% de metafases con quiebras y 1.1% de metafases con fallas en los individuos expuestos y 1.2% de metafases con quiebras y 0.4% de metafases con fallas en los controles. En los cultivos de 72 horas fue observado 1.8% de metafases con quiebras y 0.7% de metafases con fallas en los individuos expuestos y 0.8% de metafases con quiebras y 2.0% de metafases con fallas en los controles. Los resultados fueron sometidos a análisis estadístico usando el test de  $X^2$  de Brandt-Snedecor, para la comparación de las frecuencias de metafases con alteraciones cromosómicas de los individuos expuestos y no expuestos. No se detectaron diferencias significativas.

La aseveración de que exposición ocupacional al mercurio puede ser clastogénico en los linfocitos de los trabajadores provienen de los resultados observados en los cultivos de 72 horas, cuando fue posible analizar un número mayor de muestras (n=24). Fueron observados 2.7 % de metafases con quiebras y 1.5 % de metafase con fallas en el grupo expuesto y 0.8% de metafases con quiebras y 2.0% de metafases con fallas en el grupo control (n=10). Se presentaron diferencias significativas a nivel de 1% por el test de Fisher en la frecuencia de metafases con quiebras cromosómicas de los expuestos con relación a los controles.

La exposición de esos trabajadores al mercurio metálico o al vapor de mercurio no indujo la formación de células con aberraciones numéricas de los cromosomas en proporción significativa, debido a la ausencia de células hiperdiploides en cultivos de 48 horas y al poco número observado en los cultivos de 72 horas.

El análisis de correlación por el coeficiente de Spermán no evidenció asociación significativa entre los resultados citogenéticos y el dosaje de mercurio urinario, el tiempo de exposición y la edad. Estos resultados sugieren que la evaluación cromosómica no es un buen indicador del riesgo relacionado con el tiempo de exposición, dentro de los límites de tolerancia biológica.

**ANEXO I****QUESTIONÁRIO: INTOXICAÇÃO POR MERCÚRIO**

1. NOME: .....
2. IDADE: .....
3. ENDEREÇO: .....
4. FIRMA ONDE TRABALHA: .....
5. QUANTO TEMPO TRABALHA COM MERCÚRIO? .....
6. SINTOMAS: .....
- .....
7. TOMA ALGUM REMÉDIO? ..... QUAL? .....
- PORQUE? .....
- QUAL A ÚLTIMA VEZ QUE TOMOU? .....
8. RECEBEU ALGUM MEDICAMENTO (TRATAMENTO MÉDICO) DEVIDO AO MERCÚRIO? .....
9. QUANTAS VEZES RECEBEU AFASTAMENTO POR ORDEM MÉDICA? .....
10. QUANDO TIROU FÉRIAS PELA ÚLTIMA VEZ? .....
- QUANTO TEMPO? .....
11. USA ALGUM EQUIPAMENTO PROTETOR (MÁSCARAS, LUVAS, MACACÃO, ETC.)? ..... QUAL? .....
12. TEM ALGUMA DOENÇA? .....
13. FEZ HEMOGRAMA RECENTEMENTE? .....
14. JÁ FEZ TRANSFUSÃO DE SANGUE ALGUMA VEZ? .....
15. BEBE? ..... QUAL A ÚLTIMA VEZ QUE BEBEU? .....
16. É FUMANTE? .....
17. QUAL A SUA OCUPAÇÃO NA FÁBRICA? .....
18. ONDE TRABALHOU ANTERIORMENTE? .....

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

- AL-SABTI, K.; LLOYD, D.C.; EDWARDS, A.A. & STEGNAR, P. - A survey of lymphocyte chromosomal damage in Slovenian workers exposed to occupational clastogens. *Mut. Res.*, **280**: 215-223, 1992.
- AMORIM, M.I.M.; LEMOS, J.A.R.; MARADEI-PEREIRA, L.M.C. & CABRAL, I.R. - Instabilidade cromossômica adquirida associada a poluentes ambientais. In: Simpósio Latinoamericano de Mutagênese Ambiental, I, Caxambu, 1991. Resumos, Caxambu, 1991. p. 32.
- ATTA, J.A.; FAINTUCH, J.J.; NASCIMENTO, L.O.T. & ROCHA, A.S. - Intoxicação aguda letal por vapor de mercúrio. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo*, **47**: 34-37, 1992.
- AZEVEDO, F.A. - Algumas bases bioquímicas da toxicodinâmica do mercúrio. *Rev. Soc. Bras. Toxicol.*, **2**: 1-9, 1989.
- BARREGÅRD, L.; HÖGSTEDT, B.; SCHÜTZ, A.; KARLSSON, A. ; SÄLLSTEN, G. & THIRINGER, G. - Effects of occupational exposure to mercury vapor on lymphocyte micronuclei. *Scan. J. Work. Environ. Health*, **17**: 263-268, 1991.
- BEIGUELMAN, B. - *Citogenética humana*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982. 328p.
- BETTI, C.; DAVINI, T. & BARALE, R. - Genotoxic activity of methyl mercury chloride and dimethyl mercury in human lymphocytes. *Mut. Res.*, **281**: 255-260, 1992.

- BETTI, C.; DAVINI, T.; HE, J. & BARALE, R. - Liquid holding effects on methylmercury genotoxicity in human lymphocytes. *Mut. Res.*, **301**: 267-273, 1993.
- CANTONI, O. & COSTA, M. - Correlations of DNA strand breaks and their repair with cell survival following acute exposure to mercury (II) and X-ray. *Mol. Pharmacol.*, **24**: 84-89, 1983.
- DE FLORA, S.; BENNICELLI, C. & BAGNASCO, M. - Genotoxicity of mercury compounds: A review. *Mut. Res.*, **317**: 57-79, 1994.
- FAINTUCH, J.J. & ROCHA, A.S. - Intoxicação por mercúrio no Brasil. *Rev. Bras. Med.*, **47**: 505- 509, 1990.
- FERRARI, I. - Teste do micronúcleo em cultura temporária de linfócitos. In: RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.L.R. & MONTELEONE-NETO, R.- *Mutagenese, teratogenese e carcinogenese: métodos e critérios de avaliação*. São Paulo, Sociedade Brasileira de Genética, 1991. p.107-112.
- FERRARI, I.; GONÇALVES, A.; BARBOSA, A.; CENTENO, A.J. & PADOVANI, C.R.; GONÇALVES, N.N.S.; PAIXÃO, N.; BRASILEIRO, I. - Investigação de genotoxicidade em pessoas profissionalmente expostas ao mercúrio em garimpos da Amazônia Legal I - Resultados clínicos e dosimétricos. *Rev. Bras. Saúde Ocup.*, **20**: 54-60, 1992a.
- FERRARI, I.; GONÇALVES, A.; BARBOSA, A.; CENTENO, A.J. & PADOVANI, C.R.; GONÇALVES, N.N.S.; PAIXÃO, N.; BRASILEIRO, I. - Investigação de genotoxicidade em pessoas profissionalmente expostas ao mercúrio em garimpos da Amazônia Legal II - Resultados dosimétricos e genotóxicos. *Rev. Bras. Saúde Ocup.*, **20**: 10-14, 1992b.

- FISKESJÖ, G. - Some results from Allium test with organic mercury halogenides. *Hereditas*, **62**: 314-322, 1969.
- FISKESJÖ, G. - The effects of two organic mercury compounds on human leukocytes *in vitro*. *Hereditas*, **64**: 142- 146, 1970.
- FRANCHI, E.; LOPRIENO, G.; BALLARDIN, M.; PETROZZI, L.; & MIGLIORE, L. - Cytogenetic monitoring of fishermen with environmental mercury exposure. *Mut. Res.*, **320**: 23-29, 1994.
- GEBHART, E. - Sister chromatid exchange (SCE) and structural chromosome aberration in mutagenicity testing. *Hum. Genet.*, **58**: 235-254, 1981.
- GOLDWATER, L.J. - Mercury in the environment *Sci. Amer.*, **224**: 15-21, 1971.
- HACKEL, C.; COSTA, A.C.; CIOLFI, H.N.; SARTORATO, E.; NASCIMENTO, J.A. & ALVES, G.L.- *Técnicas de análise dos cromossomos humanos, Laboratório de citogenética humana*. Departamento de Genética Médica - FCM - UNICAMP. Apostila, 1988.
- HANSTEEN, I.L.; ELLINGSEN, D.G.; CLAUSEN, K.O. & KJUUS, H. - Chromosome aberrations in chloralkali workers previously exposed to mercury vapor. *Scand. J. Work Environ. Health*, **19**: 375-381, 1993.
- HEDDLE, J.A. - A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. *Mut. Res.*, **18**: 187-190, 1973.
- HEDDLE, J.A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MACGREGOR, J.T.; NEWELL, G.W. & SALAMONE, M.F. - The induction of micronuclei as a measure of

genotoxicity: a report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mut. Res.*, **123**: 61-118, 1983.

KATO, R.; NAKAMURA, A. & SAWAI, T. - Chromosome breakage associated with organic mercury in human leukocytes *in vitro* and *in vivo*. *Jpn. J. Hum. Genet.*, **20**: 256-257, 1976.

MABILLE, V.; ROELS, H.; JACQUET, P. LÉONARD, A. & LAUWERYS, R. - Cytogenetic examination of leucocytes of worker exposed to mercury vapor. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **53**: 257-260, 1984.

MAIA, M.; ARAÚJO, M. & MIYOSHI, N. -Reação ao mercúrio usado em tatuagem. Relato de um caso. *An. Bras. Dermatol.*, **63**: 455-457, 1988.

MOOREHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D.M. & HUMGERFORD, D.A. - Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.*, **20**: 613-616, 1960.

NASCIMENTO, L.O.T.; LORENZI-FILHO, G. & ROCHA, A.S. - Intoxicação letal por mercúrio através da ingestão de "merthiolate". *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo*, **45**: 216-218, 1990.

NATARAJAN, A.T. - Origin and significance de chromosomal alterations. In: OBE, G. - Mutations in man. New York, Springer-Verlag, 1984. p.156-176.

NATARAJAN, A.T. & OBE, G. - Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberration. III. Restriction endonucleases. *Chromosoma*, **90**: 120-127, 1984.

- NICHOLS, W.W.; MOOREHEAD, P.& BREWEN, G. Ad Hoc Committee report. - Chromosome methodologies in mutation testing. *Toxicol. Appl. Pharmac.*, **22**: 269-275, 1972.
- OCHI, H. & TONOMURA, A. - The low-dose effect of two organic mercury compounds on cultured human fibroblastic cells. *Mut. Res.*, **31**: 268, 1975.
- PERLINGEIRO, R.C.R. - Função celular em indivíduos com exposição ocupacional ao mercúrio. Campinas, 1993. [Tese - Mestrado - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas]
- PERLINGEIRO, R.C.R. & QUEIROZ, M.L.S. - Measurement of the respiratory burst and chemotaxis in polymorphonuclear leukocytes from mercury-exposed workers. *Hum. Exp. 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.*, **16**: 1011-1017, 1994.
- PERRY, P. & EVANS, H.J. - Cytological detection of mutagen: carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature*, **258**: 121-125, 1975
- POPESCU, H.I.; NEGRU, L. & LANCRANJAN, I. - Chromosome aberration induced by occupational exposure to mercury. *Arch. Environ. Health*, **34**: 461-463, 1979.
- PREGNOLATTO, W.; TOLEDO, M. & SANTESSO, N. - Teor de mercúrio em águas da baixada santista, São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **39**: 5-15, 1979.



- QUEIROZ, M.L.S.; PERLINGEIRO, R.C.R.; DANTAS, D.C.M.; ANNICHINO BIZZACCHI, J.M. & DE CAPITANI, E.M. - Immunoglobulin leves in workers occupationally exposed to inorganic mercury. *Pharmacol. Toxicol.*, **74**: 72-75, 1994.
- RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.L.R. & MONTELEONE-NETO, R. - *Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação*. 1.ed. São Paulo, Sociedade Brasileira de Genética, 1991. 241p.
- RABELLO-GAY, M.N. - Teste de metáfases da medula óssea. In: RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.L.R. & MONTELEONE-NETO, R.- *Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação*. São Paulo, Sociedade Brasileira de Genética, 1991a. p.77-82.
- RABELLO-GAY, M.N. - Teste do micronúcleo em medula óssea. In: RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.L.R. & MONTELEONE-NETO, R.- *Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação*. São Paulo, Sociedade Brasileira de Genética, 1991b. p.83- 90.
- RABELLO-GAY, M.N.- Teste com linfócitos do sangue periférico. In: RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.L.R. & MONTELEONE-NETO, R.- *Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação*. São Paulo, Sociedade Brasileira de Genética, 1991c. p.97-105
- RAMEL, C. - Genetic effects of organic mercury compounds: I. cytological investigations on Allium roots. *Hereditas*, **61**: 208-230, 1969.
- RAMEL, C. & MAGNUSSON, J. - Genetic effects of organic mercury compounds: II. Chromosome segregation in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas*, **61**: 231-254, 1969.

- RIBEIRO, L.R. - Teste do micronúcleo em células esfoliadas. In: RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.L.R. & MONTELEONE-NETO, R. - *Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação*. São Paulo, Sociedade Brasileira de Genética, 1991. p.151-155.
- ROBISON, S.H.; CANTONI, O. & COSTA, M. - Analysis of metal-induced DNA lesions and DNA-repair replication in mammalian cells. *Mut. Res.*, **131**: 173-181, 1984.
- ROZYNKOWA, D. & RACZKIEWICZ, B. - Destructive effect of methyl mercury chloride on human mitoses in living cells *in vitro*. *Mut. Res.*, **56**: 185-191, 1977.
- SALGADO, P.E.T.; LEPERA, J.S.; OLIVEIRA, G.H. & LARINI, L. - Determinação de mercúrio, proteínas, sódio e potássio em amostras de urina de cirurgiões-dentistas expostos ocupacionalmente ao mercúrio. *Rev. Bras. Saúde Ocup.*, **14**: 7-11, 1986
- SKERFVING, S.; HANSSON, K. & LINDSTEN, J. - Chromosome breakage in human exposed to methyl mercury through fish consumption. *Arch. Environ. Health*, **21**: 133-139, 1970.
- SKERFVING, S.; HANSSON, K.; MANGS, C.; LINDSTEN, J. & RYMAN, N. - Methylmercury-induced chromosome damage in man. *Environ. Res.*, **7**: 83-98, 1974.
- SNEDECOR, G.W. - *Métodos de estadística: su aplicación a experimentos en agricultura y biología*. Buenos Aires, Acme Agency Soc. Resp. Ltd, 1948 557p.
- SOARES-VIERA, J.A.; CARDOSO, L.A.; ESTANQUEIRO, R.C.R.; ZAHER, V.L. & GATTÁS, G.J.F. Frequência de micronúcleos (MN) em trabalhadores expostos ao mercúrio. *Revista Brasileira de Genética*, **16** (suppl.3): B.137, 1993.

- THERMAN, E.- *Human chromosomes: Structure Behavior Effects*. 2.ed. New York Springer-Verlag, 1986. 313p.
- UMEDA, M.; SAITO, K.; HIROSA, K. & SAITO, M. - Cytotoxic effect of inorganic phenyl and alkyl mercuric on Hela cells. *Jpn. J. Exp. Med.*, **39**: 47-58, 1969.
- VARELLA-GARCIA, M.- Teste de trocas entre cromátides-irmãs. In: RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.L.R. & MONTELEONE-NETO, R. - *Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação*. São Paulo, Sociedade Brasileira de Genética, 1991. p.123-140.
- VERSCHAEVE, L.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HENS, L. & SUSANNE, C. - Chromosome distribution studies in phenyl mercury acetate exposed subjects and in age-related controls. *Mut. Res.*, **57**: 335-347, 1978.
- VERSCHAEVE, L.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HENS, L. & SUSANNE, C. - Comparative *in vitro* cytogenetic studies in mercury-exposed human lymphocytes. *Mut. Res.*, **157**: 221-226, 1985.
- VERSCHAEVE, L.; KIRSCH-VOLDERS, M.; SUSANNE, C.; GROETENBRIEL, C. HAUSTERMANS, R.; LECOMTE, A. & ROOSSELS, D. Genetic damage induced by occupationally low mercury exposure. *Environ. Res.*, **12**: 306-316, 1976.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - *Inorganic Mercury*. Geneva, WHO, 1991. 168p. (Environmental Health Criteria, 118)
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - *Methylmercury*. Geneva, WHO, 1990. 144p. (Environmental Health Criteria, 101)

ZAKHAROV, A.F. & EGOLINA, N.A. - Differential spiralization along mammalian mitotic chromosome. I: BUdR-revealed differentiation in Chinese hamster chromosomes. *Chromosoma*, 38: 341-365, 1972.

\* HERANI, M.L.G. - Normas para apresentação de Dissertações e teses. São Paulo, BIREME, 1990. p.46.