# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

## FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da distribuição, metabolismo e nefrotoxicidade do timerosal - um conservante a base de mercúrio usado em vacinas - utilizando modelos *in vivo* e *in vitro* 

Maria Fernanda Hornos Carneiro

Ribeirão Preto 2014

## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

## FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

# Avaliação da distribuição, metabolismo e nefrotoxicidade do timerosal - um conservante a base de mercúrio usado em vacinas - utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Maria Fernanda Hornos Carneiro

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Ribeirão Preto 2014 AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Carneiro, Maria Fernanda Hornos

Avaliação da distribuição, metabolismo e nefrotoxicidade do timerosal - um conservante a base de mercúrio usado em vacinas - utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*. Ribeirão Preto, 2014. 85p.: il.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Barbosa Júnior, Fernando. 1. Timerosal. 2. Etilmercúrio. 3. Distribuição. 4. Metabolismo. 5. Nefrotoxicidade.

Fonte da imagem da capa: http://iranbanner.com/Portals/0/productimages/155967\_5c017.jpg - *Acesso em 18/06/2014.* 

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Maria Fernanda Hornos Carneiro

Avaliação da distribuição, metabolismo e nefrotoxicidade do timerosal - um conservante a base de mercúrio usado em vacinas - utilizando modelos *in vivo* e *in vitro* 

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Babosa Júnior

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr.		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	

Dedico esta tese a todos os cientistas, que experimentam o bom e o ruim desta incrível carreira.

### AGRADECIMENTOS

Agradeço,

a Deus e meu anjo da guarda, pela forte proteção e guiamento.

a minha mãe e melhor amiga, Liz, e ao meu pai, João Carlos, pelo amor e suporte constantes.

aos meus irmãos, Ana Carolina e Vitor, pela amizade, carinho e sentimento de admiração que sempre me proporcionaram. Ao Vitor e à Kuka por me darem um sobrinho tão especial como o JP e o Antônio, que vem chegando.

aos meus avôs, Mário e Dite, e aos meus dindos, de batismo e de coração Tetê e Gê, Lili e Coca, que muito amo e me amam e por sempre demonstrarem isso.

ao querido e amado, Fabio, pela cumplicidade e por colorir a minha vida. Pelo convívio carinhoso e divertido e pelas conversas que acalmam e clareiam os horizontes.

a todos os meus amigos, em especial a Isadora Langaro, Henrique Kochenborger, Carolina Pereyron, Fernanda Infantini, Andréa Azambuja, Rafael Jardim, André Dutra, Elton Oppermann e Lúcia Baltar por todos os momentos juntos, nas horas felizes e tristes. ao prezado Professor Fernando Barbosa Júnior, pelo seu papel fundamental na minha trajetória acadêmica, pela oportunidade de crescimento, conselhos, agilidade, ensinamentos, paciência e confiança.

a todos os colegas do laboratório TOXEM. Em especial ao Bruno Lemos, Denise Grotto, Juliana Oliveira, Eloísa de Paula, Gustavo Barcelos e Vanessa de Souza pela cumplicidade, amizade, parceria e grande auxílio na realização do trabalho. Agradeço também ao Samuel Simião pela grande ajuda e presteza nos experimentos.

a todos os integrantes do Centro de Pesquisa em Doença Renal (CKDR) da Universidade de Queensland, em Brisbane, na Austrália, em especial à minha supervisora Glenda Gobe, pela nobreza, paciência, oportunidade, empenho e gentileza tanto dentro do laboratório quanto fora dele.

à professora e amiga Claudia Ramos Rhoden e integrantes do Laboratório de Estresse Oxidativo e Poluição Atmosférica – onde tudo começou.

aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, em especial à Ana, Rosemary e Rosana, pela presteza e eficiência.

e, finalmente, ao CNPq e à CAPES, pela confiança e apoio financeiro concedido.



"The most beautiful experience we can have is the mysterious - the fundamental emotion which stands at the cradle of true art and true science."

Albert Einstein (1879-1955)

### RESUMO

CARNEIRO, M.F.H. Avaliação da distribuição, metabolismo e nefrotoxicidade do timerosal - um conservante a base de mercúrio usado em vacinas utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*. 2014. 85p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O timerosal é um agente antisséptico utilizado em vacinas como conservante. presença de etilmercúrio Devido а (EtHg) em sua composição (com aproximadamente 49% de mercúrio (Hg) em peso), uma preocupação existe em relação aos possíveis efeitos tóxicos em humanos. No entanto, pouco se sabe sobre o perfil cinético do EtHg em mamíferos. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar a distribuição tecidual e meias-vidas do Hg, seu metabolismo no sangue (conversão a mercúrio inorgânico) e nefrotoxicidade após exposição ao timerosal, utilizando modelos in vivo e in vitro. Para isto, o trabalho foi dividido em 3 estudos: (I) camundongos machos Swiss foram expostos a 20 µg de Hg sob a forma de timerosal via intramuscular. Sangue, cérebro, coração, rim e fígado foram coletados após 0,5; 1; 8; 16; 144; 720 e 1980 horas (h) da exposição (n=4) e analisados quanto às concentrações das espécies de Hg por HPLC-ICP-MS; (II) alíquotas (n=4) de sangue total, plasma e eritrócitos humanos foram expostas a timerosal ou EtHg (3 mg/l) durante 24 h e analisadas quanto às concentrações das espécies de Hg por HPLC-ICP-MS; (III) células HK2 foram expostas durante 24 h a timerosal (0 µM a 2 µM) e avaliadas quanto à viabilidade e proliferação celular, apoptose, expressão de proteínas Bax e TGF-β1, saúde mitocondrial e concentrações de fibronectina no meio. Verificou-se que o transporte de EtHg do músculo para os tecidos e a sua conversão em Hg inorgânico (Hgi) ocorrem rapidamente. Após 0,5 h da exposição ao timerosal, as concentrações mais altas de ambos EtHg e Hgi foram encontradas no rins (> 70% do Hg total no corpo do animal). O cérebro apresentou uma menor contribuição para a carga corporal de Hg (<1,0% do Hg total no corpo do animal). Após trinta dias da exposição ao timerosal, houve excreção considerável de Hg e o fígado apresentou a maior parte do Hg ainda restante no corpo dos animais. As meias-vidas foram estimadas (em dias) em 8,8; 10,7; 7,8; 7,7 e 45,2; para o sangue, cérebro, coração, fígado e rim, respectivamente. Sugere-se que a extensão da conversão de EtHg a Hgi é modulada em parte pela partição do EtHg no plasma e no sangue, uma vez que o EtHg é rapidamente convertido a Hgi nas células vermelhas, mas não no plasma. O mecanismo de dealquilação em células vermelhas parece ser mediado pela reação de Fenton (formação de radicais hidroxil). Ainda, EtHg/timerosal diminuiu a viabilidade celular e mitose, promoveu a apoptose, prejudicou o estado de transição de fibronectina. Coletivamente, os resultados demonstram que a cinética do timerosal (EtHg) está mais próxima a do Hgi - e não do MeHg - e o rim deve ser considerado um alvo potencial de toxicidade do EtHg, já que é o órgão exposto às maiores concentrações de Hg, e onde o metal apresenta sua maior meia-vida Adicionalmente, o EtHg/timerosal biológica. demonstrou ser um agente antiproliferativo, apoptótico e pró-fibrótico em células humanas renais.

Palavras-chave: Timerosal, etilmercúrio, distribuição, metabolismo, nefrotoxicidade.

#### ABSTRACT

CARNEIRO, M.F.H. Evaluation of the distribution, metabolism and nephrotoxicity of thimerosal - a mercury containing preservative found in vaccines - using *in vivo* and *in vitro* models. 2014. 85p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Thimerosal is an antiseptic agent used in vaccines as a preservative. Due to the presence of ethylmercury (EtHg) in its composition (approximately 49% mercury (Hg) by weight), there is a concern regarding possible toxic effects in humans. However, little is known about the kinetic profile of EtHg in mammals. Thus, this study aimed to evaluate the tissue distribution and half-life of Hg, its metabolism in blood (conversion to inorganic mercury) and nephrotoxicity after exposure to thimerosal, using in vivo and in vitro models. The work was divided into three studies: (I) Swiss male mice were exposed to 20 µg of Hg in the form of thimerosal intramuscularly. Blood, brain, heart, kidney and liver were collected after 0.5, 1, 8, 16, 144, 720 and 1980 hours (h) of exposure (n=4) and analyzed for concentrations of Hg species by HPLC-ICP-MS; (II) aliquots (n=4) of whole blood, plasma and erythrocytes were exposed to thimerosal or EtHg (3 mg/l) for 24 h and analyzed for Hg species concentrations by HPLC-ICP-MS; (III) HK2 cells were exposed for 24 h to thimerosal (0  $\mu$ M to 2  $\mu$ M) and evaluated for cell viability and proliferation, apoptosis, Bax and TGF-B1 expression, mitochondrial health and concentrations of fibronectin in the medium. It has been found that the transport of EtHg from muscle to tissues and its conversion into inorganic Hg (Hgi) occur quickly. After 0.5 h of exposure to thimerosal, higher concentrations of both EtHg and Hgi were found in the kidneys (> 70% of total Hg in the animal body). The brain showed a minor contribution to the body burden of Hg (<1.0% of total Hg in the animal body). Thirty days after exposure to thimerosal, there was considerable excretion of Hg and liver had the most Hg still remaining in the animal body. Half-lives were estimated (in days) at 8.8; 10.7; 7.8; 7.7 and 45.2; for blood, brain, heart, liver and kidney, respectively. It is suggested that the extent of conversion of the EtHg into Hgi is modulated in part by the partition of EtHg in plasma and blood, since EtHg is rapidly converted into Hgi in red cells but not in plasma. The mechanism of dealkylation in red cells seems to be mediated by the Fenton reaction

(formation of hydroxyl radicals). Additionally, EtHg/thimerosal decreased cell viability and mitosis, promoted apoptosis, impaired mitochondrial permeability transition state, increased expression of Bax and TGF-β1 and fibronectin secretion in the media. Collectively, the results demonstrate that the kinetics of thimerosal (EtHg) is closer to the Hgi - and not the MeHg - and kidney should be considered a potential target for EtHg toxicity, since it is exposed to the highest concentrations of Hg and it is the tissue where the metal has a greater biological half-life. Additionally, EtHg/thimerosal was shown to be an antiproliferative, apoptotic and pro-fibrotic agent in human kidney cells.

Key-words: Thimerosal, ethylmercury, distribution, metabolism, nephrotoxicity.

### **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1.3. Representação gráfica das estruturas moleculares do timerosal (e após dissociação a tiossalicilato de sódio e EtHg)......6

**Figura 1.4.** Reportagem publicada no Jornal *Folha de São Paulo* em 18 de abril de 2001 sobre a proibição da produção de mertiolate. Fonte: *http://www1.folha.uol.com.br/fsp/cotidian/ff1804200101.htm......***8** 

Figura 1.5. Charge sobre o uso do timerosal nas vacinas. Autor desconhecido. Fonte: http://www.informedchoice.info/MMR.html......12

Figura 1.6. Estrutura química do MeHg e EtHg.....15

Figura 3.1. Etapas da reação de Fenton e Haber-Weiss......31

**Figura 4.1.** Cromatograma típico obtido por uma solução estoque de espécies de Hg a 10 μg/l (expresso como Hg, m/z= 202).....**39**  **Figura 4.2.** Concentrações médias de Hgi (círculos) e EtHg (triângulos) ± DP obtidas em sangue, coração, cérebro, rim e fígado de camundongos expostos a 20 μg de Hg na forma de timerosal (n = 4)......47

**Figura 4.3.** Representação esquemática da distribuição do Hg após exposição ao timerosal. O tamanho dos órgãos representa uma aproximação da percentagem da dose inicial retido em cada um dos órgãos/tecidos ao longo do tempo......**51** 

**Figura 4.4.** Média ± DP das concentrações de Hg (Hgi e EtHg) obtidas após 24 h da adição de Hg (EtHg ou timerosal (tim) (3mg/l)) em sangue total, plasma ou células vermelhas ao longo da primeira (A), segunda (B) e terceira (C) experiências do estudo *in vitro*. ANOVA de uma via seguida do teste de *Tukey* foram utilizadas. \* concentração de EtHg e Hgi estatisticamente inferior e superior, respectivamente, do que as obtidas em plasma e eritrócitos; # concentrações de EtHg e Hgi estatisticamente superior e inferior, respectivamente, do que as obtidas em eritrócitos sem Fe, e em ambos os grupos sanguíneos ; ## concentrações de EtHg e Hgi estatisticamente inferior e superior, respectivamente, do que as obtidas em plasma sem Fe, P < 0,05. \*\*\* concentrações de Hgi e EtHg e Hgi estatisticamente inferior e superior, respectivamente, do que as obtidas em plasma sem Fe, P < 0,05. \*\*\* concentrações de Hgi e EtHg e Hgi estatisticamente inferior e superior, respectivamente, do que as obtidas em plasma sem Fe, P < 0,05. \*\*\* concentrações de Hgi e EtHg e Hgi estatisticamente inferior e superior, respectivamente, do que as obtidas em plasma sem Fe, P < 0,05. \*\*\* concentrações de Hgi e EtHg e Hgi estatisticamente inferior e superior, respectivamente, do que as obtidas em plasma sem Fe, P < 0,05. \*\*\* concentrações de Hgi e EtHg e Hgi estatisticamente inferior e superior, respectivamente, do que as obtidas em plasma sem Fe, P < 0,05. \*\*\* concentrações de Hgi e EtHg e Hgi estatisticamente inferior e superior, respectivamente, do que as obtidas em plasma sem Fe, P < 0,05. \*\*\* concentrações de Hgi e Hgi estatisticamente inferior e superior, respectivamente, do que as obtidas em plasma sem Fe, P < 0,05. \*\*\* concentrações de Hgi e Hgi estatisticamente superior e inferior, respectivamente, do que as obtidas nas

**Figura 4.5.** Timerosal nas concentrações de 0,5; 1; e 2  $\mu$ M diminuiu significativamente a viabilidade celular após 24 h e 48 h do tratamento em comparação ao controle. Os resultados são expressos como média ± DP das absorbâncias resultantes utilizadas no ensaio MTT (n = 6). ANOVA uma via seguido pelo teste de *Tukey*. \*\*\* P <0,001 vs. controle (0  $\mu$ M); ns: não significativo......**56** 

**Figura 4.6.** Topo: aumento e diminuição estatisticamente significativos do percentual de apoptose e mitose, respectivamente, após tratamento com concentrações crescentes de timerosal durante 24 h. Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP de 15 campos (5 por lamela circular (n = 3)). ANOVA uma via seguida do teste de *Tukey.* \*\*\* P <0,001 vs. controle (0 µM). Parte inferior: microscopia de células HK2 coradas com hematoxilina e eosina. Em (a) pode-se vislumbrar uma célula - exposta a timerosal 0,5 µM - prejudicada com características morfológicas peculiares do processo de apoptose, como núcleo com fragmentos e em condensação. Em (b) demonstra-se uma célula saudável do grupo controle (aumento de 200 x)......**58** 

**Figura 4.7.** Topo: avaliação fluorimétrica da função mitocondrial usando JC-1 e densitometria da expressão protéica obtida por *Western blot* para a Bax em células HK2 expostas a timerosal por 24 h. As bandas apresentadas são exemplos representativos dos *immunoblots* para Bax e respectivo controle de GAPDH. As barras dos gráficos representam média  $\pm$  DP de 6 e 3 amostras independentes para JC-1 e Bax, respectivamente. ANOVA uma via seguida pelo teste de *Tukey.* \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001 vs. grupo controle; ns: não significativo. Inferior: células HK2 foram coradas para mitocôndrias com *MitoTracker Red CMXRos* (fluorescência vermelha), para Bax com anti- Bax seguido por Alexa Fluor 488- anticorpo conjugado (fluorescência verde) e para os núcleos com coloração DAPI. As células de ambos os grupos foram fotografados com parâmetros de exposição idênticos.......**60** 

**Figura 4.8.** Timerosal aumenta a expressão TGF- $\beta$ 1 e secreção de fibronectina em células HK2. *Western blot* e densitometria para o TGF- $\beta$ 1 foram realizadas utilizando a proteína extraída das células HK2, ao passo que a fibronectina foi determinada no meio de cultura. Para o resultado de *Western blot*, as barras representam a média ± DP de três experimentos independentes. Já para a fibronectina, as barras são representativas da média ± DP de 4 repetições em duplicata. As fotos são exemplos representativos de *immunoblots* obtidos por *Western blot* para esta proteína e seu respectivo controle GAPDH. ANOVA uma via seguida pelo teste de *Tukey*, \* P <0,05; \*\* P <0,01; \*\*\* P <0,001 vs. grupo controle; ns: não significativo......**63** 

### LISTA DE TABELAS

**Tabela1.1.**CalendárioNacionaldeVacinação,Brasil.Fonte:http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/gif/svspni\_calendario\_26092013.gif.......**13** 

Tabela 3.1. Parâmetros de operação do ICP-MS, HPLC e geração de vapor frio....28

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	análise de variância						
BCA	ácido bicinconínico						
C8	coluna cromatográfica C8						
Citc	citocromo C						
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol						
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético						
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay						
ERO	espécies reativas de oxigênio						
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenaseGSH glutationa						
HPLC	High Performance Liquid Chromatography						
HPLC-ICP-MS	High Performance Liquid Chromatography hiphenated to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry						
HRP	horseradish peroxidase						
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry						
IGEPAL CA - 630	Octilfenoxipolietoxietanol						

JC-1 5, 5 ', 6, 6'-tetracloro-1, 1 ', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanineiodide

МТТ	3- (4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
OPD	ortofenilenodiamina
OH•	radical hidroxil
SDS	dodecil sulfato de sódio

# SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	iii
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos	ix

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	O mercúrio no ambiente	1
1.2.	Exposição humana ao mercúrio e seus efeitos	3
1.3.	Timerosal	6
1.4.	Toxicocinética do mercúrio	.14
1.5.	Efeitos citotóxicos do mercúrio no tecido renal	.19
2.	OBJETIVOS	.22
2.1.	Estudo I	.22
2.2.	Estudo II	.22
2.3.	Estudo III	.23
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	.24
3.1.	Estudo I	.24
3.2.	Estudo II	.29
3.3.	Estudo III	.32
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	.39
4.1.	Estudo I	.39
4.2.	Estudo II	.52
4.3.	Estudo III	.56
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	.64
5.1.	Estudo I	.64
5.2.	Estudo II	.65
5.3.	Estudo III	.65
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	.66

XO(S)81
---------

### 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. O mercúrio no ambiente

O mercúrio (Hg) é um poluente global que pode ser transportado a grandes distâncias e acumular-se nos seres vivos, produzindo severas alterações biológicas (LIN, et al., 2012). No ambiente, ele pode ser encontrado em diferentes estados de oxidação: Hg elementar (Hg°) e íons mercuroso (Hg<sup>+</sup>) e mercúrico (Hg<sup>+2</sup>), os quais podem constituir compostos inorgânicos e orgânicos de Hg, como o metilHg (MeHg) (NRC, 2000), sendo todos altamente tóxicos. É um metal de massa atômica 200 e número atômico 80. Devido ao seu estado líquido e cor prata na forma elementar, este elemento químico era conhecido no passado como hidrargírio (do grego *hydr:* água e *argyros:* prata) e, mais recentemente, como prata líquida (NORRBY, 1991).

A relação entre o homem e o Hg é bastante antiga, datada da pré-história, época em que o homem fazia uso de uma pedra mineral vermelha, o cinábrio (HgS), para fazer suas pinturas nas cavernas (IORDANIDIS, et al., 2011). Na idade média, o Hg esteve presente na obra de alquimistas, que procuravam pela essência universal, a chamada quintessência ou, ainda, a fórmula da pedra filosofal (do latim: *Lapis Philosophorum*). A pedra filosofal é o objeto que os alquimistas deveriam alcançar a todo custo; uma substância transmutadora de simples metais em ouro puro assim como um elixir da vida longa, uma panacéia universal, um remédio que curaria todas as doenças e daria vida eterna àqueles que o ingerissem (NORN, et al., 2008).

Ao longo dos séculos o metal acompanhou o homem e foi utilizado para fins diversificados na agricultura, odontologia e indústrias variadas como a de tintas, aparelhos de medição e farmacêutica. Atualmente, apesar do uso do Hg ter diminuído acentuadamente, o metal ainda é utilizado na fabricação de termômetros, barômetros, bombas de vácuo, explosivos, assim como na extração de minérios e composição de alguns produtos farmacêuticos, como vacinas (KLYS, 2010).

O ciclo do Hg inicia quando o metal é liberado da crosta terrestre para a atmosfera durante processos de erosão e vulcanismo, de forma natural. Em maiores quantidades, vapores e material particulado contendo Hg têm origem na queima de combustível fóssil e petróleo, assim como na mineração do ouro (BURGER

CHAKRABORTY, et al., 2013). Vapores ou material particulado contendo Hg podem ser transportados a longas distâncias, principalmente como Hg°, o qual pode sofrer oxidação na atmosfera a Hg<sup>+</sup> ou Hg<sup>2+</sup>, sendo incorporado ao solo e águas e, consequentemente, à vegetação (ROLFHUS; FITZGERALD, 1995). Uma vez no ecossistema aquático, o Hg pode ser metilado por microorganismos, formando o MeHg, composto que se bioacumula e biomagnifica ao longo da cadeia trófica (CHETELAT, et al., 2013). Dessa forma, as algas e plantas aquáticas apresentam concentrações de MeHg poucas vezes maiores do que os sedimentos ao passo que os peixes que consomem estes vegetais têm concentrações de MeHg maiores, podendo os organismos do topo da cadeia alimentar apresentar concentrações de MeHg até um milhão de vezes maiores do que os organismos produtores (GUIMARÃES, et al., 1999). Ainda, após longos períodos, o Hg pode reagir com enxofre (S) acumulando-se na forma de compostos de S em pequenos crustáceos no sedimento. Além disso, várias reações bióticas e abióticas podem interconverter as diferentes formas de Hg, alterando a absorção e evasão do Hg e reiniciando o seu ciclo. Algumas das principais rotas do Hg no ambiente são apresentadas na Figura 1.1.



Figura 1.1. Principais rotas do ciclo biogeoquímico do Hg. Esta figura foi extraída do site <u>http://www.ornl.gov/ornl/news/news-releases/2013/ornl-research-reveals-new-</u> <u>challenges-for-mercury-cleanup</u> e adaptada para o português.

### 1.2. Exposição humana ao mercúrio e seus efeitos

Os efeitos tóxicos após exposição ao mercúrio são dependentes de vários fatores, tais como forma química do elemento, via, frequência e duração da exposição, dose e características do indivíduo exposto (GOCHFELD, 2003). As vias inalatória e a oral são as principais vias de exposição do homem ao Hg. A inalação de vapores de Hg° assim como de Hg inorgânico (Hgi) está frequentemente relacionada à toxicologia ocupacional ao passo que a exposição ao MeHg ocorre

principalmente pela ingestão de peixes contaminados com o metal, em episódios de contaminação ambiental (CLARKSON, 2002).

As formas químicas do Hg têm diferentes afinidades pelos diferentes tecidos e os efeitos tóxicos e a via de exposição têm influência direta na concentração de Hg nos sítios-alvo. Por exemplo, sabe-se que o Hgi tem como alvo principal os rins, ao passo que o MeHg, o cérebro (CLARKSON; MAGOS, 2006). No entanto, para que estas formas químicas de Hg atinjam tais tecidos, a via de exposição deve ser compatível, já que o Hg°/Hgi é consideravelmente menos absorvido pela via oral em comparação ao MeHg, que tem ampla absorção por tal via (WHO, 1990). Os efeitos nocivos do MeHg são notáveis no cérebro, sendo os principais sintomas distúrbios visuais, parestesia, perda da audição, tremor muscular, distúrbio da motilidade, paralisia e até a morte (VALENT, et al., 2013; YORIFUJI, et al., 2013). Nos rins, o Hgi pode causar importantes quadros de nefrotoxicidade (WOODS, et al., 2002; SHI, et al., 2011). Vários outros sistemas biológicos são afetados negativamente pela exposição ao Hg como, por exemplo, os sistemas cardiovascular (DE MARCO, et al., 2010; HOUSTON, 2011), imune (HAVARINASAB, et al., 2007; ZHANG, et al., 2011; ZHANG, et al., 2013) e visual (FILLION, et al., 2013).

Ainda hoje, a exposição humana a Hg continua a ser uma questão de saúde pública, particularmente em países em desenvolvimento (PARK; ZHENG, 2012; BURGER CHAKRABORTY, et al., 2013; CHEN, et al., 2013). Historicamente, há casos clássicos de intoxicação por Hg. Tais casos, dentre outros, ocorreram no Iraque e na cidade de Minamata, no Japão, na década de 50 com inúmeras vítimas. No primeiro caso, houve contaminação em massa devido ao destino errôneo e consequente consumo pela população de sementes de trigo tratadas com fungicidas organomercuriais para plantio em 1956 e 1960 e novamente nos anos 70 (JALILI; ABBASI, 1961; BAKIR, et al., 1973; AL-TIKRITI; AL-MUFTI, 1976). Já no Japão, a intoxicação ocorreu pelo consumo de pescados da baía de Minamata, a qual foi contaminada por descarte inadeguado de efluentes industriais contendo Hg (HARADA, 1995). Um vasto número de habitantes da região foram vítimas da contaminação, muitos com deficiências físicas permanentes. A condição compreendia uma grande coleção de sintomas como distúrbios sensoriais nas mãos e pés, danos à visão e audição, fraqueza e, em casos extremos, delírio, convulsões severas, surtos de psicose, perda de consciência, paralisia, coma e morte. Além disso, crianças expostas in utero começaram a nascer com sérias complicações neurológicas, visto o elevado potencial teratogênico do MeHg. A síndrome ficou conhecida como Doença de Minamata (KONDO, 2000).

A figura 1.2 ilustra uma foto de manifestantes protestando por seus familiares e amigos mortos e/ou adoecidos no episódio de contaminação por Hg em Minamata.



Figura 1.2. Protesto pelos mortos na cidade de Minamata durante o julgamento da indústria poluidora em 1972. Registro de SMITH, W.E. Fonte: http://archives.evergreen.edu/webpages/curricular/2006-2007/summerwork/images/Smith,%20%20W.E/index.html

No Brasil, há relatos de casos de contaminação humana por Hg na enseada dos Tainheiros, na Bahia, devido ao lançamento do metal por uma indústria de cloroálcalis (SOARES, 1990) assim como inúmeros casos de contaminação de Hg na região norte do país, na famosa jazida de ouro conhecida mundialmente como Serra Pelada (LEINO; LODENIUS, 1995; CORBETT, et al., 2007). Na região Amazônica, o interesse em estudar a exposição ao Hg e seus efeitos surgiu em meados dos anos 80, quando concentrações elevadas de Hg foram encontradas no ambiente e inicialmente associadas à atividade do garimpo de ouro (PFEIFFER, et al., 1989; BRANCHES, et al., 1993; LACERDA, et al., 1994). No entanto, estudos mais recentes (posteriores), concluíram que a exploração do ouro nesta região pouco contribui para as altas concentrações de Hg. Estes estudos propuseram que as elevadas concentrações de Hg eram resultado da erosão pela queima e desmatamento da floresta visto que o solo da região é naturalmente rico neste metal (MALM, et al., 1990; LECHLER, et al., 2000). Consequentemente, a contaminação de peixes pelo MeHg tem sido reconhecida como um grande problema de saúde pública para a população ribeirinha, que tem o peixe como sua principal fonte de proteínas (GROTTO, et al., 2010).

### 1.3. Timerosal

Outra forma de exposição ao Hg ocorre em decorrência do uso do timerosal (tiomersal, mertiolate, mercurocromo ou tiossalicilato de sódio de etilmercúrio) – antimicrobiano usado em produtos farmacêuticos há mais de 80 anos (CLARKSON, 2002). O composto contém 49,6 % de Hg (m/m) e é frequentemente utilizado em frascos multidose de vacinas na ordem de 0,003 % a 0,01 % (BALL, et al., 2001; DÓREA, 2011). No organismo, este composto de Hg é dissociado em tiossalicilato de sódio e etilmercúrio (EtHg) (TAN; PARKIN, 2000), composto cuja atividade antibacteriana é atribuída (PICHICHERO, et al., 2002). Na figura 1.3 são mostradas as estruturas moleculares do timerosal e seus componentes após dissociação.



timerosal

tiosalicilato de sódio

EtHg



Inicialmente, após o composto ser sintetizado e patenteado por Kharasch e Lilly em 1928, o timerosal foi usado como bactericida intravenoso e tópico, já que havia um consenso de baixo potencial de toxicidade (GEIER, et al., 2007). Houve experimentos clínicos com humanos utilizando timerosal como, por exemplo, para tratamento de meningite o qual conferiu grau de baixa toxicidade ao composto. No entanto, alguns anos mais tarde, o experimento foi reavaliado e caracterizado como enviesado já que os sujeitos tratados e avaliados tinham, de fato, meningite, e, portanto, não eram saudáveis (SMITHBURN, et al., 1930). Possivelmente, qualquer lesão neurológica, ou mesmo de outra natureza, ocorreu devido à meningite e não ao timerosal. Além disso, o tempo de seguimento dos pacientes após a administração intravenosa de timerosal foi curto o que impediria uma avaliação fidedigna da intoxicação, já que poderia haver manifestação tardia de outros efeitos. Assim, alguns anos mais tarde, após investigações mais rígidas, os efeitos tóxicos do timerosal começaram a ser observados e relatados, mas sua aplicação como bactericida de uso tópico (Merthiolate® e Mercurocromo®) e conservante em produtos biológicos continuou (JAMIESON; POWELL, 1931) até o final do século 2000.

Mais recentemente, o timerosal surgiu como um possível fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurocomportamentais. De acordo com CLEMENTS e colaboradores, crianças que receberam a série completa de vacinas podem ter sido potencialmente expostas a aproximadamente 200 µg de Hg durante os 3,5 primeiros meses de vida (CLEMENTS, et al., 2000). Esta exposição cumulativa excede o limite definido pela Agência de Proteção Ambiental Norte Americana, estimado em 0,1 µg de Hg/Kg de peso corporal/dia (USEPA, 1997). Tal conclusão gerou interesse para o desenvolvimento de mais estudos e alguns deles apontaram que o desenvolvimento de autismo e outras complicações neurológicas em crianças estaria potencialmente ligado à exposição ao EtHg por meio da vacinação (BERNARD, et al., 2001; DELONG, 2011). Contudo, a maioria dos estudos não suporta tal hipótese (HVIID, et al., 2003; PARKER, et al., 2004; MONTANA, et al., 2010). Devido à grande discussão gerada em torno do timerosal, em julho de 1999, houve decreto de retirada do composto de medicamentos e vacinas nos Estados Unidos da América, o que foi seguido pela grande maioria dos países Europeus e outros considerados desenvolvidos (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1999).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proibiu o uso do Merthiolate® e similares em 2001 alegando se tratar de uma substância organomercurial, com risco de toxicidade e sem controle de utilização. A figura 1.4 mostra uma reportagem publicada no Jornal *Folha de São Paulo* em 18 de abril de

2001 acerca da proibição da produção de mertiolate. A ANVISA determinou "a proibição da utilização de derivados de Hg em medicamentos fabricados no Brasil, exceto vacinas e a proibição da comercialização desse tipo de produto a partir do dia 18.04.2001; exigiu que os fabricantes de produtos à base de derivados de Hg tivessem dois meses para retirá-los do mercado" e ainda, esclareceu que "timerosal, no Brasil, não será usado como remédio, mas apenas como conservante de vacinas, por recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS), pois não existe ainda substituto a altura para ser aplicado com este fim".

São Paulo, quarta-feira, 18 de abril de 2001 FOLHA DE S.PAULO COTIDIANO

Próximo Texto | Índice

### SAÚDE

Medida atinge todos os produtos a base de mercúrio; farmácias e laboratórios têm 60 dias para recolher medicamentos

# Governo proíbe a produção de Merthiolate

### LISANDRA PARAGUASSÚ

DA SUCURSAL DE BRASÍLIA

Produtos a base de mercúrio usados para limpar ferimentos, como o mercurocromo e o tiomersal (princípio ativo da marca Merthiolate), estão proibidos de serem produzidos ou vendidos no país a partir de hoje.Uma resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), que será publicada hoje, suspende a venda dos produtos no país. As farmácias e os laboratórios terão 60 dias para retirar os medicamentos do mercado.

A intenção da Anvisa é diminuir a oferta de remédios que contenham o mercúrio, um metal pesado, na fórmula. Em doses altas, o metal pode provocar intoxicação e outros problemas de saúde.

Os anti-sépticos usados em machucados têm doses muito pequenas de mercúrio e, sozinhos, não fazem mal à saúde. "O problema é a soma de fontes do metal à qual a pessoa está sujeita", afirmou o presidente da

Anvisa, Gonzalo Vecina. "Queremos diminuir ao máximo as fontes possíveis de mercúrio", disse.

O mercurocromo e o tiomersal não são mais usados em hospitais desde 1991. Segundo Vecina, a medida

foi adotada porque em atendimentos hospitalares normalmente a superfície a ser limpa é grande, o que exige dose maior de mercurocromo, podendo

aumentar a absorção do metal.

A Anvisa não sabe quantos produtos a base de mercúrio são vendidos hoje porque não é necessário o registro na agência.

Nos guias de medicamento, aparecem pelo menos 15 produtos contendo mercuriais como tiomersal ou timerosal.

"A suspensão da venda não é uma notícia muito preocupante", afirmou o ministro da Saúde, José Serra.

"Um ferimento doméstico pode ser melhor tratado com água e sabão." Segundo o ministro, também

existem outros produtos que podem substituir com vantagem a limpeza de ferimentos domésticos. Um exemplo são os anti-sépticos feitos com iodo. A decisão de proibir os medicamentos a base de mercúrio ocorre depois de o jornalista Boris Casoy levantar, nos últimos dias, o problema no "Jornal da Record". A resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária será publicada hoje no "Diário Oficial" da União. As empresas que não retirarem seus produtos do mercado nos próximos 60 dias serão autuadas e poderão ser multadas. Os valores das multas variam de R\$ 2.000 a R\$ 50 mil, dependendo do tipo de infração. Uma portaria do Ministério da Saúde, que foi publicada em 1998, já tratava do uso de anti-sépticos e esterilizantes. Segundo a medida, não era recomendada a utilização de fórmulas contendo acetona, éter, clorofôrmio e mercuriais orgânicos, como tiomersal, com a finalidade de anti-séptico. A

portaria 2.616 do ministério também estabelece normas para o controle de infecções hospitalares.

### Outro lado

O laboratório Eli Lilly, que produz o Merthiolate, divulgou nota ontem à noite informando que cumprirá o "texto da resolução".

"Continuamos a assegurar a eficácia e a segurança da atual fórmula do Merthiolate e estaremos adequando a mesma às novas exigências da Anvisa, como já anteriormente sugerido pela própria Eli Lilly." Segundo a nota do laboratório, o "Merthiolate continuará a existir no mercado, com sua fórmula modificada".
Nos EUA, os mercuriais foram retirados do mercado pelo governo em 1998. Segundo a Lilly norteamericana, a empresa já tinha decidido em 1991, "por questões puramente mercadológicas, retirar o produto daquele mercado".

Colaborou Leila Suwwan, da Sucursal de Brasília

Figura 1.4. Reportagem publicada no Jornal *Folha de São Paulo* em 18 de abril de 2001 sobre a proibição da produção de mertiolate. Fonte: *http://www1.folha.uol.com.br/fsp/cotidian/ff1804200101.htm* 

A manutenção da utilização do timerosal em vacinas tanto no Brasil quanto em outros países em desenvolvimento está muito relacionada ao risco de contaminação bacteriana advinda de múltiplas administrações de vacina de um mesmo frasco (frasco multidose). Portanto, a manutenção do timerosal nas vacinas explica-se por um fator primordialmente econômico. Nos EUA e países da Europa as vacinas não mais são armazenadas em frascos multidose e, sim, em frascos de dose única, o que aumenta o custo da produção e armazenamento.

A figura 1.5 mostra uma charge que satiriza a questão do uso do timerosal nas vacinas exatamente devido ao impasse gerado a respeito do risco-benefício deste composto químico.



Figura 1.5. Charge sobre o uso do timerosal nas vacinas. Autor desconhecido. Fonte: http://www.informedchoice.info/MMR.html

No Brasil, o uso do conservante a base de Hg nas vacinas não é uniforme. A Tabela 1.1 mostra o Calendário Nacional de Vacinação do Brasil. Supondo-se uma concentração de 0,01 % em cada uma das vacinas (volume de 0,5 ml), uma criança até os 6 meses de idade estaria exposta a aproximadamente 650 µg de timerosal ou ainda 325 µg de Hg.

# CALENDÁRIO NACIONAL DE VACINAÇÃO

Grupo alvo	Idade	BCG	Hepatite B	Penta	VIP e VOP	Pneumo 10	Rotavírus	Meningo C	Febre amarela	Tríplice viral	Tetra viral	Dupla adulto
	Ao nascer	Dose única	Dose ao nascer									
	2 meses			1ª dose	1ª dose (com VIP)	1ª dose	1ª dose					
	3 meses							1ª dose				
	4 meses			2ª dose	2ª dose (com VIP)	2ª dose	2ª dose					
C	5 meses							2ª dose				
Criança	6 meses			3ª dose	3 <sup>a</sup> dose (com VOP)	3ª dose						
	9 meses								Dose inicial			
	12 meses					Reforço				Dose única		
	15 meses			1º reforço (com DTP)	Reforço (com VOP)			Reforço			Dose única	
	4 anos			2° reforço (com DTP)	Reforço (com VOP)							
Adolescente	10 a 19 anos		3 doses <sup>(1)</sup>						Dose a cada 10 anos	2 doses <sup>(1)</sup>		Reforço a cada 10 anos
Adulto	20 a 59 anos		3 doses <sup>(1)</sup> (até 49 anos)						Dose a cada 10 anos	1 dose <sup>(1)</sup> (até 49 anos)		Reforço a cada 10 anos
Idoso	60 anos ou mais								Dose <sup>(2)</sup> a cada 10 anos			Reforço a cada 10 anos
Gestante			3 doses <sup>(1)</sup>									3 doses <sup>(3)</sup>

(1) Se não tiver recebido o esquema completo na infância. (2) Deverá ser avaliado o benefício/risco da vacinação para indivíduos com 60 anos ou mais que receberão a vacina Febre Amarela pela primeira vez. (3) Respeitar esquemas anteriores.
 Fonte: Portaria GM/MS nº 1.498, de 19 de julho de 2013.

Tabela	1.1.	Calendário	Nacional	de	Vacinação,	Brasil.	Fonte:
http://portal.saud	le.gov.br/portal	/arquivos/gif/svspni_c	alendario_2609201	3.gif			

Além das crianças, outras populações suscetíveis como grávidas e idosos estão expostos ao timerosal, pois quase todas as vacinas contra a gripe no mundo - as quais vêm sendo bastante incentivadas a estas populações específicas - contém o composto (DÓREA, 2011; CDC, 2013). Portanto, uma vez que o perfil toxicológico do EtHg ainda não foi totalmente elucidado e considerável parcela da população mundial está exposta, o risco inerente ao uso deste composto necessita ser melhor avaliado.

### 1.4. Toxicocinética do mercúrio

Compreender a cinética das diferentes formas do Hg é crucial para avaliar os seus efeitos biológicos (DÓREA, et al., 2013). Cerca de 80 % do vapor de Hg inalado é transportado para os tecidos, enquanto que esta percentagem aumenta para 95 % para o MeHg ingerido (CLARKSON; MAGOS, 2006). Quanto ao EtHg, no entanto, pouco se sabe sobre as concentrações de Hg em tecidos humanos após exposição. Acredita-se que esta espécie química de Hg seja consideravelmente absorvida, visto suas características químicas e da via rotineiramente utilizada, a intramuscular (ZUIDEMA, et al., 1994; CLEMENTS, et al., 2000; CLARKSON, 2002).

Uma vez na corrente sanguínea, os mecanismos celulares intrínsecos de transporte e metabolismo das diferentes formas de Hg são provavelmente os responsáveis pela disparidade na distribuição sistêmica, padrões de efeito biológico e de potência tóxica (ZALUPS; BRIDGES, 2012). Por exemplo, o Hgi deposita-se principalmente nos rins, concentrando-se no córtex e na faixa periférica da medula externa (ZALUPS, 1993). Por outro lado, devido à sua conjugação com o átomo de enxofre da L-cisteína, o MeHg forma um complexo químico muito semelhante ao aminoácido L-metionina, que é normalmente transportado através da membrana celular cerebral, o que resulta em acumulação de MeHg no cérebro (KERPER, et al., 1992). Para o EtHg, recentemente, ZIMMERMANN e colaboradores revelaram que a absorção de complexos cisteína-EtHg em células de glioma não foi estatisticamente diferente do complexo cisteína-MeHg o que indica que as duas espécies de Hg têm potencialmente o mesmo mecanismo de transporte considerando o tecido nervoso (ZIMMERMANN, et al., 2013).

Apesar da toxicologia do MeHg ser relativamente bem conhecida, a do EtHg é menos compreendida. Até pouco tempo atrás, pensava-se que o EtHg teria propriedades toxicológicas semelhantes às do MeHg, devido à grande similaridade entre as estruturas químicas (BURBACHER, et al., 2005), conforme pode ser observado na Figura 1.6.



Figura 1.6. Estrutura química do MeHg e EtHg.

Contudo, atualmente, sabe-se que algumas propriedades - como a cinética diferem entre estas formas orgânicas de Hg. Um dos estudos mais antigos relacionados à cinética do EtHg foi realizado em macacos e demonstrou que grande parte do Hg estava presente na forma inorgânica e em termos de ordem de magnitude esteve maior no tecido renal, fígado e menor no cérebro e músculos (BLAIR, et al., 1975). Dez anos depois, MAGOS e colaboradores estudaram as diferenças entre EtHg e MeHg em ratos e constataram que os animais expostos ao EtHg tiveram menor concentração de Hg tecidual, mas maior conteúdo de Hgi no tecido renal e menor de Hg orgânico no cérebro em comparação aos animais que foram expostos ao MeHg (MAGOS, et al., 1985). Estes dados foram confirmados posteriormente por ZAREBA e colaboradores cujo estudo demonstrou que, após administração intramuscular de timerosal, camundongos neonatos, passadas 24 a 72h da exposição, acumularam significativamente menos Hg orgânico no cérebro e mais Hgi nos rins em comparação com os animais que receberam MeHg (ZAREBA, et al., 2007). A hipótese a partir de tais resultados é a de que, após a administração de timerosal, o EtHg é metabolizado a Hgi que, em seguida, acumula-se nos rins (DÓREA, et al., 2013). Outro estudo, com tratamento repetido por 4 vezes (no nascimento e na 1ª, 2 ª, e 3ª semana) foi realizado por BURBACHER e colaboradores (BURBACHER, et al., 2005). As concentrações de Hg total foram significativamente menores no cérebro dos macacos bebês que receberam timerosal pela via intramuscular em comparação a outros recebendo MeHg por via oral, com proporção de Hgi no tecido nervoso maior no grupo timerosal, o que corrobora os estudos de BLAIR e colaboradores, ZAREBA e colaboradores e MAGOS e colaboradores (BLAIR, et al., 1975; ZAREBA, et al., 2007; MAGOS, et al., 1985). Além disso, a meia-vida biológica do Hg no sangue foi estatisticamente menor nos macacos tratados com o timerosal (2,1 e 8,6 dias, inicial e final, respectivamente) quando comparada à obtida para o MeHg (21,5 dias) evidenciando a diferença na eliminação de tais formas de Hg (BURBACHER, et al., 2005). No entanto, até o momento, nenhum estudo definiu, após exposição ao timerosal, a contribuição dos principais órgãos em termos de percentagem da carga de Hg total no organismo, retenção da dose inicial assim como os valores de meia-vida teciduais do Hg.

Sabe-se que o Hg tem diferentes meias-vidas biológicas de acordo com a espécie química em questão, assim como a via de exposição. Para o MeHg - após ingestão, a absorção é grande, cerca de 95 % do Hg é encontrado no sangue (WHO, 1990). A meia-vida, neste mesmo compartimento é relativamente longa, de aproximadamente 50 dias, entretanto há descrição de variações de 35 a 100 dias (SMITH, et al., 1994; OGA, 2008; YAGINUMA-SAKURAI, et al., 2012). O Hg elementar ingerido tem uma absorção quase nula (menos de 0,01 %) ao passo que quando o mesmo é aspirado na forma de vapor, como ocorre, por exemplo, em exposição ocupacional ou ainda, por presença de amálgamas dentários, sua absorção torna-se importante (aproximadamente 74 %) (CLARKSON; MAGOS, 2006). Após exposição ao Hgi, as concentrações de Hg no sangue diminuem inicialmente com uma meia-vida rápida de aproximadamente 1 a 3 dias seguido por uma meia-vida mais lenta de cerca de 1 a 3 semanas (BARREGÅRD, et al., 1992; SANDBORGH-ERGLUND, et al., 1998). Entretanto, para o EtHg ou timerosal, os dados são mais raros. No sangue, os valores de meia-vida sanguínea em humanos após exposição ao EtHg são estimados em cerca de 7 dias (MAGOS, 2003; PICHICHERO, et al., 2009) mas também há relato de períodos ainda menores, como 5,6 e 3,7 dias, respectivamente (PICHICHERO, et al., 2008; BARREGARD et al., 2011)..

Presumivelmente, o ânion do ácido tiossalicílico ligado ao EtHg na molécula de timerosal não exerce nenhum efeito especial sobre a absorção do EtHg. Isto já foi sugerido em 1973, quando SUZUKI e colaboradores observaram as mesmas disposições de Hg nos tecidos após doses equivalentes de EtHg e timerosal (SUZUKI, et al., 1973). Conforme relatado anteriormente, há relatos na literatura sugerindo que o EtHg forma Hgi mais rapidamente do que o MeHg, já que concentrações mais elevadas de Hgi foram encontradas nos tecidos após exposição ao EtHg em comparação a MeHg. Da mesma forma, MATHESON e colaboradores relataram que, após exposição ao timerosal, a proporção de Hgi no sangue representou cerca de 50 % do Hg total (MATHESON, et al., 1980), enquanto que para o MeHg, a razão se aproximou de 10 % (BAKIR, et al., 1973).

A dealquilação de Hg *in vivo* é considerada um processo de desintoxicação, pois é fator essencial à eliminação do Hg (MAGOS, et al., 1985; MAGOS, 2003; BURBACHER, et al., 2005). Sugere-se que a biotransformação do Hg orgânico a Hgi ocorra mediada pela microflora intestinal (ROWLAND, et al., 1980; ROWLAND, et al., 1984), ação de células fagocíticas, tais como leucócitos polimorfonucleares, monócitos e macrófagos, ou ainda, por enzimas microssomais (SUDA, et al., 1991; SUDA; TAKAHASHI, 1992; SUDA, et al., 1992). Desta forma, o Hgi encontrado nos tecidos após a exposição ao Hg orgânico pode ser devido à absorção de parte de Hg demetilado pela microflora intestinal ou por microssomas hepáticos; à ação da NADPH-citocromo P450 redutase; ou ainda, devido à conversão de MeHg ou EtHg a Hgi por células fagocíticas (SUDA, et al., 1991; SUDA; HIRAYAMA, 1992; SUDA, et al., 1992).

Um dos mecanismos sugeridos para a conversão do Hg orgânico em inorgânico é a ação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (SUDA, et al., 1993; SHAPIRO; CHAN, 2008), mais especificamente, do radical hidroxil (OH•), uma das ERO mais prejudiciais (SUDA, et al., 1991; SUDA; TAKAHASHI, 1992; HALLIWELL; CHIRICO, 1993). Ainda, sabe-se que a molécula de EtHg apresenta uma maior susceptibilidade ao ataque do OH• o que poderia explicar a maior e mais rápida conversão a Hgi desta molécula em comparação a MeHg (SUDA, et al., 1991; SUDA; TAKAHASHI, 1992). No entanto, tal conversão foi pouco estudada. Perguntas acerca de onde tal dealquilação ocorre, qual o tempo que a reação demanda e ainda que consequências são ocasionadas por tal conversão estão ainda sem resposta na literatura científica.
Após exposição ao Hgi, sugere-se que o Hg seja primariamente eliminado pelas fezes - provavelmente o Hg não absorvido. Depois disso, a secreção da bile é importante fonte de excreção até que a maior parte da carga corporal restante se acumule nos rins, ponto o qual a principal via de excreção é a urinária (NEWTON; FRY, 1978). Consequentemente a urina vem sendo a matriz de escolha para determinar a concentração de Hg e avaliar exposição ocupacional a Hgi (BERGLUND, et al., 2005).

Já o MeHg pode ser eliminado diretamente após conjugação a ácidos biliares, reabsorvido pela circulação enterohepática ou ainda convertido a Hgi (CLARKSON; MAGOS, 2006). A principal rota relatada para eliminação do MeHg são as fezes, com até 90 % da excreção total, de acordo com CLARKSON e MAGOS (CLARKSON; MAGOS, 2006). No entanto, um estudo demonstrou que, em indivíduos humanos considerados não expostos a Hg, a quantidade de Hg excretada nas fezes foi pouco maior que a encontrada na urina, com concentração de MeHg bastante semelhante nos dois compartimentos (ISHIHARA, 2000). Ainda, outro estudo apontou uma razão de Hgi 1:1 urina: fezes após 24 horas da exposição ao MeHg (88µg de Hg por rato) (CIKRT; TICHÝ, 1974). Além disso, ainda não foram definidas as proporções entre as espécies de Hg (MeHg e Hgi) na urina e fezes após exposição ao MeHg.

Considerando o EtHg/timerosal, os achados de PICHICHERO e colaboradores sobre as concentrações de Hg total em amostras de fezes e urina indicam excreção substancial por via fecal (PICHICHERO, et al., 2002). No entanto, diferentes tempos de seguimento após a exposição, assim como duração, frequência, via de exposição e dose devem ser melhor estudados para efetivamente preencher esta lacuna a respeito da eliminação do Hg, principalmente do Hg orgânico.

Grande parte - senão a totalidade - dos estudos investigando a cinética do timerosal reportados até hoje utilizaram como metodologia de determinação do Hg o seu fracionamento. Com esta metodologia determina-se a concentração de Hgi e de Hg total em uma amostra, obtendo-se a concentração de Hg orgânico por subtração. Por conseguinte, este procedimento tem menor confiabilidade dos resultados em comparação com uma metodologia mais precisa e exata para a determinação das espécies de Hg e não de suas frações, como ocorre na análise de especiação química de Hg utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (da sigla em inglês HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*), hifenada à Espectrometria de

Massas com Plasma Acoplado Indutivamente (da sigla em inglês ICP-MS – *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*), a qual determina as concentrações das espécies químicas de Hg individualmente (KATSOYIANNIS; KATSOYIANNIS, 2006; DE SOUZA, et al., 2013).

### 1.5. Efeitos citotóxicos do mercúrio no tecido renal

Estudos *in vitro* são bastante úteis, pois permitem predizer o potencial tóxico de um xenobiótico através da avaliação de respostas tóxicas em micro-organismos como bactérias e fungos, ou ainda, em culturas celulares (BEDNARCZUK, 2010). Apesar dos resultados não serem passíveis de extrapolação direta para humanos, ensaios *in vitro* permitem limitar o número de variáveis experimentais, têm execução mais simples e rápida que a de testes *in vivo* e são muitas vezes ideais para determinação de mecanismos de toxicidade (ROGERO, 2003).

Até a data, a maioria dos estudos de avaliação de citotoxicidade promovida pelo EtHg/timerosal tem sido feita em células do tecido nervoso (BASKIN, et al., 2003; HUMPHREY, et al., 2005; SHARPE, et al., 2012). Isto é consequência dos intensos debates sobre a possível associação da exposição humana ao timerosal na vacinas e o desenvolvimento de autismo e outras desordens neurocomportamentais (BALL, et al., 2001; SHARPE, et al., 2012). Em contrapartida, o rim - um órgão-alvo da toxicidade do Hg foi raramente estudado quanto aos mecanismos de toxicidade e morte celular considerando a exposição ao EtHg/timerosal (CARNEIRO, et al., 2013).

Uma causa de acúmulo de Hg - bem como de outros xenobióticos - no tecido renal está provavelmente relacionada à sua função fisiológica de excreção. O grande fluxo sanguíneo renal - cerca de 25 % da vazão cardíaca - é outra característica importante que contribui para a retenção de substâncias neste tecido, uma vez que o rim é repleto de sistemas de transporte essenciais (BERNDT, et al., 1985). No rim, o Hg é majoritariamente acumulado no córtex e na faixa exterior da medula externa, e os túbulos proximais parecem ser o local predominante onde os íons de Hg são capturados como complexos Hg-tiólicos (ZALUPS, 1993). Esse Hg

ligado à glutationa (GSH) ou cisteína, por exemplo, é filtrado no glomérulo e absorvido pelas células tubulares proximais, onde tende a se acumular.

A maioria das evidências relatadas sobre a toxicidade renal vem de estudos de MeHg e Hgi e indicam aumento da apoptose celular após exposição. Mecanismos para tal incluem mudanças no estado redox e função mitocondrial; distribuição intracelular alterada de cálcio; aumento da expressão de proteínas de estresse e interação do Hg com o citoesqueleto celular (ZALUPS, 2000). Dependendo da gravidade da lesão induzida por Hg, necrose e fibrose também podem ocorrer (SHARMA, et al., 2007; SLEEMAN, et al., 2010; GEWIN, et al., 2012). A palavra apoptose tem origem grega e significa queda de folhas, devido ao aspecto das células que morrem através deste caminho bem programado (KERR, et al., 1972). Em contraste, a necrose é uma morte celular prematura e acidental, na qual várias células nos arredores daquela atacada também são mortas em um estado de comprometimento irreversível de energia celular (PROSKURYAKOV, et al., 2003; GOBE; HARMON, 2006). A definição do modo de morte celular parece ser orquestrada pela dose de exposição ao xenobiótico, a cronicidade do insulto e por mecanismos endógenos de sobrevivência celular ou ainda aqueles estimulados por compostos protetores exógenos (CASTOLDI, et al., 2000; LASH, et al., 2007).

Na figura 1.7 são mostradas as vias extrínseca (via do receptor de morte mediado por ligante) ou intrínseca (via mitocondrial) do processo de apoptose em mamíferos. Ambas as vias envolvem a ativação de caspases, que são consideradas os agentes efetores da apoptose numa cascata bioquímica complexa. A primeira via envolve o acoplamento de ativadores de morte na membrana plasmática externa, tais como o ligante Fas e Fator de Necrose Tumoral-α (TNF-α) com os seus respectivos receptores que, por suas vezes, ativam as caspases, iniciando o processo de morte celular (ZIEBELL, et al., 2011). Já a via mitocondrial é desencadeada por agentes citotóxicos que acabam exercendo influência sobre a família de proteínas Bcl-2 (CECCATELLI, et al., 2010). Funcionalmente, a interação de tais proteínas - que podem pertencer a facções opostas pró e anti-apoptose (como a Bax e a Bcl-2, respectivamente) - é o fator determinante para uma célula morrer ou viver (WILLIS, 2003). Ainda, dentre as causas da liberação do CitC no citoplasma, podem ser citadas a diminuição do conteúdo de GSH e/ou aumento de ERO e/ou de nitrogênio que podem danificar membranas celulares, como a mitocondrial (GUO, et al., 1998; SMALL, et al., 2012a).



Figura 1.7 Rotas extrínseca (via do receptor de morte mediado por ligante) e intrínseca (mitocondrial) do processo de apoptose. A figura foi extraída do livro ROBBINS BASIC PATHOLOGY e adaptada ao português (KUMAR, et al., 2007).

Utilizando diferentes abordagens, vários grupos sugerem que o timerosal induz apoptose em diversas linhagens de células não-renais (BASKIN, et al., 2003; HUMPHREY, et al., 2005; KUO, et al., 2009; LI, et al., 2012). Até o momento, o único estudo que avaliou um potencial mecanismo de nefrotoxicidade do timerosal no tecido renal foi realizado por JAN e colaboradores que demonstraram que este agente organomercurial induz aumento de cálcio intracelular, em células renais caninas (*Madin Darby canine kidney*) (JAN, et al., 2003). No entanto, nenhum outro estudo foi realizado a fim de verificafr a toxicidade renal do timerosal/EtHg e seus mecanismos (CARNEIRO, et al., 2013).

### 2. OBJETIVO GERAL:

Este trabalho teve como objetivo avaliar a distribuição tecidual e meias-vidas do Hg, seu metabolismo (conversão) no sangue e frações (eritrócitos e plasma) e nefrotoxicidade após exposição ao timerosal utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*, contribuindo assim para o conhecimento e definição do potencial tóxico do EtHg/timerosal.

# 2.1. Objetivos Específicos:

# 2.1.1. Estudo I: Estudo da distribuição e meias-vidas teciduais de Hg *in vivo* após exposição à timerosal

Determinar e avaliar a distribuição das espécies químicas de Hg formadas nos tecidos de camundongos *Swiss* (cérebro, coração, rim, fígado e sangue) após 0,5; 1; 8; 16; 144; 720 e 1980 horas (h) da injeção intramuscular contendo 20 µg de Hg na forma de timerosal. Também foi objetivo estimar as meias-vidas biológicas do Hg nos tecidos em estudo.

# 2.1.2. Estudo II: Estudo da conversão do EtHg presente no timerosal em sangue total e frações (plasma e eritrócitos) *in vitro*

Avaliar a conversão do timerosal e EtHg em sangue total, plasma e eritrócitos. O estudo II foi realizado em três experimentos diferentes com os seguintes objetivos específicos: (i)-avaliar a conversão do timerosal e EtHg em amostras de sangue total, plasma e eritrócitos; (ii) e (iii)- elucidar um potencial mecanismo subjacente à dealquilação do EtHg no sangue e frações. 2.1.3. Estudo III: Estudo dos mecanismos de citotoxicidade renal *in vitro* do timerosal (desenvolvido no estágio de Doutoramento Sanduíche sob orientação e supervisão da Prof. Dra. Glenda Gobe na *The University of Queensland*, Austrália)

Avaliar e determinar os mecanismos envolvidos na citotoxicidade de timerosal em células de rim humano (células HK2). Didaticamente, este estudo foi dividido nos seguintes objetivos específicos (métodos):

**A.** Avaliar a viabilidade celular em um estudo dose-resposta (ensaio do 3- (4,5- dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina - MTT);

B. Avaliar apoptose e a proliferação celular (microscopia ótica);

C. Avaliar a expressão da proteína Bax (Western blot);

D. Avaliar o estado de saúde mitocondrial (medição de fluorescência e microscopia confocal com imunofluorescência);

**E.** Avaliar o potencial fibrótico do timerosal pela determinação da concentração de fibronectina no meio de cultura celular (ELISA) e expressão de TGF-β1 nas células (*Western blot*).

# 3. MATERIAIS E MÉTODOS

# 3.1. Estudo I: Estudo da distribuição e meias-vidas teciduais de Hg *in vivo* após exposição à timerosal

## 3.1.1. Equipamentos, reagentes e soluções

As análises de especiação de Hg foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC, PerkinElmer L-200, Norwalk, CT, EUA) e um espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS, PerkinElmer, Norwalk, CT, EUA) operando com argônio de alta pureza (99,999 %, Praxair – White Martins, Brasil) hifenados por um injetor de 6 saídas (Rheodyne 9725). O eluente do HPLC foi introduzido diretamente no nebulizador do ICP-MS através de tubos conectores. A coluna de fase reversa utilizada foi uma C8 com dimensões de 3µm, 33mm x 4,6 mm (Brownlee Columns, PerkinElmer, Norwalk, CT, EUA). Ambos os equipamentos foram conectados em um computador Dell Pentium 4 com os softwares Elan® (versão 3.4) e Chromera® (versão 2.1.0.1631) em uma sala limpa classe 100. O sistema de introdução de amostra utilizado no ICP-MS foi composto de câmara de nebulização de quartzo tipo ciclônica e um nebulizador de Meinhard® conectados por tubos tygon® à bomba peristáltica do ICP-MS. O ICP-MS foi equipado com cone de amostragem e *skimmer* de platina (PerkinElmer, Norwalk, EUA).

Um processador ultra-sônico (Vibracell VC 100) com ponteira de titânio (Sonics & Materials Inc., Danburry, CT, EUA) e banho de ultra-som 1400 A (ORIGINAL, Brasil) foram empregados na extração de Hg das amostras de sangue e tecidos.

Água deionizada de alta pureza (resistividade 18,2 M Ω.cm) obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore<sup>®</sup>, Bedford, MA, EUA) foi utilizada em todo o trabalho. Para o tratamento dos animais, timerosal (aproximadamente 98 %, HPLC) foi utilizado (Sigma-Aldrich, MO, EUA). Todos os reagentes usados foram de grau analítico. Ácido clorídrico a 37 % (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi duplamente destilado num aparelho de sub-ebulição de quartzo (Kürner Analysentechnik, Rosenheim, Alemanha). Os seguintes sais foram obtidos da Sigma-Aldrich para confecção das soluções padrão de Hg: cloreto de MeHg (CH<sub>3</sub>HgCl), cloreto de EtHg (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>HgCl)

e cloreto de Hg (HgCl<sub>2</sub>). Os padrões de calibração para a análise de espécies de Hg foram preparados diariamente nas concentrações de 0, 5, 10 e 20 mg/l em extrator de Hg. Ácido fórmico e 2-mercaptoetanol foram também adquiridos da Sigma-Aldrich. A solução de extração foi preparada diariamente e composta de 0,10 % v/v de HCl + 0,05 % m/v L-cisteína + 0,10 % v/v de 2-mercaptoetanol.

Todas as soluções e amostras foram condicionadas em frascos de polietileno após prévio tratamento para eliminação de contaminantes. Para tal, frascos de plástico foram mergulhados em solução contendo 10 % v/v HNO<sub>3</sub> por 24 h, lavados com água Milli-Q e secos em capela de fluxo laminar classe 100. Todas as operações para preparo das soluções foram realizadas em sala limpa classe 1000.

#### 3.1.2. Delineamento experimental

Camundongos *Swiss* machos pesando aproximadamente 25g (quinta semana de vida) provindos do Biotério Central da Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto - foram utilizados. Os animais foram submetidos a ciclos de 12h claro/12h escuro em uma sala com temperatura controlada (22 - 25 °C) e livre acesso a água e comida. Os animais foram manuseados e tratados de acordo com as orientações da Comissão sobre Cuidados no Uso de Animais Experimentais da Universidade de São Paulo. Além disso, o estudo tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, conforme Parecer emitido em anexo (Anexo I).

A solução de timerosal foi preparada em água Milli-Q na concentração de 400 µg/ml. Os animais (n = 28) foram expostos a 20 µg de Hg sob a forma de timerosal - o que corresponde a uma dose de 0,8 mg Hg/kg - por uma injeção no músculo posterior da pata direita traseira (50 µl). A eutanásia e coleta dos tecidos dos animais ocorreram após 0,5 horas (h), 1 h, 8 h, 16 h, 144 h (6 dias (d)), 720 h (30 d) e 1980 h (80 d) a partir da exposição (4 animais por tempo de estudo). Após confirmação da anestesia (feita por injeção intraperitoneal de pentobarbital de sódio na dose de 150 mg/kg), o sangue foi coletado por punção cardíaca e armazenado em tubo livre de metais em nitrogênio líquido. Em seguida, cérebro, coração, rim e fígado também foram coletados em tubos criogênicos e armazenados em nitrogênio

líquido. Em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer a -80°C até o dia das análises.

A análise descritiva foi usada para mostrar alguns resultados deste estudo. As concentrações de espécies de Hg ( $\mu$ g/ml ou  $\mu$ g/g) foram transformadas em  $\mu$ g - dividindo-se a concentração pela massa do respectivo órgão (g) ou volume de sangue (ml) - previamente determinados. Este balanço de massa foi realizado devido ao fato das concentrações de Hg em  $\mu$ g/ml ou  $\mu$ g/g não refletirem a quantidade real de Hg acumulado em tecidos, isto é, as concentrações neste formato são influenciadas pela extensão dos tecidos. Por exemplo, para uma mesma concentração de Hg em  $\mu$ g/g em um tecido maior e um menor, no segundo haverá maior conteúdo de Hg em  $\mu$ g.

Além disso, em cada ponto de tempo, a quantidade total de Hg obtida - isto é, a soma dos µg de Hg nos tecidos monitorados individualmente - foi considerada como 100 %. Isto foi feito a fim de melhor ilustrar a contribuição de cada um dos órgãos/tecidos à carga total de Hg no organismo em cada um dos tempos em análise. Além disso, as percentagens de Hgi e EtHg foram calculadas em cada órgão/tecido em cada ponto de tempo em estudo.

A percentagem de Hg - considerando a dose inicial de 20 µg como 100% - foi também estimada para cada órgão/tecido em cada ponto de tempo. Isto foi feito para visualizar o quanto de Hg ficou retido em cada tecido ao longo do tempo em relação à dose inicial.

# 3.1.3. Preparo das amostras e método

Para o sangue (n=4), uma alíquota de 250 µl foi adicionada de 2,75 ml de solução de extração. A mistura foi sonicada durante 15 minutos (min) no banho de ultra-som e a solução resultante foi centrifugada a 3000 rpm (1077 g) durante 10 minutos e filtrada usando filtros de 0,20 µm de Nylon® (Millipore, Bedford, MA, EUA). Após, as amostras (100 µl) foram diretamente injetadas no sistema de HPLC-ICP-MS e analisadas quanto às concentrações das espécies de Hg. Para os diferentes tecidos em estudo (n=4), a preparação inicial envolveu a liofilização, homogeneização e pesagem (de 30 a 100 mg) das amostras. Às amostras foram

adicionados 5 ml de solução extratora e a mistura foi sonicada utilizando-se ponteira ultra-sônica programada em 80 % de amplitude, 50W de potência e 20 kHz de frequência. Após, a mistura resultante seguiu o mesmo caminho das amostras de sangue: banho de ultra-som (15 min), centrifugação (3000 rpm por 10 min), filtragem (0,20 µm) e injeção no equipamento (100 µl).

Todas as separações foram realizadas à temperatura ambiente, sob condições isocráticas. Na tabela 3.1 estão demonstrados os parâmetros operacionais do ICP-MS, HPLC e geração de vapor frio utilizados na análise de especiação química de Hg. A fase móvel foi composta de 3 % v/v metanol + 97 % v/v (0,5 % v/v 2-mercaptoetanol + 0,05 % v/v de ácido fórmico). O fluxo usado foi de 1,2 ml/min. Materiais de referência padrão de sangue bovino e soro humano contendo elementos tóxicos (obtidos respectivamente do *National Institute of Standards and Technology* -NIST, Gaithersburg, MD e In*stitut National de Santé Publique*, Quebec, Canadá) ou ainda um padrão de espécies de Hg conhecido (10 ppb) foram analisados a cada 3 corridas de amostras a fim de garantir a reprodutibilidade e condições adequadas dos equipamentos de acordo com o recomendado por DE SOUZA e colaboradores (DE SOUZA, et al., 2013). Os cromatogramas resultantes foram avaliados utilizando o software Chromera®. As condições experimentais ótimas para o método foram estabelecidas de acordo com DE SOUZA e colaboradores (DE SOUZA, et al., 2013).

ICP-MS	
Potência de radiofreqüência	1200 W
Câmara de spray	Ciclônica
Nebulizador	Concentric Meinhard
Vazão do gás (Ar)	Plasma - 15 l/min; auxiliar 1,2 l/min
Vazão do gás de nebulização	0.8 l/min
Interface	Cones de platina
Cone de amostragem	1,1 mm
Skimmer	0,9 mm
Isótopo monitorado	Hg <sup>202</sup>
Modo de operação do DRC	Padrão
HPLC	
Modo de transição	Isocrático
	3 % v/v metanol + 97 % v/v
Fase móvel	(0,5 % v/v 2-mercaptoetanol +
	0,05 % v/v ácido fórmico)
Vazão da fase móvel	1,2 ml/min
Volume de injeção	100 µl
Coluna cromatográfica	C <sub>8</sub> , 3µm, 33 x 4,6 mm
Quantificação	Área do pico
Tempo de equilíbrio	1 min
Tempo de corrida	8,5 min
Tempo de lavagem	1 min
Geração de vapor frio	
NaBH₄ em 0,08 % m/v NaOH	0,06 % m/v
Vazão de NaBH4	0,65 ml/min

Tabela 3.1 Parâmetros de operação do ICP-MS, HPLC e geração de vapor frio

### 3.1.4. Análise estatística

As médias das concentrações das espécies de Hg obtidas nos órgãos/tecidos foram comparadas considerando somente o tempo imediatamente anterior através do teste t.

As meias-vidas teciduais do Hg foram estimadas usando o software de modelagem farmacocinética SAAM II (Instituto SAAM, WA, EUA). No rim, o modelo monocompartimental não forneceu um ajuste satisfatório dos dados de concentrações médias de Hg por tempo. Os dados de concentração do Hg foram log transformados e as meias-vidas para o declínio mono/bi-exponencial das concentrações de Hg foram estimadas por fórmulas padrão (FOSS, 1969; GIBALDI, 1982; BONATE, 2006; WOLFSEGGER, 2006).

A significância estatística foi estipulada em 5%. Os procedimentos estatísticos e preparação das figuras foram realizados utilizando o software GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software, Inc. CA, EUA).

# 3.2. Estudo II: Estudo da conversão do EtHg presente no timerosal em sangue total e frações (plasma e eritrócitos) *in vitro*

#### 3.2.1. Equipamentos, reagentes e soluções

Os equipamentos, reagentes e soluções utilizados foram os mesmos descritos no item 3.1.1 (Estudo I).

### 3.2.2. Delineamento experimental

Conforme anteriormente relatado, este estudo foi subdivido em 3 etapas, que tiveram a coleta das amostras (sangue total e separação de plasma e eritrócitos) feita no dia do experimento e sempre de forma idêntica. Assim, amostras de sangue

humano (30 ml) foram coletadas da veia mediana cubital em tubos *metal-free* contendo heparina. Após a homogeneização, 15 ml de sangue foram centrifugados a 3000 rpm (1077 g) durante 10 minutos, para obtenção de plasma e eritrócitos. Depois de coletar o plasma e remover o anel leucocitário, os eritrócitos foram lavados três vezes em solução tamponada de fosfato salino isotônico (PBS) frio de acordo com o procedimento descrito por (HARISA, et al., 2012). Todas as soluções utilizadas neste estudo foram preparadas diariamente.

Na primeira etapa, alíquotas de sangue total, plasma e eritrócitos foram mantidas em banho-maria a 37 °C. Em seguida, a estas alíquotas, soluções de timerosal ou de EtHg foram adicionados, resultando numa concentração final de Hg de 3 mg/l. Sangue, plasma e eritrócitos também foram avaliados sem a adição de Hg (amostras controle). Vinte e quatro horas após a incubação com timerosal/EtHg, as amostras foram analisadas para a determinação de espécies de Hg (n=4). Como não houve diferença estatística nas concentrações das espécies de Hg formadas entre os compostos, no segundo e terceiro experimento, decidiu-se por usar apenas EtHg.

As segunda e terceira etapas do experimento foram realizadas da mesma maneira que o da primeira etapa com o adicional de avaliar um mecanismo potencialmente envolvido na conversão de EtHg em Hgi. Assim, na segunda etapa, alíquotas de sangue total, plasma e eritrócitos foram mantidas em banho-maria a 37 °C. Em seguida, a estas alíquotas, foram adicionadas soluções de EtHg e cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>), resultando em concentrações finais de 3 mg/l de Hg e 400 mg/dl de ferro (Fe). Vinte e quatro horas após a incubação com e EtHg e EtHg+Fe, as amostras foram analisadas para a determinação de espécies de Hg (n=4).

Na terceira etapa, a análise foi realizada em amostras de plasma. Alíquotas de plasma humano foram mantidas em banho-maria a 37 °C, após coleta e centrifugação. Em seguida, as amostras foram alocadas em três grupos de tratamento (concentração final): (a) - etHg (3 mg/l); (b) - etHg (3 mg/l) + peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (10 mM); (c) - etHg (3 mg/l) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM) + dimetil sulfóxido (DMSO) (100 mM). Vinte e quatro horas mais tarde, as amostras de plasma foram analisadas para determinação das espécies de Hg (n=4).

O fundamento para o estudo das etapas 2 e 3 é que o principal mecanismo sugerido para a biotransformação de Hg orgânico é mediado pela ação de espécies reativas de oxigênio, especificamente, o OH• (SUDA, et al., 1991), formado através da reação de Fenton e Haber -Weiss, demonstrada na Figura 3.1. O Fe é o cofator desta reação e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, um substrato para a formação de OH• (HALLIWELL; CHIRICO, 1993). Além disso, o DMSO é um potente *scavenger* de OH• (BRUCK, et al., 1999).

$$O_2^- + Fe^{3+} \longrightarrow O_2^+ Fe^{2+}$$
  
 $H_2O_2^+ Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^-$ 

Figura 3.1 Etapas da reação de Fenton e Haber-Weiss.

#### 3.2.3. Preparo das amostras e método

Vinte e quatro horas após a adição de EtHg ou EtHg +Fe ou EtHg +H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou EtHg+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+DMSO, as amostras de plasma foram mantidas em banho-maria a 37°C. No preparo de amostras para análise, a alíquotas de 250 µl de amostra foram adicionados 2,75 ml de solução de extração. A mistura permaneceu durante 15 min no banho de ultra-som e a solução resultante foi centrifugada (3000 rpm por 10 min) e filtrada usando filtros de 0,20 mM de Nylon ® (Millipore, Bedford, MA, EUA). Em seguida, as amostras (100 µl) foram diretamente injetadas no sistema de HPLC-ICP-MS e analisadas quanto às concentrações das espécies de Hg. O método utilizado para a especiação química de Hg foi o mesmo descrito no item 3.1.3. Os parâmetros de operação do ICP-MS, HPLC e geração de vapor frio para este estudo são os mesmos descritos na tabela 3.1 (Estudo I).

#### 3.2.4. Análise estatística

As concentrações médias das espécies de Hg obtidas em sangue total, plasma e eritrócitos foram comparadas em relação ao composto utilizado (EtHg ou timerosal) no primeiro experimento, utilizando ANOVA uma via seguida pelo teste de *Tukey*, quando necessário. Similarmente, nas segunda e terceira experiências, a influência de Fe/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+DMSO sob a conversão do EtHg foi testada utilizando a mesma combinação de testes estatísticos.

A significância estatística foi estipulada em 5%. Os procedimentos estatísticos e preparação das figuras foram realizados utilizando o software GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software, Inc. CA, EUA).

# 3.3. Estudo III: Estudo dos mecanismos de citotoxicidade *in vitro* do timerosal (desenvolvido no estágio de Doutoramento Sanduíche)

Primeiramente, deve-se pontuar que este estudo foi desenvolvido durante o estágio de Doutoramento Sanduíche sob orientação e supervisão da Prof. Dra. Glenda Gobe no *Centre of Kidney Disease Research* (CKDR) na *The University of Queensland* (UQ) - Australia.

# 3.3.1. Equipamentos, reagentes e soluções

Um leitor de microplaca foi utilizado para o ensaio de viabilidade celular (Multiskan Go micro plate reader, Thermo Scientific, VIC, Austrália). Para a estimativa de células em apoptose assim como em proliferação, utilizou-se um microscópio ótico Nikon Eclipse 50i (Nikon Instruments Inc., NY, EUA). A avaliação da fluorescência das estruturas celulares foi realizada utilizando-se um microscópio confocal de fluorescência Olympus FluoView 1200 (Olympus, PA, EUA). Para a mensuração da fluorescência do corante JC-1 foi utilizado um leitor de placa de fluorescência Synergy MxMonochromator-Based Multi-Mode (BioTek, VT, EUA). Para a determinação de fibronectina, utilizou-se o leitor de ELISA IEMS Reader MF (LabSystems, Helsinki, Finland).

3 - [4, 5 - dimetiltiazol - 2 - il] -2, brometo de 5 - difeniltetrazólio (MTT), solução de Ponceau S e timerosal foram adquiridos da Sigma-Aldrich (MO, EUA). Dimetilsulfóxido (DMSO) foi adquirido da Ajax Finechem (NSW, Austrália). Os seguintes meio de cultura e suplementos foram adquiridos da Gibco (Invitrogen, CA, EUA): 1:1 meio DMEM:F12, soro bovino fetal, Penstrep e tripsina-EDTA. Inibidores de protease foram adquiridos da Roche Diagnostics Corporation (IN, EUA). Frascos e placas de cultura foram adquiridos da Becton - Dickinson Labware (NJ, EUA). Os seguintes anticorpos primários e secundários foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (CA, EUA): Bax (sc - 6236), TGF-β1 (sc - 146) e IgG de carneiro anti-coelho (sc -2004). As fontes de outros materiais são mencionadas ao longo do texto.

#### 3.3.2. Cultura de células e delineamento experimental

A linhagem celular epitelial túbulo-proximal imortalizada de rim humano HK2 foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC) (MA, EUA). As células foram cultivadas em meio DMEM/F12 contendo 10 % de soro bovino fetal, penicilina (50 U/ml) e estreptomicina (50 mg/ml) em uma atmosfera umidificada de 95 % ar e 5 %  $CO_2$  a 37°C.

#### 3.3.3. Avaliação de citotoxicidade e potenciais mecanismos

# 3.3.3.1. Viabilidade celular

A viabilidade celular em resposta ao tratamento foi avaliada utilizando o ensaio do MTT. Células HK2 (5 x 10<sup>4</sup> células/ml) foram semeadas em placas de 96 poços. No decorrer de 24 h, as células foram tratadas com timerosal em diferentes concentrações: 0  $\mu$ M; 0,125  $\mu$ M, 0,25  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M. O volume da cultura foi de 100  $\mu$ I. Vinte e quatro ou 48 h depois, o meio de cultura foi removido e as células foram incubadas com 100  $\mu$ I de meio de cultura fresco isento de timerosal, contendo 0,25 mg/ml de MTT a 36,5°C durante 90 min. O meio de cultura foi removido e os cristais roxos formados foram dissolvidos em 100  $\mu$ I de DMSO. A absorbância foi lida a 570 nm com uma correção de fundo de 690 nm em um micro leitor de placas Multiskan Go (Thermo Scientific, VIC, Austrália).

### 3.3.3.2. Avaliação da proliferação celular e apoptose

Células HK2 foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamelas de vidro circulares (5 x 10<sup>4</sup> células/ml). Após, houve tratamento com o timerosal nas seguintes concentrações: 0 µM; 0,125 µM, 0,25 µM, 0,5 µM, 1 µM. O volume de cultura foi de 1 ml. Vinte e quatro horas mais tarde, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS. As células foram então fixadas em paraformaldeído a 4 % à temperatura ambiente. Ao término de 30 min, o paraformaldeído foi retirado e as células foram lavadas novamente com PBS (três vezes) e embebidas em 0,2 % de Triton X - 100 (feito em PBS) durante 10 min para permeabilização das membranas celulares. Após lavagem em PBS, as células foram incubadas em hematoxilina de Mayer (Sigma - Aldrich) durante 5 min e lavadas em água de torneira por 2 min. As lamelas foram submetidas a desidratações em série de etanol (70 % e 95 %). Para a coloração com eosina, as lamelas foram cobertas com a solução alcoólica do corante (Sigma - Aldrich) durante 5 min. As lamelas contendo as células foram em seguida lavadas em série com etanol a 70 %, 95 % e 100 %. Após, as lamelas circulares foram imersas em xileno fresco e montadas em lâminas usando meio de montagem DEPEX (Searle Diagnostics, OH, USA) para posterior análise de microscopia de luz e fotografia utilizando um microscópio Nikon Eclipse 50i (Nikon Instruments Inc., NY, EUA) com ampliação de 200x. Células apoptóticas e em proliferação que ficaram dentro do reticulado de 100 quadrados foram contadas em 5 pontos diferentes de cada uma das 3 lamelas por grupo de tratamento. Células foram consideradas apoptóticas ao exibir certas características morfológicas distintas como hipercromasia, núcleo encolhido/condensado, blebbing da membrana com integridade mantida e corpos apoptóticos de acordo com alguns autores (GOBE; HARMON, 2006; KERR, et al., 1972; KERR, et al., 1995). Já as células em proliferação foram identificadas por placa de mitose e citocinese. O número de células apoptóticas e em proliferação foi expresso como percentagem do total de células por campo contado em cinco campos aleatórios em cada lamela (n = 3/controle ou grupo exposto).

#### 3.3.3.3. Western blot

Células HK2 foram cultivadas a cerca de 90 % de confluência em placas de petri de 100x20mm e tratadas com timerosal nas seguintes concentrações: 0 µM, 0,25 µM, 0,5 µM, 1 µM. O volume da cultura foi de 10 ml. Vinte e quatro horas mais tarde, o meio de cultura foi removido e o extrato protéico foi coletado por lise celular utilizando-se 100 µl de tampão de ensaio de rádio imuno-precipitação (RIPA buffer) composto por 50 mM Tris - CI (pH 7,5), 150 mM NaCl, 25 mM NaF, EDTA 0,5 mM, SDS 0,1 % (w/v), IGEPAL CA - 630 1 % (todos da Sigma- Aldrich) de acordo com protocolo de (Pat et al., 2003). O lisado celular foi centrifugado a 3000 rpm a 4 °C durante 15 min em centrífuga Sigma 113 (SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Alemanha). O sobrenadante foi recolhido e o teor de proteína foi mensurado utilizando-se o ensaio do ácido bicinconínico (BCA) (Pierce, IL, EUA). Os lisados foram divididos em alíquotas e armazenados a -80°C até análise. Cinquenta µg de extrato protéico foram resolvidos em gel de Tris - HCl a 10 % (Biorad, CA, EUA) e transferidos para uma membrana de difluoreto de polivinila (PVDF) (Biorad, CA, EUA). A transferência e carregamento homogêneo das proteínas foram confirmados por coloração das membranas com solução Ponceau S. O imunoblotting foi realizado contra as proteínas (diluições) Bax (1: 500) e TGF-β1 (1:500) durante 24 h a 4 °C. Procedimentos padrão do protocolo de Western blot foram seguidos, e as proteínas foram coradas em filme fotográfico utilizando-se o reagente SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, IL, EUA). As bandas protéicas puderam ser vistas no filme fotográfico após a imersão do mesmo nos reagentes utilizados para a revelação em sala escura. Após lavagens seriadas com tampão de lavagem e de bloqueio para evitar ligação inespecífica, todas as membranas foram testadas para a proteína GAPDH (1:1000). Os anticorpos secundários conjugados com HRP foram usados na concentração de 1:1000.

O software Scion Imagem Alpha 4.0.3.2 (*Scion Corporation*, MD, EUA) foi usado para a obtenção da densitometria, sendo que os *immunoblots* de GAPDH foram utilizados para normalizar as respectivas densitometrias de Bax e TGF-β1. Os resultados foram expressos como alteração em relação ao valor das células controle, designado como igual a 1. Tal alteração foi calculada dividindo-se o valor da densitometria arbitrária do grupo de tratamento pelo valor arbitrário do respectivo

grupo não tratado. Para cada proteína analisada foram realizados três experimentos independentes.

#### 3.3.3.4. Avaliação da função mitocondrial

# 3.3.3.4.1. MitoTracker Red CMXRos e imunofluorescência da proteína Bax

Células HK2 foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamelas de vidro circulares (6 x 10<sup>3</sup> células/ml) e após 24 h, tratadas com timerosal a 0 µM, 0,25 µM, 0,5 µM, 1 µM. O volume da cultura foi de 1 ml. Vinte e quatro horas mais tarde, as células foram lavadas duas vezes em meio isento de soro e coradas com MitoTracker Red CMXRos 100 nM (Invitrogen Austrália, VIC, Austrália) por 30 min. As células foram então fixadas em metanol arrefecido com gelo durante 15 min a -20 °C e lavadas três vezes com PBS. Após, houve permeabilização com Triton - X100 0,2 % (em PBS) durante 10 min e lavagem (6 vezes) com PBS. Para evitar a ligação não específica, as células foram bloqueadas com uma solução 1:1 soro fetal bovino: albumina de soro bovino durante 30 min e, em seguida, lavadas em PBS. Após, houve incubação das células com anticorpo primário Bax (1:200) durante 2h à temperatura ambiente, sendo posteriormente lavadas em PBS. O passo seguinte foi a adição do anticorpo secundário Pierce Alexa - Fluor (1:100) (Molecular Probes Inc., OR, EUA). Após 60 min as células foram lavadas em PBS e expostas ao corante nuclear DAPI (300 nM) (Molecular Probes Inc.). As lamelas circulares foram montadas em lâminas utilizando meio de montagem Vectashield aquoso (Vectashield, Vecta Laboratories, CA, EUA). As células foram visualizadas e fotografadas em microscópio confocal de fluorescência FluoView 1200 (Olympus, PA, EUA) em aumento de 63x em objetiva de imersão.

### 3.3.3.4.2. Avaliação fluorimétrica

Ο 5 ', 1 3'corante 5. 6, 6'-tetracloro-1, 3. tetraethylbenzimidazolylcarbocyanineiodide (JC-1) é um fluoróforo que seletivamente se acumula na membrana mitocondrial e modifica sua coloração de verde a vermelho de acordo com o potencial elétrico de tais organelas. Em células saudáveis mitocôndrias possuem potencial transmembrana (ΔΨm) alto e JC-1 as espontaneamente forma complexos - J-agregados - que fluorescem vermelho. Por outro lado, em células com mitocôndrias avariadas (baixo ΔΨm), o corante permanece na forma monomérica, que tem fluorescência verde (PERELMAN, et al., 2012).

Para este ensaio, células HK2 foram semeadas em placas de 96 poços (75 x  $10^2$  células/ml) e 24 h depois, tratadas com timerosal a 0 µM, 0,25 µM, 0,5 µM, 1 µM. O volume da cultura foi de 100 µl. Vinte e quatro horas mais tarde, as células foram lavadas e incubadas durante 30 min em 100 µl de meio de cultura isento de soro contendo JC-1 (3 µM). Após incubação durante 30 min, as células foram lavadas duas vezes em PBS e as placas envoltas em papel de alumínio e imediatamente levadas ao leitor de fluorescência para análise (Synergy MxMonochromator, BioTek, VT, EUA). Foram utilizados os seguintes comprimentos de onda (excitação-emissão): JC-1 vermelho (525-590 nm) e JC-1 verde (490-530 nm). Após, foi feita normalização do valor de fluorescência pela concentração de proteínas em cada poço (mensurada posteriormente pelo ensaio do BCA).

## 3.3.3.5. Determinação de fibronectina

Células HK2 foram cultivadas numa placa de 24 poços durante 24 h (1 x  $10^5$  células/ml) e tratadas com timerosal (0 µM, 0,25 µM, 0,5 µM, 1 µM) durante 24 h. O volume da cultura foi de 1 ml. Os meios de cultura foram recolhidos para as determinações de fibronectina utilizando o ensaio imunoenzimático ELISA, como previamente descrito por (CHRISTIANSEN, et al., 1988). O tampão de lavagem utilizado foi PBS contendo 0,05 % de Tween 20 (pH 7,4). O tampão de revestimento

foi de carbonato/bicarbonato (0,05 mol/l) (pH 9,7). Cada um dos 96 poços da placa de microtitulação de fundo chato (NalgeNunc Internacional, NY, EUA) foi revestido com 100 µl de fibronectina de coelho anti- humana (Dako, Glostrup, Dinamarca) diluída para uma concentração de 10 mg/ml em tampão de revestimento durante 24 h a 4°C. As placas foram então lavadas quatro vezes com tampão de lavagem. As amostras adequadamente diluídas foram então adicionadas à placa de ensaio, juntamente com padrões de concentração de fibronectina. As placas foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente e depois lavadas três vezes com tampão de lavagem. Em seguida, 100 µl do anticorpo secundário de fibronectina conjugado com peroxidase (Dako) diluído a 1:3000 em PBS contendo 0,05 % de Tween- 20 foram adicionados a cada poço de placa. Após 1 h de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lavadas e incubadas com o substrato ortofenilenodiamina (OPD) de acordo com as instruções do fabricante (Dako). A reação de coloração foi terminada com a adição de 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5 mol/l) e determinou-se a absorbância a 492 nm (leitor de IEMS MF, LabSystems, Finlândia). Uma curva padrão foi construída e as concentrações foram determinadas a partir da equação de tal curva (6 - 200 ng/ml). Os resultados foram obtidos a partir de quatro amostras independentes analisadas em duplicata por grupo de tratamento. Foi realizado ensaio BCA para determinação da concentração de proteína, mas não houve diferença estatística entre os grupos. O experimento teve ainda controles internos contendo apenas meio de cultura (meios de cultura com ou sem timerosal nas diferentes concentrações em estudo - sem células) que passaram pelos mesmos procedimentos e técnicas que as células. Não foi observada diferença significativa entre as concentrações de fibronectina entre estes grupos.

# 3.3.4. Análise estatística

As comparações entre os grupos foram realizadas por meio de análise de variância de uma via seguida do teste post-hoc de *Tukey*, quando apropriado. As análises foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism versão 5 (CA, EUA). Um P<0,05 foi considerado significativo. Os resultados foram expressos como média ± DP.

### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo I: Estudo da distribuição e meias-vidas teciduais de Hg *in vivo* após exposição à timerosal

# 4.1.1. Hg distribuição nos tecidos de ratos expostos ao timerosal

Um cromatograma típico obtido por uma solução estoque contendo 10 µg/l de cada uma das espécies de Hg (expresso como Hg, m/z= 202) pode ser observado na Figura 4.1. Este cromatograma é um exemplo dos cromatogramas obtidos nas análises de especiação de Hg realizadas nos estudos I e II.



Figura 4.1 Cromatograma típico obtido por uma solução estoque de espécies de Hg a 10 µg/l (expresso como Hg, m/z= 202)

A Tabela 4.1 mostra as quantidades de Hg (EtHg e Hgi) em µg acumuladas nos órgãos e sangue de camundongos em diferentes momentos após a exposição ao timerosal. Em cada compartimento, as quantidades de Hg foram expressas em µg, dividindo-se a concentração encontrada (µg/ml or µg/g), pelo volume total de sangue no corpo do animal (camundongos de 25g) ou a massa média obtida do respectivo órgão (em gramas) - anteriormente determinadas em 3 animais do grupo controle com 25g. Este balanço de massa foi realizado devido ao fato de as concentrações

de Hg (como as µg/ml or µg/g) não refletirem diretamente a quantidade absoluta de Hg acumulado nos tecidos, ou seja, para uma concentração de Hg similar em µg/g, um tecido com menor massa conteria mais Hg.

A quantidade total de Hg medido 0,5 h após a exposição ao timerosal (soma do Hg determinado em órgãos e sangue) foi de  $17,3 \pm 0,8 \mu g$  (Tabela 4.1). A quantidade restante de Hg (considerando a dose administrada de 20 ug) está provavelmente distribuída em outros órgãos não abordados neste estudo ou foi excretada. Mesmo assim, é razoável considerar a soma de Hg determinada no sangue, cérebro, coração, fígado e rim como 100 % do Hg total no organismo, uma vez que o valor encontrado é próximo de 20  $\mu g$  e possivelmente a contribuição de outros órgãos é menos relevante. Assim, a contribuição de cada órgão e do sangue para a carga total de Hg é também representada em percentagem na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Hg (µg) determinado nos órgãos e sangue de camundongos em diferentes tempos após a administração de timerosal e as respectivas porcentagens de cada espécie química, porcentagem de Hg em cada órgão/sangue considerando a soma de Hg como 100% e a razão de Hg total órgão/sangue em cada tempo de estudo

Tempo pós- exposiçã o	Órgão/ Sangue	Média de Hg total (µg) ± DP	Hgi (%)	EtHg (%)	% de Hg considerando a soma do Hg nos tecidos como 100% em cada tempo	Razão Hg total [órgão] / [sangue]
	coração	0,11±0,02	100	0	0,65	0,1
	fígado	3,26±0,31	53	47	18,8	2,5
05 h	Rim	12,44±3,34	60	40	71,9	9,4
0,5 11	cérebro	0,17±0,04	52	48	0,97	0,1
	sangue	1,33±0,32	46	54	7,66	1,0
	Total	17,31±0,8				
	coração	0,43±0,05	94	6	2,35	0,4
1 h	fígado	3,66±0,44	48	52	20	3,1
	rim	12,95±1,91	65	35	70,8	10,9
	cérebro	0,07±0,01	56	44	0,39	0,1
	sangue	1,19±0,10	71	29	6,48	1,0
	total	18,30±2,44				

8 h	coração	0,26±0,02	95	5	1,46	0,7
	fígado	3,46±0,33	42	58	19,33	9,4
	rim	13,76±1,48	67	33	76,9	37,4
	cérebro	0,04±0,001	53	47	0,2	0,1
	sangue	0,37±0,02	75	25	2,06	1,0
	total	17,89±0,37				
	coração	0,24±0,02	87	13	1,42	0,5
	fígado	4,27±0,76	43	57	24,9	8,4
40 h	rim	12,10±0,82	80	20	70,4	23,9
16 N	cérebro	0,06±0,0001	55	45	0,32	0,1
	sangue	0,51±0,19	83	27	2,95	1,0
	total	17,17±0,36				
	coração	0,04±0,01	77	23	0,88	0,5
	fígado	1,19±0,26	67	33	24,7	14,0
144 h	rim	3,5±1,29	92	8	72,5	41,2
(6 dias)	cérebro	0,01±0,0001	100	0	0,21	0,1
	sangue	0,09±0,03	100	0	1,76	1,0
	total	4,83±0,26				
	coração	0,01±0,001	100	0	1,90	0,2
	fígado	0,19±0,03	83	17	54	4,7
720 h	rim	0,10±0,02	94	6	27,9	2,4
(30 dias)	cérebro	0,02±0,001	100	0	4,63	0,4
	sangue	0,04±0,02	100	0	11,6	1,0
	total	0,36±0,01				
	coração	ND	-	-	-	-
	fígado	ND	-	-	-	-
1980 h	rim	0,02	100	0	100	-
(80 dias)	Cérebro	ND	-	-	-	-
	sangue	ND	-	-	-	-
	Total	0,02				

ND: não detectado. DP: desvio padrão.

Aparentemente, não existe excreção de Hg de 0,5 h a 16 h da exposição ao timerosal, uma vez que a soma dos  $\mu$ g de Hg obtidos nos órgãos monitorados ligeiramente se altera (variou de 17,31 ± 0,8  $\mu$ g (0,5 h) para 17,17 ± 0,36  $\mu$ g (16h)). Além disso, durante este mesmo período, não houve mudança significativa na

contribuição do sangue e órgãos considerando a porcentagem de cada um para a carga corporal total de Hg, em cada momento individualmente (Tabela 4.1). O rim foi o órgão com maior contribuição para a carga corporal de Hg (cerca de 70-75 %) seguido pelo fígado (20-24%). Uma possível causa do acúmulo de Hg no tecido renal a ser apontada é a suscetibilidade inerente da função fisiológica de filtração e elevado fluxo de sangue, como anteriormente comentado (BERNDT, et al., 1985).

Após meia hora da exposição ao timerosal, a quantidade de Hg no sangue correspondeu a aproximadamente 7,6% da carga total de Hg no corpo do animal (6,6%, considerando 20µg). Este dado corrobora os resultados obtidos no sangue de crianças após receberem vacinas contendo 12,5 µg de Hg como timerosal (4,2 -5,1% da dose) (STAJICH, et al., 2000; ASCHNER; CECCATELLI, 2010). Por outro lado, o cérebro foi responsável por menos de 1 % da carga total de Hg corporal, sendo o tecido com menos Hg acumulado após exposição ao timerosal e com maior perda da Hg acumulado em percentagem (Tabela 4.1). A proporção de Hg entre cérebro e sangue foi inferior a 1 (variando de 0,1 a 0,4 - Tabela 4.1). Esta taxa está em concordância com outros estudos (HARRY, et al., 2004; ZAREBA, et al., 2007; ORCT, et al., 2006; BLANUŠA, et al., 2012; RODRIGUES, et al., 2010). Além disso, entre 0,5 h e 16 h após exposição ao timerosal, o Hg encontrado no tecido cerebral se apresentou nas formas de Hgi e EtHg (cerca de 50/50), o que indica que, apesar de possuir tamanho molecular maior em comparação ao MeHg, o EtHg atravessa a barreira hematoencefálica. De fato, recentemente, a captação intracelular de MeHg e de EtHg na forma de complexos com cisteína em células de glioma foi demonstrada ser mediada, pelo menos em parte, pelo sistema de transporte do aminoácido neutro do tipo L (ZIMMERMANN, et al., 2013). No entanto, após 6 d da exposição, o EtHg não foi mais determinado neste tecido (Tabela 4.1). No que diz respeito ao conteúdo de Hgi no cérebro, duas hipóteses principais podem ser lançadas: (i) - o EtHg atravessa a barreira hematoencefálica e, uma vez no interior do cérebro é convertido a Hgi, como observado para o MeHg (VAHTER, et al., 1995) ou; (ii) - há captação direta de Hgi a partir do sangue, uma vez que estudos têm relatado Hgi no cérebro após a exposição ao Hgi (ARVIDSON, 1992; PAMPHLETT; WALEY, 1996; PAMPHLETT; JEW, 2013). Ambos os mecanismos podem estar ocorrendo simultaneamente. Além disso, apesar das baixas concentrações de Hg no cérebro dos camundongos após exposição ao timerosal e o predomínio de Hgi, o risco tóxico não pode ser excluído, uma vez que os tecidos respondem de forma diferente a Hg.

#### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Como comparação, um estudo reportou maior atividade no teste de campo aberto associada a concentrações cerebrais de Hg de 0,4 µg/g observadas após 3 semanas da exposição ao Hgi por uma injeção intraventricular (YASUTAKE, et al., 2010). Tal concentração é próxima da encontrada no presente estudo (cerca de 0,2 µg/g em 0,5 h e 0,1 µg/g em 1h - Figura 4.2). Nesse sentido, tal como sugerido há décadas atrás, qualquer concentração de Hg no cérebro, seja Hg orgânico, seja Hg inorgânico, deve ser vista como potencialmente perigosa (BLAIR, et al., 1975).

Também é interessante observar que das 16 h aos 6 d da exposição ao timerosal houve uma queda considerável na carga corporal total de Hg em µg (de 17,2 µg para 4,83 µg). Ao mesmo tempo, a quantidade de Hg no rim caiu de 12,1 µg para 3,5 µg, demonstrando que a contribuição do rim para a redução da carga corporal total de Hg é importante, de 69 % (8,5 µg). Isso pode significar que uma parte significativa de Hg foi excretada pela urina. Por outro lado, no mesmo período, a carga de Hg no fígado, responsável por menos de 25 % da carga de Hg total no animal sugere que possivelmente o sistema hepático - biliar não seja a principal via de excreção do EtHg. No presente estudo não se determinou as concentrações de Hg na urina ou nas fezes dos animais; no entanto, é razoável acreditar que parte significativa do Hg excretado tenha sido eliminada via urina, uma vez que a maior parte do Hg encontrado no rim estava na forma inorgânica. Este achado é contrário às observações de PICHICHERO, et al. (2002). Segundo esses autores, as concentrações de Hg determinadas em amostras de fezes e urina coletadas de crianças que receberam vacinas contendo timerosal indicaram excreção substancial de Hg por via fecal. No entanto, em seu estudo, PICHICHERO, et al. (2002) coletaram amostra de urina somente uma vez após a vacinação e as concentrações de Hg na urina não tiveram correção de diluição.

Aos 80 d da exposição, o Hg ainda foi determinado nos rins, mas não em outros compartimentos. É importante ressaltar que concentrações elevadas de Hg nos rins também foram observadas em um episódio de intoxicação por EtHg no Iraque (HILMY, et al., 1976). SUZUKI, et al. (1973) relataram concentrações de Hg total e Hgi nos tecidos de um menino de 13 anos, que morreu cinco dias após ter recebido uma infusão de plasma contendo alta quantidade de timerosal (284-540 mg Hg). Concentrações substanciais de Hg foram encontradas no rim deste indivíduo.

A nefropatia tem sido reconhecida como o principal efeito da exposição crônica ao Hgi, induzida principalmente por apoptose e necrose (GEWIN, et al., 2012; SHARMA, et al., 2007). Embora tenha sido fortemente sugerido que o timerosal seja decomposto rapidamente a Hgi após a injeção de timerosal no organismo, pouco se sabe acerca dos efeitos tóxicos das concentrações de ambos EtHg e Hgi no rim. Considerando-se a toxicidade mediada pelo Hgi nos rins, a literatura mostra que, mesmo em exposição considerada baixa (e cerca de quatro vezes superior à concentração de Hg que se administrou no presente estudo), ratos exibiram taxa de filtração glomerular diminuída (ZALUPS, 1997). Além disso, há evidência de insuficiência renal, entre outras lesões de órgãos em um paciente que ingeriu 83 mg/kg de timerosal (PFAB, et al., 1996). No entanto, existe pouca informação sobre os efeitos tóxicos nos rins após a administração de vacinas contendo timerosal. Até hoje, muito pouco se sabe sobre os mecanismos e interações moleculares subjacentes à toxicidade do EtHg/timerosal no rim (CARNEIRO, et al., 2013). Devido ao sistema imaturo/compromisso da função renal, recém-nascidos e pacientes renais, respectivamente, podem estar sob grande risco de toxicidade após exposição ao timerosal na vacinação e merece mais atenção e estudos.

A Tabela 4.1 também mostra as percentagens de EtHg ou Hgi em cada compartimento analisado, após exposição ao timerosal. É evidente neste quadro uma notável mudança na proporção entre as espécies químicas de Hg no sangue entre 0,5 e 1 h após a exposição ao timerosal, o que indica uma rápida dealquilação de EtHg neste fluido e/ou transferência de EtHg aos tecidos. No entanto, não houve alterações significativas na quantidade de EtHg nos órgãos, considerando este mesmo intervalo de tempo, o que sugere que o EtHg é rapidamente convertido a Hgi no sangue uma vez na corrente sanguínea. Além disso, ao longo do tempo, a fração de Hgi aumenta em todos os compartimentos, o que confirma a conversão de EtHg a Hgi como um processo bastante dinâmico.

Uma comparação entre as concentrações de Hg encontradas no sangue e tecidos após exposição ao timerosal em diferentes condições experimentais e doses relativamente semelhantes de exposição pode ser feita observando-se a Tabela 4.2. Em geral, as concentrações de Hg no sangue e tecidos do presente estudo estão dentro das variações de concentração relatadas em outros estudos com diferentes espécies de animais, com a exceção do estudo desenvolvido por HARRY, et al. (2004), que usou uma dose consideravelmente maior.

	Delineamento		Tempo	Hg em	Cor	ncentração de H	lg aproxima	da em mg/l ou	µg/g	_
Espécie animal	experimental e dose	Via	pós exposição*	questão	sangue	cérebro	Coração	fígado	rim	Referência
Camundongo adulto CD-1 (macho)	70 mg Hg/kg (1,75 mg Hg)	IM	24h	Total	22,5	2,6	-	-	97	HARRY, et al., 2004
Camundongo neonatal ICR (ambos os gêneros)	1,4 mg Hg/kg (35 µg Hg)	IM	24h	Hgi/fração orgânica	0,8	0,04/0,2	-	0,9/2,3	0,7/2,5	ZAREBA, et al., 2007
Camundongo adulto Swiss (macho)	0,8 mg Hg/kg (20 μg Hg)	IM	8h 16h 6d	Hgi/EtHg	0,2/0,06 0,3/0,06 0,08/ND	0,04/0,04 0,07/0,05 0,03/ND	2,25/0,12 2,1/0,32 0,33/0,09	1,24/4,08 1,04/2,83 0,72/0,35	21,15/10,12 21,33/5,6 10,7/0,9	Presente estudo
Rato em amamentação <i>Wistar</i> (macho)	0,81 μmol Hg/kg (17 μg Hg), 3x	SC	72h	Total	0,85	0,108	-	1,37	2	ORCT, et al., 2006
Rato em amamentação <i>Wistar</i> (macho)	0,81 µmol Hg/kg (17 µg Hg), 3x	SC	24h 6d	Total	1,2 0,5	0,08 0,08	-	1,5 1,2	1,7 2,1	BLANUŠA, et al., 2012
Rato adulto <i>Wistar</i> (macho)	0,5 mg Hg/kg (100 µg Hg)	Oral	sangue: 12h/ órgãos: 5d	/120h (Total) (Hgi/EtHg)	0.4/0.05	0,16/0,035	0,84/ND	3,0/0,5	9,5/0,38	RODRIGUES, et al,, 2010
Macaco adulto (ambos os gêneros)	207 µg Hg	IN	6 meses de exposição	Hgi/fração orgânica	0,012/0,004	0,012/0,020	-	0,073/0,007	0,41/0,05	BLAIR, et al., 1975
Macaco infantil (ambos os gêneros)	35 µg Hg, divididos em 4x	IM	7d	Total	0,006	-	-	-	-	BURBACHER, et al., 2005

Tabela 4.2. Comparação das concentrações de Hg no sangue e órgãos após exposição ao timerosal em estudos experimentais

\* Tempos em comum reportados entre os estudos (outros estudos apresentaram outros tempos de avaliação).
ND, não detectado; IM, intramuscular; SC, subcutâneo; IN, Intranasal.

# 4.1.2. Meias-vidas biológicas em sangue e tecidos de camundongos

Até o momento, este é o primeiro estudo a estimar as meias-vidas de Hg após exposição à baixa dose de timerosal no sangue, cérebro, rim, fígado e coração de camundongos.

A Figura 4.2 mostra as concentrações médias de Hgi e EtHg ± DP obtidas no sangue e órgãos (coração, cérebro, rim e fígado) após 0,5 h; 1 h; 8 h; 16 h; 6 d; 30 d e 80 d da injeção intramuscular de 20 µg de Hg como timerosal. Estes dados foram utilizados para estimar as meias- vidas biológicas em sangue e tecidos discutidos ao longo do texto.



Figura 4.2. Concentrações médias de Hgi (círculos) e EtHg (triângulos)  $\pm$  DP obtidas em sangue, coração, cérebro, rim e fígado de camundongos expostos a 20 µg de Hg na forma de timerosal (n = 4).

A Tabela 4.3 apresenta as meias-vidas (T<sub>1/2</sub>) derivadas da análise de um ou de dois compartimentos após transformação logarítmica das concentrações obtidas (ver material e métodos para detalhes). As meias-vidas do Hg no sangue, cérebro, coração e fígado foram melhor descritas por modelo de um compartimento, enquanto que a do rim, por um modelo de dois compartimentos, com uma fase inicial rápida (T<sub>1/2</sub> $\alpha$ ) seguida de uma fase mais lenta de eliminação (T<sub>1/2</sub> $\beta$ ).

Fígado

Cérebro

Rim

undongos expostos a tin
T <sub>1/2</sub> (dias)
8,8
7,8

T<sub>1/2</sub>α (dias)

2.71

7,7

10,7

T<sub>1/2</sub> β (dias)

45.2

Tabela 4.3. Meias-vidas estimadas para o sangue e órgãos derivadas de análises usando modelos de um ou dois compartimentos após transformação log das concentrações de Hg obtidas nos camundongos expostos a timerosal

A meia-vida de Hg no sangue foi estimada em aproximadamente 8,8 d. Este valor é muito próximo ao relatado para os seres humanos e espécies de outros animais expostos a timerosal (Tabela 4.4) e muito menor à observada após a exposição ao MeHg (SKERFVING, 1974; YAGINUMA-SAKURAI, et al., 2012).

Tabela 4.4. Meia-vida de Hg no sangue estimadas após exposição ao timerosal em diferentes espécies animais

Espécie animal	T <sub>1/2</sub> no sangue (dias)	Referência			
Camundongo	8,8	Presente estudo			
Macacos	Inicial: 2,1	BURBACHER et al. 2005			
Madaddo	Terminal: 8,6				
Humanos					
Adultos	5,6	BARREGÅRD, et al., 2011			
Recém-nascidos	7	PICHICHERO, et al., 2002			
Recém-nascidos	6,3	PICHICHERO, et al., 2009			

BURBACHER, et al. (2005) relataram uma meia-vida terminal de 8,62 d no sangue de macacos bebês após injeção IM de timerosal enquanto que BARREGÅRD, et al. (2011) e PICHICHERO, et al. (2002; 2009) relataram tempos de

5,6 d, 7 d e 6,3 d, para adultos e recém-nascidos humanos. Assim, apesar da possibilidade das interações biológicas de Hg serem diferentes entre as diferentes espécies de mamíferos (EPA, 1997), os resultados de meia-vida no sangue foram muito próximos e apontam fortemente para semelhanças. Esta consistência salienta a contribuição do presente trabalho para o estabelecimento de um perfil toxicológico do timerosal. Além disso, uma vez que a eliminação de Hg do sangue após a exposição ao timerosal é muito mais rápida do que após exposição ao MeHg (BURBACHER, et al., 2005), claramente, o segundo não é uma referência adequada para a avaliação dos riscos tóxicos do EtHg. Dadas as baixas concentrações de Hg em sangue e meias-vidas biológicas mais curtas, o potencial de toxicidade do EtHg é menor que o oferecido pelo MeHg.

No coração e no fígado, as meias-vidas foram estimadas em 7,8 d e 7,7 d, respectivamente, enquanto que no cérebro foi de 10,7 d, tempo mais curto que os 26 d relatados como meia-vida do Hg no cérebro após exposição ao MeHg (Tabela 4.3) (MAGOS; BUTLER, 1976). Em contrapartida, a meia-vida renal inicial foi de cerca de 2,7 d e a terminal, de 45,2 d (Tabela 4.3), outro indicativo de que o rim é o órgão onde o Hg reside por mais tempo após a exposição ao timerosal. Como comparação, em coelhos expostos ao MeHg, a meia-vida de Hg total no fígado e nos rins (após administração de 0,125 mol Hg/kg, duas vezes por semana durante 9 semanas por injeção intravenosa) foi estimada em 28 d (PETERSSON, et al., 1991). Este tempo é de cerca de quatro vezes mais longo do que a meia-vida de Hg no fígado, mas menor do que a meia-vida do Hg no tecido renal após exposição ao timerosal é mais próxima dos 58 d (variando de 35 a 90 d) estimados após exposição ao vapor de Hg (CLARKSON; MAGOS, 2006).

# 4.1.3. Retenção da dose inicial de Hg para cada tecido ao longo do tempo após a exposição ao timerosal

A Figura 4.3 apresenta uma representação esquemática da distribuição de Hg após exposição ao timerosal, onde o tamanho dos órgãos representa uma aproximação da percentagem da dose inicial (20 µg de Hg na forma de timerosal) retida em cada órgão/sangue ao longo do curso do tempo. Para produzir a figura foi utilizada a quantidade de Hg total em µg em cada tecido, em cada ponto de tempo, calculando-se assim a percentagem desta fração em relação à dose inicial de 20 µg Hg como 100 %.



Figura 4.3 Representação esquemática da distribuição do Hg após exposição ao timerosal. O tamanho dos órgãos representa uma aproximação da percentagem da dose inicial retido em cada um dos órgãos/tecidos ao longo do tempo.

No sangue, as concentrações de Hg não excederam 7 % da dose inicial. Os valores máximos e mínimos foram observados às 0,5 h e 30 d, respectivamente (6,63 e 0,21 %). No coração o Hg acumulado atingiu o valor de 2,15% da dose inicial de Hg 1h após a exposição e diminuiu ao longo seguimento até que o percentual mínimo de 0,03% da dose inicial Hg foi observado.

No cérebro houve variação de 0,82% após 0,5 h da exposição para 0,08% após 30 d decorridos da exposição ao timerosal. Já no fígado, após 16 h, as concentrações de Hg alcançaram 21,3% da dose inicial, caindo para 0,96% em 30 d. Com efeito, a percentagem de dose inicial no rim variou (do maior ao menor e não do menor ao maior) de 69 % após 8 h para cerca 0,11 % aos 80 d da exposição, o que corresponde a cerca de 14 µg e 22 ng de Hg, respectivamente.

# 4.2. Estudo II: Estudo da conversão do EtHg presente no timerosal em sangue total e frações (plasma e eritrócitos) *in vitro*

Com o aumento do tamanho da molécula, a ligação entre o Hg e o radical orgânico torna-se menos estável, o que resulta em mais fácil degradação do EtHg em Hgi em comparação ao MeHg. Por exemplo, os comprimentos de ligação entre Hg e carbono no MeHg e EtHg foram estimados por KAUPP e MALKINA em 2,115 e 2,150 Â, respectivamente (KAUPP; MALKINA, 1998). Além disso, em experiências preliminares, foi observado que o EtHg é estável à temperatura ambiente em amostras de plasma, mas convertido a Hgi nas células vermelhas do sangue (dados não publicados). O presente estudo *in vitro* foi então realizado para avaliar a conversão do timerosal e EtHg em sangue total, plasma e eritrócitos e também para tentar elucidar o mecanismo de dealquilação de EtHg no sangue, utilizando amostras de sangue humano.

A Figura 4.4 mostra as concentrações de espécies de Hg medidas (média ± DP) após a adição de solução de EtHg ou timerosal (3 mg/l) em amostras humanas de sangue total, plasma ou células vermelhas incubadas por 24 h. Não houve diferença entre as concentrações das espécies de Hg formadas após a adição de timerosal ou EtHg, considerando o sangue total, plasma ou eritrócitos

individualmente. Isto indica que o ânion tiossalicilato não interfere na dealquilação de EtHg presente na molécula de timerosal (Figura 4.4 - A).



Figura 4.4. Média  $\pm$  DP das concentrações de Hg (Hgi e EtHg) obtidas após 24 h da adição de Hg (EtHg ou timerosal (tim) (3mg/l)) em sangue total, plasma ou células vermelhas ao longo da primeira (A), segunda (B) e terceira (C) experiências do estudo *in vitro*. ANOVA de uma via seguida do teste de *Tukey* foram utilizadas. \* concentração de EtHg e Hgi estatisticamente inferior e superior, respectivamente, do que as obtidas em plasma e eritrócitos; # concentrações de EtHg e Hgi estatisticamente superior e inferior, respectivamente, do que as obtidas em eritrócitos sem Fe, e em ambos os grupos sanguíneos ; ## concentrações de EtHg e Hgi estatisticamente inferior e superior, respectivamente, do que as obtidas em plasma sem Fe, P < 0,05. \*\*\* concentrações de Hgi e EtHg estatisticamente inferior e superior, respectivamente, do que as obtidas em plasma sem Fe, P < 0,05. \*\*\* concentrações de Hgi e EtHg estatisticamente inferior e superior, respectivamente, do que as obtidas em plasma sem Fe, P < 0,05. \*\*\* concentrações de Hgi e EtHg estatisticamente inferior e superior, respectivamente, do que as obtidas em plasma sem Fe, P < 0,05. \*\*\* concentrações de Hgi e EtHg estatisticamente superior e inferior, respectivamente, do que as obtidas em plasma sem Fe, P < 0,05. \*\*\* concentrações de Hgi e EtHg estatisticamente superior, respectivamente, do que as obtidas em plasma sem Fe, P < 0,05. \*\*\* concentrações de Hgi e EtHg estatisticamente superior e inferior, P < 0,05.

Por outro lado, após o tempo de incubação, as concentrações de EtHg no sangue total foram menores do que as encontradas tanto em eritrócitos quanto plasma para ambos os compostos. Além disso, no sangue total, o EtHg é convertido de forma mais intensa quando comparado às células vermelhas do sangue e não houve dealquilação no plasma (Figura 4.4 - A). Esta ausência de dealquilação indica que a partição do EtHg entre as células vermelhas e o plasma determina, pelo menos em parte, a extensão da conversão do EtHg a Hgi e pode contribuir para a manutenção do Hg como EtHg *in vivo*.
Existem algumas evidências de que a dealquilação de organomercuriais é desencadeada por espécies reativas de oxigênio e de organismos microbianos; no entanto, os mecanismos subjacentes à conversão são ainda desconhecidos (QVARNSTRÖM, et al., 2003; SUDA, et al., 1991; SUDA, et al., 1992). As experiências B e C foram realizadas a fim de evidenciar um potencial mecanismo associado à conversão do EtHg a Hgi no sangue.

Sabe-se que o Fe é um cofator da reação de Fenton Haber - Weiss e que o plasma tem uma concentração muito menor de Fe em relação ao sangue total e os glóbulos vermelhos. A Figura 4.4 (B) mostra que a incubação de FeCl<sub>3</sub> em conjunto com EtHg resultou em concentração significativamente mais elevada de Hgi e mais baixa de EtHg em amostras de plasma, quando comparado com plasma sem adição de Fe. Consequentemente, maior conversão ocorreu no plasma, possivelmente pela ação do radical OH• formado em maior quantidade em meio com Fe. Além disso, após a incubação com Fe, foi observado um aumento na conversão do EtHg a Hgi em eritrócitos (Figura 4.4 -B) e as concentrações das espécies de Hg foram estatisticamente iguais em comparação às obtidas em sangue total (tanto com Fe ou sem). Sabe-se que os eritrócitos possuem concentrações de Fe muito semelhantes ao sangue total (FAIRBANKS, 1994; HELMER; EMERSON, 1934). Com base nessas informações, seria de se esperar uma taxa de conversão de EtHg a Hgi semelhante entre sangue total e eritrócitos. No entanto, nas células vermelhas do sangue, uma conversão um pouco inferior foi observada em comparação com sangue total (Figura 4.4 - A e B). Isto sugere o envolvimento de outros mecanismos na dealquilação de EtHg além da ação oxidante do OH • como previamente relatado por SUDA e TAKAHASHI e SUDA et al. (SUDA; TAKAHASHI, 1992; SUDA, et al., 1991). Potencialmente, outras células, moléculas e enzimas contidas no sangue total podem estar envolvidas neste processo. Por exemplo, leucócitos polimorfonucleares de sangue humano e da cavidade peritoneal de ratos, coelhos e porquinhos da índia, além de macrófagos e eosinófilos de cobaias e monócitos humanos já foram relatados participarem da conversão de Hg orgânico a Hgi (SUDA; HIRAYAMA, 1992; SUDA, et al., 1992).

A fim de confirmar que a conversão de EtHg a Hgi ocorre através da formação de OH •, uma terceira etapa deste experimento foi realizada, consistindo de adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e DMSO. A incubação do plasma com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentou estatisticamente a conversão de EtHg a Hgi como demonstrado na Figura 4.4 (C). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é formado

no segundo passo da reação de Fenton e Haber-Weiss e serve como um substrato para formação de OH • (HALLIWELL; CHIRICO, 1993). Mais tarde, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi adicionado em conjunto com DMSO, que atua como um *scavenger* de OH • e, nesta condição, não foi observada nenhuma diferença estatística em termos de concentrações de Hgi formadas em comparação ao plasma que teve somente adição de EtHg (Figura 4.4 - C). Tais resultados indicam fortemente que um dos mecanismos subjacentes à conversão de EtHg a Hgi nos organismos vivos é mediado por OH•. Outras explicações plausíveis para a não conversão de EtHg no plasma incluem a ausência de células e hemoglobina e menor teor de proteínas e outros compostos que tornam o plasma um ambiente menos oxidante. Esta condição pode também contribuir para a maior conversão de EtHg no plasma. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

Com base na ausência de conversão do EtHg no plasma e levando em consideração que compostos no plasma estão mais livres/disponíveis para interagir com os tecidos, sugere-se que o EtHg encontrado nos tecidos foi transportado pelo plasma e não pelas células vermelhas do sangue. Além disso, uma vez no plasma, o EtHg pode ser "sequestrado" por células vermelhas do sangue e convertido a Hgi ou ainda, ser retido nos tecidos. O EtHg pode ser também convertido por reações oxidativas/enzimas específicas dentro de células de outros tecidos - algo ainda não investigado - ou ser devolvido para o plasma/glóbulos vermelhos. Portanto, o coeficiente de partição do EtHg entre as células vermelhas do sangue e o plasma regula o transporte desta espécie de Hg dentro do organismo o que, por conseguinte, é largamente influenciado pela taxa de conversão de EtHg nas células vermelhas do sangue. Esta conversão pode também ter um impacto sobre os efeitos tóxicos do Hg, após a administração de vacinas contendo timerosal.

4.3. Estudo III: Estudo dos mecanismos de citotoxicidade renal *in vitro* do timerosal (desenvolvido no estágio de Doutoramento Sanduíche)

#### 4.3.1. Timerosal acima de 0,5 µM diminuiu a viabilidade celular

No decorrer de 24 h de exposição ao timerosal, a viabilidade celular foi estatisticamente menor de 0,5 a 2  $\mu$ M (P < 0,001; Figura 4.5). O mesmo padrão foi observado para o tratamento mais prolongado, 48 h.



Figura 4.5 Timerosal nas concentrações de 0,5; 1; e 2  $\mu$ M diminuiu significativamente a viabilidade celular após 24 h e 48 h do tratamento em comparação ao controle. Os resultados são expressos como média ± DP das absorbâncias resultantes utilizadas no ensaio MTT (n = 6). ANOVA uma via seguido pelo teste de *Tukey*. \*\*\* P <0,001 vs. controle (0  $\mu$ M); ns: não significativo.

A concentração de timerosal varia entre 0,003 % a 0,01 % nas vacinas (BALL, et al., 2001). Tais concentrações correspondem a aproximadamente 150  $\mu$ M e 500  $\mu$ M de timerosal (cerca de 75 e 250  $\mu$ M de Hg), respectivamente. Se uma vacina para a gripe (0,5 ml) contendo 0,01 % de timerosal é dada a um adulto de 60 kg (volume de sangue de cerca de 4,7 l), a concentração de timerosal na corrente sanguínea seria de cerca de 10,6  $\mu$ g/l de timerosal, ou aproximadamente 5,3  $\mu$ g/l de Hg. A concentração de timerosal de 10,63  $\mu$ g/l é equivalente a 0,0511  $\mu$ M, concentração próxima da menor testada neste estudo e que não teve efeito significativo sobre a viabilidade celular em relação ao controle. No entanto, devido

ao grande potencial de acúmulo do Hg no rim, acredita-se justificar o teste com doses mais elevadas de timerosal *in vitro*. Por exemplo, baseando-se no estudo I (*in vivo*) obteve-se concentrações médias de Hg total variando de 13 a 3,5  $\mu$ g/g de Hg (de 0,5 a 16 h a 6 d, respectivamente) no rim, o que corresponde a aproximadamente 64 e 17  $\mu$ M de Hg, respectivamente (ou ainda, aproximadamente 34 e 128  $\mu$ M de timerosal). Se considerarmos somente a média da fração de EtHg no tecido renal até as 16 h (aproximadamente 35 %) tem-se uma concentração de 22  $\mu$ M (ou 44  $\mu$ M de timerosal). Ainda assim, no estudo III utilizaram-se concentrações menores para teste, escolhidas a partir do teste de viabilidade celular e que compreendem uma faixa de concentração onde o efeito tóxico foi e não foi observado.

#### 4.3.2. Timerosal reduziu a mitose e promoveu apoptose

Todas as concentrações testadas de timerosal reduziram a proliferação celular de forma significativa em comparação com o controle (Figura 4.6). Estudos anteriores têm demonstrado que a exposição aguda ao MeHg induz parada do ciclo celular de precursores neuronais no hipocampo do rato (BURKE, et al., 2006; FALLUEL-MOREL, et al., 2007; FALLUEL-MOREL, et al., 2012). Além disso, existem alguns relatos antigos de toxicidade do Hgi no ciclo celular de células renais (CUPPAGE, et al., 1969; CUPPAGE, et al., 1972; STADNICKA, 1978). Em contraste, até o momento, não há relatos do potencial antiproliferativo do timerosal.

A apoptose é uma forma de morte celular necessária para a homeostase celular e a sua desregulação está envolvida na patogênese de muitas doenças (GOBE; HARMON, 2006). Na Figura 4.6 uma resposta dose-dependente para a freqüência de observação de células em apoptose após tratamento com timerosal pode ser observada. Mesmo na dose mais baixa testada neste ensaio (0,125 μM), uma diferença significativa foi detectada em relação ao controle.



Figura 4.6 Topo: aumento e diminuição do percentual de apoptose e mitose, respectivamente, após tratamento com concentrações crescentes de timerosal durante 24 h. Os dados são apresentados como média ± DP de 15 campos (5 por lamela circular (n = 3)). ANOVA uma via seguida do teste de *Tukey*. \*\*\* P <0,001 vs. controle (0  $\mu$ M). Parte inferior: microscopia de células HK2 coradas com hematoxilina e eosina. Em (a) pode-se vislumbrar uma célula - exposta a timerosal 0,5  $\mu$ M - prejudicada com características morfológicas peculiares do processo de apoptose, como núcleo com fragmentos e em condensação. Em (b) demonstra-se uma célula saudável do grupo controle (aumento de 200 x).

Diferentes estudos desenvolvidos em várias linhagens de células não-renais têm demonstrado que o timerosal induz apoptose (LI, et al., 2012; KUO, et al., 2009; HUMPHREY, et al., 2005; BASKIN, et al., 2003). O Hgi e o MeHg têm sido descritos como agentes apoptóticos em tecido renal a partir da observação de características morfológicas peculiares, redução da atividade de arginase II, clivagem de proteínas pró-apoptóticas, interação com canais de cálcio ativados por voltagem, queda do potencial transmembrana mitocondrial, ativação de caspases e externalização de fosfatidilserina (DUNCAN-ACHANZAR, et al., 1996; GUO, et al., 1998; CARRANZA-ROSALES, et al., 2005; LEE, et al., 2006; TARABOVA, et al., 2006; SUTTON; TCHOUNWOU, 2007; KANDA, et al., 2008). No entanto, em relação a marcadores apoptóticos após exposição ao EtHg ou timerosal, no tecido renal não foram encontradas evidências na literatura. Os possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento da apoptose presentemente observada por meio da microscopia serão discutidos ao longo do texto.

### 4.3.3. Timerosal altera a transição de permeabilidade mitocondrial e aumenta a expressão de Bax

A transição de permeabilidade mitocondrial é um passo importante na indução da apoptose celular (GOBE; CRANE, 2010). Mesmo que não totalmente elucidados, os mecanismos envolvidos na disfunção mitocondrial incluem aumento da produção de ROS, consumo de GSH celular e instabilidades na homeostase do cálcio intracelular (BELYAEVA, et al., 2011; PAL; GHOSH, 2012; SMALL, et al., 2012b).

Na Figura 4.7 podem ser observadas as médias ± DP das medições fluorimétricas a partir da aplicação do corante JC-1 nas células HK2 expostas por 24 h ao timerosal. Visivelmente, a razão da absorção vermelha para verde diminui estatisticamente à medida que se aumenta a concentração de timerosal em exposição. Assim, demonstra-se que o timerosal ocasiona a despolarização do potencial de membrana mitocondrial, uma etapa importante no desencadeamento do processo de apoptose.

A propriedade perturbadora do EtHg contido no timerosal à função mitocondrial já foi examinada em linhagens de células neuronais e imunes (MAKANI, et al., 2002; HUMPHREY, et al., 2005; YEL, et al., 2005; MIGDAL, et al., 2010; ZIEMINSKA, et al., 2010). Presentemente, acredita-se que esta seja a primeira reportagem dos efeitos do timerosal na transição de permeabilidade mitocondrial no rim.



Figura 4.7 Topo: avaliação fluorimétrica da função mitocondrial usando JC-1 e densitometria da expressão protéica obtida por *Western blot* para a Bax em células HK2 expostas a timerosal por 24 h. As bandas apresentadas são exemplos representativos dos *immunoblots* para Bax e respectivo controle de GAPDH. As barras dos gráficos representam média ± DP de 6 e 3 amostras independentes para JC-1 e Bax, respectivamente. ANOVA uma via seguida pelo teste de *Tukey.* \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001 vs. grupo controle; ns: não significativo. Inferior: células HK2 foram coradas para mitocôndrias com *MitoTracker Red CMXRos* (fluorescência vermelha), para Bax com anti- Bax seguido por Alexa Fluor 488- anticorpo conjugado (fluorescência verde) e para os núcleos com coloração DAPI. As células de ambos os grupos foram fotografados com parâmetros de exposição idênticos.

A proteína Bax da família Bcl-2 é uma molécula pró-apoptótica (VAN CRUCHTEN; VAN DEN BROECK, 2002). Depois do tratamento com 0,5 μM de timerosal, as células HK2 expressaram uma quantidade estatisticamente maior de Bax em comparação com os controles (Figura 4.7), indicando que, após exposição ao timerosal, mais células estão programadas para morrer, o que possivelmente ocorre pela via intrínseca (mitocondrial) em conformidade com o resultado previamente reportado acerca do dano ao potencial de membrana mitocondrial. Embora a diferença estatística para a expressão da Bax tenha sido observada apenas para a concentração de 0,5 μM de timerosal, uma tendência de aumento é observada entre 0,25 μM e 0,5 μM. Não houve diferença significativa considerando a dose mais elevada de timerosal em teste (1 μM) provavelmente devido a morte celular mais precoce nesta concentração, o que pode ter impedido a análise de expressão protéica.

Na figura 4.7 também são exibidas imagens de células HK2 controle e expostas a 0,5 µM timerosal obtidas por microscopia confocal. Uma clara diferença entre as células não tratadas e tratadas pode ser observada. No painel de cima, quatro células HK2 saudáveis do grupo controle podem ser vislumbradas com a coloração mitocondrial vermelho brilhante à volta do núcleo e de alguns pontos verdes distribuído no citoplasma. Já no painel inferior, três células danificadas expostas a 0,5 µM timerosal aparecem com substancialmente menos corante de fluorescência vermelha (*MitoTracker Red CMXRos*) e verde citoplasmático mais intenso, que corresponde à fragmentação de mitocôndrias e fluorescência da Bax, respectivamente. Isto evidencia a quebra do potencial de membrana mitocondrial e maior manifestação de Bax.

### 4.3.4. Timerosal como potencial agente fibrótico no tecido renal: expressão aumentada de TGF-β1 e aumento da secreção de fibronectina

Doenças renais estão frequentemente associadas com mudanças nos padrões de expressão e distribuição dos componentes da matriz extracelular (BAELDE; DE HEER, 2013). Por exemplo, a expressão, degradação e organização alteradas de fibronectina são características de fibrose (WILLIAMS, et al., 2008). O papel prófibrótico do TGF-β1 é devido em grande parte a sua participação na condução da transição epitelial a mesenquimal, onde as células epiteliais são convertidas em fibroblastos que produzem matriz extracelular em excesso, resultando em fibrose (BURNS; THOMAS, 2010). Uma proteína que é secretada por estímulo do TGF-β1 é a fibronectina, que está ativamente envolvida em vias de sinalização celulares e extracelulares que levam à fibrose (WIGHT; POTTER-PERIGO, 2011; TANG, et al., 2013).

O Hg, especialmente o Hgi, é conhecido por produzir numerosas lesões glomerulares (MILLER, et al., 2013). Embora já relatado na literatura, o potencial fibrótico do Hg no tecido renal não foi estudado em profundidade (ETO, et al., 1997; SONNE, et al., 2007; SLEEMAN, et al., 2010). Por exemplo, na insuficiência renal aguda induzida por tratamento com cloreto de Hg em ratos, notáveis depósitos de fibronectina nos rins foram encontrados (SABALL, et al., 2001). Quanto ao timerosal, que contém uma das menos estudadas espécies de Hg - o EtHg - até o presente não havia nenhum estudo.

No presente estudo, o tratamento com timerosal aumentou a expressão protéica de TGF-β1 em células HK2 assim como a secreção de fibronectina no meio (Figura 4.8).



Figura 4.8 Timerosal aumenta a expressão TGF- $\beta$ 1 e secreção de fibronectina em células HK2. *Western blot* e densitometria para o TGF- $\beta$ 1 foram realizadas utilizando a proteína extraída das células HK2, ao passo que a fibronectina foi determinada no meio de cultura. Para o resultado de *Western blot*, as barras representam a média ± DP de três experimentos independentes. Já para a fibronectina, as barras são representativas da média ± DP de 4 repetições em duplicata. As fotos são exemplos representativos de *immunoblots* obtidos por *Western blot* para esta proteína e seu respectivo controle GAPDH. ANOVA uma via seguida pelo teste de *Tukey*, \* P <0,05; \*\* P <0,01; \*\*\* P <0,001 vs. grupo controle; ns: não significativo.

Este resultado indica que o timerosal estimula células renais a alterarem os seus padrões de produção de componentes da matriz extracelular pelo aumento da expressão de TGF-β1, o qual possivelmente estimula o aumento da secreção de fibronectina. Embora para o TGF-β1 haja uma relação de dose-resposta clara, para a fibronectina houve diferença estatística apenas entre o grupo controle e 0,5 µM. A morte celular, na dose mais elevada de timerosal pode ter evitado a secreção de fibronectina no meio de cultura e, por conseguinte, na comunicação celular. Logo, sugere-se que o timerosal tem um efeito pró-fibrótico sobre células renais o que pode ter conseqüências sérias em populações expostas, ainda mais quando considerando pacientes renais e crianças, o que demanda mais estudos neste tecido.

### 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 5.1. Estudo I: Estudo da distribuição e meias-vidas teciduais de Hg *in vivo* após exposição à timerosal

O presente estudo contribui para a avaliação do perfil toxicológico do timerosal. Os resultados indicam que o transporte de EtHg do músculo para os tecidos e a sua conversão em Hgi ocorrem rapidamente - observada na meia hora seguinte a injeção intramuscular do timerosal. O presente trabalho também fornece meias-vidas biológicas em outros tecidos que não o sangue, após exposição a uma baixa dose de timerosal pela primeira vez na literatura.

Embora alguns tecidos tenham acumulado quantidades significativas de Hg após exposição ao timerosal, o tempo de eliminação do EtHg do corpo do animal é mais curto que o observado para o MeHg. Uma vez que o EtHg é rapidamente metabolizado a Hgi, a cinética desta última espécie química pode determinar a eliminação de Hg após exposição ao timerosal. Apesar da menor contribuição do cérebro para a carga corporal de Hg, a neurotoxicidade potencial de timerosal deve ser monitorada de forma contínua, uma vez que qualquer concentração de Hg no cérebro - quer orgânico, quer inorgânico - deve ser visto como potencialmente perigosa. Além disso, a persistência e maior acúmulo de ambas as espécies de Hg nos rins com a maior meia-vida registrada, demonstram que este tecido é alvo potencial para os efeitos tóxicos após a exposição ao timerosal. Neste sentido, estudos futuros devem ser realizados para avaliar a potencial nefrotoxicidade do timerosal. A vigilância contínua sobre a segurança do uso de timerosal em vacinas é amplamente necessária, tal qual são as avaliações imparciais e de bom-senso de novas evidências sobre sua toxicidade.

# 5.2. Estudo II: Estudo da conversão do EtHg presente no timerosal em sangue total e frações (plasma e eritrócitos) *in vitro*

O processo de dealquilação ocorre em glóbulos vermelhos, mas não no plasma, com o OH• como o potencial efetor. Ainda, sugere-se, pela primeira vez, que o coeficiente de partição do EtHg entre as células vermelhas sanguíneas e plasma potencialmente define a quantidade de EtHg que atinge os tecidos após a exposição ao timerosal. A adição de Fe às células vermelhas do sangue e ao plasma aumentou a conversão, provavelmente devido à produção aumentada de OH•. Esta foi provavelmente a mesma razão das concentrações aumentadas de Hgi após a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em plasma com EtHg. Além disso, quando foi adicionado DMSO em conjunto com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, houve redução significativa da conversão. Outros tecidos e potenciais mecanismos do metabolismo do Hg orgânico merecem ser testados a fim de elucidar a biotransformação de espécies orgânicas de Hg como o EtHg/timerosal.

# 5.3. Estudo III: Estudo dos mecanismos de citotoxicidade renal *in vitro* do timerosal (desenvolvido no estágio de Doutoramento Sanduíche)

O estudo aprofundado dos efeitos tóxicos e dos mecanismos de morte celular após a exposição ao timerosal no rim é relevante. Até onde se tem notícia, este é o primeiro estudo sobre os mecanismos de morte celular por trás da citotoxicidade promovida pelo timerosal no rim. O timerosal provou ser um agente antiproliferativo, pró-apoptótico e pró-fibrótico em células de rim humano. O estudo de outras vias e interações moleculares envolvidas nestes processos é necessário para elucidação do potencial de morte celular exercido pelo EtHg. Além disso, a avaliação *in vivo* dos mecanismos de toxicidade do timerosal no rim observadas *in vitro* é altamente relevante para estudos futuros.

### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-TIKRITI, K.; AL-MUFTI, A. W. An outbreak of organomercury poisoning among Iraqi farmers. **Bulletin of World Health Organization**, Geneva, v. 53, p. 15-21, 1976.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Joint statement of the American Academy of Pediatrics (AAP) and the United States Public Health Service (USPHS). **Pediatrics**, Elk Grove Village, v. 104, n. 3, p. 568-569, 1999.

ARVIDSON, B. Accumulation of inorganic mercury in lower motoneurons of mice. **Neurotoxicology**, Little Rock, v.13, n.1, p.277-280, 1992.

ASCHNER, M.; CECCATELLI, S. Are neuropathological conditions relevant to ethylmercury exposure? **Neurotoxicity Research**, New York, v. 18, n. 1, p. 59-68, Jul 2010. ISSN 1476-3524

BAELDE, H.; DE HEER, E. *In vivo* imaging of disease-modified glomerular extracellular matrix in renal disease. **Kidney International**, New York, v. 84, n. 2, p. 238-239, 2013.

BAKIR, F. et al. Methylmercury poisoning in Iraq. **Science**, New York, v. 181, n. 4096, p. 230-241, 1973.

BALL, L. K.; BALL, R.; PRATT, R. D. An assessment of thimerosal use in childhood vaccines. **Pediatrics**, Elk Grove Village, v. 107, n. 5, p. 1147-1154, 2001.

BARREGÅRD, L. et al. Toxicokinetics of mercury after long-term repeated exposure to thimerosal-containing vaccine. **Toxicology Sciences**, Reston, v. 120, n. 2, p. 499-506, 2011.

BARREGÅRD, L. Kinetics of mercury in blood and urine after brief occupational exposure. **Archives of Environmental Health**, Washington, v. 47, n. 3, p. 176-184, 1992.

BASKIN, D. S.; NGO, H.; DIDENKO, V. V. Thimerosal induces DNA breaks, caspase-3 activation, membrane damage, and cell death in cultured human neurons and fibroblasts. **Toxicology Sciences**, Reston, v. 74, n. 2, p. 361-368, 2003.

BEDNARCZUK, V. O. et al. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 11, n. 2, 43-50, 2010.

BELYAEVA, E. A.; KOROTKOV, S. M.; SARIS, N. E. *In vitro* modulation of heavy metal-induced rat liver mitochondria dysfunction: a comparison of copper and mercury with cadmium. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Stuttgart, v. 25, n. 1, p. 63-73, 2011.

BERGLUND, M. et al. Inter-individual variations of human mercury exposure biomarkers: a cross-sectional assessment. **Environmental Health**, Boston, v.3, p. 4-20, 2005.

BERNARD, S. et al. Autism: a novel form of mercury poisoning. **Medical Hypotheses**, Birmingham v. 56, n. 4, p. 462-471, 2001.

BERNDT, W. O. et al. Renal glutathione and mercury uptake by kidney. **Fundamental and Applied Toxicology**, San Diego, v. 5, n. 5, p. 832-839, 1985.

BLAIR, A. et al. Tissue concentrations of mercury after chronic dosing of squirrel monkeys with thiomersal. **Toxicology**, Berlin, v. 3, n. 2, p. 171-176, 1975.

BLANUŠA, M. et al. Mercury disposition in suckling rats: comparative assessment following parenteral exposure to thiomersal and mercuric chloride. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, New York, v. 2012, p. 256965, 2012.

BONATE, P. L. **Pharmacokinetic- Pharmacodynamic Modeling and Simulation**. New York, Springer, 637 p., 2011.

BRANCHES, F. J. et al. The price of gold: mercury exposure in the Amazonian rain forest. **Journal of Toxicology - Clinical Toxicology**, Brussels v. 31, n. 2, p. 295-306, 1993.

BRUCK, R. et al. The hydroxyl radical scavengers dimethylsulfoxide and dimethylthiourea protect rats against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. **Journal of Hepatology**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 27-38, 1999.

BURBACHER, T. M. et al. Comparison of blood and brain mercury levels in infant monkeys exposed to methylmercury or vaccines containing thimerosal. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 113, n. 8, p. 1015-1021, 2005.

BURGER CHAKRABORTY, L. et al. Anthropogenic mercury flows in India and impacts of emission controls. **Environmental Science and Technology**, Iowa City, v. 47, n. 15, p. 8105-8113, 2013.

BURKE, K. et al. Methylmercury elicits rapid inhibition of cell proliferation in the developing brain and decreases cell cycle regulator, cyclin E. **Neurotoxicology**, Little Rock, v. 27, n. 6, p. 970-981, 2006.

BURNS, W. C.; THOMAS, M. C. The molecular mediators of type 2 epithelial to mesenchymal transition (EMT) and their role in renal pathophysiology. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, Cambridge, v. 12, p. e17, 2010.

CARNEIRO, M.F.H. et al. Thimerosal in childhood vaccines contributes to accumulating mercury toxicity in the kidney. **Toxicological and Environmental Chemistry**, Bayreuth, v. 95, n. 8, p. 1424-1447, 2013.

CARRANZA-ROSALES, P. et al. Morphologic and functional alterations induced by low doses of mercuric chloride in the kidney OK cell line: ultrastructural evidence for an apoptotic mechanism of damage. **Toxicology**, Berlin,v. 210, n. 2-3, p. 111-121, 2005.

CASTOLDI, A. F. et al. Early acute necrosis, delayed apoptosis and cytoskeletal breakdown in cultured cerebellar granule neurons exposed to methylmercury. **J Neuroscience Research**, Wako, v. 59, n. 6, p. 775-787, 2000.

CECCATELLI, S.; DARE, E.; MOORS, M. Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, Konstanz, v. 188, n. 2, p. 301-308, 2010.

CDC (Centers of Disease Control and Prevention). **National Influenza Vaccination Week: Key Points.** Disponível em http://www.cdc.gov/flu/pdf/nivw/nivw-keypoints-2013.pdf, acesso em 10 de novembro de 2013, 2013.

CHEN, C. et al. Spatial distribution and pollution assessment of mercury in sediments of Lake Taihu, China. **Journal of Environmental Science**, Beijing, v. 25, n. 2, p. 316-25, Feb 1 2013.

CHETELAT, J.; CLOUTIER, L.; AMYOT, M. An investigation of enhanced mercury bioaccumulation in fish from offshore feeding. **Ecotoxicology**, Oak Ridge, v. 22, n. 6, p. 1020-1032, 2013.

CHRISTIANSEN, B. S. et al. Human hepatocytes in culture synthesize and secrete fibronectin. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, Oslo, v. 48, n. 7, p. 685-690, 1988.

CIKRT, M.; TICHÝ, M. Biliary excretion of phenyl and methyl mercury chlorids and their enterohepatic circulation in rats. **Environmental Research**, New York,, vol.8, n.1, p.71-81, 1974.

CLARKSON, T. W. The three modern faces of mercury. **Research Triangle Park**, v. 110, n.1, p. 11-23, 2002.

CLARKSON, T. W.; MAGOS, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. **Critical Reviews in Toxicology**, London, v. 36, n. 8, p. 609-662, 2006.

CLEMENTS, C. J. et al. Thiomersal in vaccines. Lancet, London, v. 355, n. 9211, p. 1279-1280, 2000.

CORBETT, C. E. et al. Health evaluation of gold miners living in a mercurycontaminated village in Serra Pelada, Para, Brazil. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, Berlin, v. 62, n. 3, p. 121-128, 2007.

CUPPAGE, F. E.; CHIGA, M.; TATE, A. Cell cycle studies in the regenerating rat nephron following injury with mercuric chloride. **Laboratory Investigation**, Augusta, v. 26, n. 1, p. 122-126, 1972.

CUPPAGE, F. E.; CUNNINGHAM, N.; TATE, A. Nucleic acid synthesis in the regenerating nephron following injury with mercuric chloride. **Laboratory Investigation**, Augusta, v. 21, n. 5, p. 449-457, 1969.

DE MARCO, K. C. et al. Environmental exposure to methylmercury is associated with a decrease in nitric oxide production. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, Aarhus, v. 106, n. 5, p. 411-415, 2010.

DE SOUZA, S. S.; CAMPIGLIA, A. D.; BARBOSA, F., JR. A simple method for methylmercury, inorganic mercury and ethylmercury determination in plasma samples by high performance liquid chromatography-cold-vapor-inductively coupled plasma mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 761, p. 11-17, 2013.

DELONG, G. A positive association found between autism prevalence and childhood vaccination uptake across the U.S. population. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part A**, Ottawa, v. 74, n. 14, p. 903-916, 2011.

DÓREA, J. G. Safety of thimerosal in vaccines: for whom and how many doses? **Therapie**, Les Ulis Cedex A, v. 66, n. 2, p. 95-96, 2011.

DÓREA, J. G.; FARINA, M.; ROCHA, J. B. Toxicity of ethylmercury (and Thimerosal): a comparison with methylmercury. **Journal of Applied Toxicology**, North Yorkshire, v. 33, n. 8, p. 700-711, 2013.

DUNCAN-ACHANZAR, K. B. et al. Inorganic mercury chloride-induced apoptosis in the cultured porcine renal cell line LLC-PK1. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v. 277, n. 3, p. 1726-1732, 1996.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). **Mercury Study Report to Congress. Volume V: Health Effects of Mercury and Mercury Compounds.** Disponível em http://www.epa.gov/ttn/oarpg/t3/reports/volume5.pdf, Acesso em outubro de 2013, 1997.

ETO, K. et al. Chronic effects of methylmercury in rats. II. Pathological aspects. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, Sendai, v. 182, n. 3, p. 197-205, 1997.

FAIRBANKS V.F. Iron in Medicine and Nutrition, Em Modern Nutrition in Health and

Fairbanks, V.F. 1994. Iron in Medicine and Nutrition, In: Modern Nutrition in Health and Disease, 8th ed, Lea & Febiger, Philadelphia, pp 191-202.

FALLUEL-MOREL, A. et al. Developmental mercury exposure elicits acute hippocampal cell death, reductions in neurogenesis, and severe learning deficits during puberty. **Journal of Neurochemistry**, Oxford, v. 103, n. 5, p. 1968-1981, 2007.

FALLUEL-MOREL, A. et al. N-acetyl cysteine treatment reduces mercury-induced neurotoxicity in the developing rat hippocampus. **Journal of Neuroscience Research**, New York, v. 90, n. 4, p. 743-750, 2012.

FILLION, M. et al. Toxic risks and nutritional benefits of traditional diet on near visual contrast sensitivity and color vision in the Brazilian Amazon. **Neurotoxicology**, Little Rock, v. 37, p. 173-181, 2013.

FOSS, S. D. A Method for Obtaining Initial Estimates of the Parameters in Exponential Curve Fitting. **Biometrics**, Arlington, v. 25, p. 580-584, 1969.

GEIER, D. A.; SYKES, L. K.; GEIER, M. R. A review of Thimerosal (Merthiolate) and its ethylmercury breakdown product: specific historical considerations regarding safety and effectiveness. **Journal of Toxicology and Environmental Health B**, Ottawa, v. 10, n. 8, p. 575-596, 2007.

GEWIN, L. et al. Deleting the TGF-beta receptor attenuates acute proximal tubule injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, Rochester, v. 23, n. 12, p. 2001-2011, 2012.

GIBALDI, M.; PERRIER, D. **Pharmacokinetics**. New York, Marcel Dekker, 441 p., 1982.

GOBE, G.; CRANE, D. Mitochondria, reactive oxygen species and cadmium toxicity in the kidney. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 198, n. 1, p. 49-55, 2010.

GOBE, G.; HARMON, B. Apoptosis: Morphological criteria and other assays.
 Encyclopedia Life Sciences, Hoboken. Disponível em: http://www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780470015902/els/article/a0002569/c urrent/abstract?hd=All,apoptosis. Acesso em agosto de 2013, 2006.

GOCHFELD, M. Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 56, n. 1, p. 174-179, 2003.

GROTTO, D. et al. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 408, n. 4, p. 806-811, 2010.

GUIMARÃES, J. R. D. et al. Mercury in human and environmental samples from two lakes in Amapa, Brazilian Amazon. **Ambio**, Dordrecht, v. 28, n. 4, p. 296-301, 1999.

GUO, T. L. et al. Mercuric chloride induces apoptosis in human T lymphocytes: evidence of mitochondrial dysfunction. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Albuquerque, v. 153, n. 2, p. 250-257, 1998.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 57, n. 5, p. 715-724, 1993.

HARADA, M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. **Critical Reviews in Toxicology**, London, v. 25, n. 1, p. 1-24, 1995.

HARISA, G. I. et al. Protective effect of pravastatin against mercury induced vascular cells damage: Erythrocytes as surrogate markers. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 34, n. 2, p. 428-435, 2012.

HARRY, G. J.; HARRIS, M. W.; BURKA, L. T. Mercury concentrations in brain and kidney following ethylmercury, methylmercury and Thimerosal administration to neonatal mice. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 154, n. 3, p. 183-189, 2004.

HAVARINASAB, S. et al. Dose and Hg species determine the T-helper cell activation in murine autoimmunity. **Toxicology**, Berlin, v. 229, n. 1-2, p. 23-32, 2007.

HELMER, O. M.; EMERSON, C. P. The iron content of the whole blood of normal individuals. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 104, n. 1, p. 157-161, 1934.

HILMY, M.I., RAHIM, S.A., ABBAS, A.H. Normal and lethal mercury levels in human beings. **Toxicology**, Berlin, v.6, n.2, p. 155-159, 1976.

HOUSTON, M. C. Role of mercury toxicity in hypertension, cardiovascular disease, and stroke. **The Journal of Clinical Hypertension**, Malden, v. 13, n. 8, p. 621-627, 2011.

HUMPHREY, M. L. et al. Mitochondrial mediated thimerosal-induced apoptosis in a human neuroblastoma cell line (SK-N-SH). **Neurotoxicology**, Little Rock, v. 26, n. 3, p. 407-416, 2005.

HVIID, A. et al. Association between thimerosal-containing vaccine and autism. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 290, n. 13, p. 1763-1766, 2003.

IORDANIDIS, A. et al. Byzantine wall paintings from Kastoria, northern Greece: spectroscopic study of pigments and efflorescing salts. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Atlanta, v. 78, n. 2, p. 874-887, 2011.

ISHIHARA N. Excretion of methyl mercury in human feces. **International Archives** of Occupational and Environmental Health, Berlin, vol. 55, n.1, p.:44-47, 2000.

JALILI, M. A.; ABBASI, A.H. Poisoning by ethyl mercury toluene sulphonanilide. **British Journal of Industrial Medicine**, London, v. 18, p. 303-308, 1961.

JAMIESON, W. A.; POWELL, H. M. Merthiolate as a preservative for biological products. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, San Francisco, v. 14, n. 1, p. 218-224, 1931.

JAN, C. R. et al. Oxidation by thimerosal increases calcium levelsin renal tubular cells. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, Odense, v. 93, n. 3, p. 123-127, 2003.

KANDA, H. et al. Downregulation of arginase II and renal apoptosis by inorganic mercury: overexpression of arginase II reduces its apoptosis. **Archives of Toxicology**, Basel, v. 82, n. 2, p. 67-73, 2008.

KATSOYIANNIS, I. A.; KATSOYIANNIS, A. A. Arsenic and other metal contamination of groundwaters in the industrial area of Thessaloniki, Northern Greece. **Environmental and Monitoring Assessment**, Dordrecht, v. 123, n. 1-3, p. 393-406, 2006.

KAUPP, M., MALKINA, O.L. Density-functional analysis of C-13 and H-1 chemicalshifts and bonding in mercurimethanes and organomercury hydrades - the role of scalar relativistic, spin-orbit, and substituent effects. **The Journal of Chemical Physics**, New York, v. 108, p. 3648 - 3659, 1998.

KERPER, L. E.; BALLATORI, N.; CLARKSON, T. W. Methylmercury transport across the blood-brain barrier by an amino acid carrier. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 262, n. 5, p. 761-765, 1992.

KERR, J. F. et al. Anatomical methods in cell death. **Methods in Cell Biology, New York,** v. 46, p. 1-27, 1995.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, London, v. 26, n. 4, p. 239-257, 1972.

KLYS, M. Mercury (and...) through the centuries. **Archiwa Medycyna Sadowej Kryminologia**. Warsaw v. 60, n. 4, p. 298-307, 2010.

KONDO, K. Congenital Minamata disease: Warnings from Japan's experience. **Journal of Child Neurology**, Rochester, v. 15, n. 7, p. 458-464, 2000.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins Basic Pathology**. Philadelphia, Saunders, 960 p., 2007.

KUO, L. N. et al. Effect of thimerosal on Ca(2+) movement and viability in human oral cancer cells. **Human and Experimental Toxicology**, Helsinki, v. 28, n. 5, p. 301-308, 2009.

LACERDA, L. D. et al. Mercury concentrations in fish from the Itacaiunas-Parauapebas River system, Carajas region, Amazon. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 3, p. 373-379, 1994.

LASH, L. H. et al. Interactive toxicity of inorganic mercury and trichloroethylene in rat and human proximal tubules: effects on apoptosis, necrosis, and glutathione status. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Albuquerque, v. 221, n. 3, p. 349-362, 2007.

LECHLER, P. J. et al. Elevated mercury concentrations in soils, sediments, water, and fish of the Madeira River basin, Brazilian Amazon: a function of natural

enrichments? The Science of the Total Environment, Amsterdam, v. 260, n. 1-3, p. 87-96, 2000.

LEE, J. H.; YOUM, J. H.; KWON, K. S. Mercuric chloride induces apoptosis in MDCK cells. **Journal of Preventive Medicine and Public Health**, Seoul, v. 39, n. 3, p. 199-204, 2006.

LEINO, T.; LODENIUS, M. Human hair mercury levels in Tucurui area, State of Para, Brazil. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 175, n. 2, p. 119-125, 1995.

LI, W. X. et al. Thimerosal-induced apoptosis in mouse C2C12 myoblast cells occurs through suppression of the PI3K/Akt/survivin pathway. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 11, p. e49064, 2012.

LIN, Y.; VOGT, R.; LARSSEN, T. Environmental mercury in China: a review. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Malden, v. 31, n. 11, p. 2431-2444, 2012.

MAGOS, L. et al. The Comparative Toxicology of ethylmercury and methylmercury. **Archives of Toxicology**, Basel, v. 57, n. 4, p. 260-267, 1985.

MAGOS, L. Neurotoxic character of thimerosal and the allometric extrapolation of adult clearance half-time to infants. **Journal of Applied Toxicology**, North Yorkshire, v. 23, n. 4, p. 263-269, 2003.

MAGOS, L. Review on the toxicity of ethylmercury, including its presence as a preservative in biological and pharmaceutical products. **Journal of Applied Toxicology**, North Yorkshire, v. 21, n. 1, p. 1-5, 2001.

MAGOS, L. The absorption, distribution and excretion of methyl mercury. In: ECCLES, C. U. A., Z. **The toxicity of methyl mercury.** Baltimore, The Johns Hopkins University Press, p. 24-44, 1986.

MAGOS, L.; BUTLER, W. H. The kinetics of methylmercury administered repeatedly to rats. **Archives of Toxicology**, Basel, v. 35, n. 1, p. 25-39, 1976.

MAKANI, S. et al. Biochemical and molecular basis of thimerosal-induced apoptosis in T cells: a major role of mitochondrial pathway. **Genes Immunity**, London, v. 3, n. 5, p. 270-278, 2002.

MALM, O. et al. Mercury pollution due to gold mining in the Madeira river basin, Brazil. **Ambio**, Dordrecht, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1990.

MATHESON, D. S.; CLARKSON, T. W.; GELFAND, E. W. Mercury toxicity (acrodynia) induced by long-term injection of gamma-globulin. **Journal of Pediatrics**, Cincinnati, v. 97, n. 1, p. 153-155, 1980.

MIGDAL, C. et al. Responsiveness of human monocyte-derived dendritic cells to thimerosal and mercury derivatives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Albuquerque, v. 246, n. 1-2, p. 66-73, 2010.

MILLER, S. et al. Mercury-associated nephrotic syndrome: a case report and systematic review of the literature. **American Journal of Kidney Diseases**, Boston, v. 62, n. 1, p. 135-138, 2013.

MONTANA, M. et al. Safety review: squalene and thimerosal in vaccines. **Therapie**, Les Ulis Cedex A, v. 65, n. 6, p. 533-541, 2010.

NRC (National Research Council). Toxicological effects of methylmercury. **Toxicological profile for mercury**, Washington. Disponível em: < http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp46.pdf >. Acesso em junho de 2013, 2000.

NEWTON, D.; FRY, F.A. The retention and active distribution of radioactive mercuric oxide following accidental inhalation. **The Annals of Occupational Hygiene**, Seattle, 21:21–32, 1978.

NORN, S. et al. Mercury--a major agent in the history of medicine and alchemy. **Dan Medicinhist Arbog**, Stockholm, v. 36, p. 21-40, 2008.

NORRBY, L. J. Why is mercury liquid? Or, why do relativistic effects not get into chemistry textbooks? **Journal of Chemical Education**, Athens, v. 68, n. 2, p. 110, 1991.

OGA, S. C.; MÁRCIA M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. Fundamentos de Toxicologia. Atheneu, São Paulo, 696 p., 2008.

ORCT, T. et al. Comparison of organic and inorganic mercury distribution in suckling rat. **Journal of Applied Toxicology**, North Yorkshire, v. 26, n. 6, p. 536-539, 2006.

PAL, M.; GHOSH, M. Studies on comparative efficacy of alpha-linolenic acid and alpha-eleostearic acid on prevention of organic mercury-induced oxidative stress in kidney and liver of rat. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, n. 3-4, p. 1066-1072, 2012.

PAMPHLETT, R.; JEW, S.K. Uptake of inorganic mercury by human locus ceruleus and corticomotor neurons: implications for amyotrophic lateral sclerosis. Acta **Neuropathologica Communications**, Münster, v.1, n.13, p.1-11, 2013.

PAMPHLETT, R.; WALEY, P. Uptake of inorganic mercury by the human brain. Acta **Neuropathologica Communications**, Münster, v.92, n.2, p.525-527, 1996.

PARK, J. D.; ZHENG, W. Human exposure and health effects of inorganic and elemental mercury. **Journal of Preventive Medicine and Public Health**, Seoul.v. 45, n. 6, p. 344-352, 2012.

PARKER, S. K. et al. Thimerosal-containing vaccines and autistic spectrum disorder: a critical review of published original data. **Pediatrics**, Elk Grove Village, v. 114, n. 3, p. 793-804, 2004.

PAT, B. K. et al. Fibrogenic stresses activate different mitogen-activated protein kinase pathways in renal epithelial, endothelial or fibroblast cell populations. **Nephrology**, Victoria, v. 8, n. 4, p. 196-204, 2003.

PERELMAN, A. et al. JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. **Cell Death and Disease**, London, v. 3, p. e430, 2012.

PETERSSON, K. et al. Distribution of mercury in rabbits subchronically exposed to low levels of radiolabeled methyl mercury. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 68, n. 6, p. 464-468, 1991.

PETRONI, D. et al. Low-dose methylmercury-induced oxidative stress, cytotoxicity, and tau-hyperphosphorylation in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. **Environmental Toxicology**, Jackson, v.27, n.9, p. 549-555, 2012.

PFAB, R. et al. Clinical course of severe poisoning with thiomersal. **Journal of Toxicology - Clinical Toxicology**, Brussels, v. 34, n. 4, p. 453-460, 1996.

PFEIFFER, W. C. et al. Mercury concentrations in inland waters of gold-mining areas in Rondonia, Brazil? **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 87-88, p. 233-240, 1989.

PICHICHERO, M. E. et al. Mercury concentrations and metabolism in infants receiving vaccines containing thiomersal: a descriptive study. **Lancet**, London, v. 360, n. 9347, p. 1737-1741, 2002.

PICHICHERO, M. E. et al. Mercury levels in newborns and infants after receipt of thimerosal-containing vaccines. **Pediatrics**, Elk Grove Village, v. 121, n. 2, p. 208-214, 2008.

PICHICHERO, M. E. et al. Mercury levels in premature and low birth weight newborn infants after receipt of thimerosal-containing vaccines. **Journal of Pediatrics**, Cincinnati, v. 155, n. 4, p. 495-499, 2009.

PROSKURYAKOV, S. Y.; KONOPLYANNIKOV, A. G.; GABAI, V. L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? **Experimental Cell Research**, Stockholm, v. 283, n. 1, p. 1-16, 2003.

QVARNSTRÖM, J. et al. Determination of methylmercury, ethylmercury, and inorganic mercury in mouse tissues, following administration of thimerosal, by species-specific isotope dilution GC-inductively coupled plasma-MS. **Analytical Chemistry**, Urbana, v. 75, n.16, p.4120-4124, 2003.

RODRIGUES, J. L. et al. Identification and distribution of mercury species in rat tissues following administration of thimerosal or methylmercury. **Archives of Toxicology**, Basel, v. 84, n. 11, p. 891-896, 2010.

ROGERO, S.O.L.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Testes in vitro de citoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, São Carlos, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

ROLFHUS, K. R.; FITZGERALD, W. F. Linkages between atmospheric mercury deposition and the methylmercury content of marine fish. **Water Air and Soil Pollution,** Guelph, v. 80, n. 1-4, p. 291-297, 1995.

ROWLAND, I. R.; DAVIES, M. J.; EVANS, J. G. Tissue content of mercury in rats given methylmercuric chloride orally: influence of intestinal flora. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, Berlin, v. 35, n. 3, p. 155-160, 1980.

ROWLAND, I. R.; ROBINSON, R. D.; DOHERTY, R. A. Effects of diet on mercury metabolism and excretion in mice given methylmercury: role of gut flora. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, Berlin, v. 39, n. 6, p. 401-408, 1984.

SABALL, E. et al. Potential mechanism of fibronectin deposits in acute renal failure induced by mercuric chloride. **Molecular and Cellular Biochemistry**, Dordrecht, v. 226, n. 1-2, p. 67-75, 2001.

SANDBORGH-ENGLUND, G. et al. The absorption, blood levels, and excretion of mercury after a single dose of mercury vapor in humans. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Albuquerque, v. 150, n. 1, p. 146-153, 1998.

SHAPIRO, A. M.; CHAN, H. M. Characterization of demethylation of methylmercury in cultured astrocytes. **Chemosphere**, New York, v. 74, n. 1, p. 112-118, 2008.

SHARMA, M. K. et al. Evaluation of protective efficacy of Spirulina fusiformis against mercury induced nephrotoxicity in Swiss albino mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 6, p. 879-887, 2007.

SHARPE, M. A.; LIVINGSTON, A. D.; BASKIN, D. S. Thimerosal-Derived Ethylmercury Is a Mitochondrial Toxin in Human Astrocytes: Possible Role of Fenton Chemistry in the Oxidation and Breakage of mtDNA. **Journal of Toxicology**, Washington, v. 2012, p. 373678, 2012.

SHI, J. Z. et al. Nephrotoxicity of mercuric chloride, methylmercury and cinnabarcontaining Zhu-Sha-An-Shen-Wan in rats. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 200, n. 3, p. 194-200, 2011.

SKERFVING, S. Methylmercury exposure, mercury levels in blood and hair, and health status in Swedes consuming contaminated fish. **Toxicology**, Amsterdam, v. 2, n. 1, p. 3-23, 1974.

SLEEMAN, J. M. et al. Mercury poisoning in a free-living northern river otter (Lontra canadensis). **Journal of wildlife diseases**, Atlanta, v. 46, n. 3, p. 1035-1039, 2010.

SMALL, D. M. et al. Oxidative Stress and Cell Senescence Combine to Cause Maximal Renal Tubular Epithelial Cell Dysfunction and Loss in an in vitro Model of Kidney Disease. **Nephron Experimental Nephrology**, Los Angeles, v. 122, n. 3-4, p. 123-130, 2012a.

SMALL, D. M. et al. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. **Nephrology**, Victoria, v. 17, n. 4, p. 311-321, 2012b.

SMITH, J. C. et al. The kinetics of intravenously administered methyl mercury in man. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Albuquerque, v. 128, n. 2, p. 251-256, 1994.

SMITHBURN, K. C. et al. Meningococcic meningitis - A clinical study of one hundred and forty-four epidemic cases. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 95, p. 776-780, 1930.

SOARES, P. V. Estudo da contaminação por mercúrio e metais pesados em garimpo de ouro primário. O estudo de caso da região de Pilar de Goiás e Guarinos, GO. Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas. Disponível http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000029340 acesso em julho de 2013, 1990.

SONNE, C. et al. Are liver and renal lesions in East Greenland polar bears (Ursus maritimus) associated with high mercury levels? **Environmental Health**, Boston, v. 17, p. 6-11, 2007.

STADNICKA, A. Inhibitory effect of mercury nitrate on mitotic activity of rat kidney tubular cells in tissue culture. **Bulletin de lácademie polonaise des sciences-seria des sciences biologiczn**, Warsaw, v. 26, n. 3, p. 207-209, 1978.

STAJICH, G. V. et al. latrogenic exposure to mercury after hepatitis B vaccination in preterm infants. **Journal of Pediatrics**, Cincinnati, v. 136, n.5, p. 679-681, 2000.

SUDA, I. et al. Degradation of methyl and ethyl mercury into inorganic mercury by various phagocytic cells. **Archives of Toxicology**, New York, v. 66, n. 1, p. 40-44, 1992.

SUDA, I.; HIRAYAMA, K. Degradation of methyl and ethyl mercury into inorganic mercury by hydroxyl radical produced from rat-liver microssomes. **Archives of Toxicology**, New York, v. 66, n. 6, p. 398-402, 1992.

SUDA, I.; SUDA, M.; HIRAYAMA, K. Degradation of methyl and ethyl mercury by singlet oxygen generated from sea-water exposed to sunlight or ultraviolet-light. **Archives of Toxicology**, New York, v. 67, n. 5, p. 365-368, 1993.

SUDA, I.; TAKAHASHI, H. Degradation of methyl and ethyl mercury into inorganic mercury by other reactive oxygen species besides hydroxyl radical. **Archives of Toxicology**, New York, v. 66, n. 1, p. 34-39, 1992.

SUDA, I.; TOTOKI, S.; TAKAHASHI, H. Degradation of methyl and ethyl mercury into inorganic mercury by oxygen free radical-producing systems: involvement of hydroxyl radical. **Archives of Toxicology**, New York, v. 65, n. 2, p. 129-134, 1991.

SUTTON, D. J.; TCHOUNWOU, P. B. Mercury induces the externalization of phosphatidyl-serine in human renal proximal tubule (HK-2) cells. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 4, n. 2, p. 138-144, 2007.

SUZUKI, T. et al. **Metabolic fate of ethylmercury in man and animal**. Em: MILLER, M. W. C., T.W. Mercury, Mercurials and Mercaptans. Charles C. Thomas, Springfield, p.208–240, 1973.

TAN, M.; PARKIN, J. E. Route of decomposition of thiomersal (thimerosal). International Journal of Pharmaceutics, London, v. 208, n. 1-2, p. 23-34, 2000.

TANG, O. et al. MiRNA-200b represses transforming growth factor-beta1-induced EMT and fibronectin expression in kidney proximal tubular cells. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, Bethesda, v. 304, n. 10, p. F1266-73, 2013.

TARABOVA, B. et al. Inorganic mercury and methylmercury inhibit the Cav3.1 channel expressed in human embryonic kidney 293 cells by different mechanisms. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v. 317, n. 1, p. 418-27, 2006.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). Mercury Study Report to Congress. Office of Air Quality Planning and Standards and Office of Research and Development. Available at http://www.epa.gov/hg/report.htm Accessed in October, 2013, 1997.

VAHTER, M. et al. Demethylation of methyl mercury in different brain sites of Macaca fascicularis monkeys during long-term subclinical methyl mercury exposure. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Albuquerque, v.134, n.2, p.273-284, 1995.

VALENT, F. et al. Neurodevelopmental effects of low-level prenatal mercury exposure from maternal fish consumption in a Mediterranean cohort: study rationale and design. **Journal of Epidemiology**, Tokyo, v. 23, n. 2, p. 146-52, 2013.

VAN CRUCHTEN, S.; VAN DEN BROECK, W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, Munich, v. 31, n. 4, p. 214-223, 2002.

WESTPHAL, G.A. et al. Thimerosal induces micronuclei in the cytochalasin B block micronucleus test with human lymphocytes **Archives of Toxicology**, New York, v. 77, n.1, p. 50-55, 2003.

WIGHT, T. N.; POTTER-PERIGO, S. The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis? **The American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 301, n. 6, p. 950-955, 2011.

WILLIAMS, C. M. et al. Fibronectin expression modulates mammary epithelial cell proliferation during acinar differentiation. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 68, n. 9, p. 3185-3192, 2008.

WILLIS, S. D., C.L.; HINDS, M.G.; HUANG, D.C. The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 15, n. 116, p. 4053-4056, 2003.

WOLFSEGGER, M. J. The R Package PK for Basic Pharmacokinetics. **Biometrie** und Medizin, Köln, v. 5, p. 61-68, 2006.

WOODS, J. S. et al. Attenuation of nuclear factor kappa B (NF-kappaB) promotes apoptosis of kidney epithelial cells: a potential mechanism of mercury-induced nephrotoxicity. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 110, n.5, p. 819-822, 2002.

WHO (World Health Organization). Methylmercury. **Environmental Health Criteria 101.** Geneva. Disponível em: < http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc101.htm >. Acesso em agosto de 2013, 1990.

YAGINUMA-SAKURAI, K. et al. Hair-to-blood ratio and biological half-life of mercury: experimental study of methylmercury exposure through fish consumption in humans. **The Journal of Toxicological Sciences**, Noda, v. 37, n. 1, p. 123-130, 2012.

YASUTAKE, A. et al. Neurotoxic action of inorganic mercury injected in the intraventricular space of mouse cerebrum. **Journal of Toxicological Sciences**, Noda, v. 35, n.5, p. 767-771, 2010.

YEL, L. et al. Thimerosal induces neuronal cell apoptosis by causing cytochrome c and apoptosis-inducing factor release from mitochondria. **International Journal of Molecular Medicine**, Athens, v. 16, n. 6, p. 971-977, 2005.

YORIFUJI, T. et al. Visual evoked potentials in children prenatally exposed to methylmercury. **Neurotoxicology**, Little Rock, v. 37, p. 15-18, 2013.

ZALUPS, R. K. Early aspects of the intrarenal distribution of mercury after the intravenous administration of mercuric chloride. **Toxicology**, Amsterdam, v. 79, n. 3, p. 215-28, 1993.

ZALUPS, R. K. Molecular interactions with mercury in the kidney. **Pharmacological Reviews**, Bethesda, v. 52, n. 1, p. 113-143, 2000.

ZALUPS, R. K.; BRIDGES, C. C. Relationships between the renal handling of DMPS and DMSA and the renal handling of mercury. **Chemical Research in Toxicology**, Minneapolis, v. 25, n. 9, p. 1825-1838, 2012.

ZALUPS, R.K., Reductions in renal mass and the nephropathy induced by mercury. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Albuquerque, v. 143, n.2, p. 366-379, 1997.

ZAREBA, G. et al. Thimerosal distribution and metabolism in neonatal mice: comparison with methyl mercury. **Journal of Applied Toxicology**, North Yorkshire, v. 27, n. 5, p. 511-518, 2007.

ZHANG, Y. et al. Induction of autoimmunity to brain antigens by developmental mercury exposure. **Toxicology Sciences**, Reston, v. 119, n. 2, p. 270-280, 2011.

ZHANG, Y.; BOLIVAR, V. J.; LAWRENCE, D. A. Maternal exposure to mercury chloride during pregnancy and lactation affects the immunity and social behavior of offspring. **Toxicology Sciences**, Reston, v. 133, n. 1, p. 101-111, 2013.

ZIEBELL, J. M. et al. Attenuated neurological deficit, cell death and lesion volume in Fas-mutant mice is associated with altered neuroinflammation following traumatic brain injury. **Brain Research**, Amsterdam, v. 1414, p. 94-105, 2011.

ZIEMINSKA, E. et al. Low molecular weight thiols reduce thimerosal neurotoxicity in vitro: modulation by proteins. **Toxicology**, Amsterdam, v. 276, n. 3, p. 154-163, 2010.

ZIMMERMANN, L. T. et al. Comparative study on methyl- and ethylmercury-induced toxicity in C6 glioma cells and the potential role of LAT-1 in mediating mercurial-thiol complexes uptake. **Neurotoxicology**, Little Rock, v. 38C, p. 1-8, 2013.

ZUIDEMA, J. et al. Release and absorption rates of intramuscularly and subcutaneously injected pharmaceuticals (II). **International Journal of Pharmaceutics**, London, v. 105, n. 3, p. 189-207, 1994.

### ANEXO I: Aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Campus de Ribeirão Preto Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 12.1.1158.53.1), intitulado "Avaliação da Toxicocinética do Hg e Estado Redox em Camundongos Expostos a Baixas Doses de Timerosal", de autoria de Maria Fernanda Hornos Carneiro e de Fernando Barbosa Junior, por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 10.12.2012.

This is to certify that the work (Protocol number 12.1.1158.53.1), entitled: "Avaliação da Toxicocinética do Hg e Estado Redox em Camundongos Expostos a Baixas Doses de Timerosal", by Maria Fernan da Hornos Carneiro and Fernando Barbosa Junior, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, December, 10 2012.

Ribeirão Preto, 14 de dezembro de 2012.

Presidente da CEUA Profa.Dra. Claudia Maria Padovan

Secretária da CEUA Maria Angélica Depiro

Recebi o original 2012 Data A44:

COPIA

Av. Bandeirantes, 3900 - CEP 14040-000 - Feberalo Preto - São Paulo Fonsi (16) 3602 4469 - Fax (16) 3633 7964

#### ANEXO II: Publicações relacionadas à tese

 CARNEIRO, MFH; MORAIS, C; BARBOSA, FJr; GOBE, G. Thimerosal in childhood vaccines contributes to accumulating mercury toxicity in the kidney.
 **Toxicological & Environmental Chemistry,** Volume 95, Issue 8, pages 1424-1447, 2013.

2) CARNEIRO, MFH; MORAIS, C; BARBOSA, FJr; GOBE, G. Thimerosal Induces Apoptotic and Fibrotic Changes to Kidney Epithelial Cells *In Vitro*. **Environmental Toxicology**, *in press (2014)*.

# ANEXO III- Publicações em análise em jornais internacionais relacionadas à tese

1) Maria Fernanda Hornos Carneiro, Juliana Maria Oliveira Souza, Denise Grotto, Bruno Lemos Batista, Vanessa Cristina de Oliveira Souza and Fernando Barbosa Jr<sup>-</sup> A systematic study of the disposition and metabolism of mercury species in mice after exposure to low levels of thimerosal (ethylmercury). Submetido para apreciação ao *journal* Environmental Research em Junho de 2014. **ANEXO IV- Material complementar** (as figuras usadas para elaboração da Figura 4.3 foram retiradas dos seguintes sites em 19/09/2013)

Cérebro: http://www.google.com.au/imgres?start=931&client=firefoxa&channel=fflb&hl=pt-

PT&biw=1440&bih=797&tbs=ic:gray,itp:lineart&tbm=isch&tbnid=3n3GG35nCSRuJM: &imgrefurl=http://www.chaosscience.org.uk/experiments/brainmodel&docid=JrlliJrAy PMQAM&itg=1&imgurl=http://www.chaosscience.org.uk/sites/default/files/exptimages /logos/brain.png%253F1323956812&w=398&h=400&ei=nApJUoq2PMOolQWImYFo &zoom=1&ved=1t:3588,r:41,s:900,i:127&iact=rc&page=31&tbnh=178&tbnw=177&nd sp=21&tx=144&ty=86

Coração: http://www.google.com.au/imgres?start=919&client=firefoxa&sa=X&channel=fflb&hl=pt-

PT&biw=1440&bih=797&tbs=itp:lineart&tbm=isch&tbnid=SDJtP7ld6bh06M:&imgrefur l=http://caritasregiondemurcia.org/ke-heart-diagram-tolabel.phtml&docid=3XWd6H\_XKS4XZM&imgurl=http://lrt.ednet.ns.ca/PD/ict\_projects/ body\_systems/sheets/heart.jpg&w=656&h=864&ei=9wRJUo6KFMelIAWiw4FQ&zoo m=1&ved=1t:3588,r:47,s:900,i:145&iact=rc&page=28&tbnh=180&tbnw=137&ndsp=2

9&tx=107&ty=114

 Fígado:
 http://www.google.com.au/imgres?client=firefox

a&sa=X&channel=fflb&hl=pt-

PT&tbas=0&biw=1440&bih=797&tbs=ic:gray,itp:lineart&tbm=isch&tbnid=51fuCMH6U 7GaFM:&imgrefurl=http://fineartamerica.com/featured/anatomy-livergranger.html&docid=dOTk7gmkjgoWpM&imgurl=http://images.fineartamerica.com/im ages-medium-large/anatomy-liver-

```
granger.jpg&w=778&h=900&ei=5glJUvOxEoTJkQW754C4Cw&zoom=1&ved=1t:358
8,r:91,s:0,i:359&iact=rc&page=4&tbnh=159&tbnw=130&start=85&ndsp=14&tx=102&t
y=64
```

```
Rim:http://www.google.com.au/imgres?um=1&client=firefox-a&sa=X&rls=org.mozilla:en-US:official&channel=fflb&hl=pt-
```

PT&tbas=0&biw=1440&bih=797&tbs=isz:l&tbm=isch&tbnid=hHqu\_VthR9A3NM:&img refurl=http://www.odontomagazine.com.br/2011/03/10/hospital-do-servidor-orientapublico-sobre-doencasrenais/&docid=nLkB7xgUqocuxM&imgurl=http://www.odontomagazine.com.br/wpcontent/uploads/2011/03/rim-

1024.jpg&w=1024&h=845&ei=4gBJUvTRLYPukQWKj4Ew&zoom=1&ved=1t:3588,r:2

6,s:0,i:173&iact=rc&page=2&tbnh=164&tbnw=199&start=16&ndsp=26&tx=107&ty=6

9