



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
BÁSICA E APLICADA**



**“AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE MERCÚRIO NO CABELO DE
PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO EM UM
AMBULATÓRIO DO SUS NA CIDADE DE MANAUS”**

JULIANA DE ANDRADE REBOUÇAS SAMPAIO

MANAUS

2011

JULIANA DE ANDRADE REBOUÇAS SAMPAIO

**“AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE MERCÚRIO NO CABELO DE
PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO EM UM
AMBULATÓRIO DO SUS NA CIDADE DE MANAUS”**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientador: Prof. Doutor Domingos Sávio Nunes de Lima
Co-orientador: Prof. Doutor Genilson Pereira Santana

MANAUS

2011

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S192a Sampaio, Juliana de Andrade Rebouças
Avaliação dos níveis de mercúrio no cabelo de pacientes com
lúpus eritematoso sistêmico em um ambulatório do sus na cidade
de Manaus / Juliana de Andrade Rebouças Sampaio. 2011
51 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Domingos Sávio Nunes de Lima
Orientador: Genilson Pereira Santana
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Mercúrio. 2. Cabelo. 3. Lúpus Eritematoso Sistêmico. 4.
Amazônia. I. Lima, Domingos Sávio Nunes de II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu Senhor e Deus, que vem guiando os meus passos e escolhas neste mundo, e se fazendo sempre presente, até quando eu menos espero.

Ao meu esposo Léo por me apoiar em tudo e me ensinar a simplificar as coisas. Aos meus pais Gracimoema e Fernando e às minhas irmãs Carol e Nanã, pelo amor e amizade inabaláveis. Vocês são bênçãos na minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter cuidado da minha vida nos detalhes, colocando pessoas preciosas em meu caminho antes e durante todo o período desta pós-graduação.

À minha família, pelo suporte inigualável. Sem palavras...

Aos meus eternos mestres Dr. Domingos e Dr. Luiz Fernando, que têm participado e contribuído com o meu crescimento e amadurecimento profissional desde a residência de Clínica Médica. Muito obrigada pelo aprendizado em todos estes anos de convivência, sobre medicina, sobre pesquisa e sobre a vida.

Às Professoras Aya e Cristina, por todo o carinho, compreensão, puxões de orelha e conhecimento que tive a oportunidade de vislumbrar mais uma vez com as aulas e seminários que tivemos.

Ao Professor Genilson, por ter apresentado para mim um outro universo, a química, e ter me ensinado que as vezes você tem mesmo que parar, tomar um café, que a solução acaba vindo na mente mais tranqüila.

Aos meus amigos do B4: Pio, Alcinei, Andrea, PC, Wanber, Merloti, Kati e Erasmo, por me ensinarem o dia a dia do laboratório e pelos momentos de descontração e estresse vividos juntos.

Às minhas companheiras das coletas: Débora, Rose e Jeana, pelo apoio e pela infalibilidade todas as vezes que marcamos os encontros com tesouras, seringas e tubos em riste!

Às minhas amigas de mestrado Fernanda, Isabella e Liziara, pelo aprendizado, troca de idéias, desabafos e risos compartilhados nestes dois anos.

Ao Professor Wanderley Bastos, Leidiane e toda a equipe do Laboratório de Biogeoquímica da UNIR, por terem me recebido de forma tão aberta e compartilhado sua experiência sobre mercúrio conosco.

Aos pacientes com lúpus e controles que de forma deliberada e desprendida, concordaram em contribuir com a formação de mais uma pequena peça deste gigante e complexo mosaico que é a autoimunidade.

Fica, para mim, reforçada no coração, a realidade de que o crescimento vem da troca de experiências, do encontro dos universos existentes na mente de cada um de nós e de que se pode até fazer algo sozinho, porém, juntos fazemos infinitamente mais.

RESUMO

O mercúrio é um metal de distribuição ubíqua, com potencial imunotóxico já demonstrado em modelos murinos. Em cepas geneticamente susceptíveis o mercúrio é capaz de induzir autoimunidade caracterizada por linfoproliferação, produção de autoanticorpos, formação de imunocomplexos e glomerulonefrite. Em humanos, os efeitos do mercúrio sobre o sistema imunológico não são tão claros. Existem relatos de maior prevalência de FAN e mesmo LES em áreas de intensa contaminação por mercúrio. Na Amazônia, vários estudos vêm demonstrando altas concentrações deste elemento em amostras ambientais e humanas, mesmo em locais onde a contaminação antrópica não é expressiva. Alguns destes, evidenciaram aumento na prevalência de FAN em comunidades onde os níveis de mercúrio no cabelo excedem o tolerável pela OMS. Com o objetivo de avaliar a influência do mercúrio na gênese ou na modulação da expressão clínica do LES nos indivíduos desta região, este estudo verificou os níveis de mercúrio total no cabelo destes pacientes e controles hígidos pareados por sexo e idade procedentes do estado do Amazonas, Brasil. Nos resultados, a mediana para a concentração de mercúrio total no cabelo foi de $1,20 \mu\text{g g}^{-1}$ e $1,14 \mu\text{g g}^{-1}$ para pacientes e controles respectivamente ($p = 0,607$). Quando analisadas as variáveis: manifestações clínicas, autoanticorpos e atividade da doença, também não houve associação significativa com o mercúrio nestes pacientes. Este foi o primeiro estudo a avaliar os níveis de mercúrio em indivíduos com LES na Amazônia, não tendo sido encontrada relação entre eles. A ausência desta associação não refuta a possibilidade deste elemento exercer influência na gênese ou no perfil clínico da doença sendo necessários mais estudos que enfoquem os níveis de mercúrio em indivíduos com lúpus manifesto, procedentes desta região.

Palavras-chave: Mercúrio, Amazônia, Lúpus Eritematoso Sistêmico

ABSTRACT

Mercury is a ubiquitous metal with immunotoxic potential in rodents. In highly susceptible mouse strains mercury can induce lymphoproliferation, elevated level of autoantibodies, immune complexes formation and glomerulonephritis. In humans, mercury's effects are not so clear. A few studies show higher prevalence of SLE and ANA in people living at high mercury concentration areas. In the Amazon, human and environmental samples have been showing high mercury levels even in areas where anthropogenic sources are unexpressive. Some studies found higher prevalence of ANA in communities where hair mercury levels crossed the tolerable stipulated by WHO. This study aimed to evaluate mercury's influence on lupus genesis and clinical expression in amazonians by measuring total mercury hair levels in these patients and healthy controls paired by age and gender. The results (median) for total mercury levels were $1,20 \mu\text{g g}^{-1}$ e $1,14 \mu\text{g g}^{-1}$ for patients and controls respectively ($p = 0,607$). When clinical manifestations, autoantibodies and disease activity were analysed, we didn't find association with hair mercury concentration as well. This was the first study evaluating mercury levels on amazonian lupus patients. The lack of association found in this study doesn't refute the possibility of mercury's impact on the disease. More studies are needed, focusing on manifested SLE in amazonians.

Keywords: Mercury, Amazon, Systemic Lupus Erythematosus

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR – *American College of Rheumatology*

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

FAN – Fator antinuclear

g – grama

HNO₃ – Ácido nítrico

HSO₄ – Ácido sulfúrico

HUGV – Hospital Universitário Getúlio Vargas

IL1 β – Interleucina 1 beta

IL1Ra – Receptor antagonista da interleucina 1

IL10 – Interleucina 10

LPS – Lipopolissacarídeo

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

mL – mililitro

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBMC – Células mononucleares de sangue periférico

SLEDAI – Índice de atividade de doença do Lúpus Eritematoso Sistêmico

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

UNIR – Universidade Federal de Rondônia

LISTA DE SÍMBOLOS

g – grama

° – grau

μg g⁻¹ – Micrograma por grama

SUMÁRIO

ARTIGO 1: O LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E O AMBIENTE: a influência do mercúrio	11
1. INTRODUÇÃO	11
2. O MERCÚRIO	12
3. O MERCÚRIO E O LÚPUS	13
4. ABSORÇÃO, CONVERSÃO E POSSÍVEIS MECANISMOS DE LESÃO CELULAR	17
5. EPIGENÉTICA, LÚPUS E MERCÚRIO	18
6. CONCLUSÃO	19
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
ARTIGO 2: NÍVEIS DE MERCÚRIO EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO NO AMAZONAS	25
1. INTRODUÇÃO	25
2. METODOLOGIA	27
2.1. PACIENTES	27
2.2. DETERMINAÇÃO DO MERCÚRIO TOTAL	28
2.3. TRATAMENTO ESTATÍSTICO	29
3. RESULTADOS	29
3.1. DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS	29
3.2. ANÁLISE DOS NÍVEIS DE MERCÚRIO	30
4. DISCUSSÃO	30
5. CONCLUSÃO	34

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
APÊNDICES.....	43
ANEXOS.....	47

ARTIGO 1: LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E O AMBIENTE: a influência do mercúrio.

RESUMO: O lúpus eritematoso sistêmico é o protótipo da doença autoimune sistêmica e o estudo de fatores ambientais associados à sua gênese vêm ganhando cada vez mais relevância nos últimos anos. Apesar disso, as informações existentes ainda são cheias de lacunas. Desde a descrição da associação do mercúrio com o desenvolvimento de autoimunidade em ratos na década de 1970, vários estudos vem avaliando a associação entre este agente e fenômenos e doenças autoimunes em modelos experimentais e seres humanos. Neste artigo, os autores revisam os potenciais papéis do mercúrio na indução da autoimunidade no lúpus eritematoso sistêmico.

1. INTRODUÇÃO

Desde a descrição do *horror autotoxicus* pelo grande bacteriologista e imunologista alemão Paul Erlich¹, os fenômenos autoimunes intrigam a sociedade científica. Várias teorias tentam explicar a quebra da tolerância ao próprio, sendo a influência de fatores ambientais sobre indivíduos geneticamente predispostos, a teoria mais aceita na atualidade.²

O Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é o protótipo da doença autoimune sistêmica e o estudo de fatores ambientais associados à sua gênese vêm ganhando cada vez mais relevância nos últimos anos. A exposição solar, algumas drogas (procaïnâmica, isoniazida) e xenobióticos, incluindo metais pesados têm sido implicados na patogênese da doença.^{3,4} Apesar disso, as informações existentes ainda são cheias de lacunas, em parte, por ser uma doença relativamente rara e extremamente heterogênea em seus fenótipos, genótipos (herança poligênica) e, provavelmente, patogênese. Desta forma, provavelmente apresenta interações ambiente-carga genética diversos, nos diferentes subgrupos de pacientes. Somado a isso, o período de latência do LES é potencialmente longo, com indivíduos mostrando evidência laboratorial de autoanticorpos circulantes, meses a anos antes dos primeiros sinais e sintomas da doença.⁵

Assim como no caso de alguns cânceres, provavelmente, devem existir alguns agentes ambientais que iniciam o processo autoimune (indutores), outros

que promovem (promotores) e outros que sustentam este processo (sustentadores), o que torna a correlação de um destes agentes com a doença em questão uma tarefa, de fato, difícil; especialmente, se levarmos em consideração que, em algumas circunstâncias mais de uma agente ambiental podem estar influenciando em conjunto a quebra da tolerância ao próprio.⁶ Além disso, alguns fatores ambientais poderiam reforçar ou amplificar o ciclo de resposta imunológica ao próprio de uma tal forma, que sua retirada de cena após determinado ponto, poderia não mais resultar no término da resposta imune já instalada.

Vários fatores ambientais vem sendo estudado no LES ultimamente. Entre os mais estudados estão agentes infecciosos como os vírus Epstein-Barr⁷, Herpes Zoster⁸, Parvovírus B19⁹, Citomegalovírus¹⁰, retrovírus¹¹ e agentes não infecciosos como os raios ultravioleta¹², o tabaco¹³, a sílica¹⁴ e alguns metais pesados, como o mercúrio.¹⁵

2. O MERCÚRIO

O mercúrio é um metal inodoro, pertencente ao grupo II B da tabela periódica. Seu símbolo, Hg, proveio de seu nome em latim *hydrargyrum*, o qual remete à sua aparência líquida e prateada na temperatura ambiente. Tem distribuição ubíqua no mundo, estando, virtualmente, todos nós expostos a este metal em algum grau.¹⁶

O mercúrio é emitido para a atmosfera naturalmente (erupções vulcânicas, desgaseificação da crosta terrestre, reevaporação do mercúrio previamente depositado). Contudo, são as emissões antropogênicas (indústrias de mineração, produtos alimentares, pesticidas, amálgamas dentários, lâmpadas fluorescentes e indústrias de cloro-álcali) que vêm contribuindo de forma crescente para o aumento da concentração deste elemento no meio ambiente.^{17, 18}

O mercúrio encontra-se sob três estados de oxidação: Hg^0 (metálico), Hg^+ (mercuroso) e Hg^{++} (mercúrico), este último forma uma variedade de compostos inorgânicos e orgânicos, cuja cinética e biotransformação depende da forma física e química do composto em questão.

A exposição humana se dá principalmente pela inalação de vapor de mercúrio (Hg^0) que ocorre por exposição ocupacional (consultórios odontológicos, fábricas cloro-álcali, garimpo) ou através da ingestão de organomercuriais (MeHg), principalmente pelo consumo de peixes e frutos do mar.¹⁸

O mercúrio emitido tanto de modo natural quanto antropogênico, está sob a forma inorgânica, predominantemente elementar (Hg^0). Na atmosfera, este sofre oxidação para as formas mercúrica e mercuriosa precipitando-se sobre a crosta terrestre. Nos corpos aquáticos, especificamente no sedimento, os íons inorgânicos sofrem biometilação por ação de certas bactérias e processos abióticos, formando o metilmercúrio (MeHg). Este é, então, consumido por pequenos peixes que são consumidos por peixes sucessivamente maiores, chegando, finalmente ao homem.^{19,20,21} Durante este processo, ocorre um aumento progressivo da concentração de MeHg nos tecidos dos peixes, a qual chega a ser centenas de vezes maior que a concentração de mercúrio inorgânico na água; este processo é chamado de biomagnificação.²¹

Os compostos orgânicos do mercúrio são quase totalmente absorvidos no trato gastrointestinal. A partir daí, ganham a corrente sangüínea e distribuem-se rapidamente por todos os tecidos do corpo, atravessando com facilidade as barreiras hemato-encefálica e placentária.

Por muito tempo, os estudos sobre os efeitos do mercúrio na saúde humana foram direcionados para os seus efeitos neurotóxicos e nefrotóxicos diretos.^{22,23} Entretanto, nos últimos 30 anos, os seus efeitos sobre o sistema imunológico têm sido cada vez mais estudados, e ganharam uma nova dimensão com as primeiras publicações dos modelos experimentais de autoimunidade induzida por mercúrio (AIHg).²⁴

3. O MERCÚRIO E O LÚPUS

Ainda na década de 70, Druet e colaboradores observaram em ratos Brown Norway (BN), pela primeira vez, que o mercúrio era capaz de induzir fenômenos imunológicos que culminavam em doença autoimune.²⁵ Alterações semelhantes foram encontradas por outros pesquisadores, mesmo utilizando doses consideradas subtóxicas (HgCl_2 1,0 mg/Kg de peso corpóreo) nos seus experimentos.²⁶

A doença autoimune gerada pelo mercúrio em ratos, é caracterizada pela ativação policlonal de linfócitos T e B, aumento dos níveis séricos de imunoglobulinas M, G, A e E; produção de autoanticorpos (anti-DNAs, antifosfolípido e antimembrana basal glomerular), além da formação de imunocomplexos e aparecimento de glomerulonefrite.⁴ A indução da doença é

restrita às cepas de ratos que possuem o haplótipo do MHC classe II RT-1ⁿ (o que é o caso dos ratos BN). Cepas que carregam outros haplótipos como o RT-1^l são resistentes à indução de autoimunidade pelo mercúrio. Uma característica interessante, e ainda sem explicação clara, é que as alterações imunológicas induzidas por este metal nos modelos experimentais utilizando ratos são autolimitadas. Elas se resolvem em um período de quatro a cinco semanas após o seu início, independentemente da persistência ou não da exposição. Esta resolução é seguida por um estado de resistência imunológica mesmo frente a novos desafios com mercúrio.

Em camundongos, o mercúrio (mesmo em doses baixas), também induz proliferação policlonal de linfócitos T e B, aumento dos níveis séricos de imunoglobulinas (IgG1 e IgE), produção de autoanticorpos e glomerulonefrite decorrente da deposição de imunocomplexos. A especificidade dos autoanticorpos produzidos é diferente dos modelos utilizando ratos e mostrou ser dirigida primordialmente a antígenos nucleolares, principalmente à fibrilarina, uma fosfoproteína de 34 kDa, que participa no processamento dos rRNA, e é encontrada junto à região rica em uridina dos RNAs nucleolares de pequeno tamanho. O desenvolvimento destas alterações imunológicas também está ligado à presença de haplótipos específicos do MHC classe II, com o haplótipo H-2^s, que determina alta susceptibilidade, os haplótipos H-2^q e H-2^f (susceptibilidade intermediária) e os haplótipos H2^a, H2^b, que conferem resistência à doença^{27,28,29}

Alguns trabalhos têm mostrado que cepas de camundongos carregando o mesmo haplótipo mostram susceptibilidades diferentes. As cepas de camundongos BALB/c, B10.D2 e DBA/2 são todas portadoras do haplótipo H-2^d. Os animais BALB/c apresentam intensa linfoproliferação com formação de imunocomplexos e desenvolvimento de glomerulonefrite grave após serem expostos ao mercúrio. Esta linfoproliferação é bem menos intensa em camundongos B10.D2, os quais evoluem com um quadro leve de glomerulonefrite, sendo os camundongos DBA/2 completamente resistentes. Isso mostra que existem outros genes não-MHC II que participam da modulação do tipo e intensidade da resposta imunológica frente a este estímulo.³⁰

Ao contrário do que acontece nos modelos utilizando ratos, nos camundongos não ocorre o desenvolvimento de resistência ao mercúrio; e apesar das

manifestações clínicas se resolverem após a retirada do estímulo, os autoanticorpos produzidos podem ser detectados meses após o cessamento da exposição.

Outros estudos experimentais vêm demonstrando que a exposição ao mercúrio pode não só gerar doença autoimune *de novo*, mas também exacerbar doença autoimune pré-existente, assim como antecipar o seu início em animais predispostos ou mesmo modular essa predisposição ao desenvolvimento. Pollard e colaboradores, observaram que a exposição da cepa murina BXSB *lupus-prone* ao mercúrio inorgânico, acelerou várias manifestações clínicas da doença, relacionadas tanto ao braço celular como ao humoral da imunidade.³¹ Em um estudo experimental utilizando linhagens de camundongos B6D2F₁(BDF₁) e DBA/2 (modelos experimentais de doença do enxerto versus hospedeiro – DEVH, que não são susceptíveis ao desenvolvimento de autoimunidade induzida pelo mercúrio), foi observado o desenvolvimento mais precoce e grave de nefrite, assim como uma maior mortalidade após a indução da DEVH, nos grupos pré-tratados com baixas doses de mercúrio inorgânico (HgCl₂).³²

A influência do mercúrio, entretanto, não se restringe à modulação da gravidade ou precocidade com as quais uma doença autoimune se manifesta. Inman e Chiu observaram que cepas de ratos BN (geneticamente resistentes ao desenvolvimento de artrite reativa à *Chlamydia tracomatis*), podem tornar-se susceptíveis após a exposição ao metal. Esta exposição altera o perfil de citocinas no microambiente articular, a capacidade de clearance do patógeno pelo indivíduo e a mudança de um fenótipo histopatológico resistente para um susceptível.³³ Isso reforça a idéia de que vários fatores ambientais provavelmente atuam orquestradamente para quebrar a tolerância ao próprio. O fator precipitante imediato pode ser, por exemplo, uma infecção bacteriana ou viral, mas isso ocorre em um contexto de outros fatores ambientais que influenciam o repertório imunológico do indivíduo e a forma de ele reagir aos estímulos subsequentes.

Em seres humanos, os primeiros relatos descrevem o desenvolvimento de síndrome nefrótica em indivíduos que fizeram tratamento de psoríase com mercúrio tópico e após o uso de cremes dermatológicos clareadores contendo este metal³⁴. Desde então, outras publicações vêm mostrando evidências da associação do mercúrio com fenômenos autoimunes em seres humanos. Lauwerys e colaboradores avaliaram 62 trabalhadores expostos ao vapor de mercúrio por um período médio de cinco anos e encontraram associação entre a concentração de

mercúrio na urina e positividade para anticorpo anti-laminina, sugerindo que o mercúrio poderia levar a uma disfunção imunológica em indivíduos predispostos.³⁵ Em um trabalho com pacientes portadores de esclerose sistêmica, os níveis de mercúrio urinário foram significativamente mais elevados nos pacientes que nos controles, em especial nos indivíduos portadores do anticorpo anti-fibrilarina.³⁶ Albert e colaboradores, investigaram a exposição prévia a vários fatores ambientais, incluindo o mercúrio, em 53 pacientes com Granulomatose de Wegener, e encontraram associação entre este metal e a presença da doença com *odds ratio* de 10,69.³⁷ Outras doenças autoimunes parecem estar associadas à exposição crônica ao mercúrio como a tireoidite de Hashimoto³⁸, o pênfigo foliáceo³⁹ e a doença de Kawasaki⁴⁰.

Em um estudo realizado na cidade de Hobbs, Novo México (EUA), Dahlgren e colaboradores encontraram 13 casos de LES em uma população de 28.600 habitantes, perfazendo uma prevalência de 45 casos/100.000. A maioria destas pessoas morava sobre um aterro de resíduos de petróleo, onde os níveis de mercúrio e pristano eram seis vezes mais altos do que em amostras ambientais provenientes de duas milhas de distância. Quando foi considerada, apenas a população residente no local de maior contaminação, a prevalência subiu para 832 casos/100.000, o que sugere que esta exposição ambiental provavelmente contribuiu para o aparecimento de lúpus nas pessoas geneticamente predispostas daquela comunidade⁴¹. A correlação entre amálgamas dentários e LES, assim como a melhora clínica da doença após a retirada destes, também tem sido relatadas. Os estudos, no entanto, têm sido conflitantes sobre este assunto.⁴²

No Brasil, a partir da década de 1990, vários estudos vêm demonstrando níveis elevados de mercúrio em amostras ambientais e em indivíduos procedentes da região amazônica.^{43,44,45} Silva e colaboradores, avaliaram os níveis de mercúrio em três comunidades na bacia do rio Amazonas, que mantinham contato direto ou indireto com a atividade de garimpo. Os indivíduos com níveis de mercúrio mais altos, apresentaram uma maior prevalência de FAN em relação aos demais. No entanto, estas comunidades também apresentavam alta prevalência de malária, o que pode ter agido como um fator confundidor.⁴⁶ Alves e colaboradores encontraram resultados diferentes. Apesar da área estudada (bacia do médio Rio Negro) apresentar indivíduos consumidores frequentes de peixe, com níveis elevados de mercúrio no cabelo (média de 35,4 $\mu\text{g g}^{-1}$), não houve associação entre este achado

e a positividade do FAN, não diferindo da prevalência encontrada na população urbana utilizada como controle.⁴⁷

4. ABSORÇÃO, CONVERSÃO E POSSÍVEIS MECANISMOS DE LESÃO CELULAR

Apesar de estarmos expostos a todas as formas químicas do mercúrio, é através dos seus compostos orgânicos e do mercúrio elementar que o nosso maior contato com este metal é estabelecido.⁴⁸

As formas inorgânicas do mercúrio são pouco absorvidas. Após a ingestão do mercúrio inorgânico, menos de 10% é absorvido no trato gastrointestinal. Similarmente, pouco deste é absorvido pelas vias aéreas.

No caso do Hg^0 , a absorção é predominantemente pela inalação do seu vapor, o qual ganha rapidamente a corrente sangüínea e ultrapassa as barreiras hemato-encefálica e placentária devido à sua lipossolubilidade.

Os organomercuriais são altamente absorvidos pelo trato gastrointestinal. Algumas formas orgânicas (especialmente o dimetilmercúrio) podem ser facilmente absorvidos, inclusive, pela pele. Após esta absorção, rapidamente ganham a corrente sangüínea e se distribuem por todos os tecidos orgânicos, atravessando, de forma similar ao Hg^0 , as barreiras hemato-encefálica e placentária.⁴⁹

Tanto o mercúrio orgânico como o inorgânico induzem autoimunidade em modelos experimentais.^{50,51} Contudo, os estudos vêm demonstrando que é a forma inorgânica do metal a responsável pela indução deste fenômenos autoimunes. Dentro da célula, o mercúrio elementar é oxidado por uma catalase e as espécies orgânicas sofrem um processo de desmetilação, ambas resultando em mercúrio inorgânico. Os íons inorgânicos de mercúrio têm alta afinidade por grupos amina, carboxil, hidroxil e principalmente grupos tiol (ricos em resíduos de cisteína) e reagem desta forma com diversas moléculas biológicas e vias metabólicas a elas relacionadas interferindo com o seu funcionamento normal.⁵² Gardner e colaboradores observaram, em um estudo *in vitro* utilizando células mononucleares de sangue periférico (PBMC) humanas, que baixas concentrações de iHg na presença de LPS modulavam a produção de citocinas, favorecendo a liberação de $TNF\alpha$ e $IL1\beta$ (citocinas pró-inflamatórias) e inibindo a secreção de $IL10$ e $IL1Ra$ (citocinas anti-inflamatórias).⁵³

Alterações nos mecanismos de apoptose têm sido relacionadas com o desenvolvimento de autoimunidade. Ziembra e colaboradores observaram que baixas doses de mercúrio acarreta a dissociação do receptor Fas, dificultando a formação do DISC e inibindo a apoptose.⁵⁴ Outro estudo *in vitro* utilizando células Jurkat, mostrou que a exposição a baixas doses de mercúrio ($\leq 10 \mu\text{M}$) HgCl_2 atenuava a apoptose mediada por anticorpo anti-CD95 provavelmente alterando a função de um dos componentes da via de sinalização já após o CD95, porém antes da ativação da caspase-3. A formação do complexo sinalizador de indução de morte (DISC) após a oligomerização do CD95/Fas é um passo primordial para a apoptose mediada pelo Fas.⁵⁵ Estes resultados sugerem ser este um dos mecanismos responsáveis pela quebra da tolerância periférica por este metal.

5. EPIGENÉTICA, LÚPUS E MERCÚRIO

A epigenética compreende as mudanças estáveis e herdáveis (ou potencialmente herdáveis) na expressão gênica e que não determinam mudança na seqüência do DNA. Apesar do genoma estar presente em todas as células nucleadas do organismo, cada tipo celular tem modificações epigenéticas características que determinam o transcriptoma adequado para o seu funcionamento específico.⁵⁶ Nos últimos anos, o número de estudos que enfocam este tema tem crescido progressivamente, na tentativa de compreender melhor a interação entre o organismo humano, seu genoma e o meio ambiente.⁵⁷ No caso da autoimunidade, a presença de alterações específicas da regulação dos processos epigenéticos seria responsável pela quebra da tolerância ao próprio através tanto da hipometilação de genes como do envolvimento de repressores da transcrição. A maioria dos estudos sobre esta influência são *in vitro* ou *in vivo* utilizando modelos animais, e vêm mostrando que variações do epigenoma podem levar à ativação de clones de linfócitos autoreativos.⁵⁸

O mercúrio têm sido associado a alterações epigenéticas que podem exercer um papel relevante na gênese de doenças como a esclerose lateral amiotrófica assim como de alguns cânceres.⁵⁹ Os resultados destes trabalhos em conjunto corroboram para o entendimento de que muito além de um efeito direto nas vias metabólicas e mecanismos de ação celular, fatores ambientais como o mercúrio podem ainda produzir mudanças epigenéticas que determinem um efeito imediato na resposta imune ou efeitos silentes em um primeiro momento mas que “preparam”

o indivíduo para que, em um encontro subsequente com outros fatores ambientais, venha a desenvolver o corolário de alterações imunológicas que vão culminar com as manifestações clínicas de uma doença autoimune como o LES.

6. CONCLUSÃO

Apesar dos diversos avanços científicos em direção ao entendimento total da gênese do LES, ainda existem muitas lacunas a serem preenchidas. Fica claro, no entanto, que a influência do ambiente é muito mais importante do que se imaginava. O mercúrio como metal ubíquo está em contato com a humanidade de várias formas, e apesar de sua estrutura química elementar ele pode afetar profundamente o sistema imunológico de animais geneticamente susceptíveis. Sua influência em seres humanos é provável, contudo, são necessários mais estudos sobre este tema com o intuito de desvendarmos o mosaico intrigante da autoimunidade.

7. REFERÊNCIAS

1. Turk JL. Paul Ehrlich: the dawn of immunology. *J R Soc Med*. 1994 Jun;87:314-5.
2. Parham P. *O Sistema Imune*. [tradução: Viezzer C et al.]. Capítulo 13: Lesão do tecido saudável pela resposta immune. Páginas 399-431. 3^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
3. Zandman-Goddard G; Solomon M; Rosman Z et al. Environment and lupus-related diseases. *Lupus*. 2012; 21:241–50.
4. Rowley B; Monestier M. Mechanisms of heavy metal-induced autoimmunity. *Molecular Immunology*. 2005; 42:833-8.
5. Arbuckle MR; McClain MT; Rubertone MV et al. FAN Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus. *The New England Journal of Medicine*. 2003; 349; 16.
6. Sarasin A. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research*. 2003; 544:99-106.

7. Toussiro E, Roudier J. Epstein-Barr virus in autoimmune diseases. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology*. 2008; 22:883-96.
8. Posnett DN. Herpesviruses and autoimmunity. *Current Opinion in Investigational Drugs*. 2008; 9:505-14.
9. Lunardi C, et al. Human parvovirus B19 infection and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*. 2008; Volume 8:116-20.
10. Newkirk MM, Venrooij WJV and Marshall GS. Autoimmune response to U1 small nuclear ribonucleoprotein (U1 snRNP) associated with cytomegalovirus infection. *Arthritis Res*. 2001;3:253-8.
11. Doria A, et al. Infections as triggers and complications of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity Reviews*. 2008; 8:24-8.
12. Kuhn A, Beisert, S. Photosensitivity in lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 2005; 38:519-29.
13. Harel-Meir M, Sherer Y, Shoenfeld Y. Tobacco smoking and autoimmune rheumatic diseases. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. 2007; 3:707-15.
14. Brown JM, et al. *Clinical Experimental Immunology*. 2003; 131:415-21.
15. Silbergeld EK, Silva IA, Nyland JF. Mercury and autoimmunity: implications for occupational and environmental health. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005; 207:282-92.
16. Skoog AD; West DM; Holler FJ; et al. *Fundamentos de Química Analítica*. 8^a ed. Thomson, 2006.
17. Pelletier L, Castedo M, Bellon B and Druet P. Mercury and Autoimmunity. In: Dean JH, Luster MI, Munson AE and Kimber I (eds). *Immunotoxicology and immunopharmacology*. New York: Raven Press Ltd, 1994, pp. 539-52.
18. Committee on the Toxicological Effects of Methylmercury, Board on Environmental Studies and Toxicology, National Research Council. *Toxicological Effects of Methylmercury*. Washington DC: National Academy Press, 2000.
19. Harris RC, Rudd JWM, Amyot M, et al. Whole-ecosystem study shows rapid fish-mercury response to changes in mercury deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Oct;104:16586-91.

20. Wasserman JC, Hacon S and Wasserman MA. Biogeochemistry of mercury in the Amazonian environment. *Ambio*. 2003;32:336-42.
21. Ciesielski T, Pastukhov MV, Szefer P and Jenssen BM. Bioaccumulation of mercury in the pelagic food chain of the lake Baikal. *Chemosphere*. 2010 Mar;78:1378-84.
22. Yokoo EM, Valente JG, Grattan L, Schmidt SL, Platt I and Silbergeld EK. Low level methylmercury exposure affects neuropsychological function in adults. *Environ Health Global Access Sci Source*. 2003 Jun;2:8.
23. Eddins D, Petro A, Pollard N, Freedman JH and Levin ED. Mercury-induced cognitive impairment in metallothionein-1/2 null mice. *Neurotoxicol Teratol*. 2008 Jun;30:88-95.
24. Vas J & Monestier M. Immunology of Mercury. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008; 1143: 240–67.
25. Druet P, Druet E, Potdevin F, Sapin C. Immune type glomerulonephritis induced by HgCl₂ in Brown Norway rat. *Ann Immunol (Paris)*. 1978; 129 c(6):777-92.
26. Capron M, Ayed K, Druet E, Sapin C, et al. Complement studies in BN rats with mercuric chloride-induced immune glomerulonephritis. *Ann Immunol (Paris)*. 1980 jul-ago; 131D:43-55.
27. Hultman P, et al. Murine susceptibility to mercury. II. Autoantibody profiles and renal immune deposits in hybrid, backcross, and H-2d congenic mice. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1993; 68:9–20.
28. Hultman P, et al. Selective induction of anti-fibrillar autoantibodies by silver nitrate in mice. *Clinical and Experimental Immunology*. 1994; 96: 285–91.
29. Hultman P, et al. Genetic susceptibility to silver-induced anti-fibrillar autoantibodies in mice. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1995; 77:291–7.
30. Hultman P; Nielsen JB. The effect of dose, gender, and non-H-2 genes in murine mercury-induced autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*. 2001; 17:27–37.
31. Pollard KM, Pearson DL, Hultman P, Deane TN, Lindh U and Kono DH. Xenobiotic acceleration of idiopathic systemic autoimmunity in lupus-prone BXSB mice. *Environ Health Perspect*. 2001 jan;109:27-33.
32. Via CS, Nguyen P, Niculescu F, Papadimitriou J, Hoover D and Silbergeld EK. Low-dose exposure to inorganic mercury accelerates disease and mortality in Acquired Murine Lupus. *Environ Health Perspect*. 2003 Apr;111:1273-7.

33. Inman RD and Chiu B. Heavy metal exposure reverses genetic resistance to Chlamydia-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2009 Feb [cited 2011 Aug 14];11(1). Available from: <http://arthritis-research.com/content/11/1/R19>.
34. Barr RD, Rees PH, Cordy PE, Kungu A, Woodger BA, Cameron HM. Nephrotic syndrome in adult africans in Nairobi. *British Medical Journal*. 1972 Apr; 2, 131-134.
35. Lauwerys R, Bernard A, Roels H, et al. Anti-laminin antibodies in workers exposed to mercury vapour. *Toxicol Lett*. 1993 Jun; 17:113-116.
36. Arnett FC, Fritzler MJ, Ahn C, Holian A. Urinary mercury levels in patients with autoantibodies to U3-RNP (fibrillarin). *J Rheumatol*. 2000 Feb; 27:405-410.
37. Albert D, Clarkin C, Komoroski J, Brensinger CM, Berlin JA. Wegener's Granulomatosis: possible role of environmental agents in its pathogenesis. *Arthritis & Rheumatism*. 2004; 51; 656-664.
38. Hybenova M, Hrda P, Prochzkov J, Stejskal V, Sterzl I. The role of environmental factors in autoimmune thyroiditis. *Neuro Endocrinol Lett*. 2010; 31;283-289.
39. Robledo MA. Chronic methyl mercury poisoning may trigger endemic pemphigus foliaceus "fogo selvagem". *Medical Hypotheses*. 2012; Jan;78(1):60-6.
40. Mutter J & Yeter D. Kawasaki's disease, acrodynia, and mercury. *Current Medicinal Chemistry*. 2008; 15(28):3000-10.
41. Dahlgren J, et al. Cluster os sistemic lupus erithematosus (SLE) associated with an oil Field waste site: a cross sectional study. *Environmental Health*. 2007; 6:8.
42. Pigatto PD & Guzzi G. Linking mercury amalgam to autoimmunity. *Trends in Immunology*. 2010; Fevereiro; 31(2):48-9.
43. Malm O. Gold mining as a source of Mercury exposure in the Brazilian Amazon. *Environmental Research*. 1998; 77:73-8.
44. Camargo LC, et al. Distribuição de mercúrio em diferentes solos da Bacia do Médio Rio Negro – AM: Influência da matéria orgânica no ciclo biogeoquímico do mercúrio. *Química Nova*. 2007; 30:274-80.
45. Barbieri FL, Gardon J. Hair mercury levels in Amazonian populations: spatial distribution and trends. *International Journal of Health Geographics*. 2009; 8:71; doi:10.1186/1476-072X-8-71.

46. Silva IA, Nyland JF, Gorman A, et al. Mercury exposure, malaria, and serum antinuclear/antinucleolar antibodies in amazon populations in Brazil: a cross-sectional study. *Environmental Health: A Global Access Science Source*. 2004; 3:11; doi:10.1186/1476-069X-3-11 .
47. Alves MFA, et al. Fish consumption, Mercury exposure and serum antinuclear antibody in Amazonians. *International Journal os Environmental Health Research*. 2006; 16:255-62.
48. Pelletier L, Castedo M, Bellon B and Druet P. Mercury and Autoimmunity. In: Dean JH, Luster MI, Munson AE and Kimber I (eds). *Immunotoxicology and immunopharmacology*. New York: Raven Press Ltd, 1994, pp. 539-52.
49. Azevedo FA. *Toxicologia do mercúrio*. São Carlos: RiMa, 2003.
50. Kempuraj D, Asadi S, Zhang B, et al. Mercury induces inflammatory mediator release from human mast cells. *Journal of Neuroinflammation*. 2010; 7:20; <http://www.jneuroinflammation.com/content/7/1/20>
51. Havarinasab S, Hultman P. Organic mercury compounds and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*. 2005 jan; 4:270-275.
52. Schiraldi M, Monestier M. How can a chemical element elicit complex immunopathology? Lessons from mercury-induced autoimmunity. *Trends in Immunology*. 2009 ago; 30:502-509.
53. Gardner RM, et al. Mercury induces an unopposed inflammatory response in human peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *Environmental Health Perspectives*. 2009 dez; 117:1932-1938.
54. Ziembra SE, McCabe MJ Jr, Rosenspire AJ. Inorganic mercury dissociates preassembled Fas/CD95 receptor oligomers in T lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 Ago; 206:334-342.
55. Whitekus MJ, Santini RP, Rosenspire AJ, McCabe MJ Jr. Protection against CD95-mediated apoptosis by inorganic mercury in Jurkat T cells. *J Immunol*. 1999; 162:7162-7170.

56. Ballestar E. An introduction to epigenetics. *Adv Exp Med Biol.* 2011; 711:1-11.
57. Rakyan VK, Down TA, Balding DJ, Beck S. Epigenome-wide association studies for common human diseases. *Nat Rev Genet.* 2011 jul; 12:529-541.
58. Meda F, Folci M, Baccarelli A, Selmi C. The epigenetics of autoimmunity. *Cell Mol Immunol.* 2011 mai; 8:226-236.
59. Callaghan B, Feldman D, Gruis K, Feldman E. The association of exposure to lead, mercury, and selenium and the development of amyotrophic lateral sclerosis and the epigenetic implications. *Neurodegener Dis.* 2011; 8:1-8.

ARTIGO 2: AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE MERCÚRIO NO CABELO DE PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO EM UM AMBULATÓRIO DO SUS NA CIDADE DE MANAUS

1. INTRODUÇÃO

Desde a tragédia ocorrida em Minamata, há mais de 40 anos, o mundo despertou para os efeitos tóxicos do mercúrio. Vários relatos de casos decorrentes de intoxicação por este elemento vêm sendo descritos e diversas vias de contaminação sendo reconhecidas, desde então (ar, água, alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos, vacinas, etc).¹⁻⁹ O mercúrio tem distribuição ubíqua no meio ambiente e sua concentração vêm crescendo progressivamente devido às emissões antrópicas aos ecossistemas por meio das indústrias de mineração, produtos alimentares, pesticidas, amálgamas dentários, lâmpadas fluorescentes, etc.^{10,11} No ambiente, encontra-se sob três estados de oxidação: Hg^0 (metálico), Hg^+ (mercuroso) e Hg^{++} (mercúrico), este último formando uma variedade de compostos inorgânicos e orgânicos. A cinética e a biotransformação do mercúrio depende da sua forma física e química. A exposição humana se dá principalmente pela inalação de vapor de mercúrio (Hg^0) que ocorre por exposição ocupacional (consultórios odontológicos, fábricas cloroálcali, garimpo) ou através da ingestão de organomercuriais (MeHg), principalmente pelo consumo de peixes. O mercúrio emitido tanto de modo natural quanto antrópico, está sob a forma inorgânica, predominantemente elementar (Hg^0). Na atmosfera, este sofre oxidação para as formas mercúrica e mercurosa precipitando-se sobre a crosta terrestre. Nos corpos aquáticos, os íons inorgânicos são organificados, ganhando a cadeia alimentar e chegando ao homem através do consumo de peixe.^{12,13,14} Os compostos orgânicos do mercúrio são quase totalmente absorvidos no trato gastrointestinal. A partir daí, ganham a corrente sanguínea e distribuem-se rapidamente por todos os tecidos do corpo, atravessando com facilidade as barreiras hemato-encefálica e placentária.

Por muito tempo, os estudos sobre os efeitos do mercúrio na saúde humana foram direcionados para os seus efeitos neurotóxicos e nefrotóxicos diretos.^{15,16} Entretanto, nos últimos 30 anos, os seus efeitos sobre o sistema imunológico têm sido cada vez mais estudados, e ganharam uma nova dimensão com as primeiras publicações dos modelos experimentais de autoimunidade induzida por mercúrio (AIHg). Ainda na década de 70, Druet e colaboradores observaram, pela primeira

vez, que o mercúrio era capaz de induzir, em ratos Brown Norway (BN), a produção de autoanticorpos (anti-DNAs, antifosfolípido e antimembrana basal glomerular), ativação policlonal de linfócitos T e B, aumento dos níveis séricos de imunoglobulinas M, G, A e E, além da formação de imunocomplexos e indução de glomerulonefrite. Estas alterações foram, também, encontradas por outros pesquisadores, que as observaram mesmo utilizando doses consideradas subtóxicas (HgCl_2 1,0 mg/Kg de peso corpóreo) em seus experimentos. Em camundongos, o mercúrio, também induz proliferação policlonal de linfócitos T e B, aumento dos níveis séricos de IgG1 e IgE, produção de autoanticorpos e glomerulonefrite decorrente da deposição de imunocomplexos mesmo em doses baixas. O desenvolvimento destas alterações imunológicas está ligado à presença de haplótipos específicos do MHC classe II (RT^{I} em ratos Brown-Norway e H2^{S} em camundongos SJL e A.SW), ocorrendo, inclusive resistência ao desenvolvimento da doença em cepas portadoras de outros haplótipos (RT^{I} em ratos e H2^{a} , H2^{b} e H2^{d} em camundongos).¹⁷⁻²⁰ Além disso, outros estudos vêm demonstrando que a exposição ao mercúrio pode exacerbar doença autoimune pré-existente, antecipar o início da doença em animais predispostos ou mesmo aumentar a predisposição de certos modelos murinos ao desenvolvimento de artrite.^{21,22}

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é o protótipo da doença autoimune sistêmica. Pollard e colaboradores, mostraram que a exposição prévia ao mercúrio, mesmo em baixas doses, acelera o início das manifestações clínicas da doença em camundongos *lupus prone*.²³ Em um outro estudo, Gardner e colaboradores, utilizando PBMCs humanas, observaram que baixas concentrações de mercúrio inorgânico, na presença de LPS, modulavam a produção de citocinas, favorecendo a liberação de $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL1}\beta$ (citocinas pró-inflamatórias) e inibindo a secreção de IL10 e IL1Ra (citocinas anti-inflamatórias).²⁴ Em humanos, têm sido descrito aumento da sua prevalência em regiões onde a contaminação ambiental por mercúrio e pristano excedem os limites estabelecidos pela OMS²⁵ e entre indivíduos expostos ocupacionalmente (misturando agrotóxicos contendo mercúrio ou como funcionários da área odontológica).²⁶ A correlação entre amálgamas dentários e LES, assim como a melhora clínica da doença após a retirada destes, têm sido relatadas; contudo, há controvérsias sobre este assunto.^{27,28}

Na Amazônia, ao longo de pouco mais de duas décadas de pesquisa, o nível de mercúrio no ambiente (solo, sedimento, água e espécies aquáticas) tem se

mostrado elevado em várias áreas estudadas.^{29,30} Inicialmente, estes valores foram atribuídos aos garimpos ali estabelecidos.³¹ Contudo, mesmo em áreas distantes de atividades deste tipo, verificou-se que estes níveis também eram elevados, o que foi posteriormente atribuído ao deflorestamento e lixiviação do mercúrio contido no solo para os corpos aquáticos.^{32,33} Os estudos em populações ribeirinhas vêm demonstrando níveis bem acima dos referidos como seguros pela OMS, estando em torno de $20 \mu\text{g g}^{-1}$ nas publicações sobre as populações da bacia do Rio Negro, Rio Madeira, Rio Xingu, Rio Tapajós e da região dos lagos no estado do Amapá.³⁴⁻⁴⁰ A exposição ao mercúrio, especificamente ao metilmercúrio, está estreitamente relacionada ao hábito alimentar. Vários trabalhos têm demonstrado correlação estreita entre níveis de mercúrio e o hábito de comer peixe, sendo a frequência e a quantidade consumida diretamente relacionada à quantidade de mercúrio encontrado.^{41,42,43}

Alguns trabalhos têm descrito maior prevalência de FAN nestas pessoas, porém, não uma maior prevalência de doenças autoimunes, ou mesmo, outros efeitos tóxicos relacionados ao mercúrio nestas populações^{44,45}. De fato, o real impacto destes achados ainda é cheio de lacunas e objeto de investigação. Até o momento, não há na literatura trabalhos correlacionando os níveis de mercúrio em pacientes com LES estabelecido na região amazônica. Este estudo teve como objetivo, avaliar os níveis de mercúrio no cabelo de pacientes com LES procedentes do estado do Amazonas, Brasil.

2. METODOLOGIA

Foi realizado um estudo observacional transversal no período de janeiro de 2008 a janeiro de 2010 envolvendo os pacientes atendidos no Ambulatório de Doenças do Tecido Conjuntivo da Disciplina de Reumatologia da Universidade Federal do Amazonas (HUGV/UFAM). A amostragem foi por conveniência, sendo convidados a participar do estudo, todos os pacientes com diagnóstico de LES recente, o que foi definido como tempo de doença até a inclusão no estudo de no máximo 12 meses.

2.1. PACIENTES

A seleção dos pacientes obedeceu aos seguintes critérios de inclusão: presença de pelo menos quatro dos 11 critérios de classificação do *American*

College of Rheumatology (ACR) e tempo de residência de pelo menos 24 meses no estado do Amazonas. Foram excluídos os indivíduos expostos a produtos químicos para coloração capilar há menos de cinco meses no momento do recrutamento e pacientes com diagnóstico de outras doenças autoimunes. Foi, ainda, selecionado um grupo controle formado por indivíduos hígidos pareados por sexo e idade. Da mesma forma que os pacientes selecionados, este grupo controle deveria residir no Amazonas há pelo menos 24 meses e não ter sido exposto à química capilar nos últimos cinco meses.

Cada paciente foi submetido a um questionário contendo perguntas sobre dados clínicos da doença. As informações sobre FAN, EAS e proteinúria de 24h, foram obtidos por revisão de prontuário. Todos os participantes foram questionados sobre o consumo de peixe, a frequência desta ingestão (diária, semanal, mensal ou rara) e as espécies ingeridas, classificadas como piscívoras ou não-piscívoras. Para avaliar a atividade da doença foi utilizado o sistema de pontuação SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*).

Foram coletadas amostras de sangue (10 mL) de cada indivíduo para realização de hemograma, C3, C4, anticardiolipina, anti-Ro, anti-La, anti-RNP, anti-Sm e anti-DNAs nos pacientes. No grupo controle foi realizado apenas o FAN.

2.2. DETERMINAÇÃO DO MERCÚRIO TOTAL

Para a quantificação dos níveis de mercúrio nos sujeitos do estudo, foram utilizados os cinco centímetros proximais do cabelo da região occipital, bem próximo ao escalpo, sendo retirados com uma tesoura de aço inox, limpa com etanol (P.A.) antes de cada coleta. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e levadas ao Laboratório de Biogeoquímica Ambiental da Universidade Federal de Rondônia (UNIR) para processamento e análise. As matrizes foram preparadas e analisadas de acordo com Bastos.⁴⁶ Inicialmente foram dispostas em recipientes limpos de poliestireno, lavadas em solução de EDTA 0,01% e água Milli-Q. Após a secagem em estufa a 50° C, cada espécime foi individualmente fracionado com tesoura de aço inoxidável, pesado para aproximadamente 0,02 g em um tubo de digestão, sendo adicionados 4 mL de solução concentrada de HNO₃:HSO₄ (1:1), permanecendo em bloco digestor a 60° C por 30 minutos. A determinação de Hg total foi feita por espectrometria de absorção

atômica com geração de vapor frio (CV AAS – *FIMS 400 – Flow Injection Mercury System, Perkin Elmer*[®]).

Todos os reagentes utilizados possuíam grau analítico. A limpeza de todo o material foi realizada com banho em extran 2% (v/v) por 24h, enxagüe com água Milli-Q, seguido de banho em HNO₃ 5% por 72 horas e três enxagües com água Milli-Q.

O controle de qualidade analítico foi realizado utilizando-se uma amostra-referência certificada *Human Hair* (IAEA 086)⁴⁷ para ser analisada em batelada juntamente com as amostras de cabelo objeto deste estudo.

2.3. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Na análise dos dados categóricos foi utilizado o teste do qui-quadrado com correção de Yates, sendo que na impossibilidade da aplicação deste utilizou-se o teste de Fisher. Na comparação das médias utilizou-se o teste de t-Student, sendo aplicado o teste de Mann-Whitney para a comparação das medianas^{48,49}. O nível de significância fixado para aplicação dos testes foi de 5%.

3. RESULTADOS

3.1. DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS

Participaram deste estudo 45 pacientes com LES e 54 controles, estatisticamente similares quanto ao gênero ($p = 0,09$) e à idade ($p = 0,98$). 93,3% dos pacientes pertenciam ao sexo feminino, e a média de idade foi de $26,7 \pm 11,9$ anos e do grupo controle foi de $26,8 \pm 7,0$ (Tabela 1). Entre os pacientes, o tempo médio de doença foi de 7,2 meses ($DP \pm 3,9$), com número de critérios do ACR no momento da entrada no estudo de $6,0 \pm 2,0$ e pontuação do SLEDAI de $8,44 \pm 4,65$.

Com relação às manifestações clínicas, o comprometimento mucocutâneo foi o mais freqüente, correspondendo a 40 pacientes (88,9%), seguido por artrite em 38 (84,4%) e por alterações hematológicas evidenciadas em 27 pacientes (60,0%). Dentre os autoanticorpos pesquisados nos pacientes, o mais prevalente foi o anti-

DNAs presente em 35 (77,8%), seguido por anticardiolipina em 12 (73,3%), anti-Sm em sete (16,7%) e anti-RNP também em sete (16,7%).

3.2. ANÁLISE DOS NÍVEIS DE MERCÚRIO

Os níveis de mercúrio total nas amostras de cabelo variaram de 0,10 a 5,00 $\mu\text{g g}^{-1}$ no grupo dos pacientes, com uma mediana de 1,20 $\mu\text{g g}^{-1}$. No grupo controle, estes valores ficaram entre 0,01 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 3,86 $\mu\text{g g}^{-1}$ com mediana de 1,14 $\mu\text{g g}^{-1}$, não havendo diferença estatística entre os dois grupos ($p = 0,607$). Quando avaliadas as manifestações clínicas da doença, não foi encontrada associação entre estas e a concentração de mercúrio, conforme demonstrado na Figura 1. A quantidade de mercúrio nos pacientes com anti-Sm positivo em relação aos que não apresentavam este anticorpo foi menor ($p = 0,027$). Não houve, no entanto, diferença quando os outros autoanticorpos foram analisados (Figura 2). Entre os controles, apenas seis (11,1%) apresentaram FAN positivo não sendo encontrada associação com os níveis de mercúrio nestes indivíduos ($p = 0,445$).

A variedade de manifestações clínicas (expressa pelo número de critérios ACR no momento da inclusão do estudo), se correlacionou com a concentração de mercúrio nos pacientes. Nos indivíduos com sete ou mais critérios, o nível de mercúrio foi maior (1,26 $\mu\text{g g}^{-1}$) do que nos que apresentavam até seis critérios de classificação (0,97 $\mu\text{g g}^{-1}$) ($p = 0,02$). A atividade da doença, entretanto, aferida pelo SLEDAI, não mostrou correlação com o mercúrio nos pacientes estudados ($r = 0,21$ com $p > 0,05$).

Quanto ao consumo de peixe, apenas 14 (12,6%) de todos os participantes faziam pelo menos quatro refeições com peixe por semana. 48 (43,2%) consumiam este item semanalmente e 18 (16,2%) mensalmente. Entre os pacientes, o consumo diário foi maior que no grupo controle, não gerando, contudo, diferença significativa na concentração de mercúrio em relação ao grupo controle. Houve, no entanto, níveis menores de mercúrio nos indivíduos que comem peixe raramente ($p=0,048$).

4. DISCUSSÃO

Desde a descrição do *horror autotoxicus* pelo bacteriologista e imunologista alemão Paul Erlich, os fenômenos autoimunes intrigam a sociedade científica.⁵⁰ Como um emaranhado tão complexo de autoreconhecimento e tolerância poderia ser enganado e quebrado de forma definitiva? Dentre as nuances clínicas da

autoimunidade, o LES representa de forma plena a doença autoimune sistêmica e a busca pela resposta a esta pergunta, por meio das pesquisas genéticas gerou o conhecimento de que a susceptibilidade ao LES, envolve a combinação de vários genes relacionados tanto ao braço inato quanto ao adaptativo da imunidade.⁵¹ Contudo, a influência genética é incompleta, e a ação do ambiente na gênese da doença têm ganhado cada vez mais importância.⁵²⁻⁵⁵

Considerando a população de pacientes analisada neste estudo, o gênero predominante foi o feminino (97,0%), com a média da faixa etária de $26,7 \pm 11,9$ anos, sendo que 64,4% (29) dos indivíduos encontravam-se entre 15 e 35 anos. Isto é compatível com estudos epidemiológicos sobre a doença, nos Estados Unidos⁵⁶ e no Brasil⁵⁷, nos quais mais de 90% das populações estudadas são mulheres com idade entre 20 e 30 anos, o que difere de alguns estudos realizados na Europa onde o início da doença ocorre mais freqüentemente após os 40 anos^{58,59}.

Entre os pacientes, o tempo médio de doença foi de $7,2 \pm 3,9$ meses. A opção de estudar LES recente objetivou aumentar a chance de encontrar correlação entre os níveis de mercúrio e a presença da doença, não restringindo tanto, o número de indivíduos participantes que contemplassem pelo menos quatro dos critérios estabelecidos pelo ACR.

O tempo de residência no Amazonas (mínimo de dois anos) teve a intenção de excluir ao máximo a influência ambiental de outras áreas amazônicas, em especial regiões onde se pratica ilegalmente a extração de ouro (municípios as margens dos rios Madeira-RO, Tapajós-PA, Xingu-PA e seus afluentes), nas quais a alta concentração de mercúrio em populações ali instaladas é decorrente da exposição ocupacional e do consumo de peixe contaminado por mercúrio proveniente das atividades de garimpo. O estado do Amazonas alberga uma porção da Amazônia onde a extração ilegal de ouro é inexpressiva. Apesar deste fato, os níveis de mercúrio em amostras ambientais e de populações ali residentes, chegam a se igualar ao de áreas onde existe exposição ocupacional (Figura 2).³⁶

Neste estudo, a concentração de mercúrio no cabelo foi baixa em ambos os grupos: $1,20 \mu\text{g g}^{-1}$ e $1,14 \mu\text{g g}^{-1}$ em pacientes e controles respectivamente ($p = 0,61$), não havendo diferença estatística entre eles. Quando foram analisados os subgrupos, os pacientes que apresentaram acima de seis critérios no momento da inclusão no estudo, apresentaram mercúrio maior ($p=0,03$). Não houve, no entanto, associação deste com a atividade da doença (SLEDAI) ou com manifestações

consideradas graves como nefrite ou sinais e sintomas neurológicos. Outras variáveis como os autoanticorpos pesquisados e as demais manifestações clínicas da doença, também não demonstraram associação com o mercúrio. Divergindo dos estudos que encontraram associação entre a concentração de mercúrio e a presença de FAN em indivíduos hígidos, isto não foi evidenciado neste trabalho ($p = 0,395$).

Os níveis encontrados por nós estão bem abaixo dos evidenciados em populações ribeirinhas estudadas na região amazônica, os quais ultrapassam $10 \mu\text{g g}^{-1}$ em grande parte dos trabalhos publicados. Contudo, nossos valores se aproximam dos encontrados em populações hipoexpostas no mundo, no Brasil e mesmo no ambiente amazônico (Tabela 4). Estes achados refletem, provavelmente, o baixo consumo de peixe na amostra populacional estudada que mesmo quando foi procedente de outros municípios, veio de suas áreas urbanas, onde os hábitos alimentares diferem das comunidades rurais. Alves e colaboradores realizaram um estudo sobre a prevalência de FAN e concentração de mercúrio no cabelo de populações ribeirinhas da bacia do médio rio Negro e encontrou uma concentração média de mercúrio de $35,4 \mu\text{g g}^{-1}$ entre eles, enquanto os controles procedentes da área urbana de Manaus, apresentaram um nível médio de $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$. Foi observada, inclusive, uma tendência de haver níveis menores de mercúrio no cabelo dos moradores das comunidades estudadas, a medida que estas se aproximavam de centros urbano, nos quais a variedade alimentar e o consumo de outras fontes de proteína é maior.⁴⁵ Hacon e colaboradores avaliaram a concentração de mercúrio em mulheres grávidas no município de Alta Floresta (bacia do rio Amazonas) e, apesar da área ser considerada como contaminada, com altas concentrações de mercúrio nos peixes locais (devido à atividade de garimpo), a concentração média de mercúrio entre os indivíduos estudados foi de $1,23 \mu\text{g g}^{-1}$ devido ao baixo consumo de peixe (média de 56g/semana).⁶⁰ Com exceção da exposição ocupacional e do mercúrio liberado pelo amálgama nas obturações dentárias, a principal via de exposição ao mercúrio é o consumo de peixe contaminado. Desde o desastre ambiental em Minamata, estudos no Japão, Estados Unidos, Canadá e dentro do Brasil em São Paulo, Pará, Porto Velho, Amapá e Amazonas vêm demonstrando uma íntima associação entre altos níveis de mercúrio no cabelo e a frequência do consumo de peixe contaminado por este elemento. Somado a isto, a procedência do peixe utilizado na dieta (supermercados ou feiras da área urbana),

provavelmente interferiu na quantidade de mercúrio presente nos espécimes, pois muitos provém de piscicultura, não refletindo os níveis de mercúrio encontrados em peixes procedentes do ambiente amazônico selvagem.

A associação de exposições ambientais ao desenvolvimento do LES não é uma tarefa fácil, pois somado ao fato do lúpus ser uma doença relativamente rara, este é extremamente heterogêneo em seus fenótipos, genótipos e provavelmente patogênese. Assim, as interações genético-ambientais podem ter importâncias diferentes nas diversas subpopulações de doentes. Somado a isto, o período de latência da doença é longo, havendo registro de autoanticorpos precedendo os primeiros sinais e sintomas em até nove anos.⁶¹

Silva e colaboradores, avaliaram os níveis de mercúrio em três comunidades na bacia do rio Amazonas, que mantinham contato direto ou indireto com a atividade de garimpo. A prevalência de FAN foi maior nos indivíduos com níveis de mercúrio mais altos. No entanto, estas comunidades também apresentavam alta prevalência de malária, o que pode ter agido como fator confundidor. Alves e colaboradores encontraram resultados diferentes. Apesar da área estudada (bacia do médio Rio Negro) apresentar indivíduos consumidores frequentes de peixe, com níveis elevados de mercúrio no cabelo (média de $35,4 \mu\text{g g}^{-1}$), não houve associação entre este achado e a positividade do FAN, não diferindo da prevalência de FAN na população urbana utilizada como controle. Nosso estudo, também não mostrou associação entre a concentração de mercúrio e a positividade do FAN entre os controles, bem como entre os títulos do FAN e os níveis deste elemento nos pacientes.

Dentre a população estudada, apenas um indivíduo apresentou concentração de mercúrio alta ($23,08 \mu\text{g g}^{-1}$), bem discrepante dos demais participantes. Este era do sexo feminino, 16 anos, procedente de Parintins, família de baixa renda e apresentou um LES com FAN em título alto (1:5120), anti-DNAs positivo e comprometimento neurológico grave (convulsão). Consumia peixe semanalmente, principalmente piranha (peixe que por ser piscívoro tem maior potencial de concentrar mercúrio). Apesar de não ser possível inferir tendo como base dados de apenas uma paciente, as características clínicas e laboratoriais desta, despertam a necessidade de se estudar esta questão mais a fundo, pois os títulos de autoanticorpos, a positividade para anti-DNAs e manifestações graves, são relacionadas ao mercúrio em estudos experimentais.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo partiu da pesquisa de mercúrio em pessoas já com LES instalado, o que difere da maioria dos trabalhos publicados, os quais têm como ponto de partida, indivíduos hígidos submetidos a algum tipo de exposição. Apesar de não termos encontrado associação entre lúpus e mercúrio, isto não exclui a possibilidade deste metal influenciar o aparecimento, a gravidade ou os surtos de recaída da doença em indivíduos expostos. O Amazonas comporta uma área geográfica que corresponde a mais de 18% do território brasileiro, com uma população de 3.483.985 milhões da qual 28,6% está distribuída na zona rural, em grande parte às margens dos rios, sem energia elétrica, sem água encanada e até mesmo, em muitas ocasiões, sem registro. Esta população é, justamente a população mais exposta ao mercúrio nesta área da Amazônia. Ao mesmo tempo, é uma população que não tem acesso aos serviços de saúde presentes apenas nas áreas urbanas, não chegando a contabilizar com os casos de lúpus diagnosticados nos serviços de referência do estado. Desta forma, faz-se necessário mais estudos não somente enfocando a concentração de mercúrio no ambiente ou nas comunidades amazônicas, mas também sobre o real impacto clínico destes achados para que, então, possa-se estabelecer quais medidas de saúde pública devem ser tomadas, se é que realmente necessárias.

Tabela 1. Características demográficas dos pacientes com LES e controles procedentes do estado do Amazonas.

Grupos				
Variáveis	LES	Controles	total	p
Gênero				0,090
Masculino	3 (6,7%)	-	3	
Feminino	42 (93,3%)	54 (100%)	96	
Idade				0,989
média ± DP	26,7 ± 11,9	26,8 ± 7,0		
Procedência				0,004
Manaus	35 (77,8%)	53 (98,1%)	88	
Outros municípios	10 (22,2%)	1 (1,9%)	11	
Renda per capita				<0,001
mediana	266,67	1000		
Q1 / Q3	142/500	417/1.500		
Consumo de peixe				0,010
Diariamente	10	4	14	
Semanalmente	25	24	49	
Mensalmente	3	15	18	
Raramente	3	7	10	

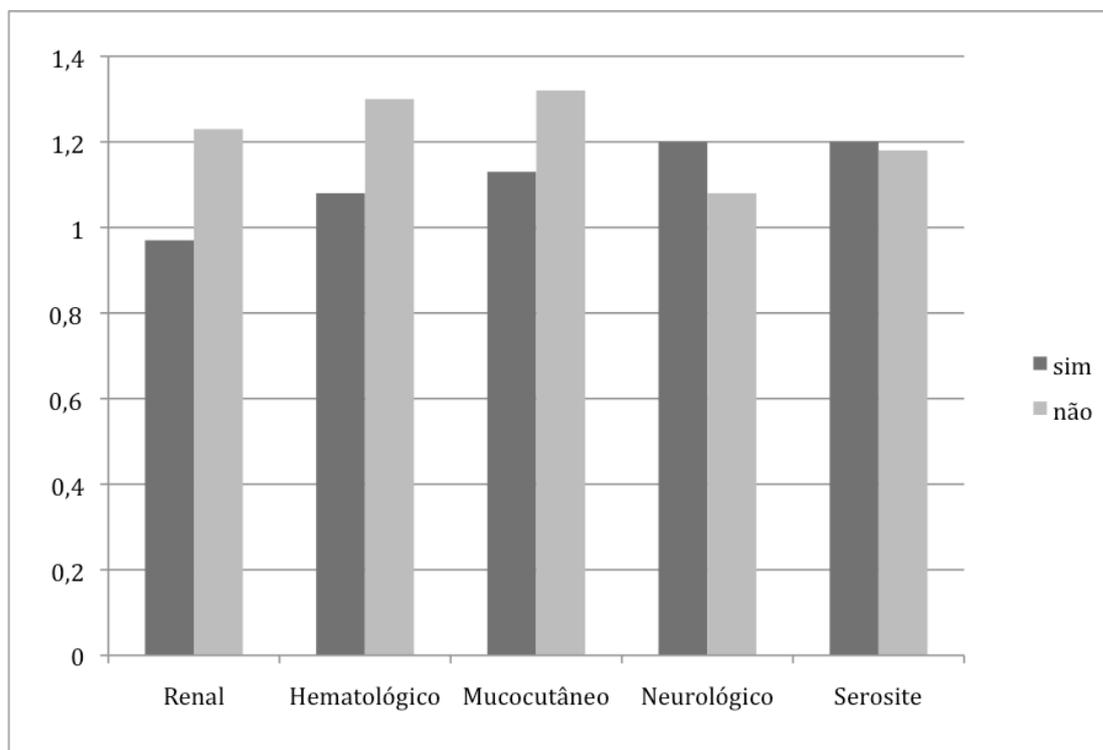


Figura 1. Distribuição segundo a mediana do mercúrio em relação ao comprometimento clínico em pacientes com Lúpus Erimatoso Sistêmico procedentes do estado do Amazonas.

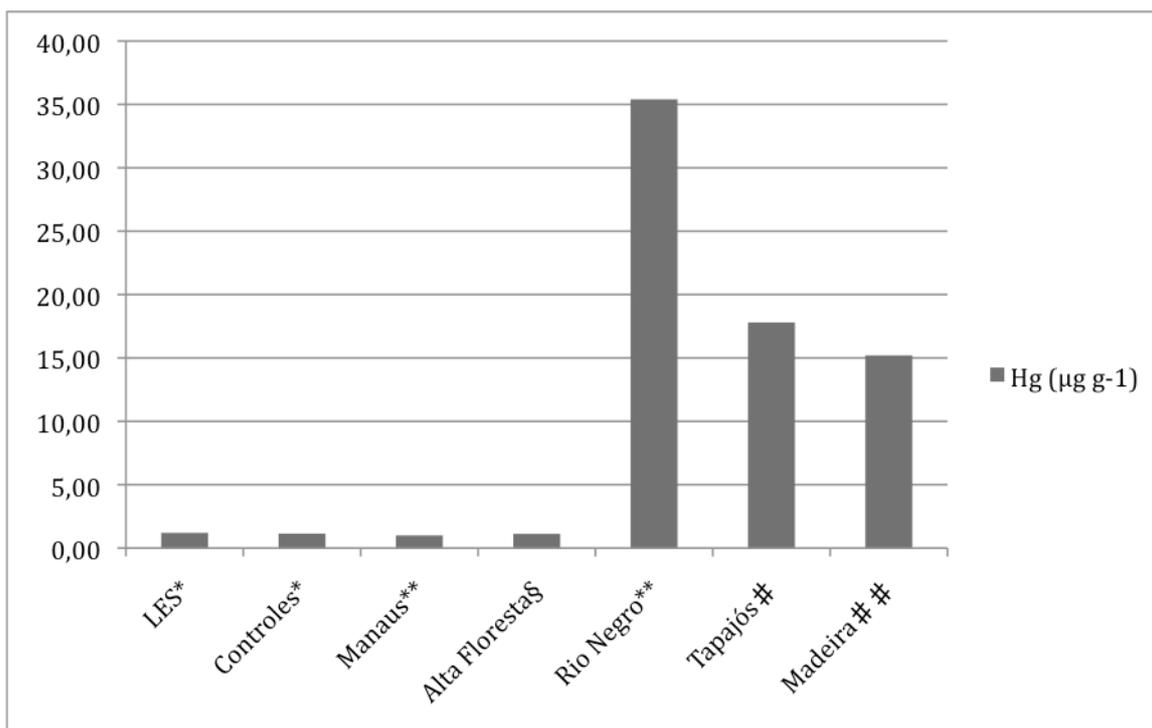


Figura 2. Níveis de mercúrio na população de estudo comparados com outros estudos.

* Estudo atual

** ref 45

§ ref 60

ref 36

ref 36

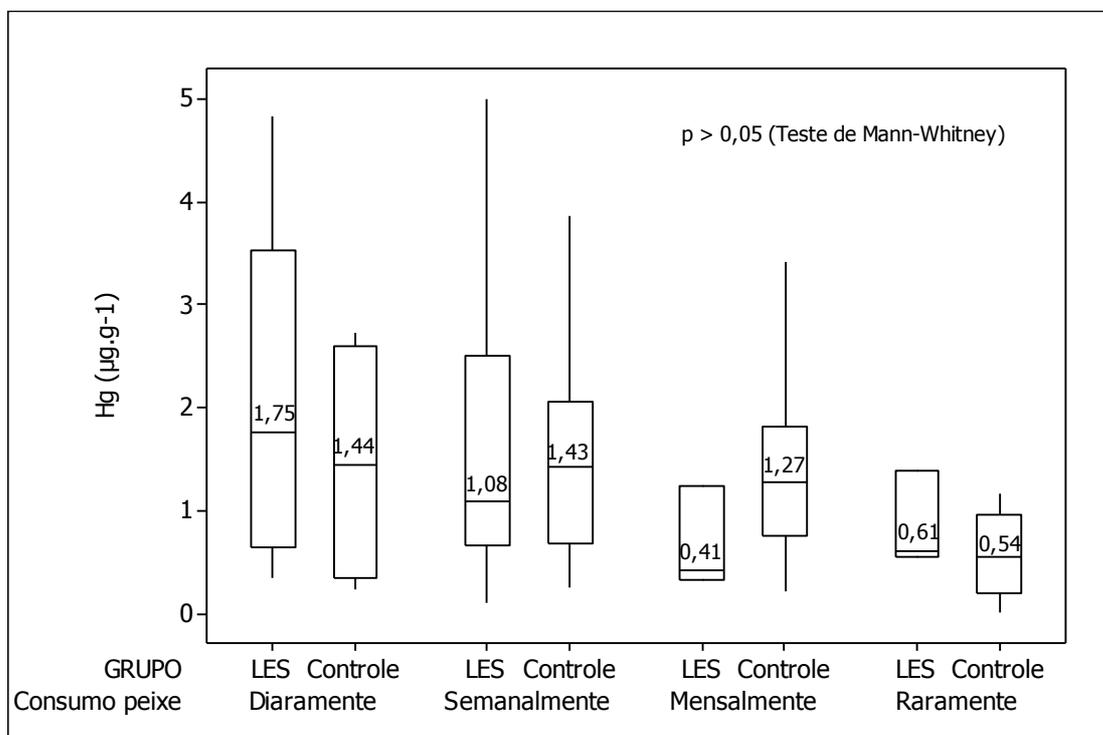


Figura 3. Distribuição segundo a mediana do mercúrio em relação ao consumo de peixe em pacientes com Lúpus Erimatoso Sistêmico e controles procedentes do estado do Amazonas.

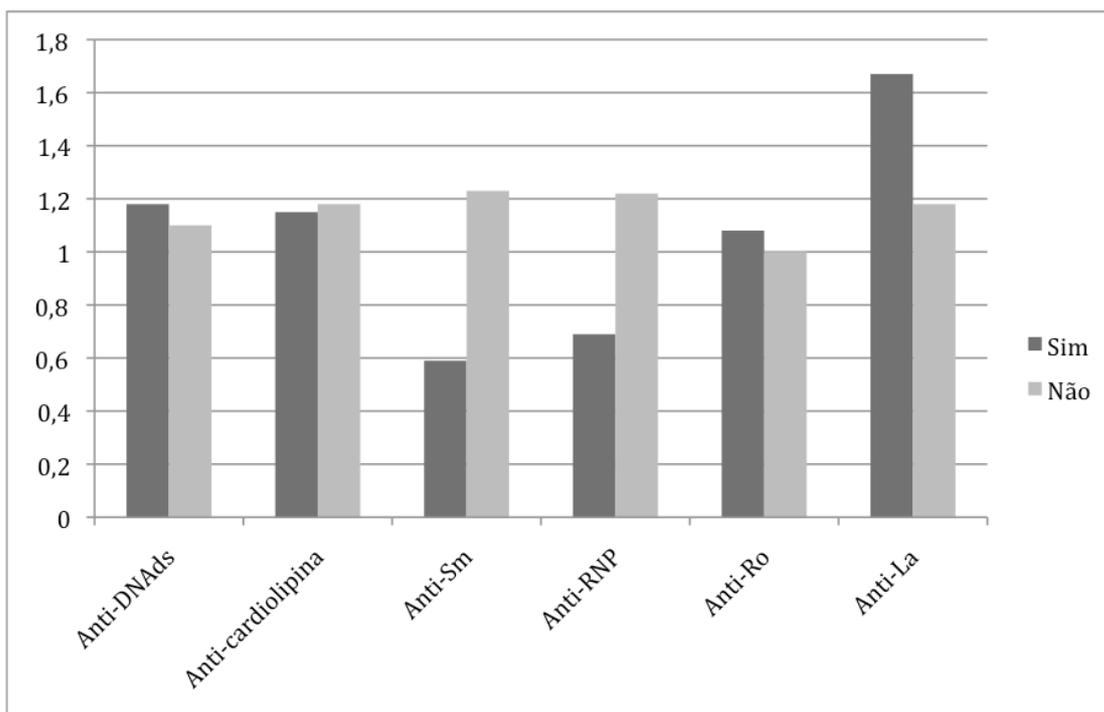


Figura 4. Distribuição segundo a mediana do mercúrio em relação às manifestações sorológicas em pacientes com Lúpus Erimatoso Sistêmico procedentes do estado do Amazonas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Saito H. Congenital Minamata disease: a description of two cases in Niigata. *Seychelles Med Dent J*. 2004 Nov;7(Special No).
2. Azevedo FA. *Toxicologia do mercúrio*. São Paulo: Rima; 2003.
3. Etzel RA. Mercury exposure and children's health. Foreword. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2010 Sep;40:185.
4. Jalili MA and Abbasi AH. Poisoning by ethylmercury toluene sulphonanilide. *Br J Ind Med*. 1961 Jul;18:303-8.
5. Haq IUL. Agrosan Poisoning in Man. *Br Med J*. 1963 Jun:1579-82.
6. Ordóñez JV, Carrillo JA, Miranda M and Gale JL. Epidemiologic study of a disease believed to be encephalitis in the region of the highlands of Guatemala. *Bol Of Sanit Panam*. 1966 Jun;60:510-9.
7. Bakir F, Damluji SF, Amin-Zaki L, et al. Methylmercury poisoning in Iraq. *Science*. 1973 Jul 20;181:230-41.
8. Clarkson TW, Magos L and Myers GJ. The toxicology of mercury: current exposures and clinical manifestations. *N Engl J Med*. 2003 Oct;349:1731-7.
9. Bose-O'Reilly S, McCarty KM, Steckling N and Lettmeier B. Mercury exposure and children's health. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2010 Sep;40:186-215.
10. Pelletier L, Castedo M, Bellon B and Druet P. Mercury and Autoimmunity. In: Dean JH, Luster MI, Munson AE and Kimber I (eds). *Immunotoxicology and immunopharmacology*. New York: Raven Press Ltd, 1994, pp. 539-52.
11. Committee on the Toxicological Effects of Methylmercury, Board on Environmental Studies and Toxicology, National Research Council. *Toxicological Effects of Methylmercury*. Washington DC: National Academy Press, 2000.
12. Harris RC, Rudd JWM, Amyot M, et al. Whole-ecosystem study shows rapid fish-mercury response to changes in mercury deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Oct;104:16586-91.
13. Wasserman JC, Hacon S and Wasserman MA. Biogeochemistry of mercury in the Amazonian environment. *Ambio*. 2003;32:336-42.
14. Ciesielski T, Pastukhov MV, Szefer P and Jenssen BM. Bioaccumulation of mercury in the pelagic food chain of the lake Baikal. *Chemosphere*. 2010 Mar;78:1378-84.

15. Yokoo EM, Valente JG, Grattan L, Schmidt SL, Platt I and Silbergeld EK. Low level methylmercury exposure affects neuropsychological function in adults. *Environ Health Global Access Sci Source*. 2003 Jun;2:8.
16. Eddins D, Petro A, Pollard N, Freedman JH and Levin ED. Mercury-induced cognitive impairment in metallothionein-1/2 null mice. *Neurotoxicol Teratol*. 2008 Jun;30:88-95.
17. Hultman P, Bell LJ, Enestrom S and Pollard KM. Murine susceptibility to mercury: I. Autoantibody profiles and systemic immune deposits in inbred, congenic, and intra-H-2 recombinant strains. *Clin Immunol Immunopathol*. 1992 Nov;65:98-109.
18. Hultman P, Bell LJ, Enestrom S and Pollard KM. Murine susceptibility to mercury: II. Autoantibody profiles and renal immune deposits in hybrid, backcross, and H2d congenic mice. *Clin Immunol Immunopathol*. 1993 Jul;68:9-20.
19. Mathieson PW, Stapleton KJ, Oliveira DB and Lockwood CM. Immunoregulation of mercuric chloride-induced autoimmunity in Brown Norway rats: a role for CD8+ T cells revealed by in vivo depletion studies. *Eur J Immunol*. 1991 Sep;21:2105-9.
20. Mathieson PW. Mercuric chloride-induced autoimmunity. *Autoimmunity*. 1992;13:243-7.
21. Via CS, Nguyen P, Niculescu F, Papadimitriou J, Hoover D and Silbergeld EK. Low-dose exposure to inorganic mercury accelerates disease and mortality in Acquired Murine Lupus. *Environ Health Perspect*. 2003 Apr;111:1273-7.
22. Inman RD and Chiu B. Heavy metal exposure reverses genetic resistance to Chlamydia-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2009 Feb [cited 2011 Aug 14];11. Available from: <http://arthritis-research.com/content/11/1/R19>.
23. Pollard KM, Pearson DL, Hultman P, Deane TN, Lindh U and Kono DH. Xenobiotic acceleration of idiopathic systemic autoimmunity in lupus-prone BXSB mice. *Environ Health Perspect*. 2001 Jan;109:27-33.
24. Gardner RM, Nyland JF, Evans SL, et al. Mercury induces an unopposed inflammatory response in human peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *Environ Health Perspect*. 2009 Dec;117:1932-8.
25. Dahlgren J, Takhar H, Anderson-Mahoney P, Kotlerman J, Tarr J and Warshaw R. Cluster of systemic lupus erythematosus (SLE) associated with an oil field waste site: a cross sectional study. *Environ Health*. 2007 Feb;6:8.
26. Cooper GS, Parks CG, Treadwell EL, St Clair EW, Gilkeson GS and Dooley MA. Occupational risk factors for the development of systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2004 Oct;31:1928-33.
27. Prochazkova J, Sterzl I, Kucerova H, Bartova J and Stejskal VD. The beneficial effect of amalgam replacement on health in patients with autoimmunity. *Neuroendocrinol Lett*. 2004 Jun;25:211-8.

28. Aminzadeh KK and Mahyar E. Dental amalgam and multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J Publ Health Dent*. 2007;67:64-6.
29. Oliveira LC de, Serudo RL, Botero WG, et al. Distribuição de mercúrio em diferentes solos da bacia do médio Rio Negro-AM: influência da matéria orgânica no ciclo biogeoquímico do mercúrio. *Quim Nova*. 2007;30:274-80.
30. Gonçalves A, Gonçalves NN da S e. Exposição humana ao mercúrio na Amazônia brasileira: uma perspectiva histórica. *Rev Panam Salud Publica*. 2004;16:415-9.
31. Malm O. Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon. *Environ Res*. 1998 May;77:73-8.
32. Lacerda LD, Souza M de, Ribeiro MG. The effects of land use change on mercury distribution in soils of Alta Floresta, Southern Amazon. *Environ Pollut*. 2004 May;129:247-55.
33. Wasserman JC, Hacon SS, Wasserman MA. O ciclo do mercúrio no ambiente amazônico. *Mundo & Vida*. 2001; 2:46-53.
34. Pinheiro M da CN, Guimarães G de A, Nakanishi J, et al. Avaliação da contaminação mercurial mediante análise do teor de Hg total em amostras de cabelo em comunidades ribeirinhas do Tapajós, Pará, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000 Mar-Abr;33:181-4.
35. Santos EC, Jesus IM, Brabo ES, et al. Mercury exposures in riverside Amazon communities in Pará, Brazil. *Environ Res*. 2000 Oct; 84:100-7.
36. Airey D. Mercury in human hair due to environment and diet: a review. *Environ Health Perspect*. 1983;52:303-16.
37. Vasconcellos MBA, Bode P, Paletti MGM, et al. Determination of mercury and selenium in hair samples of Brazilian Indian populations living in the Amazonic region by NAA. *J Radioanal Nucl Chem*. 2000 Apr;244:81-5.
38. Forsberg BR, Forsberg MCS, Padovani CR, Sargentini E and Malm O. High levels of mercury in fish and human hair from the Rio Negro Basin (Brazilian Amazon): natural background or anthropogenic contamination? In: International workshop on environmental mercury pollution and its health effects in Amazon River basin; 1994 Nov 30 – Dec 02; Rio de Janeiro, Brazil. Minamata City: National Institute for Minamata Disease; 1995. p. 174.
39. Barbieri FL and Gardon J. Hair mercury levels in Amazonian populations: spatial distribution and trends. *Int J Health Geogr*. 2009 Dec;8:71.
40. Fillion M, Mergler D, Passos CJS, Larribe F, Lemire M and Guimarães JRD. A preliminary study of mercury exposure and blood pressure in the Brazilian Amazon. *Environ Health Global Access Sci Source*. 2006 Oct;5:29.

41. Passos CJS, Mergler D, Fillion M, et al. Epidemiologic confirmation that fruit consumption influences mercury exposure in riparian communities in the Brazilian Amazon. *Environ Res.* 2007 Mar;105:183-93.
42. Malm O, Guimarães JRD, Castro MB, et al. Follow-up of mercury levels in fish, human hair and urine in the Madeira and Tapajós basins, Amazon, Brazil. *Water, Air, Soil Pollut.* 1997 Jun;97:45-51.
43. Barbosa AC, Garcia AM, Souza JR. Mercury contamination in hair of riverine populations of Apiacás Reserve in the Brazilian Amazon. *Water, Air, Soil Pollut.* 1997 Jun;97:1-8.
44. Silva IA, Nyland JF, Gorman A, et al. Mercury exposure, malaria, and serum antinuclear/antinucleolar antibodies in Amazon populations in Brazil: a cross-sectional study. *Environ Health Global Access Sci Source.* 2004 Nov [cited 2011 Mar 07];3:11. Available from: <http://www.ehjournal.net/content/3/1/11>.
45. Alves MFA, Fraiji NA, Barbosa AC, et al. Fish consumption, mercury exposure and serum antinuclear antibody in Amazonians. *Int J Environ Health Res.* 2006 Aug;16:255-62.
46. Bastos WR. *Métodos de digestão utilizando microondas para a determinação automatizada de Hg em amostras ambientais e humanas: Implantação de laboratórios e avaliação da qualidade analítica* [dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho; 1997.
47. Bleise AR, Heller-Zeisler SF and Parr RM. *Reference sheet – Reference material – IAEA-086 – methylmercury, total mercury and other trace elements in human hair*. Viena: International Atomic Energy Agency; 2000.
48. Arango HG. *Bioestatística teórica e computacional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
49. Vieira S. *Bioestatística: tópicos avançados*. 2ªed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.
50. Turk JL. Paul Ehrlich: the dawn of immunology. *J R Soc Med.* 1994 Jun;87:314-5.
51. Crow MK. Developments in the clinical understanding of lupus. *Arthritis Res Ther.* 2009 Oct;11:245.
52. Strickland FM and Richardson BC. Epigenetics in human autoimmunity: epigenetics in autoimmunity – DNA methylation in systemic lupus erythematosus and beyond. *Autoimmunity.* 2008 May;41:278.
53. Cooper GS, Gilbert KM, Greidinger EL, et al. Recent advances and opportunities in research on Lupus: environmental influences and mechanisms of disease. *Environmental Health Perspectives.* 2008;116:695-702.

54. Newkirk MM, Venrooij WJV and Marshall GS. Autoimmune response to U1 small nuclear ribonucleoprotein (U1 snRNP) associated with cytomegalovirus infection. *Arthritis Res.* 2001;3:253-8.
55. Toussirot E and Roudier J. Epstein-Barr virus in autoimmune diseases. *Best Pract Res, Clin Rheumatol.* 2008;22:883-96.
56. Bae SC, Fraser P and Liang MH. The epidemiology of systemic lupus erythematosus in populations of african ancestry: a critical review of the "prevalence gradient hypothesis". *Arthritis Rheum.* 1998 Dec;41:2091-9.
57. Vilar MJP and Sato EI. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus J.* 2002;11:528-32.
58. Stahl-Hallengren C, Jonsen A, Nived O and Sturfelt G. Incidence studies of systemic lupus erythematosus in southern sweden: increasing age, decreasing frequency of renal manifestations and good prognosis. *J Rheumatol.* 2000 Mar;27:685-91.
59. Somers EC, Thomas SL, Smeeth L, Schoonen WM and Hall AJ. Incidence of systemic lupus erythematosus in the United Kingdom. *Arthritis Rheum.* 2007 May;57:612-8.
60. Hacon S, Yokoo E, Valente J, et al. Exposure to mercury in pregnant women from Alta Floresta – Amazon basin, Brazil. *Environ Res.* 2000;84:204-10.
61. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med.* 2003 Oct;349:1526-33.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Questionário de coleta de dados

“AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE MERCÚRIO NO CABELO DE PACIENTES PORTADORES DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO EM UM AMBULATÓRIO DO SUS NA CIDADE DE MANAUS.”

1. IDENTIFICAÇÃO:

Nome: _____

Idade: _____ Data de nascimento: _____ Data atual: _____

Tempo de doença: _____ Tempo de diagnóstico: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

2. ESCOLARIDADE:

() Alfabetizado

() Ensino Fundamental

() Ensino Médio

() Ensino Profissionalizante

() Ensino Superior

() Analfabeto

3. RENDA FAMILIAR:

- Quantos moram na mesma casa? _____

- Quantos trabalham? _____

- Qual a renda familiar em reais? _____

- Renda familiar percapita: _____

4. HISTÓRIA FAMILIAR:

() Doenças autoimunes : _____

() IAM _____

() AVC: _____

5. O LES:

5.1. CRITÉRIOS ACR:

() Rash malar

() Artrite

() Renal

() Sorológico

- () úlcera oral () Rash discóide () neurológico () Serosite
 () Fotossensibilidade () Hematológico () FAN

5.2. PELE:

- () lesão aguda : _____
 () lesão subaguda: _____
 () lesão crônica: _____
 () vasculite : _____
 () Bx : _____

5.3. HEMATOLÓGICO:

- () Leucopenia () linfopenia () AHAI () plaquetopenia

5.4. SOROLÓGICO:

- () AntiSm () AntiRNP () AntiRo () AntiLa () AntiDNA
 () Anticardiolipina () VDRL () Antifibrilarina () outro _____

5.5. NEUROLÓGICO:

- () Convulsão () cefaléia () psicose
 () polineuropatia () mononeurite () mononeurite múltip
 () AVC () mielite transversa () outros: _____

5.6. RENAL:

- () nefrite () HAS () U / Crea aument
 () leucocitúria () hematúria () Outro: _____
 Bx () SIM () NÃO CLASSE: _____

5.7. SEROSITE:

- () Pleural () pericárdica () peritoneal

5.8. OUTRAS MANIFESTAÇÕES: _____

5.9. SLEDAI:

- () convulsão-8 () psicose-8 () Sínd org cerebral-8 () AVC-8
 () cilindrúria-4 () artrite-4 () distúrbio visual-8 () piúria-4

- | | | | |
|--|---|---|---------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> cefaléia-8 | <input type="checkbox"/> miosite-4 | <input type="checkbox"/> alt nervo craniano-8 | <input type="checkbox"/> leucopenia-1 |
| <input type="checkbox"/> vasculite-8 | <input type="checkbox"/> alopecia-2 | <input type="checkbox"/> trombocitopenia-1 | <input type="checkbox"/> hematúria-4 |
| <input type="checkbox"/> pericardite-2 | <input type="checkbox"/> antiDNA-2 | <input type="checkbox"/> queda complem-2 | <input type="checkbox"/> pleurisia-2 |
| <input type="checkbox"/> proteinúria-4 | <input type="checkbox"/> rash cutâneo-2 | <input type="checkbox"/> úlcera mucosa-2 | <input type="checkbox"/> febre-1 |

6.0. COMORBIDADES: SIM NÃO

QUAIS: _____

7.0. MEDICAÇÕES EM USO:

Prednisona HCQN MTX AZA CF

outros: _____

8.0. Acompanhamento médico regular? SIM NÃO

9.0. EXAME FÍSICO:

10.0. G () P () A () ACO () Está grávida ()

11.0. Come peixe? SIM NÃO

Qual? _____

Freqüência: diário semanal mensal raro

ASSINATURA DO ENTREVISTADOR

APÊNDICE B – Termo de consentimento livre e esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO**

Investigadores: Juliana de Andrade Rebouças Sampaio, Domingos Sávio Nunes de Lima e Luiz Fernando de Souza Passos

Instituição: Universidade Federal do Amazonas, Telefone: 0-xx-92-36216500

Título: Avaliação dos níveis de mercúrio no cabelo de pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico atendidos em ambulatório do SUS em Manaus.

Você esta sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contem todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo.

Esse estudo será realizado para avaliar os níveis de Mercúrio nos cabelos em pacientes com diagnóstico recente de Lúpus Eritematoso Sistêmico em atendimento no Ambulatório Araújo Lima, Universidade Federal do Amazonas e em pessoas normais. Com este estudo buscamos observar se os níveis altos de mercúrio podem favorecer o aparecimento do lúpus.

Ao participar do estudo permitirá que seja retirado (cortados alguns fios com 3 cm de comprimento) de cabelo e 10ml de sangue venoso, e será questionado sobre identificação, sintomas do lúpus e hábitos de vida.

O desconforto associado ao estudo será no momento da coleta do sangue, mas o procedimento não causa qualquer prejuízo à saúde do participante; na coleta será usado material descartável.

O participante não obterá qualquer benefício pessoal, mas estará contribuindo para o conhecimento médico sobre possíveis efeitos do mercúrio na saúde humana.

A participação é confidencial, e os registros e resultados serão avaliados na Universidade Federal do Amazonas, bem como por autoridades normativas nacionais. O voluntário terá direito a fazer qualquer pergunta referente a sua participação e será notificado sobre qualquer nova informação relacionada a este estudo e poderá contatar os responsáveis pelo trabalho no telefone 0-(x) 92-81237212 e 0-(xx) 92-36216500.

A participação é voluntária e caso deseje retirar-se do estudo, não haverá qualquer perda de benefícios a que tenha direito. (por exemplo, informações do trabalho, exames clínicos e laboratoriais).

E por estar devidamente informado e esclarecido sobre o conteúdo deste termo, livremente, eu, _____ expresse meu consentimento para minha inclusão como participante neste estudo, recebendo uma cópia deste documento.

Participante esclarecido (CI _____)

Dr. Domingos Sávio Nunes de Lima CRM/AM 2023 (médico responsável)

Impressão Digital

ANEXOS

ANEXO 1 – Lista dos reagentes e soluções utilizadas

I. REAGENTES

HNO_3 65% P.A. Merck[®] (Ácido nítrico)

HCl 37% P.A. Merck[®] (Ácido clorídrico)

H_2SO_4 96% P.A. Merck[®] (Ácido sulfúrico)

KMnO_4 P.A. Merck[®] (Permanganato de potássio)

H_2O_2 30% P.A. Merck[®] (Peróxido de hidrogênio)

$\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ P.A. Merck[®] (Cloridrato de hidroxilamina)

NaBH_4 P.A. Merck[®] (Borohidreto de sódio)

$(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ P.A. Merck[®] (Oxalato de amônia)

NaOH P.A. Merck[®] (Hidróxido de sódio)

$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ P.A. Merck[®] (ácido etilenodiamotetracético – EDTA)

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ P.A. Merck[®] (Dicromato de potássio)

$\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ Merck[®] (Solução padrão de mercúrio – 1000 mg.L^{-1})

II. SOLUÇÕES

1. Solução de KMnO_4 5%

Pesar 50g de KMnO_4 em um béquer, adicionar 800 mL de água ultra-pura e homogeneizar em agitador magnético. Pesar 2,75g de $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ e acrescentar à solução de KMnO_4 , para purificar a solução da contaminação por Hg. Deixar agitando durante uma noite, em frasco escuro para proteção contra luminosidade. No dia seguinte, deixar em repouso por aproximadamente 2 horas, filtrar em filtro de fibra de vidro (GF/A Whatman) e aferir o volume a 1000 mL com água ultra-pura. Armazenar a solução em frasco escuro a temperatura ambiente.

2. Solução de $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ 12%

Adicionar 120g de $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ a 800 mL de água ultra-pura e homogeneizar em agitador magnético até total solubilização. Depejar conteúdo em balão volumétrico de 1000 mL e completar a este volume com água ultra-pura.

3. Solução de $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HNO}_3$ (1:1)

Em banho de gelo, adicionar 500 mL de H_2SO_4 96% em 500 mL de HNO_3 65%. Aguardar o resfriamento total da solução para, então, realizar armazenagem em frasco de vidro.

4. Solução de HCl 3%

Adicionar 81 mL de HCl 37% a 800 mL de água ultra-pura em balão volumétrico de 1000 mL e completar para este volume com a mesma água.

5. Solução de NaBH₄ 0,2%

Adicionar 0,5g de NaOH em 800 mL de água ultra-pura e agitar até a solubilização total. Em seguida, acrescentar 2g de NaBH₄ e agitar, novamente, até homogeneização. Completar com água ultra-pura até 1000 mL em balão volumétrico.

6. Solução de EDTA 0,01%

Pesar 100 mg do sal sódico de EDTA e despejar em balão volumétrico de 1000 mL, completando-se com água ultra-pura até este volume final. Agitar até alcançar solubilização total.

ANEXO 2 – Critérios de classificação para Lúpus Eritematoso Sistêmico – Colégio Americano de Reumatologia (ACR)

CRITÉRIO	DESCRIÇÃO
1. Erupção malar	Eritema fixo, plano e elevado sobre as eminências malares, que tendem a respeitar as pregas naso labiais.
2. Erupção discóide	Placas eritematosas elevadas com cicatrização queratótica e clavos foliculares com cicatrização atrófica nas lesões velhas.
3. Fotossensibilidade	Exantema cutâneo como resultado de uma reação não usual a luz solar, por relato do paciente e observação do medico.
4. Úlcera mucosa	Ulceração oral ou nasofaríngea, usualmente sem dores, observadas por um medico.
5. Serosite	a) Pleurite, história convincente de dor pleural ou atrito auscultado por medico ou evidência de derrame pleural b) Pericardite documentada por ECG ou atrito ou evidência de derrame pericárdico
6. Artrite	De tipo não erosiva comprometendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizada por dor à pressão, tumefação ou derrame.
7. Renal	a) Proteinúria superior a 500mg/24h ou superior a 3+ se não for efetuada a quantificação. b) Cilindros celulares
8. Hematológico	a) Anemia hemolítica b) leucopenia < 4.000 por mm ³ em duas ou mais ocasiões c) Linfopenia < 1.500 por mm ³ em duas ou mais ocasiões d) Trombocitopenia < 100.000 por mm ³ em ausência de drogas agressoras
9. Neurológico	a) Convulsões b) Psicose
10. Sorológico	a) Células LE positivas b) Anti-DNAs, Anti-Sm ou Anticardiolipina positivos c) VDRL falso positivo
11. FAN	Títulos anormais na ausência de drogas que provoquem síndrome lúpus-símile

ANEXO 3 – Índice de atividade de doença do Lúpus Eritematoso Sistêmico – SLEDAI

Assinalar a pontuação se o evento estiver presente na altura da avaliação ou nos 10 dias prévios

Pontuação	Definição
8	Convulsões
8	Psicose
8	Síndrome cerebral orgânica
8	Distúrbios visuais
8	Distúrbios dos nervos cranianos
8	Cefaleia lúpica
8	AVC
8	Vasculite
4	Artrite
4	Miosite
4	Cilindros urinários
4	Hematuria
4	Proteinúria
4	Piúria
2	Rash malar
2	Alopécia
2	Mucosas
2	Pleurisia
2	Pericardite
2	Hipocomplementémia
2	Anti-dsDNA elevado
1	Febre
1	Trombocitopenia
1	Leucopenia

Pontuação total: (0-105)