

Luís Rafael Rebelo e Silva

Utilização do modelo experimental de
leveduras *Saccharomyces Cerevisiae*
para estudos de metais pesados em
doenças neurodegenerativas



Dissertação apresentada no Instituto Superior de
Ciências da Saúde – Norte, para obtenção do grau de Mestre

Sob orientação da Professora Doutora
Maria José Carneiro de Sousa Pinto da Costa

Resumo

A medicina legal é hoje em dia uma ciência de grande complexidade que cresce e evolui em comunhão com o progresso científico de variadíssimas áreas do conhecimento. A toxicologia, por sua vez, é parte integrante da medicina legal. Na actualidade não é possível pensar na medicina legal, sem englobar as várias vertentes de estudo dos tóxicos, na sua manifestação de confronto com a Justiça em muitas situações. É uma ciência de características essencialmente analíticas fundamental para o esclarecimento de questões jurídicas relacionadas com intoxicações, isto é, estuda os aspectos médico-legais, procurando esclarecer a causa da morte em casos de intoxicação e envenenamento. As substâncias tóxicas têm vindo a ser usadas desde sempre. Com a evolução do conhecimento e da Ciência, muitos foram os meios utilizados para o estudo da toxicologia.

A medicina do trabalho tem como principal objectivo a prevenção da saúde dos trabalhadores. Contudo, este ramo da medicina devidamente legislado pelo código do trabalho confere as competências da química médico-legal e da possível avaliação do dano. As doenças profissionais encontram-se contempladas na tabela nacional de incapacidades. Dos três metais contemplados na TNI relativa a doenças profissionais, esta dissertação debruçou-se no estudo de dois deles, o mercúrio e o chumbo, cujos efeitos tóxicos são amplamente reconhecidos. São inúmeros os trabalhos que relacionam os metais pesados com as doenças neurodegenerativas, principalmente Alzheimer e Parkinson.

O objectivo desta dissertação foi fazer o estudo de possíveis alterações dos depósitos da proteína α -sinucleína a nível do tráfego intracelular, causadas pelo contacto com um agente nocivo.

Para isso, utilizou-se a levedura *Saccharomyces Cerevisiae* como modelo de estudo para a doença de Parkinson e Alzheimer, através da inoculação com os metais pesados, chumbo e mercúrio, juntamente com técnicas de microscopia electrónica de transmissão. Assim, obtiveram-se como resultados a deposição de *dots/clusters* junto à membrana plasmática. Estes

dots/clusters representam a desorganização da α -sinucleína, devido à inoculação das leveduras *Saccharomyces Cerevisiae* com mercúrio.

O facto de a α -sinucleína ser o principal componente estrutural dos corpos de Lewy, cuja presença acompanhada de perda de neurónios dopaminérgicos representa a característica patológica de uma doença neurodegenerativa e, a evidencia da desorganização e/ou marcação mais evidenciada desta proteína neste modelo de estudo utilizado, aquando da inoculação com o metal pesado contemplado na TNI que se sabe que tem uma acção em processos bioquímicos que se acredita estarem envolvidos na doença de Alzheimer vem corroborar o já descrito na bibliografia da possível relação entre o mercúrio e as doenças neurodegenerativas.

Abstract

Legal Medicine is now a science of great complexity that grows and evolves in communion with a variety of different scientific fields of knowledge. Toxicology, in turn, is part of forensic medicine. At present you cannot think of forensic medicine without encompass the various aspects of study of toxic substances in their expressions of confrontation with the courts in many situations. It is essentially a science of analytical features essential to the clarification of legal issues related to intoxication, that is, studying the medical-legal aspects, seeking to clarify the cause of death in cases of intoxication and poisoning. The toxic substances have been used ever since. With the evolution of knowledge and science, many were the means used for the study of toxicology.

The occupational medicine has as main objective the prevention of health workers. However, this branch of medicine duly legislated by the Labour Code, the powers conferred doctor of chemistry - and legal assessment of the possible damage. Occupational diseases are covered in the national table of disabilities. Of the three metals covered by the TNI on occupational diseases, this dissertation examined in the study of two of them, mercury and lead, whose toxic effects are widely recognized. There are numerous studies linking heavy metals in neurodegenerative diseases, particularly Alzheimer's and Parkinson's.

The goal of this thesis was to study possible changes in deposits of the protein α -synuclein at the level of intracellular traffic, caused by contact with a harmful agent.

To do this, we used the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model for Parkinson's disease and Alzheimer's disease by inoculation with heavy metals, lead and mercury, together with techniques of transmission electronic microscopy. Thus was obtained as a result of the deposition dots / clusters near the plasma membrane. These dots / clusters represent the disruption of α -synuclein due to inoculation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* with mercury.

The fact that α -synuclein is the main structural component of Lewy bodies, whose presence accompanied by loss of dopaminergic neurons is the pathological characteristic of a neurodegenerative disease, and the evidence of clutter and / or more evident marking of this protein in this model study used during the inoculation of the heavy metal contemplated in TNI known to have an action in biochemical processes which are believed to be involved in Alzheimer's disease corroborates the already described in the literature for a possible relationship between mercury and neurodegenerative diseases.

Capítulo I

Introdução

Introdução

A actividade probatória, na área das ciências forenses, assume importância cada vez mais relevante no âmbito científico e jurídico. Isto deve-se principalmente à crescente exigência, por parte das variadas instâncias que interferem no sistema de justiça, ao nível do rigor e da segurança da prova científica que é produzida para servir a justiça nos mais variados casos. Todavia, os conflitos gerados pelo aumento do número de casos de violência, voluntária ou involuntária, que por sua vez geram conflitos que evoluem com grande frequência para a resolução judicial, também são um factor de enorme importância.

1. Enquadramento Médico-Legal e Forense [1]

1.1. Origens da Medicina Legal

É possível admitir que a medicina legal teve origem quando o Homem, vivendo em sociedade, achou necessário aplicar a Justiça que a concepção comunitária lhe impunha. Deste modo, é admissível que o crime seja tão antigo como o próprio Ser Humano, e a imagem bíblica, ao aludir ao fratricídio de Caim sobre Abel, primogénitos de Adão e Eva, apresenta-nos essa precocidade. Os litígios nas sociedades primitivas eram muito simples e resolvidos pelo consenso local, progressivamente as sociedades foram criando as suas próprias organizações que se alicerçavam, por vezes, na magia e na superstição. A certa altura, começou a exigir-se a prova como fase processual do julgamento de incriminados.

Na antiguidade Oriental, cerca de 3000 a.C., Imotep é apontado como o primeiro perito médico-legal. Nesta época, os médicos eram indicados pelo Estado, existindo já as especialidades. Os erros médicos eram severamente punidos, chegando os culpados a ser lançados ao Nilo para serem devorados por crocodilos.

Na Babilónia, 1700 a.C., o Código de Hamurabi e o Código dos Hititas, 1400 a.C., são exemplos muito precoces da relação médico-legal. Entre as inovações jurídico-administrativas destaca-se a criação de corpos de representantes com elementos da plebe (povo) e a submissão do poder da magistratura à soberania popular, sendo que até essa ocasião a magistratura era controlada pela aristocrática classe dos patrícios. Com a nova organização do poder, a réplica romana era governada por magistrados, eleitos por um ano, pelo senado e pelas assembleias populares ou comícios.

Pelo tipo de organização sócio-política referida anteriormente, compreende-se que cerca de cinco séculos antes de Cristo, havia enorme dificuldade na administração da justiça, em Roma. A luta de classes, que levou à queda do sistema republicano, desenvolveu-se largamente motivada pela arbitrariedade dos juízes. Os cidadãos não eram todos iguais perante a lei, o que acarretava grandes discrepâncias exprimidas em benevolência excessiva para uns e severidade excessiva para outros.

Na Grécia antiga houve grande interesse pela medicina. Hipócrates (460-377 A.C.) entre os seus dados sobre medicina refere informações isoladas sobre anatomia e fisiologia. Galeno (131-210 a.C.) fez experiências em animais e dissecou os seus cadáveres. O grande erro de Galeno foi ter transferido para o Homem, sem adaptação, todos os dados sobre as estruturas dos animais.

Durante a Idade Média o progresso científico não foi muito expansivo. A proibição da dissecação cadavérica impediu um maior desenvolvimento da medicina. Contudo, e apesar de todas as dificuldades, alguns sábios deram uma importante contribuição para a medicina, devendo evidenciar Avicena

(980-1037) em cuja obra “Cânion da Medicina” se englobam conjuntamente os conhecimentos médicos desta data e, dados sobre anatomia e fisiologia.

No século XIII, na China, apareceu um valioso documento médico-legal: “Hsi Yuan Lu”, no qual se classificavam as lesões de acordo com o instrumento que as concebia e a sua gravidade em função da região do organismo em que se localizavam.

Em 1507, sob os vaticínios do Bispo de Bamberg e do barão João de Schrvartzenberg, a Alemanha passou a dispor de um código penal bastante completo. Em 1537, o Imperador Carlos V promulgou o Código Carolino, que estabelecia que o perito médico devia ajudar os juízes em casos de homicídios e vários tipos de lesões.

A fisiologia e a anatomia surgem no Renascimento como disciplinas científicas. A anatomia, como ciência independente, inicia-se no século XVI, com André van Wesele, conhecido por André Vesálio (1514-1564), que realizou grande número de dissecções humanas. Durante dois séculos, a obra de Mondino (1270-1326), que realizou a primeira abertura de um cadáver, descrevendo a posição e a forma dos órgãos internos (“Anatomia”), constituiria o texto básico dos estudos anatómicos, tendo sido inúmeras vezes copiado na íntegra ou em resumos até que foi substituída pela: “Humani Corporis Fabrica” (1543) de Vesálio.

A anatomia, sob o ponto de vista renascentista do século XVI, tem o seu expoente máximo em Itália, assinalando-se a colaboração de célebres artistas como Leonardo da Vinci e Miguel Angelo. Entre os anatomistas destacam-se Eustáquio, Ingrassia, falópio, Fabricio d’Acquapendente, Varólio. Da Vinci, na prática, pouco contribuiu para a evolução da anatomia. Contudo, se é um facto que do ponto de vista da forma corporal haveria de vir a ser superado por Vesálio, do ponto de vista científico, Leonardo da Vinci, tem lugar ímpar na história... atentando a alguns dos seus pensamentos: “Não há investigação humana que possa ser chamada de verdadeira ciência se não for submetida a demonstrações matemáticas; se afirmares que são verdadeiras as ciências que se iniciam e terminam na mente, contestar-te-ei por muitas razões: em primeiro

lugar, porque em tais especulações mentais não ocorre a experiência, sem a qual nada é certo”; “Quem discute baseando-se na autoridade, não usa o engenho, mas a memória”; “a Sabedoria é filha da experiência”.

No século XVII, o conhecimento de causa fica limitado ao âmbito da filosofia pura, enquanto paralelamente a ciência passa a ser dominada sobretudo no saber como a realidade se manifesta, isto é, o séc. XVII (e o séc. XVIII) está muito mais voltado para o empirismo do que para a metafísica. Em termos mais amplos da apreciação do mundo, Galileu Galilei destacara já a impossibilidade de a ciência explicar o porquê das coisas, restringindo-se apenas à descrição dos fenómenos. Poder-se-á considerar que o homem científico do séc. XVII é um homem confundido perante as múltiplas concepções do Renascimento. Na área da medicina, essa confusão manifestar-se pela apresentação de teorias novas, tentando reduzir todos os fenómenos à dependência de uma estrutura, a qual, manifestando-se de modos diferentes nos vários órgãos, seria encarada como fundamento para explicar individualmente e em conjunto o fenómeno vital. O séc. XVII procurou substituir o sentido anímico da vida por estruturas orgânicas. Esta propensão encontra-se em Mapighi que pretendeu reduzir todo o fenómeno vital ao conceito primitivo de glândula.

No séc. XVIII a supremacia médico-legal passou para a Alemanha.

Um dos aspectos mais importantes da interferência médico-legal diz respeito aos envenenamentos. As substâncias tóxicas têm sido usadas para ataque ou defesa do Homem desde sempre. Pesquisas arqueológicas demonstraram conhecimentos de venenos pelos homens primitivos que pintavam as pontas das suas armas com eles para mais facilmente matarem as suas vítimas ou inimigos. Entre os mais antigos escritos de Toxicologia encontram-se os velhos papiros do Egipto. O papiro de Ebers, datado de 1552 a.C., é talvez o mais conhecido. É uma colectânea de muitas invocações e práticas de artes mágicas para expulsar as doenças e menciona muitos remédios específicos.

No princípio do séc. XVII, o sul de Itália, estava assolado de perigosos envenenadores que prosperaram durante anos, tendo-se Nápoles tornado o centro de tão nocivo ofício. Conheciam-se o arsénio, ouro-pimento, antimónio, mercúrio, ouro, cobre e chumbo bem como algumas das suas propriedades. Os envenenamentos continuaram em muitas partes do mundo durante os sécs. XVIII e XIX e actualmente ainda não se está livre de tal prática pois a natureza capital do homem não mudou com os tempos. Antes do séc. XIX não podiam ser realizadas autópsias nem análises químicas dos órgãos das vítimas para detectar venenos no organismo. Foi então que surgiram rápidos avanços nos domínios da química, fisiologia, patologia e clínica médica. Também a partir desta época a consciencialização de Estado para o perigo que as populações corriam, não só por parte de criminosos mas também de acidentes industriais, foi reconhecida na generalidade. O conhecimento das ciências atrás descritas permitiu a detecção dos agentes tóxicos o que permitiu o diagnóstico dos agentes causais aquando da suspeita de envenenamento. Da química surgiram os métodos para a análise e detecção dos agentes tóxicos nos tecidos e órgãos. Os conhecimentos da patologia, acerca das mudanças no organismo originadas pela acção dos agentes tóxicos, e a clínica uniram os sintomas dos doentes aos tecidos agredidos. É da competência da clínica médico-legal fornecer os dados mais importantes para a protecção do público e os apropriados procedimentos para a protecção dos trabalhadores na indústria.

1.2. Ciências Forenses e suas principais valências

Como já foi referido anteriormente, a actividade probatória, na área das ciências forenses, assume importância cada vez mais relevante no âmbito científico e jurídico devido, principalmente, à crescente exigência de rigor e segurança por parte das instâncias que interferem no sistema de justiça.

As Ciências Forenses são talhadas para a análise de vestígios nos mais variados tipos de crime. Esses vestígios vão desde os espécimes biológicos como sangue, cabelo, sêmen, a muitos outros tecidos e materiais que estão

entre os tipos de evidências mais frequentemente encontrados nas cenas do crime, como armas e outros objectos. As Ciências Forenses abrangem um conjunto de áreas tão variadas como a Antropologia, Criminologia, Entomologia, Odontologia, Patologia, Genética, Psicologia ou Toxicologia que em conjunto, actuam de modo a resolver casos de carácter legal. É importante referir que a Ciência Forense não é uma ciência única, está dependente de todas as áreas que sejam necessárias em casos específicos.

É reconhecido que um dos fundadores da Toxicologia moderna foi Mateo J. B. Orfila (1787-1853). Em 1814, publicou o Tratado de Toxicologia, obra de dois volumes que é hoje reconhecido como um clássico e do qual se fizeram várias edições. Era um experimentador e desenvolveu certo número de testes para a identificação de agentes tóxicos. Uma das mais importantes descobertas de Orfila foi a de que a absorção dos venenos ocorre no estômago e que se acumulam nos tecidos. Desenvolveram-se métodos quantitativos para a detecção de substâncias tóxicas, entre os quais se destacam o teste de Marsch para o arsénio (1836) e o teste de Reinsch para o arsénio e o mercúrio (1841).

Com o decorrer do tempo, outros métodos e técnicas específicas e delicadas surgiram para a detecção de crimes como são a identificação pelas impressões digitais, o exame microscópico de artigos suspeitos e os testes serológicos.

2. Tabela Nacional de Incapacidades. Doenças Profissionais. [2]

O conceito de Medicina Legal é relativamente recente, no entanto, já desde a antiguidade se começou a delinear o seu esboço, quando um médico era chamado para esclarecer certas questões relacionadas com a morte de um indivíduo.

A medicina legal é hoje em dia uma ciência de grande complexidade que cresce e evolui em comunhão com o progresso científico de variadíssimas áreas do conhecimento. Não é apenas a medicina dos mortos, mas diz respeito a tudo aquilo que se relaciona com conhecimentos médicos e biológicos, exista ou não acção judicial.

Tal como foi referido anteriormente, até chegar ao nível de desenvolvimento actual das técnicas foi percorrido um longo caminho. A medicina legal é, hoje, a aplicação de conhecimentos biomédicos e de outros conhecimentos científicos às questões de direito.

Segundo o professor Pinto da Costa “A Medicina Legal deve contribuir para uma administração da justiça mais humana, mais exacta, de forma a obter o equilíbrio dos homens em sociedade distanciada dos princípios medievais (...) Ela não pretende invadir outras esferas, não lhe compete fazer leis, mas, como ponte que é entre a medicina e o direito, cabe-lhe a análise científica das questões para proporcionar um equilíbrio desejável entre ambos, com mira na dignidade do Homem como ser superior”.

Pode dizer-se que a Medicina Legal usufrui de diversas áreas do saber utilizando inúmeros tipos de amostras para cumprir o seu objectivo: pêlos, cabelos, fibras, entre muitas outras para além de toda a amostragem de material biológico.

A toxicologia, por sua vez, é parte integrante da medicina legal. Na actualidade não é possível pensar na medicina legal, sem englobar as várias vertentes de estudo dos tóxicos, na sua manifestação de confronto com a Justiça em muitas situações. A Toxicologia Forense é uma ciência de características essencialmente analíticas fundamental para o esclarecimento de questões jurídicas relacionadas com intoxicações, isto é, estuda os

aspectos médico-legais, procurando esclarecer a causa da morte em casos de intoxicação e envenenamento.

2.1. Medicina do Trabalho

A medicina do trabalho é um ramo da medicina que advém de um passado longínquo, uma vez que já Hipócrates (460-377a.C.) advertia a população para os efeitos nocivos que a exposição aos vapores de chumbo tinha sobre a saúde dos mineiros e dos operários que o manipulavam. Vários autores da antiguidade, como Plínio (23-79 d.C.), que refere que os trabalhadores das refinarias usavam bexigas de animais para tapar a cara, com o objectivo de evitar a inalação do pó do metal, ou Galeno (129-201d.C.) referem nas suas obras o perigo a que estão sujeitos os trabalhadores das refinarias. Contudo, só no século XV é que houve progressos significativos no campo da medicina do trabalho. Em 1473 Ellenborg reconheceu a perigosidade dos vapores de certos metais e descreveu os sintomas da intoxicação industrial por chumbo, sugerindo medidas preventivas, nomeadamente o uso de máscaras e luvas. Ramazzini (1633-1714), que publicou a célebre “*De morbis artificum dictata*”, na qual descreveu através uma série de trabalhos com os subjacentes perigos patogénicos, valoriza o papel patogénico do trabalho, perseverando e recomendando que as medidas para controlar as doenças profissionais deveriam ser preventivas e não terapêuticas.

A medicina do trabalho tem como principal objectivo a prevenção da saúde dos trabalhadores, melhorando as condições da sua actividade, corrigindo as consequências da mesma que lhe são prejudiciais. Sendo que o Código do Trabalho refere as competências da Clínica Médico-Legal e da peritagem no âmbito do Direito do Trabalho.

2.2. Acidentes de Trabalho e Doenças Profissionais

É considerado acidente de trabalho todo o evento traumático, imprevisto, súbito, anormal e que surge no decorrer do trabalho, na sua preparação para o iniciar ou para o terminar, no local de trabalho quer seja habitual ou não e que causa perturbação da integridade corporal do trabalhador. Referem-se ao risco do trabalho propriamente dito.

As causas de risco profissional poderão variar desde a imprudência do operário, a fadiga ou cansaço, os riscos inerentes ao hábito, ou até a falta de aprendizagem ou a falta de exame médico. Os acidentes de trabalho poderão ser classificados quanto às consequências que provocam (morte ou incapacidade temporal parcial ou permanentes); quanto à forma da ocorrência (quedas, choque, exposição a agentes lesivos, entre outros); quanto ao agente material (máquinas, meios de transporte, radiações, ambiente de trabalho, entre outros); quanto à natureza da lesão (fracturas, luxações, entorses, amputações, queimaduras, intoxicações). Considera-se em medicina legal que o dano é o “prejuízo material (perda ou deterioração de um bem, realização de uma despesa...) ou moral (sofrimento físico ou moral, atentado à dignidade, ao respeito da vida privada...) sofrido por uma pessoa, por facto de um terceiro”.

Aquando de um acidente de trabalho é necessário ter em conta o estado anterior do indivíduo, a quem compete a prova, a designada descaracterização do ocorrido e a consequente indemnização.

Por sua vez, doença profissional é a alteração da integridade psicofísica do trabalhador, causada por contacto com um agente nocivo que existe no local, tempo e condições de trabalho. Neste caso é sempre necessário aplicar o nexo de causalidade entre o agente nocivo, o tempo de contacto e a relação da patologia ao contacto com esse agente nocivo. Todavia, é necessário distinguir doença profissional de doença do trabalho, visto que esta é a alteração psicofísica causada pelo exercício do trabalho seja ele de que género for (comum a todos os que trabalham). A título de exemplo podemos considerar o Saturnismo como uma doença profissional, enquanto uma constipação é

considerada uma doença de trabalho. Nas doenças profissionais é necessário ter em atenção os critérios clínicos, os critérios etiológicos e estatísticos, os critérios de presunção e os critérios legais.

2.3. Legislação

Segundo a Lei n.º 98/2009 de 4 de Setembro, artigo 8º, alínea 1, “É acidente de trabalho aquele que se verifique no local e no tempo de trabalho e produza directa ou indirectamente lesão corporal, perturbação funcional ou doença de que resulte redução na capacidade de trabalho ou e ganho ou a morte.”. No artigo 9º é referida a extensão do conceito anterior a acidente que ocorre no trajecto de ida e de regresso para e do local de trabalho; na execução de serviços espontaneamente prestados, mas dos quais resulte proveito para a entidade empregadora; no local de trabalho quando no exercício do direito de reunião ou de actividade representante dos trabalhadores e também fora do local de trabalho, quando verificado na execução de serviços determinados pela entidade empregadora. Considera-se local de trabalho, aquele em que o trabalhador se encontra ou aonde se dirija, desde que sujeito ao controlo do empregador. Também é acidente de trabalho o que ocorre na ida ou regresso do local de trabalho, no exercício de serviços espontâneos que aproveitem ao empregador, no exercício do direito de reunião ou de representação colectiva, em formação profissional, em procura de emprego, ou fora do tempo e local de trabalho, se determinado ou consentido pelo empregador.

Os Artigos 2º, 3º, 4º, 5º e 6º referem quem tem direito à reparação dos danos dos acidentes e doenças profissionais; os trabalhadores e seus familiares, mesmo que em actividade explorada sem fins lucrativos, têm direito à reparação dos danos emergentes dos acidentes de trabalho e das doenças profissionais. Também os trabalhadores estrangeiros, que exerçam actividade em Portugal e seus familiares, têm direito à reparação dos danos emergentes dos acidentes de trabalho e das doenças profissionais. Os trabalhadores

portugueses, ou os estrangeiros residentes em Portugal, que sofram acidentes no estrangeiro ao serviço de empresas portuguesas, têm direito à reparação prevista no presente regime, podendo optar pelo regime de reparação do local do acidente, se pela legislação do Estado respectivo lhes for reconhecido tal direito. Dano é a lesão corporal, perturbação funcional ou doença, resultantes de acidente ou doença profissional, que determina redução da capacidade de trabalho, de ganho, ou de morte. A lesão corporal, perturbação ou doença presume-se consequência do acidente se for reconhecida imediatamente a seguir a ele. Se o não for, o trabalhador terá que provar que foi consequência desse acidente. Se havia por parte do trabalhador uma predisposição para a doença ou acidente, ainda assim terá direito a reparação, salvo se culposamente a tiver ocultado.

O Artigo 14º, contempla a situação do acidente cujo dano não será reparável pelo empregador; esta situação verificar-se-á se o acidente for provocado dolosamente ou com culpa grave e exclusiva do trabalhador, ou resultar da violação das regras de segurança, o dano dele resultante não é indemnizável, pelo que é o trabalhador que sofre as suas consequências. Também o dano não é indemnizável se o acidente resultar da privação permanente ou acidental do uso da razão, salvo se ela derivar da própria prestação do trabalho ou se o empregador a conhecia e permitiu que o trabalhador exercesse a sua actividade. Também o dano não é indemnizável se o acidente resultar da prestação de serviços eventuais ou ocasionais de curta duração a pessoas singulares em actividades sem fim lucrativo. Mas, se forem utilizadas máquinas ou outros equipamentos perigosos, já o acidente dá lugar à reparação. O empregador, mesmo que se trate de acidente não indemnizável, tem de providenciar pelos primeiros socorros e transporte de sinistrados.

Por sua vez, é considerada pela lei como doença profissional aquela que resulta directamente das condições de trabalho e que consta da Lista de Doenças Profissionais (Decreto Regulamentar n.º 76/2007 de 17 de Julho) e causa incapacidade para o exercício da profissão ou morte. Além das que constam do referido decreto, também se consideram doenças profissionais as

que o doente prove serem consequência da actividade exercida e não resultem do normal desgaste do organismo.

A matéria dos acidentes de trabalho tem uma grande relevância em termos de contestação judicial de trabalho, pois ocupa cerca de 50% das questões jus laborais postas em juízo junto dos tribunais de trabalho nacionais. Este facto estará associado com a grande sinistralidade laboral que ocorre em Portugal. Desde a revisão da Constituição da República Portuguesa em 1997, que todos os trabalhadores têm direito a assistência e justa reparação, quando vítimas de acidentes de trabalho ou de doenças profissionais, estando esta consagrada na alínea f) do n.º 1 do artigo 59º.

A Lei n.º 7/2009 de 12 de Fevereiro, aprova a revisão do Código de Trabalho, nomeadamente o artigo 4º que se refere a acidentes de trabalho e doenças profissionais, no ponto 1 nas alíneas a, b, c e no ponto 2, o artigo 12º no ponto m) artigos 212.º a 280.º, sobre segurança e saúde no trabalho.

O Código do Trabalho, no capítulo IV, Prevenção e reparação de acidentes de trabalho e doenças profissionais, nos sete pontos do artigo 281.º refere os princípios gerais em matéria de segurança e saúde no trabalho e no artigo 282º que nos seus quatro pontos faz referência à obrigatoriedade do empregador informar, consultar e assegurar a formação adequada dos seus trabalhadores. Ainda no mesmo capítulo mas no artigo 283º se faz referência, em particular no seu ponto 2 às doenças profissionais, remetendo para a lista organizada e publicada no Diário da República.

A Lei n.º 98/2009 de 4 de Setembro regulamenta o regime de reparação de acidentes de trabalho e de doenças profissionais, incluindo a reabilitação e reintegração profissionais, nos termos do artigo 284.º do Código do Trabalho, aprovado pela Lei n.º 7/2009, de 12 de Fevereiro.

2.4. Tabela Nacional de Incapacidades

O Decreto nº 21978, de 10 de Dezembro 1932 (Tabela de Lucien Mayet), 1ª Tabela de Desvalorização Nacional (Decreto nº 43189, de 23 de

Setembro), Tabela Nacional de Incapacidades (Decreto-Lei nº 341/93 de 30 de Setembro), contribuiu para uma maior Humanização da avaliação da incapacidade, introduziu o conceito de considerar o sinistrado como um todo físico e psíquico excluindo o considerar apenas da função desempenhada pelo mesmo.

A TNI (Tabela Nacional de Incapacidades) tem por objectivo fornecer as bases de avaliação do prejuízo funcional sofrido em consequência de acidente de trabalho e doença profissional, com perda de capacidade de ganho. A cada situação do prejuízo funcional corresponde um coeficiente expresso em percentagem, que traduz a proporção da perda da capacidade de trabalho resultante da disfunção, como sequela final da lesão inicial, sendo a disfunção total, com incapacidade permanente absoluta para todo e qualquer trabalho.

Na determinação do valor final da incapacidade devem ser observadas as seguintes normas: (i) sempre que se verifique perda ou diminuição de função inerente ou imprescindível ao desempenho do posto de trabalho que o indivíduo ocupava com carácter permanente, os coeficientes de incapacidade previstos são bonificados com a multiplicação pelo factor 1,5 se a vítima não for reconvertível em relação ao posto de trabalho ou tiver 50 anos ou mais; a incapacidade será igualmente corrigida com a multiplicação pelo factor 1,5 quando a lesão implicar alteração visível do aspecto físico (como no caso das dismorfias ou equivalentes), se a estética for inerente ou indispensável ao desempenho do posto de trabalho ou tiver 50 anos ou mais (não acumulável com a alínea anterior); quando a função for substituída, no todo ou em parte, por prótese, a incapacidade poderá ser reduzida, consoante o grau de recuperação da função e da capacidade de ganho do sinistrado, não podendo, porém, tal redução ser superior a 15%; no caso de lesões múltiplas, o coeficiente global de incapacidades será obtido pela soma dos coeficientes parciais, segundo o princípio da capacidade restante, calculando-se o primeiro coeficiente por referência à capacidade do indivíduo anterior ao acidente ou doença profissional e os demais à capacidade restante, fazendo-se a dedução sucessiva do coeficiente ou coeficientes já tidos em conta no mesmo cálculo; as incapacidades que derivem de disfunções ou sequelas não descritas na

Tabela são avaliados pelo coeficiente relativo a disfunção análoga ou equivalente.

O Decreto-Lei n.º 352/2007 de 23 de Outubro, para impedir o uso incorrecto da Tabela Nacional de Incapacidades por Acidentes de Trabalho e Doenças Profissionais (TNI), aprovada pelo Decreto-Lei n.º 341/93, de 30 de Setembro, que era utilizada não apenas no contexto das situações especificamente referidas à avaliação de incapacidade laboral, para a qual foi realmente elaborada, mas por vezes também, era usada embora incorrectamente, como tabela de referência noutros domínios do direito para colmatar a ausência de regulamentação específica. Assim, o Decreto-Lei n.º 352/2007 de 23 de Outubro optou pela publicação de duas tabelas de avaliação de incapacidades, uma destinada a proteger os trabalhadores no domínio da sua actividade, isto é, no âmbito do direito laboral, e outra direccionada para a reparação do dano em direito civil. Para realizar este duplo objectivo o decreto possui dois anexos.

Num anexo do decreto referido anteriormente, consta a Tabela Nacional de Incapacidades por Acidentes de Trabalho e Doenças Profissionais revista e actualizada. Esta actualização decorreu ao longo de vários anos, fruto de ininterruptos trabalhos realizados por parte de uma comissão permanente que foi criada pela Portaria n.º 1036/2001, de 23 de Agosto, e que integrou representantes de diversos ministérios, de organismos e serviços públicos, da Associação Portuguesa de Seguros, dos tribunais do trabalho, da Associação Nacional dos Deficientes Sinistrados do Trabalho, da Sociedade Portuguesa de Medicina do Trabalho, das associações patronais e das associações sindicais com assento na Comissão Permanente de Concertação Social, e do Conselho Nacional para a Reabilitação e Integração das Pessoas com Deficiência. No anexo ii, o presente decreto-lei introduz na legislação nacional uma Tabela Nacional para Avaliação de Incapacidades Permanentes em Direito Civil, que visa a criação de um instrumento adequado de avaliação neste domínio específico do direito, consubstanciado na aplicação de uma tabela médica com valor indicativo, destinada à avaliação e pontuação das incapacidades resultantes de alterações na integridade psicofísica. Nesta encontram-se as

grandes incapacidades, estabelecem-se as taxas para as sequelas referentes aos diferentes sistemas, aparelhos e órgãos e respectivas funções e avaliam-se as situações não descritas por comparação com as situações clínicas descritas e quantificadas. Embora inspirada na tabela europeia “Guide barème européen d'évaluation des atteintes à l'intégrité physique e psychique” foi em particular resultado da elevada capacidade científica e técnica do Instituto de Medicina Legal, que a co-redigiu, destinando-se a ser utilizada exclusivamente por médicos especialistas em medicina legal ou por especialistas médicos de outras áreas com específica competência na avaliação do dano corporal, ou seja por peritos conhecedores dos princípios da avaliação médico-legal no âmbito do direito civil e das respectivas regras, desde os problemas decorrentes de um eventual estado anterior, à problemática das sequelas múltiplas, constituindo assim um elemento auxiliar que se reputa de grande utilidade prática para a uniformização de critérios e procedimentos.

3. Metais Pesados e a sua importância nas Ciências Forenses

3.1. Arsénio

O nome arsénio (AS), que deriva do grego “Arsenikon” que significa substância amarela, é conhecido desde as civilizações antigas (Egípcia, Grega e também Chinesa). Nessa época, foram também descobertas as suas propriedades tóxicas, cuja autoria se presume ser de Albertus Magnus em 1250 a.C.

O arsénio é um elemento químico com o nº Atómico 33, possui 74.92160 de massa atómica e classifica-se como semi-metal. Está espalhado pelo solo, oceanos, atmosfera e encontra-se acumulado em peixes e moluscos.

É um tóxico ambiental e recentemente foi referido que se encontra na água, solo e ar e deriva de processos naturais e actividades como, queima de carvão, extracção mineira, fertilizantes agrícolas e uso de pesticidas, o que contribui para o aumento de problemas para a saúde humana [3].

Este metal pode apresentar-se sob a forma orgânica podendo ser tri ou pentavalente. Exerce menor toxicidade nesta forma, uma vez que é melhor absorvido e eliminado pela via renal. Pode ser encontrado na alimentação humana, na mesma forma orgânica (arsenobetaina e arsenocolina), sendo estas formas, rapidamente excretadas pela via urinária e não apresentam perigo de grande toxicidade [4].

Nas águas minerais o arsénio pode ser encontrado na forma inorgânica. Pode ser tri ou pentavalente á semelhança da forma orgânica, sendo que a primeira é mais tóxica, uma vez que o trióxido de arsénio e o arsenito de sódio evidenciam-se com formas trivalentes muito abundantes.

O arsénio tem três formas de exposição que são: oral – quando ingeridos produtos contaminados como pesticidas e herbicidas bem como através de alimentos ou água que contém arsénio; por inalação – mais frequente em zonas industriais uma vez que existe uma elevada concentração

na atmosfera de arsénio, ou em zonas agrícolas devido ao uso de pesticidas e herbicidas; dérmica – esta exposição pode originar-se no decorrer de actividade laboral, podendo ocorrer acidentes de trabalho causados pelo contacto directo com compostos arsenicais.

A toxicidade do arsénio prende-se ao facto de ser corrosivo e de, após absorvido pelo organismo humano, perturbar vários processos metabólicos essenciais – é rapidamente convertido em espécies altamente tóxicas que têm acção inibidora sobre as enzimas que contêm grupos sulfidrilas, inibindo e bloqueando os processos celulares do indivíduo (síntese de ATP, o metabolismo energético, glucídico e lipídico).

Além da sua toxicidade, o arsénio é bioacumulativo, à semelhança de outros elementos. 24 Horas após ser introduzido no organismo, por ingestão, inalação ou absorção, os compostos deste elemento são distribuídos por diferentes órgãos do corpo humano.

A intoxicação por arsénio ou derivados costuma ocorrer de forma accidental, caso não se cumpram as devidas medidas higiénicas de trabalho, ou de forma voluntária, com intenções suicidas ou homicidas. Para além disso, os derivados do arsénico utilizados com fins terapêuticos apenas provocam uma intoxicação caso sejam ingeridos em doses superiores às prescritas.

A intoxicação aguda que advém da exposição de trabalhadores a níveis elevados de fumos ou poeiras de arsénio provoca efeitos gastrointestinais (náuseas, diarreia, dores abdominais), enquanto a exposição ao arsénio inorgânico resulta em desordens no sistema nervoso central e periférico.

A exposição oral aguda ao arsénio inorgânico, em doses de aproximadamente 600 µg/kg/dia ou mais elevadas em humanos, provoca a morte. Em doses mais baixas resulta em efeitos no tracto gastrointestinal (náuseas, vómitos), sistema nervoso central (dores de cabeça, delírios), sistema cardiovascular (hipotensão), fígado, rins e sangue (anemia, leucopenia). Por sua vez, a inalação do gás arsénico (arsina) apresenta

sintomas como dor de cabeça, vômitos, sensação de formigueiro, icterícia e insuficiência cardíaca, que evoluem rapidamente [4].

Em ambos os casos, se a dose ingerida ou inalada for elevada, pode favorecer o desenvolvimento de complicações mortais (30 minutos a uma exposição de 25 a 50 ppm pode ser letal). Por outro lado, em caso de intoxicação crónica, as manifestações vão-se evidenciando gradualmente e baseiam-se em debilidade, perda de apetite, vermelhidão e úlceras na pele, dor de cabeça, inchaço e debilidade dos membros, problemas digestivos, renais, hepáticos e do ritmo cardíaco, com uma grave deterioração das funções mentais nas fases avançadas [4].

A título de exemplo, os sintomas de uma intoxicação aguda pelo arsenato de gálio (incluindo desconforto gastrointestinal, vômitos, coma e algumas vezes a morte) podem ocorrer em 30 minutos, enquanto as consequências de um envenenamento crónico (incluindo anemia, cancro da pele e outros cancros internos) são muito mais insidiosos [4].

Uma única dose de 100mg/kg de arsenato de gálio e arsenato de índio resulta numa inflamação pulmonar aguda e hiperplasia pneumocócica após 14 dias da exposição. Uma exposição crónica com pequenas doses (≤ 1 mg/L) de arsenato de gálio e arsenato de índio produz lesões pulmonares e toxicidade sistémica. [4]

Não existem só efeitos de uma exposição aguda a derivados de arsénio, existem também efeitos crónicos não cancerígenos a estes compostos.

A inalação de arsénio inorgânico resultante de uma exposição crónica está associada a irritações da pele e das mucosas nos humanos (dermatites, conjuntivites, faringites e rinites). Quanto à exposição oral, esta origina efeitos gastrointestinais, anemia, lesões na pele, gangrena de extremidades, lesões vasculares e danos nos rins ou no fígado.

Existem diversos estudos que demonstram que a ingestão de arsénio inorgânico pode aumentar o risco de cancro da pele, fígado e pulmões. A Agência de Protecção Ambiental dos EUA determinou o arsénio inorgânico

como um agente carcinogénico humano. Esta estima que, se um indivíduo respirar em média $0.0002 \mu\text{g}/\text{m}^3$, continuamente, de arsénio inorgânico durante a sua vida, essa pessoa teoricamente terá uma probabilidade aumentada de 1 para 1 milhão de desenvolver cancro como consequência directa de respirar ar que contem este químico.

A melhor forma de determinar exposições recentes ao arsénio é através de uma análise à urina (1 a 2 dias após o contacto), porém, medindo no cabelo ou nas unhas pode ser útil para detectar elevados níveis de exposição que ocorreram nos passados 6-12 meses. Estes testes apenas determinam se a pessoa esteve exposta ao arsénio em níveis acima da média, não sendo possível prever se os níveis existentes no corpo poderão prejudicar, ou não, a saúde.

O tratamento da intoxicação por arsénico fundamentar-se na eliminação do tóxico que está presente no organismo, que pode ser através de uma lavagem gástrica ou mediante a administração de dimercaprol. Em caso de intoxicação crónica, deve-se acabar com a exposição do paciente à fonte de intoxicação.

3.2 Chumbo

O chumbo (do latim Plumbum) é um elemento químico de símbolo Pb que se encontra no estado sólido à temperatura ambiente, funde a $327,4^\circ\text{C}$, começa a produzir vapores a partir dos 550°C e entra em ebulição a partir dos 1740°C . Através da interacção com outros elementos dá origem a compostos tais como sulfato de chumbo, cromato de chumbo, arseniato de chumbo, dióxido de chumbo, brometo de chumbo, entre outros [5].

É um metal muito conhecido e usado desde a antiguidade. Presume-se que já é trabalhado há mais de 7000 anos.

O chumbo é anfótero, uma vez que se comporta como base na presença de ácidos e como ácido na presença de bases. É um metal tóxico, pesado,

maleável, mau condutor da electricidade, mas é altamente resistente à corrosão. É utilizado na construção civil, nas baterias de ácido, em munições, protecção contra os raios-X, em ligas metálicas para a produção de soldas, em fusíveis, em revestimento de cabos eléctricos, em metais de tipografia entre outros.

Apesar de não ser um elemento comum nas águas naturais, o chumbo tem sido responsável por graves problemas de intoxicação, devido ao facto de ser facilmente introduzido no meio ambiente a partir de uma série de processos e produtos humanos, como por exemplo através da indústria de plásticos, tintas e pigmentos ou a da própria indústria metalúrgica. Uma das principais fontes de poluição por parte do chumbo ocorre em países em que o chumbo continua a ser adicionado à gasolina, sob a forma de tetraetilo de chumbo. Trata-se de um metal que tem efeito cumulativo no organismo, o que pode provocar uma doença crónica chamada saturnismo. Hoje em dia esta patologia é mais comum em trabalhadores que estão muito expostos à contaminação, contudo, no passado, a taxa de intoxicação por chumbo era muito elevada devido ao uso de canecas e vasilhames de chumbo. Os efeitos da intoxicação são tonturas, irritabilidade, dores de cabeça chegando em casos mais graves à perda de memória. A intoxicação aguda caracteriza-se por sensação intensa de sede, sabor metálico na boca, inflamação gastrointestinal, vómitos e diarreias. Em crianças, este metal provoca retardamento físico e mental, perda de concentração e diminuição da capacidade cognitiva. Em adultos são comuns os problemas nos rins e aumento da pressão arterial.

Poder-se-á concluir que as fontes de chumbo serão a mineração ou fundição de Pb e outros metais (operários das fundições de chumbo estão sujeitos a intoxicações através da inalação de poeiras de óxido de chumbo), indústrias petrolíferas, tintas à base de chumbo, água e exposição ambiental e industrial (alimentos e bebidas ácidas tais como sumos, refrigerantes e “pickles” dissolvem as ligas metálicas das embalagens). A exposição aguda ocorre em tentativas de homicídio e suicídio e pela ingestão acidental de alimentos e bebidas com altos teores. Por sua vez a exposição crónica poderá dever-se a três situações: ocupacional, por galvanoplastia, soldagens ou baterias, por exemplo; ambiental, através de tintas, água e ar de regiões

contaminadas pelo metal; e alimentar, por alimentos e água com elevados teores de chumbo.

O Pb compete com o ião cálcio (Ca^{2+}) para a absorção no intestino. Assim, uma deficiência de ferro na dieta aumenta a possibilidade de intoxicação devido ao aumento da absorção de chumbo pelo tracto gastrointestinal.

Segundo o Instituto Regulador de Águas e Resíduos (IRAR), na recomendação nº 02/2005, o teor máximo de chumbo na água de abastecimento deverá ser 0.025 mg/L até 25 de Dezembro de 2013 e 0.01 mg/L depois desta data. Este valor, que se aplica a um consumo médio mensal, foi estabelecido com vista a assegurar a protecção da saúde humana.

O tempo de acumulação de doses tóxicas diminui com o aumento da ingestão, por exemplo: ingestão de 2.5 mg/dia levará cerca de 4 anos a atingir uma carga tóxica; já na ingestão de 3.5 mg/dia serão necessários apenas alguns meses para ser atingida uma carga tóxica.

A concentração plasmática tida como valor de referência normal é de 0.2 mg, para um valor de 0.6 mg considerar-se-á pequena toxicidade.

A título de curiosidade, análises realizadas em amostras de cabelo de Beethoven, detectaram chumbo em níveis 60 vezes superiores ao comum. Para alguns estudiosos uma intoxicação aguda por chumbo pode explicar muitas das dores que o compositor sentia e pode também ser a causa do seu comportamento irascível e insociável.

3.3 Mercúrio

O nome mercúrio surge como homenagem ao Deus grego Mercúrio, mensageiro dos deuses, lembrando a fluidez do metal. O símbolo Hg vem do latim “hydrargyrum” (hydor que significa “água” e argyros que era o nome grego da “prata”), que significa prata líquida.

O mercúrio é um elemento químico de número atómico 80 e massa atómica 200,59 (massa atómica relativa ao átomo de carbono-12 e

recomendada pela IUPAC em 2001). Em conjunto com o gálio são os únicos metais líquidos à temperatura ambiente. Pertence ao grupo 12, integrando a classe dos metais de transição. Forma vapores incolores e inodoros, que se tornam tóxicos e corrosivos com o aumento da temperatura, tendo uma densidade superior à densidade do ar.

Este metal vem sendo usado na indústria e na medicina desde há séculos. Pode ainda ser encontrado em termómetros e medidores pressão arterial que, apesar de proibidos em hospitais desde Abril de 2009, continuam a ser utilizados nas casas de muitos portugueses, visto que não houve nenhuma campanha de recolha. A nível comercial, o mercúrio pode ser encontrado em baterias, luz fluorescente e interruptores [6].

Grande quantidade de mercúrio metálico é utilizada em eléctrodos usados na produção industrial electrolítica de cloreto e sódio a partir do sal. Esta aplicação industrial do mercúrio potencia o risco de exposição ocupacional e acidental [6].

De um modo geral existem três formas de apresentação do mercúrio: elemento metálico - mercúrio elementar (Hg_0); sais inorgânicos - também designados como sais de mercúrio, quando este se combina com elementos como o cloro, enxofre ou oxigénio; compostos orgânicos - se um átomo de mercúrio se liga covalentemente a pelo menos um átomo de carbono, originando compostos de metilmercúrio, etilmercúrio ou fenilmercúrio.

O Hg pode encontrar-se em três estados de oxidação (0, +1, +2). O estado elementar Hg_0 , que existe na forma líquida à temperatura ambiente, é volátil e liberta o vapor de mercúrio. Torna-se muito importante no ciclo do mercúrio pois sofrendo oxidação pode formar os outros estados, o mercurioso $\text{Hg}+1$ e mercúrico, $\text{Hg}+2$.

Hoje em dia a exposição da população em geral surge a partir das duas formas orgânicas deste metal: o metilmercúrio (CH_3Hg^+) e o etilmercúrio ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$). Por sua vez, estas formas orgânicas podem ter três proveniências distintas: o consumo de peixe contaminado, as amálgamas dentárias e algumas vacinas. O peixe contaminado é a maior, senão a única, fonte de metilmercúrio, uma vez que hoje em dia a utilização de fungicidas contendo esta molécula não é muito frequente.

Há muitos anos que são conhecidos casos de envenenamento por inalação de vapores de mercúrio [7]. Hoje em dia, as exposições resultantes de actividades profissionais são já muito mais controladas do que no século passado. As concentrações na urina de pessoas com amálgamas dentárias (2 a 4 mg de mercúrio por litro), são muito mais baixas do que as concentrações encontradas em pessoas que estão, pela sua actividade profissional, em contacto com o mercúrio (20 a 50 mg de mercúrio por litro), [8].

Em muitos países, os bebés continuam a ser expostos ao etilmercúrio sob a forma de vacinas, uma vez que esta forma de mercúrio orgânico é o ingrediente activo usado no timerosal (etilmercuritosalicilato, composto rapidamente metabolizado a etilmercúrio ([9]) preservante usado em algumas preparações médicas, incluindo as vacinas.

A exposição ao mercúrio pelo consumo de peixe contaminado ou a partir de amálgamas dentárias é uma questão presente há várias décadas. Já o possível risco associado ao timerosal usado em vacinas é uma questão relativamente recente.

Esta preocupação crescente com o mercúrio teve o seu expoente máximo na recomendação da “Environmental Protection Agency (EPA)” dos EUA (2001) que estabeleceu como a dose diária de metilmercúrio segura por dia como 0.1 mg por Kg de peso corporal, contrariando o valor estabelecido em 1978 pela “FAO/WHO Expert Committee on Food Additives” de 0.5 mg/Kg/dia.

O efeito crónico provocado por este metal poderá dever-se a uma exposição ocupacional, como por exemplo, garimpagem, fábrica de lâmpadas ou odontologia [10-12].

O mercúrio pode também estar associado a hidrocarbonetos gasosos e líquidos (petróleo e betumes), e é um elemento de origem profunda (manto terrestre) que ascende na forma de metil ou dimetil mercúrio. Nos depósitos vulcanogénicos, quando há disponibilidade de enxofre, o mercúrio pode precipitar como sulfureto (HgS).

A tabela 1, elaborada por Gossel and Bricker [13], apresenta uma sumula dos aspectos toxicológicos e clínicos do vapor de mercúrio, do metilmercúrio e do etilmercúrio. Nesta tabela é também possível verificar as

manifestações clínicas resultantes da absorção deste metal sob a forma inorgânica divalente, visto que se admite ser a espécie tóxica produzida nos tecidos após a inalação do vapor. Hg^{2+} é também a espécie química responsável por lesões renais.

Variable	Mercury Vapor	Inorganic Divalent Mercury	Methyl Mercury	Ethyl Mercury
Route of exposure	Inhalation	Oral	Oral (from fish consumption)	Parenteral (through vaccines)
Target organ	Central nervous system, peripheral nervous system, kidney	Kidney	Central nervous system	Central nervous system, kidney
Local clinical signs				
Lungs	Bronchial irritation, pneumonitis (>1000 $\mu g/m^3$ of air)			
Gastrointestinal tract	Metallic taste, stomatitis, gingivitis, increased salivation (>1000 $\mu g/m^3$ of air)	Metallic taste, stomatitis, gastroenteritis		
Skin		Urticaria, vesication		
Systemic clinical signs				
Kidney	Proteinuria (>500 $\mu g/m^3$ of air)	Proteinuria, tubular necrosis		Tubular necrosis
Peripheral nervous system	Peripheral neuropathy (>500 $\mu g/m^3$ of air)	Acrodynia		Acrodynia
Central nervous system	Erethism (>500 $\mu g/m^3$ of air), tremor		Paresthesia, ataxia, visual and hearing loss (>200 $\mu g/liter$ of blood)	Paresthesia, ataxia, visual and hearing loss
Approximate half-life (whole body) (days)	60	40	70	20†
Treatment‡	Meso-2,3-dimercaptosuccinic acid	Meso-2,3-dimercaptosuccinic acid	Chelators not effective§	Chelators not effective§

Tabela 1. Principais aspectos clínicos de toxicologia de mercúrio [13].

O mercúrio é um fascinante objecto de brincadeira para as crianças, especialmente em países subdesenvolvidos, e se ingerido sob a forma líquida é rapidamente absorvido pelo tracto intestinal.

De acordo com tradições religiosas e culturais em determinados locais, indivíduos pertencentes a alguns cultos espalham o metal no chão das casas ou no carro, ou misturando-o com perfumes e pomadas de uso cutâneo [14]. Nestas situações o risco de toxicidade é muito elevado. Devido ao facto do vapor de mercúrio ser muito “pesado” quimicamente e tender a formar uma camada muito perto do chão, o risco da exposição de crianças pequenas e bebés é grande. Há séculos atrás, este metal era muito utilizado no tratamento de obstipações [15]. Este é, aliás, um dos mais polémicos assuntos das primeiras práticas médicas, assim como a sua generalizada utilização no princípio do século XX no tratamento da sífilis.

Existem estudos que abordam a possibilidade de o mercúrio e outros metais pesados estarem relacionados com as doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer ou a doença de Parkinson [16, 17]. Não existem contudo dados científicos que o justifiquem, coexistindo vários estudos nesse sentido. Estudos “*in vitro*” indicam que o mercúrio pode afectar processos bioquímicos que se acredita estarem envolvidos na doença de Alzheimer [18]. Contudo, a inibição de vários processos bioquímicos “*in vitro*” provocada pelo metal, poderá não ocorrer “*in vivo*”, pelo que existem ainda dúvidas relativamente ao seu efeito neste campo.

As amálgamas dentárias, que consistem em aproximadamente 50% de mercúrio combinado com outros metais (35% de prata e 15% de cobre e vestígios de zinco) são usadas há mais de 150 anos sendo de mais barata e fácil aplicação do que amálgamas exclusivamente de ouro [19]. Os profissionais de saúde, para além da população em geral, que contactam ou possuem amálgamas dentárias (vulgo “chumbo”) estão expostos ao vapor de mercúrio que acaba por ser inalado e absorvido na corrente sanguínea.

Os argumentos partilhados entre apoiantes e antagonistas destas amálgamas têm sido referidos como a guerra das amálgamas. Estes foram salientados a partir de 1970 com a descoberta de que as amálgamas dentárias podem libertar vapor de mercúrio na cavidade oral, em concentrações superiores às tidas como aceitáveis. Mais tarde, foi tido em conta que a dose inalada é relativamente pequena tendo em consideração o pequeno volume da cavidade oral. Mesmo assim, as amálgamas dentárias são a principal fonte de exposição da população humana em geral ao mercúrio sob a forma de vapor. A título ilustrativo, é referido que o equivalente à superfície de 10 amálgamas dentárias eleva a concentração de mercúrio na urina de 1 mg do metal por litro e que a quantidade de vapor de mercúrio na boca de pessoas com amálgamas dentárias é cerca de 50-150 µg/cc [20].

Através da actividade bactérias metanogénicas, o mercúrio inorgânico pode ser convertido em metilmercúrio e dimetilmercúrio, particularmente em sedimentos [13].

Esta biotransformação em metilmercúrio representa um sério risco ambiental uma vez que leva à sua acumulação na cadeia alimentar aquática por um fenómeno que se designa de bioamplificação, ou seja, a concentração do metal aumenta com a progressão dos níveis tróficos. Daí a capacidade do metilmercúrio permanecer por períodos de tempo muito longos nos tecidos do organismo.

Nos humanos, a única fonte de contaminação pelo metilmercúrio é o consumo de peixe contaminado. O metilmercúrio é produzido no ambiente por biometilação do mercúrio inorgânico presente nos sedimentos aquáticos, Figuras 1A e 1B, [13].

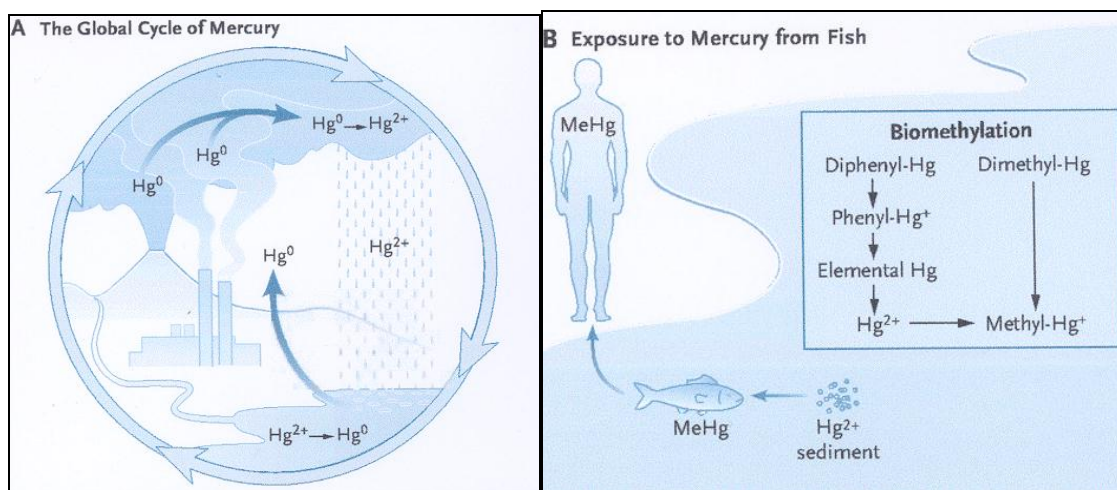


Figura 1. A- Ciclo global do mercúrio. B- Exposição ao mercúrio através do peixe [13].

Existem algumas publicações que apresentam a problemática da contaminação por mercúrio através do consumo de peixe contaminado, relativas ao peixe-espada preto da Madeira [21, 22]. Existem também exemplos de casos, de elevada gravidade, chegando mesmo a ser fatais, de envenenamento por metilmercúrio, que remontam a 1860 em Inglaterra [23]. Desde esta altura, inúmeros casos foram-se seguindo relacionados com exposição relativa à dieta e à ocupação profissional. Como exemplos podem-se referir os acidentes ecológicos de origem industrial do século passado, como o caso da Baía de Minamata no Japão ([24]), nos anos 50, no Iraque ([25]) em 1971 ou nos Estados Unidos da América ([26]) em 1990.

Vários estudos têm demonstrado também efeitos neurotóxicos do metilmercúrio. Exemplo disso são os resultados obtidos numa população da Bacia Amazónica, exposta ao metilmercúrio. Avaliando-se as funções visuais e motoras dos indivíduos através de testes neurofuncionais sensíveis, observou-se um decréscimo destas funções, estabelecendo-se uma relação com o aumento nos níveis de mercúrio no cabelo, sendo que estas manifestações estavam presentes com níveis de mercúrio abaixo de 50 µg/g. Entre as funções motoras comprometidas encontravam-se a destreza manual, a coordenação manual e a fadiga muscular [27].

Estudos publicados no *New England Journal of Medicine* (2002) demonstram uma associação entre doenças cardiovasculares e mercúrio, principalmente na forma de metilmercúrio. Dois destes estudos mostram uma relação directa entre uma dada concentração de mercúrio e o risco de enfarte do miocárdio [28, 29]. Mais recentemente, a Organização Mundial de Saúde concluiu que as restaurações dentárias com as tradicionais amálgamas contribuem com mais mercúrio para o organismo humano de uma pessoa do que todas as outras fontes combinadas.

De todos os compostos de mercúrio orgânico, o metilmercúrio é o mais tóxico e é responsável pelos danos mais importantes observados em humanos. Este facto tem a ver com a sua lenta eliminação, podendo mesmo prolongar-se por alguns anos no cérebro e rins. O sistema nervoso central é o alvo principal do metilmercúrio, onde áreas específicas do cérebro são afectadas como os lobos temporais e o cerebelo. A intoxicação pelo metilmercúrio caracteriza-se por ataxia (perda de coordenação dos movimentos voluntários), disartria (problemas na articulação das palavras), parestesia (perda da sensibilidade nas extremidades e em torno da boca), visão em túnel (constricção do campo visual) e perda da audição. Uma contaminação severa pode causar cegueira, coma e morte. O período médio de latência varia entre 16 e 38 dias.

O mercúrio é reconhecidamente um agente teratogénico. O metilmercúrio absorvido pela mãe é transferido para a placenta e transportado para o feto. Por sua vez, o mercúrio inorgânico é encontrado em maior quantidade no líquido amniótico, uma vez que tem uma menor capacidade de

atravessar a barreira placentária. Todavia, o mercúrio inorgânico é também transportado pelo leite materno. O cérebro fetal é mais susceptível, comparativamente ao cérebro adulto, aos efeitos tóxicos do mercúrio. O metilmercúrio inibe a divisão e migração das células neuronais e interrompe a citoarquitura do desenvolvimento do cérebro [30, 31].

Existem duas entidades que se se debruçam em estudos de interesse para a saúde pública, a EPA (europeia) e a FDA (americana).

Como consequência de estudos realizados nos últimos anos, a EPA reduziu a quantidade limite de metilmercúrio de 0.5 para 0.1mg de mercúrio/Kg/dia (2001). Este valor reduz o consumo máximo de atum (peixe mais consumido nos Estados Unidos da América), para uma quantidade mínima de cerca de 198g peixe por adulto/dia. O consumo de peixe tem benefícios alimentares já cientificamente comprovados, muitas vezes tidos em consideração em detrimento dos possíveis e especulativos riscos da possível exposição ao mercúrio. Assim, a FDA ("Food and Drug Administration") recomendou em 2004 uma especial atenção às mulheres grávidas e crianças no consumo de peixes suspeitos de conterem elevada contaminação de mercúrio, (>1 ppm), tais como o peixe-espada e a cavala [21].

A exposição pré-natal a compostos de mercúrio orgânico, principalmente após desastres industriais levou a defeitos no desenvolvimento cerebral que se tornavam mais intensos à medida que a exposição era mais elevada. Mulheres sem sinais clínicos de contaminação tiveram filhos com paralisia cerebral severa e microcefalia.

O mercúrio pode também influenciar o estado hormonal (o eixo hipotálamo-hipofisário), podendo ser responsável por ciclos menstruais irregulares e menor número de ovulações [7]. Outros autores referem que o mercúrio afecta as glândulas adrenais, causando um bloqueio das actividades enzimáticas, que por sua vez provoca distúrbios no ciclo menstrual.

Estudos epidemiológicos também relacionam os efeitos do mercúrio com problemas reprodutivos. Na Polónia, mulheres dentistas e assistentes de odontologia apresentaram uma taxa significativamente maior de abortos em relação a grupos controlos (16% e 11% respectivamente), além de distúrbios do ciclo menstrual e malformações congénitas [32, 33].

Relativamente à fertilidade masculina, pouco referenciada na bibliografia, verificou-se que esta não era significativamente afectada por um nível médio de mercúrio de cerca de 50 mg/L. Num outro trabalho, e após longos períodos de exposição ao mercúrio (níveis de 44000 mg/m³ no ar), verificou-se uma perda significativa da libido [34].

Existem ainda referenciados bibliograficamente alguns dados contraditórios no que diz respeito à ocorrência de abortos e malformações congénitas após longos períodos de exposição ao mercúrio de pais do sexo masculino [35].

Estudos relativos aos efeitos do mercúrio e seus compostos a nível celular demonstraram que linfócitos e linhagens linfoblásticas celulares humanas, sujeitas tanto a mercúrio orgânico como a mercúrio inorgânico, apresentaram um decréscimo considerável em termos de capacidade proliferativa, produção de citocinas e secreção de imunoglobulinas. Experiências com cloreto de mercúrio (HgCl₂) demonstraram que este composto tem afinidade para se ligar à região de interface da molécula de Na,K-ATPase [36]. Esta molécula está directamente relacionada com a actividade de transporte de iões, cujo movimento (principalmente do K⁺) pela membrana plasmática é de vital importância para que se inicie o processo mitogénico. Uma possível associação daquele metal à molécula de Na-K-ATPase levaria à supressão da passagem de iões K⁺ e, conseqüentemente, a uma inibição na actividade dos linfócitos B. A redução da função das células linfóides é o resultado da citotoxicidade induzida pelo mercúrio. Linfócitos e monócitos tratados com mercúrio (tanto orgânico como inorgânico) exibem sinais funcionais e morfológicos de morte celular ([37]), como por exemplo um marcado decréscimo na produção de adenina, alteração na síntese de fosfolípidos e aumento de iões Ca²⁺. Como estas células evidenciam mudanças nucleares e de membrana que são consideradas características de uma célula em processo de morte celular programada, pode-se concluir que células linfóides tratadas com mercúrio são levadas a apoptose [38].

Os testes genotóxicos detectam mutações tanto a nível cromossómico como a nível génico. Essas mutações são responsáveis pelo aparecimento de

cancros e doenças hereditárias. Estudos efectuados em plantas e animais de laboratório mostraram que o mercúrio tem a capacidade de inibir a formação do fuso mitótico, originando uma anormal distribuição dos cromossomas e poliploidia. Esta acção resulta da grande afinidade do mercúrio para os grupos sulfidrilo encontrados nas proteínas do fuso e é considerada como a acção mais típica, do ponto de vista genético, dos compostos de mercúrio. Embora o efeito genotóxicos do mercúrio seja a sua ligação ao fuso mitótico, existem estudos que propõem um efeito deste metal na produção de radicais livres, via peroxidação lipídica [39].

O timerosal tem vindo a ser utilizado como preservante em vacinas desde 1930 [40, 41]. Nas concentrações encontradas nas vacinas, o timerosal inactiva organismos específicos e consegue impedir o crescimento de fungos indesejados, satisfazendo assim os requisitos da U.S. Pharmacopeia (1999). Contém o radical etilmercúrio ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$) que ataca o grupo sulfúrico do tiosalicilato.

Estudos iniciais não revelaram efeitos adversos do timerosal. Porém, numa reavaliação dos possíveis efeitos nefastos do timerosal, foram realizados ensaios no sentido de avaliar a quantidade de mercúrio ingerido pelas crianças americanas sujeitas ao programa nacional de vacinação, (0-6 meses) [42]. Concluiu-se que recebem mais de $0.1 \mu\text{g}$ de mercúrio/kg/dia. Após obtidos estes resultados procedeu-se imediatamente à remoção do timerosal das vacinas, passando a usar-se doses simples que não requerem a utilização de preservantes.

O etilmercúrio tem algumas semelhanças químicas com o metilmercúrio, partilham uma distribuição inicial similar no corpo e provocam efeitos muito semelhantes em doses tóxicas para o cérebro. Todavia, apesar do metilmercúrio ser mais potente, o etilmercúrio é metabolizado em mercúrio inorgânico mais rapidamente. Talvez seja esta a razão do etilmercúrio não causar lesões renais nos humanos, contrariamente ao metilmercúrio. Hoje sabe-se também que o tempo de semi-vida do etilmercúrio no organismo é muito pequeno [43]. Em crianças que receberam timerosal em vacinas, o tempo de semi-vida do etilmercúrio no sangue é normalmente assumido como

sendo de 7 a 10 dias. Já o tempo de semi-vida do metilmercúrio é de cerca de 50 dias. A Organização Mundial de Saúde, mesmo tendo em conta estes possíveis riscos da utilização do timerosal, concluiu no seu relatório anual de Janeiro de 2008, que é seguro e que deverá ser utilizado este preservante nas vacinas, principalmente em países em desenvolvimento, uma vez que o risco de contaminação nas multidoses é muito grande, excedendo o hipotético risco do timerosal nas vacinas. Mais recentemente, tem sido apontada a possibilidade de o uso deste preservante estar associado a problemas de autismo [44]. Apesar de existirem já numerosos estudos sobre este assunto não existem ainda dados conclusivos.

Apesar de todas as formas de mercúrio terem efeitos adversos na saúde em doses elevadas, as consequências da exposição dos humanos a pequenas doses de mercúrio quer a partir do consumo de peixe contaminado, das amálgamas dentárias ou do timerosal das vacinas, estão ainda sujeitas a discussão.

Os vapores deste metal, quando inalados, podem atravessar a membrana alveolar facilmente até atingir a circulação sanguínea. No sangue, fígado e rins o mercúrio é oxidado à forma divalente, Hg^{2+} , pelo complexo enzimático designado hidrogénio peróxido catalase. Esta é a forma de mercúrio que representa a maior fonte de toxicidade verificada em laboratórios industriais e de pesquisa.

Embora o nível fatal de mercúrio não seja conhecido, está documentado que uma exposição acima de 1-2 mg/m³ de vapor de mercúrio elementar durante algumas horas provoca bronquite química aguda e pneumonia. Danos no pulmão através da formação de uma membrana hialina e finalmente a ocorrência de fibrose pulmonar são possíveis de verificar duas horas após a exposição ao mercúrio [45].

A contaminação pelos diversos compostos de mercúrio também está associada a condições clínicas relacionadas com patologias cutâneas [46]. Concentrações de metal no sangue 5 µg/ dL, são geralmente acompanhadas de sintomas e sinais de toxicidade.

O mercúrio forma rapidamente ligações covalentes com o enxofre na forma sulfidrilo (-SH, designado também por grupo tiol ou grupo mercaptano – do latim *mercurius captans* - pela capacidade que o grupo -SH tem de se ligar fortemente com o mercúrio), alterando a solubilidade, dissociação e afinidade relativa para os receptores, distribuição e excreção das enzimas e compostos que contêm esses grupos sulfidrilo. Como as proteínas que têm grupos tiol existem tanto nas membranas extracelulares, como nas intracelulares e ainda nos organelos, não foi ainda possível determinar o alvo exacto deste metal. O mecanismo de acção é traduzido por um conjunto de alterações que podem ocorrer individualmente ou em conjunto, manifestar-se no aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, inibição da polimerização e formação dos microtúbulos, alterações na replicação do DNA e na síntese proteica, desregulação do sistema imunitário e mudança na homeostase do cálcio.

Para além deste mecanismo de acção, o mercúrio está também associado à indução de mecanismos de peroxidação lipídica e a alterações no mecanismo do grupo heme. Como consequência, o Hg origina uma depleção dos níveis de glutatona, superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase, conferindo um défice na protecção celular com relação ao stress oxidativo, pela acção deste metal na despolarização da membrana interna mitocondrial, levando ao aumento de peróxido de hidrogénio (H₂O₂), uma das quatro espécies reactivas de oxigénio (oxigénio singleto, radical hidroxilo e radical superóxido).

É a afinidade do metal para os grupos tióis (com enxofre) que permite a utilização do ácido 2,3 dimercapto-1-propano-sulfónico ou DMPS ou da penicilina como agentes quelantes no tratamento de intoxicações por Hg.

O mercúrio também se liga a outros grupos químicos, embora com uma menor afinidade, como o fosforilo (PH₃), carboxilo (COOH), amina (R-NH₂, amina primária), e amida (R-CO) NH₂. É também considerado um poluente ambiental e está classificado em terceiro lugar no Top 20 das substâncias perigosas publicadas na “Agency for Toxic Substances & Disease Registry”, ATSDR, 1999. Os efeitos biológicos deste metal e seus derivados são grandemente diversificados, englobando desde efeitos citológicos, reprodutivos

(teratogénicos) e até mesmo neurológicos. A possível associação ao processo carcinogénico, bem como os seus efeitos genotóxicos não estão ainda completamente esclarecidos, apesar da existência de inúmeras evidências do efeito do Hg ao nível do ADN.

Os inúmeros estudos apresentados servem de indicadores que privilegiam a integridade da saúde das pessoas potencialmente expostas ao metal, evidenciando os efeitos biológicos deste metal. Todos os efeitos biológicos do mercúrio e seus compostos derivados demonstram que apesar de incalculáveis contradições estes compostos apresentam graves consequências no organismo que merecem um estudo aprofundado.

4. Doenças Neurodegenerativas

4.1. Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é uma avançada desordem neurodegenerativa relacionada com a idade, essencialmente definida pela sua relação com a deficiência de movimento, incluindo tremor de repouso, rigidez do tónus muscular e bradicinesia [47]. À medida que a doença progride afecta também várias áreas dentro do sistema nervoso central e periférico, causando sintomas adicionais não-motorizados [48].

Patologicamente, a DP é caracterizada por perda de neurónios dopaminérgicos na via nigroestriatal do cérebro e por a presença de corpos de Lewy e neuritos de Lewy [49], que com a progressão da doença, se espalham a partir do tronco cerebral para o córtex frontal [50]. A depleção da dopamina causa desregulação nos circuitos motores resultando nas manifestações clínicas da PD. A grande maioria dos casos de PD até mesmo pela própria dificuldade no seu estudo (post-mortem) são considerados idiopáticos mas uma pequena percentagem (5 a 10%) estão associadas a um componente genético de hereditariedade. [51].

Os corpos de Lewy são inclusões citoplasmáticas intraneuronais, cujo principal componente estrutural é uma Sinucleína (α -Syn) [49]. Uma Syn é uma proteína pré-sináptica criticamente envolvida na citopatologia e genética da DP (revisto em [52- 54], e de outras sinocleinopatias em humanos, como a demência associada aos corpos de Lewy e a atrofia sistémica [55].

A α -Syn é o componente nuclear dos corpos de Lewy encontrado maioritariamente na substancia nigra mas também em outras regiões do cérebro tais como o córtex. Varias mutações da α -Syn estão já postuladas na bibliografia como tendo um papel fundamental na patogenia da PD. Algumas dessas mutações são duplicações e triplicações do locus do gene directamente associadas à hereditariedade da DP em idade adulta [56].

A progressiva conversão da proteína solúvel α -Syn, em oligómeros solúveis e agregados insolúveis é anterior à sua deposição citoplasmática

intraneuronal e fundamenta a sua citopatologia neste grupo de distúrbios [57-58]. Esta progressiva conversão e acumulação em formas citotóxicas de α -Syn é associada à neurodegeneração na DP [59].

O papel fisiológico da α -Syn ainda é incerto. Estudos recentes têm sugerido que a proteína neuronal α -Syn está envolvida em aspectos do tráfego de vesículas, tanto na exocitose ([60]) como na endocitose [61]. De acordo com descobertas recentes, que indicam o seu enriquecimento nos terminais pré-sinápticos, a α -Syn mostrou que tinha efeitos na reciclagem de vesículas sinápticas [61-62].

No entanto, a expressão da α -Syn não está restrita ao sistema nervoso central. Uma parte da α -Syn é detectada no plasma ([63]), células vermelhas do sangue ([64]) e fibroblastos da pele [65]. Além disso, a expressão da α -Syn foi encontrada em uma variedade de tumores cerebrais ([66, 67]), bem como cancros periféricos, incluindo ovário e de mama ([68]), tumores no cólon ([69]) e no melanoma [70].

Tem sido sugerido que a perda neuronal em doenças neurodegenerativas pode resultar da activação de componentes do ciclo celular. Os neurónios são geralmente considerados como células pós-mitóticas e não-replicadas. No entanto, os componentes específicos do mecanismo do ciclo celular podem ser reactivados em alguns neurónios mediante certos estímulos [71]. Embora essa activação do mecanismo do ciclo celular possa resultar na proliferação de células cancerosas, a reactivação do ciclo celular em neurónios pós-mitóticos pode levar à apoptose.

4.2. Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de insanidade mental, afectando mais de 18 milhões de pessoas em todo o mundo. Com o aumento da esperança de vida, é esperado que este número venha a aumentar no futuro.

A DA é caracterizada pela progressiva perda da memória, deficit cognitivo e alterações de personalidade associados à degeneração de vários

tipos de neurónios e, patologicamente, pela presença de placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares [72]. A proteína amilóide β ($A\beta$) parece desempenhar um papel patogénico fundamental na DA, e existem estudos que fazem ligação entre as placas $A\beta$ e a formação de emaranhados intercelulares, outra característica neurotóxica da DA [73- 75]. Actualmente, não existe tratamento para curar ou prevenir a morte celular neuronal, que resulta num inevitável declínio na saúde dos pacientes com AD.

Desenvolvimentos recentes na tecnologia de células-tronco têm estimulado novas terapias potenciais para doenças neurodegenerativas como o DA. As células estaminais adultas estão sob intensa investigação como uma fonte potencial terapêutico de neurónios para substituir células danificadas ou mortas, em várias doenças neurológicas [76].

O sistema imunológico inato é a primeira linha de defesa vital contra uma ampla gama de patogénios e lesões dos tecidos, provocando inflamação através da ativação da microglia e dos macrófagos. Muitos estudos têm mostrado que a microglia é atraída para rodear placas de células danificadas, tanto em amostras de seres humanos com DA como em modelos animais que desenvolvem doenças relacionadas com a DA [77- 79]. No entanto, o seu papel exacto na patogénese da DA continua sem ser elucidado. Alguns estudos também têm demonstrado que a $A\beta$ pode activar a microglia para produzir citocinas e neurotoxinas, promovendo desta forma uma neurodegeneração [80- 82].

Em contrapartida, outros estudos têm sugerido que a microglia é realmente benéfica através da produção de factores neurotróficos e da eliminação da $A\beta$ tóxica por fagocitose [78, 79, 83].

Na verdade, a estimulação do sistema imunológico em modelos animais com DA apresenta redução na quantidade de $A\beta$ [78, 79]. A $A\beta$ é fagocitada pela microglia e enviada ao lisossoma, onde é posteriormente degradada []. Contudo, uma cultura primária de microglia de rato indica que essas células imunitárias residentes no sistema nervoso central (SNC) precisam ser activadas antecipadamente para adquirirem a capacidade de limpar a $A\beta$ do cérebro.

4.3. Doenças Neurodegenerativas e Metais Pesados

Existem imensas referências bibliográficas publicadas em artigos científicos indexados, que apontam a exposição crónica a metais pesados como uma das possíveis causas para as doenças neurodegenerativas em exposição laboral, apesar de alguns estudos preliminares já realizados não existirem contudo dados epidemiológicos que o confirmem. O facto deste grupo de doenças aparecerem num estágio avançado (idade) poderá de algum modo justificar que uma exposição crónica a certos agentes tóxicos, neste caso metais pesados possam estar implicados directa ou indirectamente, de uma forma sinérgica ou exclusiva. Sabe-se que uma patologia comum nas doenças neurodegenerativas é a acumulação de proteínas desorganizadas (misfold). Esta ligação proteína-proteína aberrante conduz a interações ou possíveis disrupções de muitas funções celulares. Alzheimer e Parkinson são as duas mais frequentes patologias neurodegenerativas. Sabe-se que na sua etiopatogenia está o “misfolding” e a agregação da α -sinucleína, uma proteína pré-sináptica que é abundante expressa no cérebro [86- 94].

Inúmeros estudos recentes implicam a função/disfunção da proteína α -syn com possíveis alterações do tráfico intracelular, contudo os efeitos precisos desta proteína na célula continuam ainda por clarificar. Existem algumas hipóteses de que os agregados no cérebro da proteína supra citada possam ser alvo esporádico ou continuado de factores exógenos tais como a acumulação de metais pesados, o que irá desencadear fenómenos de defeito do tráfico intracelular [95].

5. Modelo de estudo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem vindo a ser utilizada como estudo para a toxicidade da α -Syn. Este modelo de estudo é muitas vezes utilizado para estudos de stress oxidativo [95, 96].

Este modelo de estudo tem sido extensivamente usada como um organismo modelo para estudar uma grande quantidade de vias celulares graças às suas vantagens intrínsecas como sistema experimental [97].

Este eucariota unicelular tem excelente genética clássica e molecular, tem uma rápida taxa crescimento e é tratável experimentalmente, o que permite um controlo completo sobre a sua composição química e ambiente físico. Sendo um microorganismo, esta levedura partilha com as bactérias a simplicidade e rapidez de crescimento e a aptidão para métodos bioquímicos e genéticos que permite a aplicação de toda a gama de tecnologias moleculares [98- 100]. Sendo um eucariota, compartilha com seus primos multicelulares muitos processos fundamentais e a típica compartimentação celular. Portanto, as lições deste organismo são muitas vezes transponíveis para eucariotas superiores e a identificação de proteínas é particularmente mais facilitada. Mais recentemente, a levedura tem sido o principal eucariota escolhido para o desenvolvimento de metodologias para estudar as funções celulares.

A sequência completa do genoma da levedura apareceu em 1996 e foi o primeiro entre os eucariontes [101]. Isso, acrescido de técnicas de genética molecular muito eficientes, que permitam que qualquer dos 6000 genes que apresente um alelo mutante possa ser substituído, completamente apagado ou modificado genomicamente, tem impulsionado os estudos genómicos da *S. Cerevisiae* [98,100].

Por marcar genomicamente todos os “frames” de leitura abertos, por exemplo, tem sido possível determinar a expressão e localização das proteínas globais [102, 103].

Capítulo II

Objectivos

Objectivos

Existem algumas hipóteses de que o aparecimento dos agregados da proteína α -Sinucleína no cérebro possam ser alvo, esporádico ou continuado, de factores exógenos tais como a acumulação de metais pesados, o que ira desencadear fenómenos de defeito do tráfego intracelular.

Com base nesta evidência já publicada, o objectivo deste trabalho e aquilo a que o aluno se propôs neste trabalho de dissertação foi, utilizando a levedura *S. Cerevisiae* como modelo de estudo para a doença de Parkinson e Alzheimer, por técnicas de microscopia electrónica de transmissão, fazer estudo de possíveis alterações dos depósitos da proteína em estudo a nível do trafego intracelular. Essas alterações seriam evidenciadas por uma diferente distribuição (evidenciada e reconhecida pelo aparecimento de “dots/clusters”). Na tentativa de obter resultados originais foram realizadas incubações do modelo de estudo utilizado com dois dos metais contemplados na TNI o mercúrio e o chumbo. A principal tarefa era o estudo do efeito modulativo da agregação da α -Sinucleína e de que forma esta pode interferir com o tráfego vesicular no modelo de estudo.

Capítulo III

Métodos

Métodos

1. *Saccharomyces Cerevisiae*

A cadeia da cultura de células *S. Cerevisiae* wild-type usada neste estudo foi a BY4741, células VSY71 controlo e células mutantes manipuladas através de diferentes vectores (pRS426GPD_GFP).

O protocolo utilizado baseou-se na adaptação do método para leveduras de Tokuyasu [96].

1.1 *Fixação de permanganato da levedura e incorporação com resina de Spurr*

Quinze unidades equivalentes de células, com densidade óptica (OD)₆₀₀, foram suspensas em 1 mL de KMnO₄ (Sigma) gelado, a 1,5%, e transferidas para um tubo de micro-centrifugação de 1,5 mL. Depois de encher o tubo com 0,5 mL da mesma solução para excluir o ar, as amostras foram misturadas num centrifugador durante 30 minutos a 4°C. Esta operação foi repetida algumas vezes antes de lavar os aglomerados cinco vezes com 1 mL de água destilada. Em seguida, as células foram desidratadas numa quantidade crescente de acetona (10, 30, 50, 70, 90,95 e três vezes 100%) por incubação num centrifugador à temperatura ambiente, durante pelo menos 20 minutos em cada etapa. Após a centrifugação, os aglomerados foram novamente suspensos com resina Spurr a 33% em acetona e misturados no mesmo dispositivo durante uma hora, à temperatura ambiente. Esta operação foi repetida duas vezes durante a noite e sucessivamente durante todo o dia em resina de Spurr a 100%.

2. Inoculação

Neste trabalho, as células foram inoculadas com o metal HgCl_2 (cloreto de mercúrio) de $271,50 \text{ g mol}^{-1}$, na concentração de $1.6 \text{ } \mu\text{g/Kg}$, e com PbCl (cloreto de chumbo) de $278,11 \text{ g mol}^{-1}$, na concentração de 150 mg/kg . Estes valores de concentração deveram-se ao facto de serem os limites biológicos máximos de chumbo e mercúrio admitidos em Seres Humanos, descritos na bibliografia.

3. Microscopia Electrónica de Transmissão

Apos duas lavagens com tampão, as células foram centrifugadas a 250 rpm , a uma temperatura de 4° . Apos a segunda lavagem fez-se a transferência para clumps de vidro de 5 ml . De seguida procedeu-se à pós-fixação com 2 ml de OSO_4 durante uma hora, em gelo. De seguida lavou-se com ddH_2O 8 vezes, durante 10 minutos cada.

Seguidamente, realizou-se o “Enbloc STAINING”:

- lavou-se 4 vezes, durante 10 minutos, com 40 mM de maleato de sódio ($\text{pH } 6.5$);
- adicionou-se 2 ml de acetato de uranilo a 0.5% em tampão maleato de sódio a 4°C , overnight;
- de seguida efectuaram-se 4 lavagens, de 15 minutos cada, com tampão maleato.

Posteriormente fizeram-se series de desidratações:

- desidratação com ETOH 5 minutos cada passo (percentagens crescentes de etanol, 50 , 70 , 95 , e $3 \times 100\%$);

- finalização com 3 lavagens com oxido de propileno a 100%.

Infiltração:

- 2:1 PO:resina durante 1 hora;
- 1:1 PO:resina overnight;
- resina a 100% 2horas;
- colocação em capsulas que depois estiveram durante 36 horas em estufa a 60°, ao fim dos quais foram desenformadas.
- os blocos foram talhados, de seguida, e depois os cortes foram processados no ultramicrotomo para posteriormente serem colocados nas grelhas e observados ao Microscópio.

4. Informação adicional

1. Glutaraldeído

Electron Microscopy Sciences

Cat. 16320 50% solution, EM grade

2. Paraformaldeído

Electron Microscopy Sciences

Cat. 15710 16% solution, EM grade

3. Tetróxido de Ósmio

Electron Microscopy Sciences

Cat. 19170 4% aqueous solution

4. Oxido Propileno

Electron Microscopy Sciences

Cat. 20400 Plastic coated bottle, EM grade

5. EMbed-812

Electron Microscopy Sciences

Cat. 14120 1kit (BDMA)

6. Wheaton Sample vials

VWR

Cat. 66011-278 4ml capacity, caps included

Capítulo IV

Resultados

Resultados

A concentração de mercúrio utilizada nesta dissertação foi a de 1.6 µg/Kg, que consta da bibliografia internacional indexada. Feitos os cálculos, foi inoculada a concentração de 7.73×10^{-11} por placa de crescimento de levedura. Já para o nível chumbo a concentração a testar foi a de 150mg/kg.

Os resultados originais obtidos apresentar-se-ão em 3 grupos experimentais:

- 1- Grupo Controlo, onde as células de levedura foram inoculadas com tampão (veículo de transporte).
- 2- Grupo Hg, onde as células de levedura foram inoculadas com um dos metais contemplados na TNI (mercúrio).
- 3- Grupo Pb, onde as células de levedura foram inoculadas com um dos metais contemplados na TNI (Chumbo).

Comparando os resultados obtidos em cada um dos grupos experimentais com o grupo controlo, é possível reconhecer algumas alterações estruturais mais evidenciadas no grupo experimental do mercúrio. Essas alterações traduzem-se, como se evidencia na figura 4, por deposição de “dots/clusters” junto à membrana plasmática (MP). Estes artefactos são facilmente reconhecidos por uma coloração negra, comparativamente ao grupo controlo. Com relação ao grupo experimental do chumbo, o supra exposto já não é evidenciado. Contudo, é possível visualizar, em apenas algumas das imagens, uma desorganização dos organelos. Tal achado não será considerado de relevância para esta dissertação uma vez que a casuística obtida na foi considerada significativa.

1. Grupo Controlo

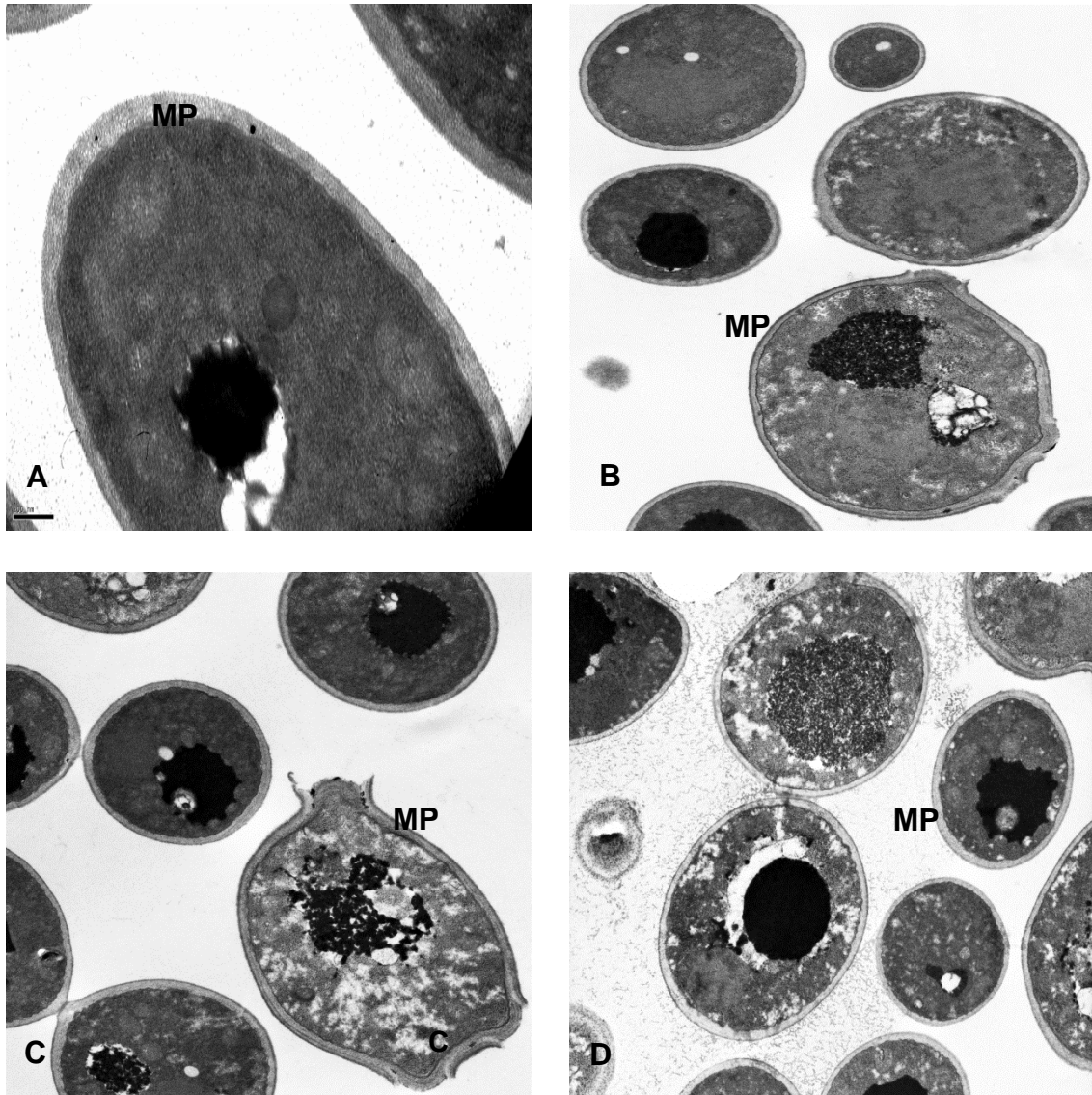
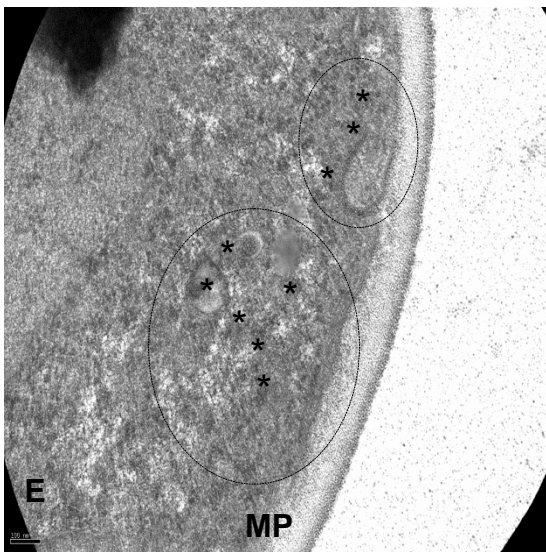
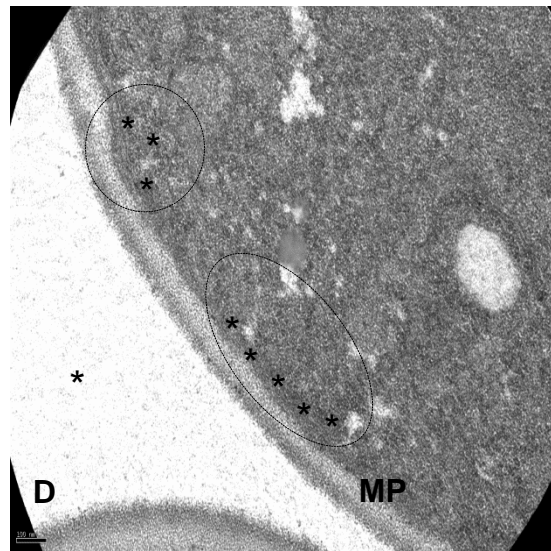
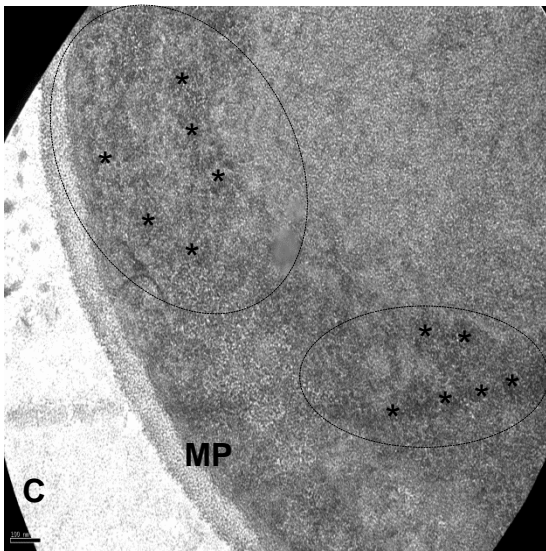
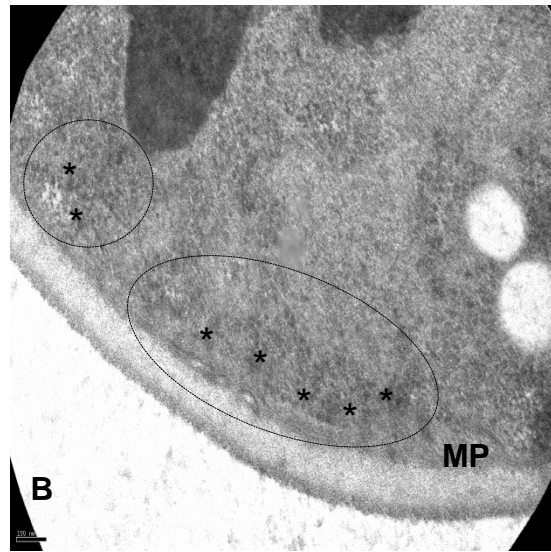
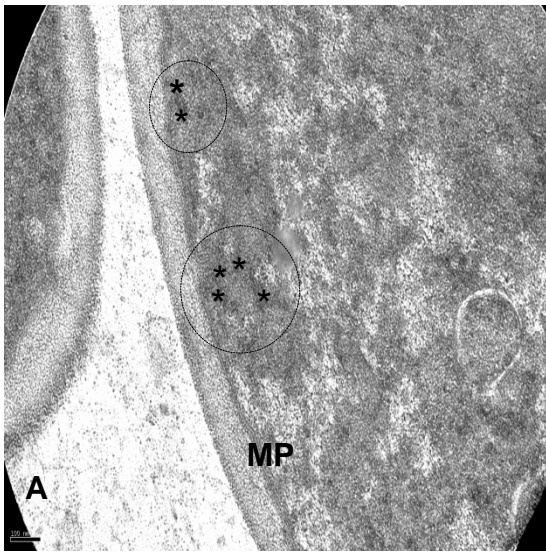


Figura 3 - Grupo Controlo, onde as células de levedura foram inoculadas com tampão. Não se verificam nenhuma alteração junto da Membrana Plasmática das células.

2. Grupo Hg



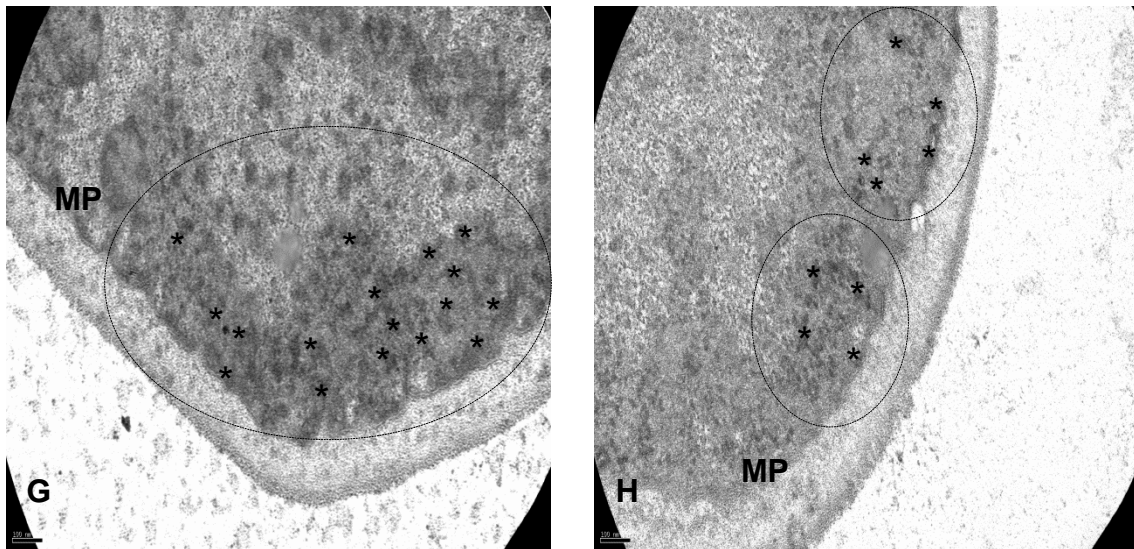
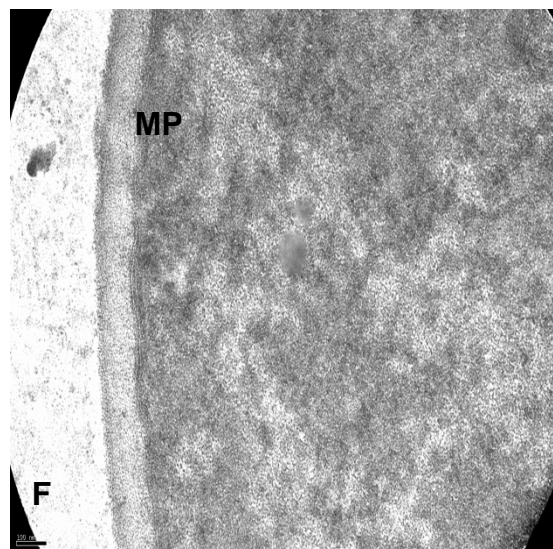
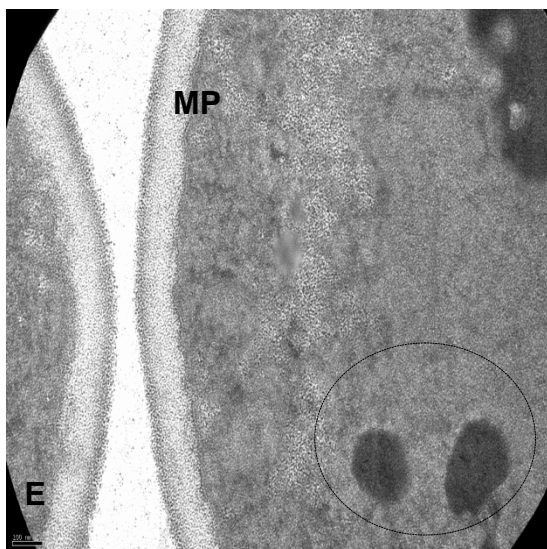
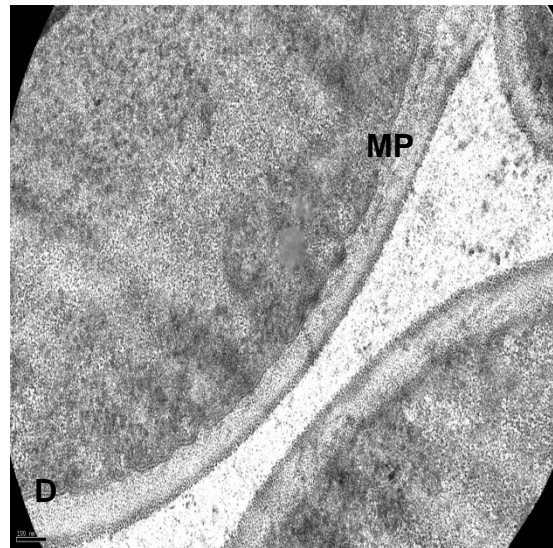
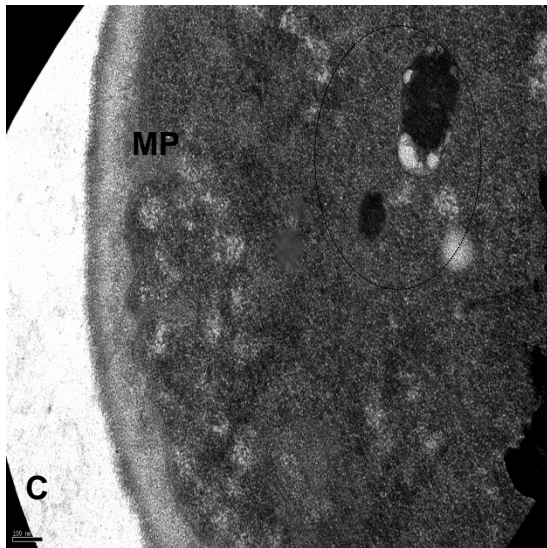
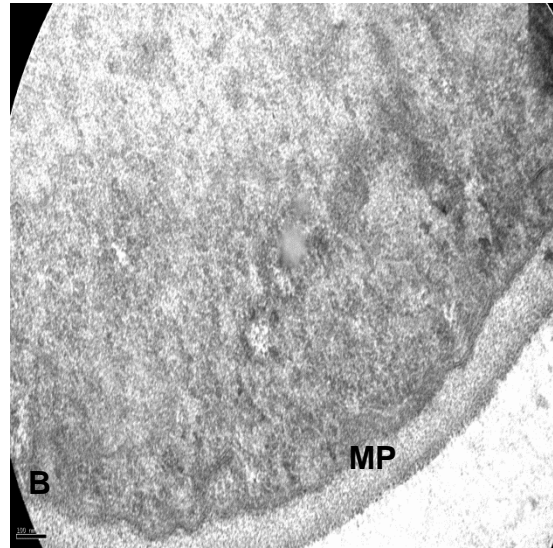
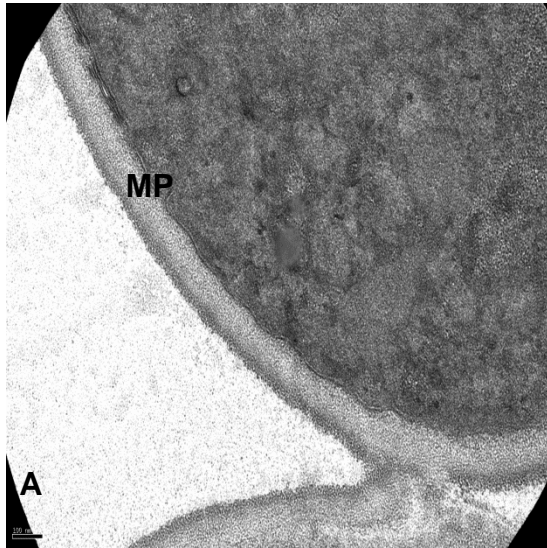


Figura 4 - Grupo Hg, onde as células de levedura foram inoculadas com mercúrio, um dos metais contemplados na TNI (1.6 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). Verificam-se algumas alterações por deposição de *dots/clusters* junto à membrana plasmática.

Estes *dots/clusters* (marcados com asteriscos) representam a desorganização da α -sinucleína, devido à inoculação das leveduras *Saccharomyces Cerevisiae* com mercúrio.

3. Grupo Pb



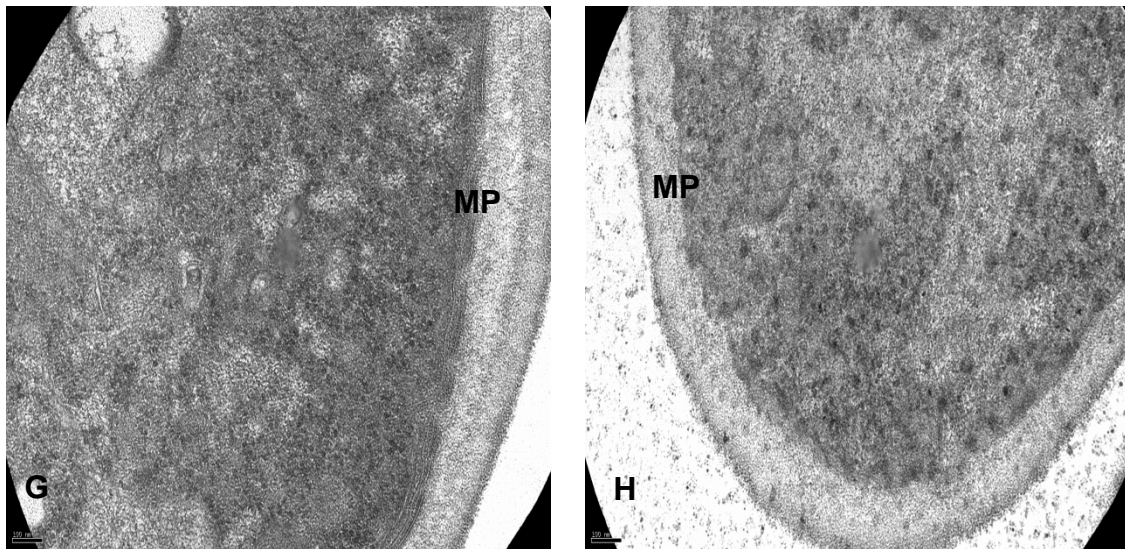


Figura 5 - Grupo Pb, onde as células de levedura foram inoculadas com chumbo, um dos metais contemplados na TNI (150mg/kg). Não se verificam grandes alterações. Contudo, é possível visualizar, em apenas algumas das imagens, uma desorganização dos organelos.

Capítulo V

Discussão

Discussão

As substâncias tóxicas têm vindo a ser usadas desde sempre. Entre os mais antigos escritos de toxicologia encontram-se os papiros do Egito. Com a evolução do conhecimento e da Ciência, muitos foram os meios utilizados para o estudo da toxicologia. Isto, levou ao seu reconhecimento aplicada às ciências forenses e criminais [1].

As Ciências Forenses são talhadas para a análise de vestígios nos mais variados tipos de crime. Esses vestígios vão desde os espécimes biológicos, a muitos outros tecidos e materiais que estão entre os tipos de evidências mais frequentemente encontrados nas cenas do crime, como armas e outros objectos. As Ciências Forenses abrangem um conjunto de áreas tão variadas como a Antropologia, Criminologia, Entomologia, Odontologia, Patologia, Genética, Psicologia ou Toxicologia que em conjunto, actuam de modo a resolver casos de carácter legal. A Toxicologia Forense é uma ciência de características essencialmente analíticas fundamental para o esclarecimento de questões jurídicas relacionadas com intoxicações, isto é, estuda os aspectos médico-legais, procurando esclarecer a causa da morte em casos de intoxicação e envenenamento [2].

O conceito de medicina legal é relativamente recente. Toda a sua complexidade: (i) levou à necessidade da estruturação da mesma em subespecialidades; (ii) os progressos científicos de variadíssimas áreas do conhecimento, permitiram uma reorganização e até mesmo uma revolução dos conceitos desta [1, 2]. Hoje em dia, técnicas tão variadas como a biologia molecular, imunohistoquímica e até mesmo a microscopia concorrem para a evolução e aperfeiçoamento dos conceitos da medicina legal e das Ciências Forenses. Neste trabalho foi utilizada a microscopia electrónica de transmissão, que consiste numa microscopia na qual um feixe de electrões é emitido na direcção de uma amostra ultra fina, interagindo com a amostra enquanto a atravessa. A interacção dos electrões transmitidos através da amostra origina uma imagem que é ampliada e focada num dispositivo de imagem [105].

A medicina do trabalho tem como principal objectivo a prevenção da saúde dos trabalhadores. Contudo, este ramo da medicina devidamente legislado pelo código do trabalho, confere as competências da química médico-legal e da possível avaliação do dano. As doenças profissionais encontram-se contempladas na tabela nacional de incapacidades. A doença profissional é a alteração da integridade psicofísica do trabalhador [104].

O objectivo desta dissertação foi, utilizando a levedura *S. Cerevisiae* como modelo de estudo para a doença de Parkinson e Alzheimer, por técnicas de microscopia electrónica de transmissão, fazer estudo de possíveis alterações dos depósitos da proteína em estudo a nível do tráfego intracelular. Esta alteração é causada pelo contacto com um agente nocivo. Dos três metais contemplados na TNI relativa a doenças profissionais, esta dissertação debruçou-se no estudo de dois deles, o mercúrio e o chumbo. São inúmeros os trabalhos que relacionam os metais pesados com as doenças neurodegenerativas, principalmente Alzheimer e Parkinson [86- 94].

A doença de Parkinson é uma desordem neurodegenerativa avançada que se define pela sua relação com a deficiência de movimento, incluindo tremor de repouso, rigidez do tónus muscular e bradicinesia [47]. À medida que a doença se desenvolve, vai afectar também várias áreas dentro do sistema nervoso central e periférico, causando sintomas adicionais não-motorizados [48]. Ao nível da patologia, esta doença é caracterizada por uma perda de neurónios dopaminérgicos na via nigroestriatal do cérebro e por a presença de corpos de Lewy e neuritos de Lewy [49], que com a progressão da doença, se espalham a partir do tronco cerebral para o córtex frontal [50]. Por sua vez, a doença de Alzheimer é a forma mais comum de insanidade mental. É caracterizada por uma perda da memória progressiva, deficit cognitivo e alterações de personalidade associados à degeneração de vários tipos de neurónios. Patologicamente, esta doença caracteriza-se pela presença de placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares [72]. A proteína amiloide β ($A\beta$), parece desempenhar um papel patogénico fundamental nesta patologia [73- 75]. Uma patologia comum nas doenças neurodegenerativas é a acumulação de proteínas desorganizadas (misfold). Esta ligação proteína-proteína aberrante conduz a interacções ou possíveis disrupções de inúmeras

funções celulares. Na etiopatogenia das doenças de Alzheimer e Parkinson está o “misfolding” e a agregação da α -sinucleína, uma proteína pré-sináptica que é abundante expressa no cérebro [86- 94]. Inúmeros estudos recentes implicam a função/disfunção da proteína α -sinucleína com possíveis alterações do tráfico intracelular [95].

O mercúrio é um metal vem sendo usado na indústria e na medicina desde há séculos [1]. Hoje em dia a exposição da população em geral surge a partir das duas formas orgânicas deste metal: o metilmercúrio (CH_3Hg^+) e o etilmercúrio ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$), que por sua vez, podem ter três proveniências distintas: o consumo de peixe contaminado, as amálgamas dentárias e algumas vacinas [104, 105]. Há muitos anos que são conhecidos casos de envenenamento por inalação de vapores de mercúrio [7]. Hoje em dia, as exposições resultantes de actividades profissionais são já muito mais controladas do que no século passado. As concentrações na urina de pessoas com amálgamas dentárias (2 a 4 mg de mercúrio por litro), são muito mais baixas do que as concentrações encontradas em pessoas que estão, pela sua actividade profissional, em contacto com o mercúrio (20 a 50 mg de mercúrio por litro), [8]. A exposição ao mercúrio pelo consumo de peixe contaminado ou a partir de amálgamas dentárias é uma questão presente há várias décadas. Já o possível risco associado ao timerosal usado em vacinas é uma questão relativamente recente. Existem estudos que abordam a possibilidade de o mercúrio e outros metais pesados estarem relacionados com as doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer ou a doença de Parkinson [16, 17]. Não existem contudo dados científicos que o justifiquem, coexistindo vários estudos nesse sentido. Estudos “*in vitro*” indicam que o mercúrio pode afectar processos bioquímicos que se acredita estarem envolvidos na doença de Alzheimer [18].

O chumbo é um metal muito conhecido e usado desde a antiguidade [1]. Através da interacção com outros elementos, dá origem a compostos tais como sulfato de chumbo, cromato de chumbo, arseniato de chumbo, dióxido de chumbo, brometo de chumbo, entre outros [5]. Apesar de não ser um elemento comum nas águas naturais, o chumbo tem sido responsável por graves problemas de intoxicação, devido ao facto de ser facilmente introduzido no

meio ambiente a partir de uma série de processos e produtos humanos, como por exemplo através da indústria de plásticos, tintas e pigmentos ou a da própria indústria metalúrgica [104]. Trata-se de um metal que tem efeito cumulativo no organismo, o que pode provocar uma doença crónica chamada saturnismo. A exposição crónica poderá dever-se a três situações: ocupacional, ambiental e alimentar. Segundo o Instituto Regulador de Águas e Resíduos (IRAR), na recomendação nº 02/2005, o teor máximo de chumbo na água de abastecimento deverá ser 0.025 mg/L até 25 de Dezembro de 2013 e 0.01 mg/L depois desta data. Este valor, que se aplica a um consumo médio mensal, foi estabelecido com vista a assegurar a protecção da saúde humana.

Neste trabalho, as células foram inoculadas com o metal HgCl₂ (cloreto de mercúrio) de 271,50 g mol⁻¹, na concentração de 1.6 µg/Kg, e com PbCl₂ (cloreto de chumbo) de 278,11 g mol⁻¹, na concentração de 150mg/kg. Estes valores de concentração deveram-se ao facto de serem os limites biológicos máximos de chumbo e mercúrio admitidos em Seres Humanos, descritos na bibliografia.

Este trabalho apresenta resultados originais da aplicação da microscopia electrónica de transmissão no estudo dos metais pesados, chumbo e mercúrio, no âmbito da possível relação destes com as doenças neurodegenerativas de Alzheimer e Parkinson. Existem já alguns estudos realizados, como atrás se faz referência, da possível relação da exposição laboral crónica e do aparecimento destas doenças neurodegenerativas. Apesar de não existirem evidências nem resultados científicos que o corroborem, este trabalho contribui com os seguintes dados: verificam-se algumas alterações por deposição de “dots/clusters” junto à membrana plasmática. Estes “dots/clusters” representam a desorganização da α -sinucleína, devido à inoculação das leveduras *Saccharomyces Cerevisiae* com mercúrio.

Pela visualização destes achados microscópicos, é possível contribuir com mais um dado no universo dos metais pesados e das doenças neurodegenerativas. Uma vez que, a α -sinucleína é o principal componente estrutural dos corpos de Lewy, que são inclusões citoplasmáticas intraneuronais existentes no sistema nervoso central, cuja presença

acompanhada de perda de neurónios dopaminérgicos representa a característica patológica de uma doença neurodegenerativa [95].

O modelo de estudo também aqui utilizado da *Saccharomyces Cerevisiae*, que é comumente usado como um organismo modelo para estudar uma grande quantidade de vias celulares graças às suas vantagens intrínsecas como sistema experimental [97], provou ser um excelente modelo de estudo para possíveis futuros estudos da relação da cronicidade da exposição dos metais pesados (pela actividade laboral) e o possível aparecimento de doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson.

Capítulo VI

Conclusão

Conclusão

Encontra-se já documentado o efeito da toxicidade dos metais pesados contemplados na TNI e os efeitos nefastos da sua exposição crónica. Esta dissertação contribui com dados originais, que vêm corroborar o já descrito na bibliografia:

- (i) A susceptibilidade da α -sinucleína aos metais pesados, mais especificamente ao Hg;
- (ii) A inoculação de um modelo de estudo, a levedura, com um metal pesado, Hg, resulta num aparecimento, evidenciado por microscopia electrónica de transmissão, de uma desorganização da α -sinucleína.

O facto de a α -sinucleína ser o principal componente estrutural dos corpos de Lewy, cuja presença acompanhada de perda de neurónios dopaminérgicos representa a característica patológica de uma doença neurodegenerativa e, a evidencia da desorganização e/ou marcação mais evidenciada desta proteína neste modelo de estudo utilizado, aquando da inoculação com o metal pesado contemplado na TNI que se sabe que tem uma acção em processos bioquímicos que se acredita estarem envolvidos na doença de Alzheimer vem corroborar o já descrito na bibliografia da possível relação entre o mercúrio e as doenças neurodegenerativas.

Capítulo VII

Bibliografia

Bibliografia

1. “Origens da Medicina Legal”, Sebenta Pós-graduação em medicina-legal do Prof. Doutor Pinto da Costa, Porto, 2003.
2. “Clínica Médico-Legal”, Sebenta Curso Superior de medicina-legal da Prof. Doutora Maria José Carneiro de Sousa ([www.idict.igt.gov.pt-Inspeção-Geral do Trabalho](http://www.idict.igt.gov.pt-Inspeção-Geral-do-Trabalho))]
3. Soriano C., Creus A., Marcos R. (2007). Gene mutation induction by arsenic compounds in the mouse lymphoma assay. *Mutation Research*; 634: 40–50
4. Burbure, C., Buchet, J., Leroyer, A., Nisse, C., Haguenoer, J., Mutti, A., Smerhovsky, Z., Cikrt, M., Ochocka, T., Razniewska, G., Jakubowski, M., Bernard, A. (2006). Renal and Neurologic Effects of Cadmium, Lead, Mercury and Arsenic in Children: Evidence of Early Effects and Multiple Interactions at the Environmental Exposure Levels. *Environmental Health Perspectives*, Volume 114, nº 4, p.584-590. Bruxelas.
5. Spínola et al., 1980 in *Cadernos de Saúde Pública*, vol.11 n.º2 Rio de Janeiro, Abril/Junho, 1995.
6. Clarkson TW, Magos L, Myers GJ. 2003. The toxicology of mercury. Current Exposures and clinical manifestations. *The New England Journal of Medicine*, 349, 1731-1737.
7. Ramazzini B. 1964. *Disease of workers*. Wright WC, trans. New York: Hafner Publishing.
8. Santos EO, Jesus IM, Câmara Vde M, Brabo Eda S, Jesus MI, Fayal KF, Asmus CI. 2007. Correlation between blood mercury levels in mothers

- and newborns in Itaituba, Pará State, Brazil. *Cadernos Saúde Pública*, 23, 622-629.
9. Havarinasab S, Häggqvist B, Björn E, Pollard KM, Hultman P. 2005. Immunosuppressive and autoimmune effects of thimerosal in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204, 109-121.
 10. Pinheiro MC, Guimarães GA, Nakanishi J, Oikawa T, Vieira JL, Quaresma M, Cardoso B, Amoras W. 2000. Total mercury in hair samples of inhabitants of Tapajós River, Para State, Brasil. *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical*, 33, 181-184.
 11. Sigeyuki A, Eto K, Kurisaki E, Gunji H, Hiraiwa K, Sato M, Hasuike M, Hagiwara N, Wakasi H. 2000. Acute inorganic mercury vapor inhalation poisoning. *Pathology International*, 50, 169-174.
 12. Tsugane S, Kondo H. 1987. The mercury content of hair of Japanese immigrants in various location in South America. *Science of the Total Environment*, 63, 69-76.
 13. Gossel TA, Bricker JD. 1990. *Principles of Clinical Toxicology*. 2nd ed. New York: Raven Press.
 14. Riley DM, Newby CA, Leal-Almeraz TO, Thomas VM. 2001. Assessing elemental mercury vapour exposure from cultural and religious practices. *Environmental Health Perspectives*, 109, 770-784.
 15. Goldwater LJ. 1972. *Mercury: a history of quicksilver*. Baltimore: York Press.
 16. Ahlqwist M, Bengtsson C, Lapidus L, Gergdahl IA, Schutz A. 1999. Serum mercury concentration in relation to survival symptoms and disease: results from the prospective population study of women in Gothenburg, Sweden. *Acta Odontologica Scandinavica*, 57, 168-174.

17. Bjorkman L, Pedersen NL, Lichtenstein P. 1996. Physical and mental health related to dental amalgam fillings in Swedish twins. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 24, 260-267.
18. Leong CC, Syed NI, Lorscheider FL. 2001. Retrograde degeneration of neurite membrane structural integrity of nerve growth cones following in vitro exposure to mercury. *Neuroreport*, 12, 733-737.
19. Gioda A, Hanke G, Elias-Boneta A, Jiménez-Velez B. 2007. A pilot study to determine mercury exposure through vapor and bound to PM10 in a dental school environment. *Toxicology and Industrial Health*, 23, 103-113.
20. Kingman A, Albertini T, Brown LJ. 1998. Mercury concentrations in urine and whole blood associated with amalgam exposure in a military population. *Journal of Dental Research*, 77, 461-471.
21. Grandjean P, Weihe P, Jorgensen PJ, Clarkson T, Cernichiari E, Videro T. 1991. Impact of maternal seafood diet on fetal exposure to mercury, selenium and lead. *Archives of Environmental Health*, 47, 185-195.
22. Carvalho CM, Matos AI, Mateus ML, Santos AP, Batoreu MC. 2008. High-fish consumption and risk prevention: assessment of exposure to methylmercury in Portugal. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A*, 71, 1279-1288.
23. Hunter D. 1969. *The disease of occupations*. 4th ed. London: English Universities Press, 221-241.
24. Eto K, Oyanagi S, Itai Y, Tokunaga H, Takizawa Y, Suda I. 1992. A fetal type of minamata disease: an autopsy case report with special reference to the nervous system. *Molecular and Chemical Neuropathology*, 16, 171-186.

25. Bakir F, Damluji SF, Amin-Zaki L, Murtadha M, Khalidi A, al-Rawi NY, Tikriti S, Dahahir HI, Clarkson TW, Smith JC, Doherty RA. 1973. Methylmercury poisoning in Iraq. *Science*, 181, 230-241.
26. Lange TR, Royals HE, Connor LL. 1994. Mercury accumulation in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) in a Florida lake. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 27, 466-471.
27. Hacon S, Barrocas PR, Vasconcellos AC, Barcellos C, Wasserman JC, Campos RC, Ribeiro C, Azevedo-Carlioni FB. 2008. Na overview of mercury contamination research in the Amazon basin with na emphasis on Brazil. *Cadernos de Saude Publica*, 24, 1479-1492.
28. Guallar E, Sanz-Gallardo MI, van't Veer P, Aro A, Gómez-Aracena J, Kark JD, Riemersma RA, Martín-Moreno JM, Kok FJ. 2002. Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction. *The New England Journal of Medicine*, 347, 1747- 1754.
29. Yoshizawa K, Rimm EB, Morris JS, Spate VL, Hsieh CC, Spiegelman D, Stampfer MJ, Willett WC. 2002. Mercury and the risk of coronary heart disease in men. *The New England Journal of Medicine*, 347, 1755-1760.
30. Kjellstrom T, Kennedy P, Wallis S. 1989. Physical and mental development of children with prenatal exposure to mercury from fish. Stage 2. Interviews and psychological tests at age 6. Report n. 3642. Solna, Sweden: Solna national Swedish Environmental Board.
31. Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K, Murata K, Sorensen N, Dahl R, Jorgensen PJ. 1997. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicology and Teratology*, 19, 417-428.
32. Sikorski R, Juskiewicz T, Paszkowski T, Szprengier-Juskiewicz T. 1987. Women in dental surgeries: reproductive hazards in occupational

- exposure to metallic mercury. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 59, 551-557.
33. Trzcinka-Ochocka M, Gazewski A, Brodzka R. 2007. Exposure to mercury vapors in dental workers in Poland, *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 20, 147-153.
34. Maramba NP, Reyes JP, Francisco-Rivera AT, Panganiban LC, Dioquino C, Dando N, Timbang R, Akagi H, Castillo MT, Quitariano C, Afuang M, Matsuyama A, Eguchi T, Fuchigami. 2006. Environmental and human exposure assessment monitoring of communities near an abandoned mercury mine in the Philippines: A toxic legacy. *Journal of Environmental Management*, 81, 135-145
35. Faria Mde A. 2003. Chronic occupational metallic mercurialism. *Revista de Saude Publica*, 37, 116-127.
36. Brandão R, Santos FW, Zeni G, Rocha JB, Nogueira CW. 2006. DMPS and Nacetylcysteine induced renal toxicity in mice exposed to mercury. *Biometals*, 19, 389-398.
37. Shenker BJ, Berthold P, Decker S, Mayro J, Rooney C, Vitale L, Shapiro IM. 1992. Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. II. Alterations in cell viability. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 14, 555-577.
38. Kim SH, Sharma RP. 2004. Mercury-induced apoptosis and necrosis in murine macrophages: role of calcium-induced reactive oxygen species and p38 mitogenactivated protein kinase signaling. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196, 47-57.
39. Milaeva E, Petrosvan V, Berberova N, Pimenov Y, Pellerito L. 2004. Organic derivatives of mercury and tin as promoters of membrane lipid peroxidation. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 69-91.

40. Magos L. 2001. Review on the toxicity of ethylmercury, including its presence as a preservative in biological and pharmaceutical preparations. *Journal of Applied Toxicology*, 21, 1-5.
41. Clarkson TW. 2002. The three modern faces of mercury. *Environmental Health Perspectives*, 110, 11-23.
42. Ball LK, Ball R, Pratt RD. 2002. An Assessment of thimerosal use in childhood vaccines, *Pediatrics*, 109, 1153-1159.
43. Pichichero ME, Cernichiari E, Lopricato J, Treanor J. 2002. Mercury concentrations and metabolism in infants receiving vaccines containing thimerosal: a descriptive study. *Lancet*, 360, 1737-1741.
44. Hughes JR. 2008. A review of recent reports in autism: 1000 studies published in 2007. *Epilepsy & Behavior*, Jul 30 (in press).
45. Del Vecchio FB, Corrente JE, Gonçalves A, Faria MM, Padovani CR, Vilarta R. 2007. Multivariate analysis of the interaction between quality of life and physical capacities for people occupationally intoxicated by mercury. *Acta Médica Portuguesa*, 20, 131-137.
46. Serrao R, Zirwas M, English JC. 2007. Palmar erythema. *American Journal of Clinical Dermatology*, 8, 347-356.
47. Fahn S, Sulzer D (2004) Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. *Neuro Rx* 1: 139–154.
48. Poewe W (2007) Dysautonomia and cognitive dysfunction in Parkinson's disease. *Mov Disord* 22 Suppl 17: S374–378.
49. Cookson MR, van der Brug M (2008) Cell systems and the toxic mechanism(s) of alpha-synuclein. *Exp Neurol* 209: 5–11.

-
50. Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, Bratzke H, Del Tredici K (2004) Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 318: 121–134.
51. Lim KL, Dawson VL, Dawson TM. 2003. The cast of molecular characters in Parkinson's disease: felons, conspirators, and suspects. *Ann N Y Acad Sci.* 991:80-92.
52. Lee VM, Trojanowski JQ (2006) Mechanisms of Parkinson's disease linked to pathological alpha-synuclein: new targets for drug discovery. *Neuron* 52: 33–38.
53. Moore DJ, West AB, Dawson VL, Dawson TM (2005) Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Ann Rev Neurosci* 28: 57–87.
54. Hardy J, Cai H, Cookson MR, Gwinn-Hardy K, Singleton A (2006) Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism. *Ann Neurol* 60: 389–398.
55. Duda JE, Lee VM, Trojanowski JQ (2000) Neuropathology of synuclein aggregates. *J Neurosci Res* 61: 121–127.
56. Klein C and Lohmann-Hedrich K. 2007. Impact of recent genetic findings in Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurology.* 20:453-464.
57. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, et al. (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388: 839–840.
58. Goedert M (2001) Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2: 492–501.
59. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, et al. (2003) alpha- Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302: 841.

60. Gitler AD, Bevis BJ, Shorter J, Strathearn KE, Hamamichi S, et al. (2008) The Parkinson's disease protein alpha-synuclein disrupts cellular Rab homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 145–150.
61. Ben Gedalya T, Loeb V, Israeli E, Altschuler Y, Selkoe DJ, et al. (2009) Alphasynuclein and polyunsaturated fatty acids promote clathrin-mediated endocytosis and synaptic vesicle recycling. *Traffic* 10: 218–234.
62. Nemani VM, Lu W, Berge V, Nakamura K, Onoa B, et al. (2010) Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis. *Neuron* 65: 66–79.
63. El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, Cooper LJ, Fullwood NJ, et al. (2003) Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *Faseb J* 17: 1945–1947.
64. Barbour R, Kling K, Anderson JP, Banducci K, Cole T, et al. (2008) Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood. *Neurodegener Dis* 5: 55–59.
65. Hoepken HH, Gispert S, Azizov M, Klinkenberg M, Ricciardi F, et al. (2008) Parkinson patient fibroblasts show increased alpha-synuclein expression. *Exp Neurol* 212: 307–313.
66. Kawashima M, Suzuki SO, Doh-ura K, Iwaki T (2000) alpha-Synuclein is expressed in a variety of brain tumors showing neuronal differentiation. *Acta Neuropathol* 99: 154–160.
67. Fung KM, Rorke LB, Giasson B, Lee VM, Trojanowski JQ (2003) Expression of alpha-, beta-, and gamma-synuclein in glial tumors and medulloblastomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 106: 167–175.

68. Bruening W, Giasson BI, Klein-Szanto AJ, Lee VM, Trojanowski JQ, et al. (2000). Synucleins are expressed in the majority of breast and ovarian carcinomas and in preneoplastic lesions of the ovary. *Cancer* 88: 2154–2163.
69. Ye Q, Wang TF, Peng YF, Xie J, Feng B, et al. (2010) Expression of alpha-, beta- and gamma-synuclein in colorectal cancer, and potential clinical significance in progression of the disease. *Oncol Rep* 23: 429–436.
70. Matsuo Y, Kamitani T (2010) Parkinson's disease-related protein, alphasynuclein, in malignant melanoma. *PLoS One* 5: e10481.
71. Staropoli JF (2008) Tumorigenesis and neurodegeneration: two sides of the same coin? *Bioessays* 30: 719–727.
72. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: Genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 2001;81:741–766.
73. Hutton M, McGowan E. Clearing tau pathology with abeta immunotherapy – reversible and irreversible stages revealed. *Neuron* 2004;43:293–294.
74. Busciglio J, Lorenzo A, Yeh J et al. Beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* 1995;14: 879–888.
75. Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 2004;430:631–639.
76. Bantubungi K, Blum D, Cuvelier L et al. Stem cell factor and mesenchymal and neural stem cell transplantation in a rat model of Huntington's disease. *Mol Cell Neurosci* 2008;37:454–470.

77. Wegiel J, Wang KC, Imaki H et al. The role of microglial cells and astrocytes in fibrillar plaque evolution in transgenic APP(SW) mice. *Neurobiol Aging* 2001;22:49–61.
78. Malm TM, Koistinaho M, Parepalo M et al. Bone-marrow-derived cells contribute to the recruitment of microglial cells in response to beta-amyloid deposition in APP/PS1 double transgenic Alzheimer mice. *Neurobiol Dis* 2005;18:134–142.
79. Simard AR, Soulet D, Gowing G et al. Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* 2006;49:489–502.
80. Coraci IS, Husemann J, Berman JW et al. CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta amyloid fibrils. *Am J Pathol* 2002;160:101–112.
81. El Khoury JB, Moore KJ, Means TK et al. CD36 mediates the innate host response to beta amyloid. *J Exp Med* 2003;197:1657– 1666.
82. Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI et al. Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature* 1995;374: 647–650.
83. Lee JK, Jin HK, Bae JS. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduce brain amyloid-beta deposition and accelerate the activation of microglia in an acutely induced Alzheimer's disease mouse model. *Neurosci Lett* 2009;450:136–141.
84. Rogers J, Strohmeyer R, Kovelowski CJ et al. Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia* 2002;40:260–269.

85. Chung H, Brazil MI, Soe Ttet al. Uptake, degradation, and release of fibrillar and soluble forms of Alzheimer's amyloid beta peptide by microglial cells. *J Biol Chem* 1999;274:32301–32308.
86. Anderson JP, Walker DE, Goldstein JM, et al. Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. *J Biol Chem* 2006; 281:29739-29752.
87. Arawaka S, Wada M, Goto S, Karube H, Sakamoto M, Ren CH, Koyama S, Nagasawa H, Kimura H, Kawanami T, Kurita K, Tajima K, Daimon M, Baba M, Kido T, Saino S, Goto K, Asao H, Kitanaka C, Takashita E, Hongo S, Nakamura T, Kayama T, Suzuki Y, Kobayashi K, Katagiri T, Kurokawa K, Kurimura M, Toyoshima I, Niizato K, Tsuchiya K, Iwatsubo T, Muramatsu M, Matsumine H, Kato T. 2006 The role of G-protein-coupled receptor kinase 5 in pathogenesis of sporadic Parkinson's disease. *J Neurosci.* 26:9227-38.
88. Bollen M, 2001 Combinatorial control of protein phosphatase-1. *Trends Biochem Sci.* 26:426-31.
89. Chen L and Feany MB, 2005. Alpha-synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a *Drosophila* model of Parkinson disease. *Nat Neurosci.* 8:657-63.
90. Flower TR, Chesnokova LS, Froelich CA, Dixon C, Witt SN. 2005. Heat shock prevents alpha-synuclein-induced apoptosis in a yeast model of Parkinson's disease. *J Mol Biol.* 351:1081-100.
91. Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, Iwatsubo T. (2002) Alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol.* 4:160-164.

92. Gibbons JA, Kozubowski L, Tatchell K, Shenolikar S. 2007. Expression of human protein phosphatase-1 in *Saccharomyces cerevisiae* highlights the role of phosphatase isoforms in regulating eukaryotic functions. *J Biol Chem.* 282:21838-47.
93. Hirai Y, Fujita SC, Iwatsubo T, Hasegawa M. 2004. Phosphorylated alpha-synuclein in normal mouse brain. *FEBS Letters* 572:227-232.
94. Kim SI, Voshol H, van Oostrum J, Hastings TG, Cascio M, Glucksman MJ. 2004. Neuroproteomics: expression profiling of the brain's proteomes in health and disease. *Neurochem Res.* 29:1317-31.
95. Outeiro TF, Lindquist S. 2003. Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science.* 302:1772-5.
96. Griffith J, Mari M, De Mazière A, and Reggiori F, 2008. A Cryosectioning Procedure for the Ultrastructural Analysis and the Immunogold Labelling of Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic.* 9:1060-72.
97. Botstein D, Fink GR. Yeast: an experimental organism for modern biology. *Science* 1988;240:1439–1443
98. Sherman F. Yeast Genetics. Weinheim, Germany: VCH Publisher; 1997. Guthrie C, Fink GR.
99. Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology. Part C. San Diego: Elsevier; 2002.
100. Johnston JR. Molecular Genetics of Yeast: A Practical Approach. Oxford: Oxford University Press; 1994.
101. Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW,

- Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H et al. Life with 6000 genes. *Science* 1996;274:546, 563–547.
102. Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephore N, O'Shea EK, Weissman JS. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 2003;425:737–741.
103. Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS, O'Shea EK. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 2003;425:686–691.
104. Mónica Elisabete da Silva Cunha. 2004. Método de detecção de mercúrio e outros metais (SEM-XRM), Importância Médico-Legal. Mestrado em Medicina Legal. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade do Porto. Porto.
105. Mónica Elisabete da Silva Cunha. 2008. Interação entre Mercúrio e Sistemas Biológicos. Dissertação de Doutoramento. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade do Porto. Porto.