UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação dos efeitos tóxicos resultantes da exposição crônica a baixas doses de chumbo e metilmercúrio, associados ou não, e do possível efeito protetor da niacina diante desta exposição

Eloísa Silva de Paula

Ribeirão Preto

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação dos efeitos tóxicos resultantes da exposição crônica a baixas doses de chumbo e metilmercúrio, associados ou não, e do possível efeito protetor da niacina diante desta exposição

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Eloísa Silva de Paula

Coorientadora: Profa. Dra. Denise Grotto

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Ribeirão Preto

2016

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

De Paula, Eloísa Silva

Avaliação dos efeitos tóxicos resultantes da exposição crônica a baixas doses de chumbo e metilmercúrio, associados ou não, e do possível efeito protetor da niacina diante desta exposição. Ribeirão Preto, 2016.

72 p.: il.; 30 cm.

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

Orientador: Barbosa Júnior, Fernando.

1. Estresse Oxidativo. 2. Genotoxicidade. 3. Antioxidante. 4. Metais tóxicos. 5. Vitamina B3. 6. Ácido nicotínico.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Eloísa Silva de Paula

Avaliação dos efeitos tóxicos resultantes da exposição crônica a baixas doses de chumbo e metilmercúrio, associados ou não, e do possível efeito protetor da niacina diante desta exposição

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

Área de Concentração: Toxicologia.

Coorientadora: Profa. Dra. Denise Grotto

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho à minha mãe Rosa (*in memoriam*), minha maior lembrança de amor! E ao meu pai Hermínio, meu exemplo de honestidade, simplicidade e dedicação!

Agradecimentos

Agradeço,

A Deus, por iluminar meu caminho e minhas decisões e pelas inúmeras conquistas que tem me proporcionado.

Aos meus pais Hermínio e Rosa (*in memoriam*), fonte de todo apoio incondicional durante minha caminhada.

À minha tia Lucinda, por não medir esforços para me ajudar e ser como uma segunda mãe em minha vida.

Ao meu querido e amado Gabriel, pelo amor, carinho, compreensão e cumplicidade. Obrigada pela paciência, pelo apoio, pelos momentos especiais e sonhos que compartilhamos.

A todos meus especiais amigos Maria Elvira, Letícia Nacano, Rafhaella Cedro, Marcelo Moraes, Maria Fernanda, Denise e Juliana Oliveira, por todos os momentos juntos.

Ao meu orientador Professor Fernando Barbosa Júnior, pelos ensinamentos, dedicação, confiança e pela grande oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa.

À minha coorientadora Denise Grotto, pelo apoio, amizade, incentivo e ensinamentos.

A todos os meus companheiros do laboratório que fizeram parte desta caminhada. Em especial à Maria Fernanda, Juliana Oliveira, Vanessa Souza, Kátia Marco, Bruno Lemos, Denise Grotto, Ailton Junior, Gustavo Barcelos, Ana Carolina Paulelli, Ana Paula Poles, Vânia de Rezende, Vinícius e Aline Santana. Obrigada a todos pela recepção amigável, pela paciência e auxílio nos experimentos.

À Vanessa pela amizade, sugestões, atenção, auxílio nos experimentos e dedicação ao Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido a esse estudo.

E a todos que não estão presentes nestas linhas, mas que, direta ou indiretamente, participaram da minha caminhada desde a graduação até a defesa desta tese de doutorado.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.” – **Paulo Freire** (1921-1997)

RESUMO

DE PAULA, E. S. **Avaliação dos efeitos tóxicos resultantes da exposição crônica a baixas doses de chumbo e metilmercúrio, associados ou não, e do possível efeito protetor da niacina diante desta exposição.** 2016. 72f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

No Brasil, populações ribeirinhas da Amazônia estão expostas ao metilmercúrio (MeHg) e ao chumbo (Pb) oriundos, respectivamente, de peixes e farinha de mandioca contaminados. Embora a toxicidade destes elementos químicos seja explorada há tempo, pouco se sabe sobre os efeitos decorrentes da exposição crônica a baixas doses destes toxicantes e, menos ainda, acerca da exposição simultânea a estes dois metais. Neste sentido, este trabalho foi desenvolvido objetivando avaliar a ocorrência de efeitos bioquímicos, genotóxicos e relacionados ao estresse oxidativo, decorrentes da exposição crônica de ratos a baixas doses de MeHg e Pb, associados ou não, bem como a distribuição tecidual destes metais. Adicionalmente, foram investigados os efeitos da administração da vitamina antioxidante niacina (NA) diante destas exposições. Para isto, ratos machos *Wistar* foram divididos em 8 grupos ($n = 6$): Grupo controle; Grupo MeHg, tratado com cloreto de MeHg (140 $\mu\text{g/Kg/dia}$) por gavagem; Grupo Pb, tratado com acetato de Pb (648 $\mu\text{g/Kg/dia}$) por gavagem; Grupo MeHg + Pb, tratado com MeHg (140 $\mu\text{g/Kg/dia}$) e Pb (648 $\mu\text{g/Kg/dia}$) por gavagem. Grupos paralelos (NA; NA + MeHg; NA + Pb e NA + MeHg + Pb) receberam o mesmo tratamento associado à suplementação de niacina (50 mg/Kg/dia) adicionada na água. O tratamento teve duração de 92 dias. Foram avaliados os parâmetros bioquímicos colesterol total e frações, glicose, atividade das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), e hemoglobina. Os marcadores relacionados ao estresse oxidativo determinados foram tióis totais (GSH); lipoperoxidação, avaliada pela concentração de malondialdeído (MDA) e espécies reativas ao ácido barbitúrico (TBARS); além da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT). Ainda, foi avaliada a concentração de óxido nítrico (NO) plasmático e a genotoxicidade por meio do Ensaio Cometa. As concentrações de mercúrio (Hg) e Pb foram determinadas em sangue total e tecidos dos animais por ICP-MS. A exposição a baixas doses de MeHg causou genotoxicidade, redução na atividade da CAT no cérebro e nas concentrações de GSH no sangue e fígado dos animais, além de peroxidação lipídica, evidenciada pelo aumento nas concentrações de MDA e TBARS no plasma e cérebro dos ratos. Os animais expostos exclusivamente ao MeHg apresentaram ainda atividade de ALT aumentada e concentração plasmática de NO reduzida. A distribuição do Hg no organismo foi maior no rim, seguido por sangue e, posteriormente, cérebro. A exposição exclusivamente ao Pb promoveu redução na concentração de GSH e na atividade de CAT, além de induzir peroxidação lipídica no cérebro dos ratos. A exposição ao Pb também resultou em genotoxicidade, além de redução na concentração de hemoglobina e NO. As maiores concentrações de Pb foram observadas no osso (fêmur) > rim > cérebro > sangue. A exposição simultânea ao MeHg e Pb não resultou em sinergismo de efeitos tóxicos em comparação ao tratamento com os metais individualmente. Considerando parâmetros como concentração plasmática de NO e GSH no sangue, fígado e cérebro, a exposição

conjunta aos metais antagonizou os efeitos desencadeados por cada metal individualmente. Entretanto, a coexposição MeHg/Pb também promoveu genotoxicidade e lipoperoxidação. Já a administração de niacina apresentou efeitos protetores frente às alterações desencadeadas pela exposição aos metais, sem alterar a concentração e distribuição destes nos órgãos/tecidos. Em resumo, nossos resultados mostram que a exposição ao MeHg e Pb, até mesmo em doses baixas, induz toxicidade em roedores. Visto que a niacina apresentou efeitos antioxidantes e antígenotóxicos relevantes, a suplementação com esta vitamina pode ser uma alternativa para amenizar os efeitos tóxicos decorrentes da exposição ao MeHg e/ou Pb.

Palavras-chave: Estresse oxidativo, genotoxicidade, antioxidante, metais tóxicos, vitamina B3, ácido nicotínico.

ABSTRACT

DE PAULA, E. S. **Evaluation of toxic effects of chronic exposure at low doses of lead and methylmercury, associated or not, and the possible protective effect of niacin on this exposure.** 2016. 72f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

In Brazil, riverside populations of the Amazon are exposed to methylmercury (MeHg) and lead (Pb) coming respectively from contaminated fish and cassava flour. Although the toxicity of these elements has been explored for some time, little is known about the effects of chronic exposure at low doses and even less about the simultaneous exposure. Thus, this work aimed to evaluate the occurrence of biochemical, genotoxic and oxidative stress related effects, resulting from chronic exposure of rats at low doses of MeHg and Pb, associated or not, as well as the tissue distribution of these elements. Additionally, the effects of co-administration of the antioxidant vitamin niacin (NA) on the toxic effects were investigated. For this, male *Wistar* rats were divided into 8 groups (n = 6): Control group; MeHg group, received MeHg chloride (140 µg/Kg/day) by gavage; Pb group, received Pb acetate (648 µg/Kg/day) by gavage; MeHg + Pb group, received MeHg (140 µg/Kg/day) and Pb (648 µg/Kg/day) by gavage. Parallel groups (NA; NA + MeHg; NA + Pb and NA + MeHg + Pb) received the same treatment associated with niacin supplementation (50 mg/kg/day) added to the water. The treatment lasted 92 days. Biochemical parameters such as total and fractions cholesterol, glucose, hepatic enzyme activity such as aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT), and hemoglobin were determined. Oxidative stress markers such as total thiols (GSH); lipid peroxidation, measured by malondialdehyde (MDA) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) concentrations; besides the activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) antioxidant enzymes were evaluated in treated and non-treated animals. Also, the concentration of plasmatic nitric oxide (NO) and genotoxicity by the Comet Assay was assessed. Levels of mercury (Hg) and Pb were determined in whole blood and tissues of animals by ICP-MS. Low doses of exposure to MeHg caused reduction of CAT activity in the brain and reduction of GSH concentrations in the blood and liver of animals, besides genotoxicity and lipid peroxidation, as evidenced by the increase levels of MDA and TBARS in plasma and brain of rats. Animals exposed to MeHg still had increased ALT activity and decreased plasmatic NO levels. Levels of Hg were found higher in kidney, followed by blood and brain. Pb exposure alone promoted reduction of GSH concentration and CAT activity, and induced lipid peroxidation in the brain of rats. Moreover, genotoxicity, and reduction of hemoglobin and plasmatic NO levels were also observed in the group of animals treated only with Pb. The highest Pb levels were observed in bone (femur) > kidney > brain > blood. Simultaneous exposure to MeHg and Pb did not result in synergistic toxic effects. Considering parameters such as plasmatic NO and GSH levels in blood, liver and brain, the joint exposure to metals antagonized the effects produced by each metal individually. However, the MeHg/Pb co-exposure also promoted genotoxicity and lipid peroxidation. On the other hand, administration of niacin exhibited protective effects under the changes triggered by exposure to metals without altering the concentration and distribution of these metals in the organs/tissues of animals. Taken together, our results demonstrated that exposure to MeHg and Pb, even at low doses, are toxic to

rodents. Moreover, since niacin presented relevant antioxidant and antigenotoxic effects, supplementation with this vitamin can be an alternative to mitigate the toxic effects resulting from exposure to MeHg and/or Pb.

Keywords: Oxidative stress, genotoxicity, antioxidant, toxic metals, vitamin B3, nicotinic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A) Ciclo global do mercúrio. B) Exposição humana ao metilmercúrio (MeHg) pela ingestão de peixes. Adaptado de Clarkson et al. (2003).....	2
Figura 2 – Interferência do chumbo na via biossintética do heme. * Enzimas com as quais o chumbo interfere. CoA: succinil coenzima A. δ -ALAS: ácido delta aminolevulínico sintetase. δ -ALAD: ácido delta aminolevulínico desidratase. Adaptado de Ahamed & Siddiqui (2007).....	8
Figura 3 - Variação da massa corporal dos ratos dos diferentes grupos de tratamento ao longo do experimento. Valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. ANOVA uma-via, seguida por teste <i>post hoc</i> de Duncan com $p < 0,05$. Nenhuma diferença estatística foi encontrada ($p > 0,05$)......	31
Figura 4 - Concentração de glutathiona reduzida (GSH) (μ M) em amostras de sangue (A), fígado (B) e cérebro (C) (nmol/mg proteína) dos diferentes grupos de animais após o término do tratamento. ANOVA uma-via, seguida por teste <i>post hoc</i> de Duncan com $p < 0,05$. ^a Média estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$); ^b Média estatisticamente diferente do grupo MeHg ($p < 0,05$); ^c Média estatisticamente diferente do grupo Pb ($p < 0,05$).	38
Figura 5 – Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (U SOD/mg Hemoglobina) no sangue (A) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) (μ mol NADPH/min/g Hemoglobina) no sangue (B) e fígado (C) (nmol NADPH/min/mg proteína) dos diferentes grupos de animais após o término do tratamento. ANOVA uma-via, seguida por teste <i>post hoc</i> de Duncan com $p < 0,05$	42
Figura 6 – Atividade da enzima catalase (CAT) (k/g Hemoglobina/min) em amostras de sangue (A), fígado (B) e cérebro (C) (U CAT/mg proteína) dos diferentes grupos de animais após o término do tratamento. ANOVA uma-via, seguida por teste <i>post hoc</i> de Duncan com $p < 0,05$. ^a Média estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$); ^b Média estatisticamente diferente do grupo MeHg ($p < 0,05$); ^c Média estatisticamente diferente do grupo MeHg + Pb ($p < 0,05$).	43
Figura 7 – Biomarcadores de peroxidação lipídica: Concentração de malondialdeído (MDA) (μ M) no plasma (A) e de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (nmol/mg proteína) em amostras de fígado (B) e cérebro (C) dos diferentes grupos de animais após o término do tratamento. ANOVA uma-via, seguida por teste <i>post hoc</i> de Duncan com $p < 0,05$. ^a Média estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$); ^b Média estatisticamente diferente do grupo MeHg ($p < 0,05$); ^c Média estatisticamente diferente do grupo Pb ($p < 0,05$); ^d Média estatisticamente diferente do grupo MeHg + Pb ($p < 0,05$); ^e Média estatisticamente diferente do grupo NA ($p < 0,05$).	45

Figura 8 - Concentração de óxido nítrico (NO) (μM) em amostras de plasma dos ratos dos diferentes grupos após o término do tratamento. ANOVA uma-
via, seguida por teste *post hoc* de Duncan com $p < 0,05$. ^a Média
estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$); ^b Média
estatisticamente diferente do grupo MeHg ($p < 0,05$); ^c Média
estatisticamente diferente do grupo Pb ($p < 0,05$)..... 51

Figura 9 – Marcador de danos ao DNA: Porcentagem de DNA na cauda (%
DNA) no Ensaio Cometa realizado em amostras de sangue total dos
diferentes grupos de animais após o término do tratamento. ANOVA uma-
via, seguida por teste *post hoc* de Duncan com $p < 0,05$. ^a Média
estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$); ^b Média
estatisticamente diferente do grupo MeHg ($p < 0,05$); ^c Média
estatisticamente diferente do grupo Pb ($p < 0,05$); ^d Média estatisticamente
diferente do grupo MeHg + Pb ($p < 0,05$); ^e Média estatisticamente diferente
do grupo NA ($p < 0,05$)..... 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições operacionais do ICP-MS para determinação da concentração de mercúrio e chumbo. 30

Tabela 2 – Avaliação do perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL e TG) no soro dos animais de diferentes grupos após o término do tratamento. Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão. ANOVA uma-via, seguida por teste *post hoc* de Duncan com $p < 0,05$. Nenhuma diferença estatística foi encontrada ($p > 0,05$) 32

Tabela 3 – Determinação de glicemia e atividade da aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) no soro e da concentração de hemoglobina (Hb) no sangue dos diferentes grupos de animais após o término do tratamento. Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão. ANOVA uma-via, seguida por teste *post hoc* de Duncan com $p < 0,05$ 34

Tabela 4 – Avaliação da concentração de mercúrio (Hg) e chumbo (Pb) em amostras de rim, cérebro, sangue e osso dos animais de diferentes grupos após o término do tratamento. Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão. ANOVA uma-via, seguida por teste *post hoc* de Duncan com $p < 0,05$. ^a Média estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$)..... 55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MeHg	Metilmercúrio
ATSDR	<i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>
EUA	Estados Unidos da América
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Surveys</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
δ-ALAS	Ácido delta aminolevulínico sintetase
δ-ALAD	Ácido delta aminolevulínico desidratase
CoA	Succinil coenzima A
δ-ALA	Ácido delta aminolevulínico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNS	Espécies reativas nitrogênio
SOD	Superóxido dismutase
CAT	Catalase
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
GSH	Glutathiona reduzida
MDA	Malondialdeído
DNA	Ácido desoxirribonucleico
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
TG	Triglicerídeos
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
HDL	Lipoproteína de alta densidade
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
PARP	Poli-ADP-ribose polimerases
NA	Niacina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
AST	Aspartato aminotransferase
ALT	Alanina aminotransferase
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
UV/Vis	Ultravioleta/Visível
HPLC	Cromatógrafo líquido de alta eficiência
ICP-MS	Espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado
DTNB	5-5-ditio-bis-2-ácido nitrobenzóico
TCA	Ácido tricloroacético
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
DMSO	Dimetilsulfóxido
TMAH	Hidróxido De Tetrametilamônio
rpm	Rotações por minuto
Hb	Hemoglobina
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
ANOVA	Análise de variância
GSSH	Glutathiona dissulfido

LISTA DE SÍMBOLOS

Hg	Mercúrio
Hg⁺	Mercúrio mercurioso
Hg²⁺	Mercúrio mercúrico
Pb	Chumbo
PbS	Sulfeto de chumbo
PbSO₄	Sulfato de chumbo
PbCO₃	Carbonato de chumbo
Fe	Ferro
Ca	Cálcio
O₂^{•-}	Ânion superóxido
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
®	Marca registrada
>	Maior que
<	Menor que
NaOH	Hidróxido de sódio
NO₂⁻	Nitrito
NO₃⁻	Nitrato
HNO₃	Ácido nítrico
Rh	Ródio
±	Mais ou menos

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS	x
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos toxicológicos do metilmercúrio.....	1
1.2 Aspectos toxicológicos do chumbo	5
1.3 Exposição simultânea a elementos químicos.....	9
1.4 Principais mecanismos de toxicidade relacionados ao metilmercúrio e ao chumbo	10
1.4.1 Estresse oxidativo	10
1.4.2 Alteração na concentração de óxido nítrico plasmático	11
1.5 Aspectos gerais sobre a niacina.....	13
2 OBJETIVOS.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Delineamento experimental.....	19
3.1.1 Seleção das doses	19
3.1.2 Animais e descrição do tratamento	20
3.2 Equipamentos e acessórios	21
3.3 Reagentes.....	22
3.4 Metodologias	23
3.4.1 Quantificação de colesterol total (TC), lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos (TG) em soro	23
3.4.2 Determinação de glicose em soro	24
3.4.3 Determinação da atividade das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) em soro	24
3.4.4 Quantificação de hemoglobina em sangue total.....	24
3.4.5 Preparo do homogenato de tecidos e quantificação de proteínas.....	25
3.4.6 Quantificação de tióis totais (GSH) em sangue total e tecidos.....	25

3.4.7 Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em sangue total.....	26
3.4.8 Determinação da atividade da enzima glutathione peroxidase (GSH-Px) em sangue total e fígado.....	26
3.4.9 Determinação da atividade da enzima catalase (CAT) em sangue total e tecidos.....	26
3.4.10 Quantificação de malondialdeído (MDA) em plasma e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em tecidos.....	27
3.4.11 Determinação da concentração plasmática de óxido nítrico (NO).....	27
3.4.12 Avaliação da genotoxicidade por meio do Ensaio Cometa.....	28
3.4.13 Determinação da concentração de mercúrio e chumbo em sangue total e tecidos por ICP-MS	29
3.5 Análises estatísticas.....	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Variação da massa corporal dos animais.....	31
4.2 Avaliação do perfil lipídico (TC, HDL, LDL e TG), glicemia, função hepática (AST e ALT) e concentração de hemoglobina.....	31
4.3 Marcadores relacionados ao estresse oxidativo.....	36
4.3.1 Glutathione	37
4.3.2 Enzimas antioxidantes.....	41
4.3.3 Peroxidação lipídica	44
4.4 Concentração de óxido nítrico plasmático.....	50
4.5 Genotoxicidade	52
4.6 Concentração de mercúrio e chumbo em rim, cérebro, sangue e osso dos animais.....	55
5 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXOS	71
ANEXO 1: Aprovação pela Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA-USP)	71
ANEXO 2: Publicação relacionada à tese	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos toxicológicos do metilmercúrio

O símbolo químico do mercúrio, Hg, é uma abreviação do seu antigo nome *hydrargyros*, que em grego significa literalmente água/prata. O mercúrio é um metal líquido à temperatura ambiente e suas propriedades físico-químicas de baixa viscosidade, alta densidade e excelente condutância elétrica constituem as razões para as inúmeras aplicações deste elemento (Clarkson & Magos, 2006).

A propensão do mercúrio líquido de formar amálgamas estáveis com outros metais, especialmente prata e ouro, já era conhecida pelos alquimistas. O amálgama semissólido formado com o ouro pode ser facilmente transformado em ouro puro quando é aquecido e o mercúrio evapora-se. A extração de ouro de sedimentos de rios na bacia Amazônica e outros lugares ainda ocorre pela utilização desta técnica. O amálgama de mercúrio e prata, ou cobre, foi muito utilizado na odontologia apesar de seus efeitos tóxicos. Entretanto, ultimamente os amálgamas dentários vêm sendo substituídos por materiais não tóxicos e esteticamente mais aceitos (Clarkson & Magos, 2006).

Atualmente o mercúrio é utilizado em termômetros, esfigmomanômetros, baterias, comutador (*switches*) e bulbos de lâmpadas fluorescentes. Adicionalmente, grandes quantidades de mercúrio metálico são empregadas como eletrodos na produção eletrolítica de cloro e hidróxido de sódio a partir de solução salina (Clarkson, Magos, & Myers, 2003; Clarkson & Magos, 2006).

O mercúrio e seus compostos constituem um grande dilema para aqueles interessados em fazer uso de suas diversas propriedades. Se por um lado este elemento exibe diferentes propriedades atrativas, por outro apresenta elevada toxicidade.

O mercúrio existe em três estados de oxidação. No estado de oxidação zero (Hg^0), este elemento encontra-se na forma metálica (líquida) ou vapor. O mercúrio mercuroso ou mercúrico constituem os estados mais oxidados e ocorrem quando este elemento perde um (Hg^+) ou dois elétrons (Hg^{2+}), respectivamente. Adicionalmente, o mercúrio mercúrico pode formar compostos orgânicos estáveis pelo ataque de um ou dois átomos de carbono. Considerando exposição humana e toxicidade, o metilmercúrio (MeHg) é a forma orgânica mais relevante. A distinção

genérica entre mercúrio inorgânico e orgânico é útil visto que estas formas de mercúrio apresentam propriedades toxicológicas distintas (Clarkson & Magos, 2006; Klaassen, 2008).

Atualmente, a exposição da população ao mercúrio ocorre quase que exclusivamente pela ingestão de peixes e mamíferos marinhos contaminados com metilmercúrio. O metilmercúrio está presente nos organismos aquáticos como consequência da metilação do mercúrio inorgânico por micro-organismos presentes em sedimentos de rios e oceanos. O mercúrio inorgânico atinge os sedimentos aquáticos como resultado do ciclo global deste elemento (Clarkson & Magos, 2006; Klaassen, 2008), conforme ilustrado na Figura 1.

O vapor de mercúrio é emitido para a atmosfera por fontes naturais como vulcões, mas também por atividades humanas como queima de carvão para geração de energia, incineração e mineração. Uma vez que o Hg^0 entra na atmosfera, ele permanece lá por cerca de um ano. Na atmosfera, o Hg^0 pode sofrer oxidação e formar o Hg^{2+} , forma química altamente solúvel que se deposita facilmente no ambiente aquático pela ação das chuvas. Nos ambientes aquáticos, uma fração do Hg^{2+} é reduzida de volta a vapor (Hg^0) e retorna a atmosfera completando o ciclo do Hg (Figura 1a). No entanto, a fração de Hg^{2+} que permanece na água é convertida a metilmercúrio pela ação de bactérias redutoras de sulfato (Figura 1b) (Clarkson & Magos, 2006).

Figura 1 – A) Ciclo global do mercúrio. B) Exposição humana ao metilmercúrio (MeHg) pela ingestão de peixes. Adaptado de Clarkson et al. (2003).

O metilmercúrio gerado pela biometilação acumula-se na cadeia trófica por meio do processo de biomagnificação. Assim, algas e plantas aquáticas apresentam concentrações de MeHg pouco maiores que as concentrações das águas onde se encontram. Já os peixes que consomem estas plantas exibem concentrações maiores, e assim ocorre sua bioacumulação até que os peixes carnívoros do topo da cadeia alimentar sejam atingidos, apresentando concentrações de MeHg até um milhão de vezes maiores às das águas onde vivem (Clarkson & Magos, 2006; Klaassen, 2008). O metilmercúrio representa quase o total de mercúrio presente em músculo de peixe (Grotto et al., 2011), onde se encontra ligado a grupos tiol de resíduos de cisteína de proteínas (Harris, Pickering, & George, 2003).

Concentrações elevadas de metilmercúrio em peixes podem também ser ocasionadas pela poluição de rios e baías. O primeiro desastre ambiental de repercussão mundial que expôs o risco eminente do mercúrio ocorreu por volta de 1953 na Baía de Minamata, sudoeste do Japão. Uma planta química da *Chisso Corporation* utilizava mercúrio inorgânico como catalisador para a produção de acetaldeído gerando metilmercúrio como subproduto. O metilmercúrio que era despejado no efluente contaminou a biota marinha e águas ao redor, chegando até a população através da ingestão de peixes e frutos do mar. A “Doença de Minamata” foi caracterizada por diversos sintomas que incluem parestesia; visão periférica prejudicada; danos à visão, paladar e olfato; falta de coordenação motora; fraqueza muscular; irritabilidade; perda de memória; e depressão (ATSDR, 1999).

Devido a sua natureza lipossolúvel, aproximadamente 95 % do metilmercúrio ingerido é absorvido pela mucosa gastrointestinal. Na corrente circulatória, o composto permanece ligado aos grupos sulfidril das proteínas dos eritrócitos e leva cerca de 4 dias para se distribuir pelos tecidos do corpo. No organismo, a meia vida biológica do metilmercúrio é em média 44 dias e sua excreção ocorre principalmente (90 %) pelas fezes (Klaassen, 2008).

Embora o metilmercúrio seja distribuído para diferentes tecidos após ser absorvido, o sistema nervoso central é o órgão mais sensível aos efeitos deste toxicante, principalmente se a exposição ocorrer durante os estágios iniciais de desenvolvimento do cérebro (Grandjean & Herz, 2011). Estudos experimentais em ratos demonstraram que o metilmercúrio atravessa as células endoteliais da barreira hematoencefálica complexado à cisteína. O complexo MeHg-cisteína apresenta

estrutura similar a do aminoácido metionina e, assim, consegue adentrar o cérebro (Simmons-Willis, Koh, Clarkson, & Ballatori, 2002).

As manifestações clínicas dos efeitos neurotóxicos induzidos pelo metilmercúrio incluem distúrbios visuais, parestesia, perda da audição, tremor muscular, fadiga, distúrbio da motilidade, coma e morte (Klaassen, 2008). Nas últimas décadas, diversos estudos têm contribuído para a compreensão dos principais eventos que medeiam a neurotoxicidade induzida por este composto. Tais estudos, os quais são baseados especialmente em experimentos animais, reportaram alguns mecanismos envolvidos na toxicidade do MeHg como depleção de antioxidantes endógenos e inibição de enzimas críticas (Marcelo Farina, Aschner, & Rocha, 2011).

No Brasil, sabe-se que na região Amazônica existem fontes relevantes de exposição ao mercúrio como a mineração de ouro, desmatamento e lixiviação dos solos que acarretam a contaminação de rios e peixes (Passos et al., 2008). Grotto e colaboradores (2011) encontraram concentrações de até 2 µg/g de mercúrio em peixes capturados no rio Tapajós e demonstraram que quase 100 % do mercúrio presente nestes peixes estava na forma de metilmercúrio. Neste sentido, a contaminação de peixes por este toxicante tem sido reconhecida como sério problema para ribeirinhos, incluindo a população indígena, que tem no consumo de peixe a principal fonte de proteínas (Lebel et al., 1997; Dórea et al., 2003; Grotto et al., 2010).

Diversos estudos têm mostrado que populações expostas ao metilmercúrio pelo consumo de peixes e frutos do mar apresentavam efeitos adversos (Lebel et al. 1998; Salonen et al. 2000) enquanto outras não (Grandjean 1995; Myers et al. 2003). Estes resultados distintos podem ser resultado de fatores genéticos (polimorfismos em genes específicos relacionados ao metabolismo do MeHg) e/ou aspectos nutricionais (nutrientes presentes na dieta). Como exemplo, nosso grupo observou recentemente que ratos expostos a peixes contaminados com MeHg apresentaram menos efeitos tóxicos que animais tratados com a mesma dose de MeHg em solução, administrada por gavagem. Alguns nutrientes presentes no próprio peixe poderiam estar modulando a toxicidade do MeHg (Grotto et al., 2011a; Grotto et al., 2011b). Um exemplo destes nutrientes poderia ser o selênio, encontrado em peixes amazônicos e que forma um complexo insolúvel com o mercúrio (Clarkson & Magos, 2006).

1.2 Aspectos toxicológicos do chumbo

O chumbo (Pb) é um metal cinza azulado encontrado naturalmente na crosta terrestre nas formas dos minérios galena (PbS), anglesita (PbSO₄) e cerusita (PbCO₃). Este elemento químico foi um dos primeiros metais descobertos pelo homem e suas propriedades particulares de maleabilidade, ductibilidade, baixo ponto de fusão e resistência à corrosão resultaram no seu uso generalizado em diferentes atividades industriais (ATSDR, 2007).

Os compostos de chumbo estão presentes em pigmentos de tintas e corantes e em esmaltes cerâmicos. Contudo, nos últimos anos a quantidade de chumbo utilizada nestes produtos foi reduzida com o propósito de minimizar os efeitos tóxicos deste metal sobre a população. Atualmente a principal utilização comercial de chumbo ocorre na fabricação de baterias automobilísticas (ATSDR, 2007).

Embora o chumbo tenha ocorrência natural, a atividade humana é a grande responsável pelas concentrações elevadas deste metal no ambiente (ATSDR, 2007). Por não ser biodegradável, o chumbo apresenta alta persistência no ambiente (Flora, Gupta, & Tiwari, 2012). A maior elevação nas concentrações atmosféricas de chumbo foi observada entre os anos de 1950 e 2000 e refletiu o crescimento da utilização deste elemento químico na gasolina. Os compostos orgânicos de chumbo (especialmente o chumbo tetraetila) foram utilizados como antidetonantes adicionados à gasolina durante muitos anos. Desde que esta utilização foi banida nos EUA na década de 70, as emissões de chumbo para a atmosfera reduziram significativamente. De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos EUA, EPA (do inglês *Environmental Protection Agency*), as emissões atmosféricas de chumbo foram reduzidas em 93 % no período de 1982 a 2002 (ATSDR, 2007).

Como consequência da redução na exposição ambiental, a concentração sanguínea de chumbo na população norte-americana diminuiu drasticamente nas últimas três décadas. Dados coletados pelo *National Health and Nutrition Examination Surveys* (NHANES) indicaram que a concentração média de chumbo no sangue desta população (indivíduos de 1 a 74 anos) reduziu 78 % de 1976 a 1991, isto é, passou de 12,8 para 2,8 µg/dL (ATSDR, 2007).

No ambiente ocupacional, a exposição ao chumbo acontece em atividades como soldagem, fundição e refino de chumbo e bronze, indústrias de cerâmica, incineração e fabricação de baterias (ATSDR, 2007; Klaassen, 2008). Considerando a população em

geral, indivíduos não ocupacionalmente expostos, a exposição a este metal ocorre sobretudo por meio da ingestão de água e alimentos contaminados (Patrick, 2006b).

No Brasil, a exposição ao chumbo tem sido relatada em diversas regiões. Um dos casos mais importantes de intoxicação por este metal ocorreu na cidade de Santo Amaro da Purificação, Bahia. Neste município funcionou desde 1960 uma fundição primária de Pb, subsidiária do grupo multinacional *Peñarroya*, que foi responsável por uma grande contaminação ambiental na região. Os trabalhadores da fundição, seus filhos e moradores de regiões próximas foram particularmente afetados (Carvalho et al., 2000). Outro caso ocorreu em 2002, quando a fábrica de baterias AJAX foi responsável pela contaminação de centenas de pessoas na cidade de Bauru, São Paulo (Quiterio et al., 2003).

Recentemente, estudos realizados por nosso grupo na região Amazônica relataram exposição da população local ao chumbo devido ao consumo de farinha de mandioca contaminada (Barbosa et al., 2009; Carneiro, Evangelista, & Barbosa, 2013). O processo de produção da farinha inclui deixar a mandioca imersa em água por alguns dias, retirar as cascas, ralar a polpa branca e secá-la. A última etapa do processo inclui torrar a polpa seca por algumas horas em grandes fornos de ligas metálicas contendo concentrações elevadas de chumbo. A relação de causa entre a torrefação da mandioca e a contaminação por chumbo foi confirmada pelo aumento na concentração deste metal comparando-se a polpa de mandioca *in natura* e a farinha pronta (torrada) (Barbosa et al., 2009; Carneiro et al., 2013). Concentrações de até um micrograma de chumbo por grama de farinha de mandioca foram encontradas em amostras produzidas e comercializadas por ribeirinhos do estado do Pará (Carneiro et al., 2013), o que corresponde a cerca de dez vezes o permitido em alimentos pelo comitê *Codex Alimentarius* (FAO, 2014). Embora não existam dados precisos a respeito da ingestão média de farinha de mandioca por esta população, Carneiro e colaboradores (2013) estimaram que o consumo individual pode ser maior que 200 gramas por dia, visto que este alimento é a principal fonte de carboidratos dos ribeirinhos. Portanto, a farinha de mandioca pode ser considerada como a principal fonte de exposição ao chumbo na região.

Na exposição por via oral, a quantidade de chumbo absorvida pelo organismo varia dependendo, principalmente, da idade e estado nutricional. Os adultos absorvem de 5 a 15 % do total de chumbo ingerido enquanto que crianças podem absorver até 50 % da quantidade ingerida (Klaassen, 2008).

A absorção gastrointestinal do chumbo é influenciada também por determinados nutrientes como ferro e cálcio. A interação entre chumbo e cálcio é antagônica por ambos os elementos disputarem os mesmos sítios de ligação de carreadores presentes na mucosa intestinal. Estudos demonstraram que a suplementação de cálcio a animais e crianças provoca redução na absorção do chumbo. Quanto ao ferro, no caso de dietas deficientes deste nutriente ocorre o estímulo de carreadores de modo a favorecer a absorção de todo o ferro que esteja presente no trato gastrintestinal, fenômeno denominado hiperabsorção do ferro. Nestes casos, ocorre também uma hiperabsorção de chumbo (Klaassen, 2008).

Uma vez absorvido, aproximadamente 99 % do chumbo sanguíneo circula ligado aos eritrócitos e é distribuído para o fígado, rins, ossos e outros tecidos. O chumbo acumula-se principalmente nos ossos onde permanece armazenado por cerca de 20 anos. (ATSDR, 2007). A excreção do chumbo é renal especialmente por filtração glomerular (Klaassen, 2008).

Os alvos mais sensíveis da ação tóxica do chumbo constituem o sistema nervoso, hematológico, cardiovascular e renal (ATSDR, 2007). Os efeitos tóxicos do chumbo no sistema hematológico ocorrem principalmente como resultado da inibição da biossíntese do heme. O chumbo é um cátion bivalente que devido à forte capacidade de ligação aos grupos sulfidrílicos de proteínas é capaz de interferir em diversos sistemas enzimáticos (Klaassen, 2008).

As enzimas envolvidas na biossíntese do grupamento heme com as quais o chumbo interfere são ácido delta aminolevulínico sintetase (δ -ALAS), ácido delta aminolevulínico desidratase (δ -ALAD) e ferroquelatase (Figura 2). A série de reações que levam à biossíntese do heme inicia-se com succinil coenzima A (CoA) e glicina e termina com a inserção de átomos de ferro (Fe^{++}) na molécula de protoporfirina para formar o heme. Inicialmente a enzima δ -ALAS catalisa a formação do ácido delta aminolevulínico (δ -ALA) a partir da glicina e succinil CoA. Após esta etapa, a δ -ALAD catalisa a formação de porfobilinogênio a partir de duas moléculas de δ -ALA e, por fim, a ferroquelatase incorpora Fe^{++} na molécula de protoporfirina para formar o heme (ATSDR, 2007; Klaassen, 2008). A alteração na atividade da δ -ALAD no sangue periférico e a excreção de δ -ALA na urina apresentam boa correlação com a concentração sanguínea de Pb e portanto, servem como marcadores de exposição recente a este toxicante (Klaassen, 2008).

Figura 2 – Interferência do chumbo na via biossintética do heme. * Enzimas com as quais o chumbo interfere. CoA: succinil coenzima A. δ -ALAS: ácido delta aminolevulínico sintetase. δ -ALAD: ácido delta aminolevulínico desidratase. Adaptado de Ahamed & Siddiqui (2007).

O sistema nervoso é o alvo mais sensível da toxicidade induzida pelo chumbo (Flora et al., 2012). A neurotoxicidade provocada por este metal causa irritabilidade, dor de cabeça, dificuldade de atenção, perda de memória e redução no desempenho cognitivo (Patrick, 2006b).

As crianças são mais sensíveis aos efeitos tóxicos do chumbo uma vez que absorvem mais este toxicante e apresentam o sistema nervoso em desenvolvimento (Patrick, 2006b). Chiodo, Jacobson, & Jacobson (2004) reportaram comprometimentos na inteligência, tempo de reação, integração visual-motora, habilidades motoras e atenção, relacionados a baixas concentrações sanguíneas de chumbo em crianças com idade média de 7,5 anos.

O diagnóstico de intoxicação por chumbo é tradicionalmente realizado pela determinação das concentrações sanguíneas deste elemento. Entretanto, dados recentes indicam que mesmo exposições a baixas doses, que resultem em concentrações de chumbo inferiores 10 μ g/dL de sangue, ocasionam disfunções cognitivas, hipertensão e danos neurológicos e renais (Bellinger, 2008; Chiodo et al., 2004). Enquanto as intoxicações agudas são normalmente tratadas com terapia quelante, as exposições crônicas ainda estão sendo investigadas (Patrick, 2006a). Alguns estudos sugerem que o tratamento com antioxidantes pode remediar alterações

no sistema redox promovidas mesmo por baixas doses de chumbo (Antonio-García & Massó-Gonzalez, 2008; Flora, Pande, & Mehta, 2003; Gurer & Ercal, 2000).

Embora a toxicidade do chumbo seja explorada e compreendida há tempo, seu controle total e prevenção estão longe de acontecer. As recentes descobertas de que mesmo exposições que resultem em baixas concentrações de chumbo no sangue (inferiores a 10 µg/dL) estão associadas com efeitos adversos sobre o desenvolvimento de crianças tem gerado grande preocupação no mundo todo (Luo, Ruan, Yan, Yin, & Chen, 2012). Aparentemente não existe concentração de chumbo necessária, benéfica ou segura para o organismo humano. A toxicidade induzida pela exposição a este metal é particularmente perigosa com a possibilidade de ocorrência de danos irreversíveis sobre a saúde.

1.3 Exposição simultânea a elementos químicos

Embora os indivíduos estejam expostos a uma mistura de toxicantes, a maioria dos estudos toxicológicos tem focado nos efeitos de apenas um composto, não considerando e/ou ajustando seus resultados em função de outros (Henn et al.; 2011). Além disso, estes outros agentes, dependendo do cenário de exposição, podem ser até mesmo mais tóxicos do que o objeto de estudo. Dessa forma, já que a exposição a múltiplas substâncias químicas representa melhor a realidade, estudos que identifiquem o potencial tóxico de tais misturas são relevantes e necessários (Simons, 1995).

A avaliação da toxicidade frente à exposição simultânea a mais de um elemento químico é um tópico desafiador e relativamente recente na literatura, que engloba tanto a questão ocupacional quanto a ambiental (Wu et al., 2011; Wasserman et al., 2011). Um estudo desenvolvido com crianças mexicanas investigou o efeito neurotóxico do chumbo isoladamente e conjuntamente ao manganês. Os resultados mostraram um aumento da neurotoxicidade do chumbo em decorrência de uma ação sinérgica do manganês (Henn et al., 2011). Wasserman e colaboradores (2011) pretendendo examinar possíveis interações entre arsênio e manganês na condição intelectual de crianças norte-americanas, estratificaram a população quanto às concentrações sanguíneas destes elementos. Quando ajustados um ao outro, ambos os elementos no sangue estiveram associados a menores escores em testes que avaliam a capacidade intelectual.

Al-Attar e colaboradores (2011) visando avaliar os efeitos decorrentes da ingestão de água contaminada por mais de um metal, expuseram camundongos a uma mistura de elementos químicos (chumbo, mercúrio, cádmio e cobre) adicionados na água de beber, durante sete semanas. Os autores observaram aumento significativo na atividade das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase, fosfatase alcalina e gama glutamil transferase no grupo de camundongos expostos a mistura de metais. Ainda, foram observadas alterações histopatológicas no fígado como ruptura de hepatócitos, necrose hepatocelular avançada, hemorragias e infiltração de linfócitos.

Como exemplo de exposição a mais de um elemento químico no Brasil, populações ribeirinhas da região Amazônica estão expostas ao metilmercúrio e chumbo de forma concomitante e crônica. Nosso grupo identificou recentemente que estes indivíduos estão expostos simultaneamente ao metilmercúrio e ao chumbo oriundos, respectivamente, de peixes e farinha de mandioca contaminados (Barbosa et al., 2009; Carneiro et al., 2013). Portanto, estudos que objetivem avaliar os efeitos decorrentes da coexposição a estes dois metais (metilmercúrio e chumbo) são oportunos.

1.4 Principais mecanismos de toxicidade relacionados ao metilmercúrio e ao chumbo

1.4.1 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção destes (Matés, Pérez-Gómez, & Núñez de Castro, 1999). O estresse oxidativo é apontado como o mecanismo básico por trás dos danos promovidos por elementos químicos tóxicos (Ercal et al., 2001).

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir, ou reduzir, os danos causados pela ação deletéria de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS). Usualmente, esse sistema é dividido em enzimático e não enzimático (Matés et al., 1999). A glutathione (GSH) é o principal tiol celular não proteico livre, e também o antioxidante endógeno prevalente no organismo (Cecconi et al., 1988). O sistema antioxidante enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase

(CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-Px). A SOD decompõe o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é subsequentemente removido pela CAT nos peroxissomos, ou pela GSH-Px via oxidação da GSH no citosol (Matés et al., 1999).

Um dos mais importantes mecanismos por trás da geração de estresse oxidativo pelo metilmercúrio é a sua alta reatividade aos grupos sulfidrílicos. Este elemento liga-se covalentemente à GSH e resíduos de cisteína de proteínas. O chumbo desencadeia estresse oxidativo induzindo a geração de ROS, reduzindo as defesas antioxidantes das células, através da depleção de GSH ou inibição de enzimas, e aumentando a susceptibilidade celular ao ataque oxidativo pela alteração da integridade das membranas (Hande Gurer & Ercal, 2000).

Estudos têm demonstrado que tanto a exposição ao metilmercúrio quanto ao chumbo gera depleção no conteúdo de enzimas antioxidantes e GSH, aumento dos marcadores de lipoperoxidação, além de dano ao DNA (Bulat et al., 1998; Pandya et al., 2011). No entanto, muito pouco é conhecido acerca dos efeitos da ação simultânea destes metais sobre o estado redox dos organismos.

1.4.2 Alteração na concentração de óxido nítrico plasmático

O óxido nítrico (NO) é considerado um neurotransmissor que participa de uma grande variedade de processos fisiológicos através da sinalização intracelular (Hawkins; Son; Arancio, 1998). Devido ao seu papel regulador da homeostase vascular, o NO tem sido apontado como um componente crítico para a ocorrência de disfunções cardiovasculares (Yetik-Anacak; Catravas, 2006; De Marco et al., 2010). Embora o NO seja um intermediário levemente reativo, este composto pode agir como precursor de potentes oxidantes em condições patológicas associadas ao estresse oxidativo incluindo, além das doenças cardiovasculares, as inflamatórias e neurodegenerativas (Calcerrada; Peluffo; Radi, 2011). O peroxinitrito ($ONOO^-$), produto de reação do NO com radicais superóxido, é um dos principais envolvidos na toxicidade derivada do NO devido a sua simples formação e habilidade de reagir com diversos alvos celulares incluindo tióis, proteínas, lipídeos e DNA (Chung et al., 2001).

Quanto às análises de NO, uma vez que ele é rapidamente oxidado a nitrato e nitrito, a determinação deste compostos no plasma é utilizada como índice das

concentrações disponíveis de NO (Ellis et al. 1998). A utilidade deste biomarcador é questionada por alguns autores devido a determinados interferentes (Ellis et al., 1998; Lauer; Kleinbongard; Kelm, 2002), porém outros autores mostraram que a concentração de NO reflete bem a atividade da NO sintase (Kelm et al., 1999; Kleinbongard et al., 2003).

De Marco e colaboradores (2010) investigaram se as concentrações de nitrito em amostras de plasma de ribeirinhos amazônicos expostos ao metilmercúrio correlacionavam-se com as concentrações deste elemento em sangue total, plasma e cabelo. Os autores não encontraram correlação entre as concentrações de mercúrio e nitrito plasmático. No entanto, após ajuste por regressão multivariada para gênero, idade e consumo de peixe, uma associação negativa significativa entre nitrito no plasma e mercúrio no plasma foi observada. Os autores apontaram os achados como uma das primeiras evidências clínicas de que o metilmercúrio altera as concentrações de NO, e sugeriram ainda que isto ocorra, possivelmente, devido a alterações na produção do NO pela enzima óxido nítrico sintase (NOS).

Em estudo realizado com animais, Wigger e colaboradores (2008) analisaram os efeitos de uma exposição crônica a baixas doses de cloreto de mercúrio sobre parâmetros cardiovasculares. Os autores observaram que o mercúrio não afetou a pressão arterial dos animais, mas aumentou a vasoconstrição induzida por fenilefrina e reduziu a vasodilatação induzida por acetilcolina, o que denota alterações no endotélio. Considerando parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, este mesmo estudo mostrou que ratos tratados com mercúrio tiveram maiores concentrações de $O_2^{\bullet-}$ e MDA plasmático, e concentração de NO reduzida. Segundo os autores, a redução na concentração de NO foi ocasionada por desequilíbrio oxidativo e possivelmente acarretou a disfunção endotelial observada (Wiggers et al., 2008). Entretanto, a literatura ainda é carente a respeito dos mecanismos envolvidos nos efeitos tóxicos do metilmercúrio sobre as concentrações de NO endotelial.

A exposição ao chumbo também é associada às desordens cardiovasculares, que podem resultar de desequilíbrio oxidativo e depleção de NO. Barbosa e colaboradores (2006) investigaram as concentrações de nitritos e chumbo em população exposta ambientalmente a este metal. Foi encontrada uma relação inversa entre as concentrações de nitrito e chumbo, sugerindo depleção do NO à medida que a concentração de chumbo aumentava. Assim, os autores sugeriram que o chumbo apresenta efeito inibitório sobre a formação de NO. De acordo com

Fostermann e Munzel (2006), o estresse oxidativo promovido pelo chumbo pode limitar a disponibilidade do NO por diversos mecanismos que incluem inativação/sequestro de NO por ROS, depleção do cofator tetrahidrobiopterina da NOS e desacoplamento da enzima.

Diante do exposto, para melhor elucidar os efeitos decorrentes da exposição ao metilmercúrio e chumbo é essencial avaliar diferentes biomarcadores conjuntamente, pois, modificações em suas concentrações/atividades podem ajudar a explicar os mecanismos envolvidos na toxicidade destes metais. Além disso, ressalta-se a escassez de estudos que avaliaram biomarcadores de diferentes efeitos tóxicos em exposições simultâneas ao metilmercúrio e chumbo.

1.5 Aspectos gerais sobre a niacina

Conforme mencionado anteriormente, populações ribeirinhas da Amazônia estão expostas concomitantemente ao metilmercúrio e chumbo oriundos, respectivamente, de peixes e farinha de mandioca contaminados. Sendo estes alimentos a base da dieta destas populações, a simples recomendação de seu não consumo pode causar tantos transtornos quanto à exposição aos metais. Diversos estudos já demonstraram que alguns nutrientes possuem a capacidade de alterar a toxicidade de elementos químicos e proteger o organismo (Grotto et al., 2011; Passos et al., 2007; Passos et al., 2003). Assim, uma alternativa para esta população seria incentivá-los a consumir alimentos que possuam nutrientes com atividade protetora contra os efeitos tóxicos causados por estes contaminantes.

Algumas frutas são ricas em compostos antioxidantes tais como vitaminas, carotenoides, flavonoides e outros compostos fenólicos; além de apresentarem capacidade de quelar metais (Barreto, Benassi, & Mercadante, 2009). Passos e colaboradores (2007) reportaram que ribeirinhos da Amazônia que consumiam frutas mais frequentemente apresentavam menor concentração de Hg no sangue e no cabelo. Recentemente, um estudo experimental demonstrou que o maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum*), um fruto nativo da Amazônia rico em niacina, apresenta atividade protetora contra os efeitos nocivos do MeHg sobre a fertilidade de ratos machos (Frenedoso da Silva et al., 2014).

A niacina (ácido nicotínico ou nicotinamida) é uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao grupo das vitaminas do complexo B. Sua síntese em humanos é

insuficiente para suprir as necessidades metabólicas e, portanto, sua ingestão diária é fundamental. Ainda, dependendo da dosagem, a niacina apresenta efeito farmacológico (Alberto, Maria, & Alves, 2011; Maiese, Chong, Hou, & Shang, 2009).

Antigamente designada como B3, a niacina é amplamente distribuída nos alimentos de origem animal e vegetal. As principais fontes são carnes, cereais, leguminosas e sementes. Os alimentos ricos em triptofano também são fontes indiretas de niacina visto que este aminoácido é precursor do ácido nicotínico. Na espécie humana, a biossíntese de niacina a partir do aminoácido essencial triptofano é rota fundamental para se atingir a necessidade bioquímica desta vitamina. A deficiência de niacina dietética e o uso farmacológico de ácido nicotínico ou nicotinamida tem efeitos sobre a homeostase metabólica, regulação do DNA, sinalização celular, função tecidual, dentre outros (Alberto et al., 2011).

A deficiência severa de niacina causa a pelagra que é caracterizada por dermatite, diarreia e demência (Hegyi, Schwartz, & Hegyi, 2004). A pelagra é uma doença associada à pobreza e ao alcoolismo e acomete, particularmente, populações sujeitas à monotonia alimentar tendo como base o uso de um único cereal. Atualmente essa doença está restrita a algumas regiões da Ásia e da África, particularmente àquelas nas quais a pobreza absoluta é prevalente (Alberto et al., 2011). Os sinais mais comuns da deficiência de niacina incluem depressão, apatia, perda de memória e alterações nas mucosas da língua, estômago, trato intestinal e sistema nervoso (Hegyi et al., 2004).

A deficiência de niacina promove ainda um aumento na quebra das fitas de DNA sem que o reparo ocorra prontamente. Assim, tem sido proposto que a deficiência subclínica de niacina possa disparar danos celulares, induzindo neoplasias malignas em células susceptíveis a alterações no mecanismo de reparo do DNA (Zhang, Henning, & Swendseid, 1993). Ratos submetidos à deficiência de niacina apresentaram alterações no metabolismo da poli-ADP-ribose, na expressão da proteína p53 e, conseqüentemente, tiveram a capacidade celular de reparar danos ao DNA reduzida (Spronck, Nickerson, & Kirkland, 2007).

Os requerimentos dietéticos de niacina para a população brasileira, de tal modo que se atinja um estado bioquímico adequado desta vitamina, varia conforme a idade, sexo e estado fisiológico, dentre outros fatores. Desta forma, a necessidade desta vitamina se apresenta no limite de 6 a 18 equivalentes de niacina (EN) por dia (1 EN = 1 mg de niacina ou 60 mg de triptofano) (Alberto et al., 2011). Resultados

obtidos com modelo animal são sugestivos de que a suplementação de niacina pode reduzir os efeitos colaterais da quimioterapia, bem como induzir a morte de células tumorais via ativação de apoptose dependente de poli-ADP-ribose (Kirkland, 2003). Assim, diferentes alterações metabólicas envolvendo sinalização celular e integridade da cromatina ocorreriam após a suplementação continuada de ácido nicotínico ou nicotinamida (Alberto et al., 2011).

Os principais efeitos adversos da niacina ocorrem quando são administradas doses elevadas ($\geq 1 \text{ g dia}^{-1}$) e incluem vasodilatação (que causa cefaleia, ardência, comichão e ruborização facial), fadiga, problemas gastrointestinais e hepatopatia. A dose oral letal para rato é $3,5 \text{ g kg}^{-1}$ de nicotinamida e $4,5 \text{ g kg}^{-1}$ de ácido nicotínico (Alberto et al., 2011).

O ácido nicotínico foi o primeiro fármaco oral utilizado para o tratamento de dislipidemias. A administração desta substância em doses farmacológicas de 1 a 4 g dia^{-1} exerce uma variedade de efeitos fisiológicos que melhora o perfil lipídico em pacientes com dislipidemias e disfunção endotelial, reduzindo efeitos aterotrombóticos (McKenney, 2004; Rosenson, 2003). O ácido nicotínico reduz o colesterol total, triglicerídeos (TG), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), colesterol LDL e lipoproteína (a), sendo um dos poucos fármacos que efetivamente aumentam o colesterol HDL (Alberto et al., 2011; Carlson, 2005).

Em adição às suas funções antidislipidêmicas, nos últimos anos estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a niacina apresenta importantes propriedades antioxidantes (Cho, Kim, Rodriguez-Iturbe, & Vaziri, 2009; S H Ganji, Qin, Zhang, Kamanna, & Kashyap, 2009; Shobha H. Ganji, Kashyap, & Kamanna, 2015; Tang, Sham, Hui, & Kirkland, 2008; Tupe, Tupe, & Agte, 2011). Em estudo realizado por Cho e colaboradores (2009), a niacina adicionada na água de beber (50 mg/Kg/dia) de ratos com falência renal crônica reduziu o estresse oxidativo, inflamação, proteinúria e hipertensão nos animais avaliados. Em outro experimento, também realizado em ratos, a suplementação de niacina (1000 mg/Kg de dieta) aumentou a captação de zinco pelo fígado e apresentou atividade hepatoprotetora contra estresse oxidativo induzido por terc-butil-hidroperóxido (Tupe et al., 2011), confirmando assim a atividade antioxidante desta vitamina.

A atividade antioxidante da niacina é relacionada principalmente às suas duas formas coenzímicas nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+ , $\text{NADH} + \text{H}^+$) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP^+ , $\text{NADPH} + \text{H}^+$). Estas coenzimas

participam em muitas reações biológicas de óxido-redução e são importantes para a manutenção do estado redox da célula (Alberto et al., 2011; Maiese et al., 2009).

A coenzima NAD^+ participa como cossustrato em diversas reações de óxido-redução no metabolismo oxidativo. Dentre as enzimas que apresentam NAD^+ como cossustrato tem-se a piruvato desidrogenase, que catalisa a conversão do piruvato a acetil-CoA, α -cetoglutarato desidrogenase, enzima do ciclo de Krebs que catalisa a conversão do α -cetoglutarato a succinil-CoA, e acil-CoA desidrogenase, enzima da β -oxidação de ácidos graxos que catalisa a conversão do 3-L-hidroxiacil-CoA a β -cetoacil-CoA. A coenzima NADH, gerada a partir das etapas supracitadas, participa como um carreador de elétrons para a etapa da cadeia transportadora de elétrons, essencial no metabolismo aeróbio. A coenzima NADPH, por sua vez, funciona como um doador de elétrons na biossíntese de ácidos graxos e esteroides e na oxidação da glicose-6-fosfato a ribose-5-fosfato na via pentose fosfato (Alberto et al., 2011; Maiese et al., 2009).

A coenzima NAD^+ também é necessária em reações de caráter não redox de suma importância para o metabolismo celular como em reações pós-translacionais de uma variedade de proteínas, particularmente de algumas associadas aos cromossomos. O NAD^+ é o substrato para três classes de enzimas que clivam a ligação b-*N*-glicosídica do NAD^+ para nicotinamida livre, e catalisam a transferência de (ADP)-ribose. Duas outras classes de enzimas catalisam a transferência de ADP-ribose para proteínas: poli-ADP-ribose polimerases (PARP) e mono-ADP-ribosiltransferases (Alberto et al., 2011; Maiese et al., 2009).

As enzimas nucleares PARP catalisam a ligação da ADP-ribose a diversas proteínas cromossômicas. Esta modificação pós-translacional é mais complexa que a metilação ou fosforilação. Uma molécula de nicotinamida é descartada em cada evento de ADP-ribosilação. As proteínas poli-ADP-ribosiladas funcionam na replicação e reparo do DNA, bem como em vários processos celulares incluindo diferenciação e apoptose. Entretanto, a niacina exerce efeito anti-inflamatório e antioxidante direto, independente da atividade da PARP (Alberto et al., 2011).

Considerando o exposto acima, foi sugerido no presente estudo que a suplementação de niacina, vitamina cuja habilidade de reparar o DNA e o desequilíbrio oxidativo tem sido reportada (S H Ganji et al., 2009; Hageman & Stierum, 2001; Surjana, Halliday, & Damian, 2010; Tang et al., 2008), aos animais expostos aos metais poderia atuar na proteção contra efeitos nocivos como

alterações no estado redox e genotoxicidade desencadeados pela exposição a estes toxicantes.

Dentro deste contexto, a hipótese levantada neste estudo foi que a exposição simultânea e crônica ao metilmercúrio e chumbo modificaria os efeitos tóxicos provocados por cada um destes compostos individualmente. Ainda, considerando que, como demonstrado na revisão da literatura acima, o mecanismo de ação mais conhecido de ambos os metais ocorre por desequilíbrio oxidativo foi pressuposto que a administração de antioxidantes, como a vitamina niacina, seria capaz de proteger contra os efeitos tóxicos decorrentes da exposição a estes metais.

Assim, no presente trabalho nós investigamos e comparamos os efeitos promovidos pelo metilmercúrio e chumbo, individual e associadamente, em ratos considerando a geração de estresse oxidativo, genotoxicidade e outros efeitos tóxicos. Adicionalmente, investigamos os potenciais efeitos protetores da suplementação de niacina aos animais expostos.

2 OBJETIVOS

Avaliar a ocorrência de efeitos genotóxicos, bioquímicos e relacionados ao estresse oxidativo; decorrentes da exposição crônica de ratos *Wistar* a baixas doses de metilmercúrio e chumbo, associados ou não, bem como a distribuição tecidual destes metais. Ainda, o presente trabalho objetivou avaliar o possível efeito protetor da suplementação de niacina diante desta exposição.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

3.1.1 Seleção das doses

Além da importância de considerar a exposição simultânea a diferentes compostos na toxicologia, outro ponto que vem sendo questionado é a dose. No intuito de observar respostas claras e quantificáveis em amostras relativamente pequenas de animais, os estudos toxicológicos têm sido tradicionalmente realizados utilizando altas doses de agentes químicos, o que gera resultados distantes da realidade de exposição em humanos (Toraason et al., 2002). Isso ocorre, em grande parte, devido à toxicidade generalizada causada pelo uso das altas doses, que pode levar a padrões alterados de metabolismo e eliminação nos animais. Portanto, estudos conduzidos com altas doses podem gerar informações limitadas em comparação aos de baixas doses, ou seja, utilizando-se doses menores é possível obter informações mais relevantes em termos de efeitos e extrapolação para outras espécies, como a humana (Toraason et al., 2002). Ademais, tanto o metilmercúrio quanto o chumbo tem gerado preocupação quanto aos seus efeitos tóxicos decorrentes da exposição a doses consideravelmente baixas, o que atesta a necessidade de mais estudos utilizando tais doses (Bellinger, 2008; Denise Grotto, De Castro, Barcelos, Garcia, & Barbosa, 2009).

Neste estudo foi utilizada a dose de 140 µg/kg/dia de CH₃HgCl, baseada no estudo de Passos e colaboradores (2008), que estimaram a ingestão diária de mercúrio pela população ribeirinha do médio Tapajós no estado do Pará. Da mesma forma, para o chumbo foi utilizada a dose de 648 µg/Kg/dia de Pb(CH₃COO)₂, baseada no estudo que determinou as quantidades deste elemento ingeridas pelo consumo de farinha na mesma população ribeirinha (Carneiro et al., 2013).

Grupos paralelos de animais receberam suplementação de niacina adicionada à água de beber. A dose de niacina (50 mg/Kg/dia) foi escolhida basendo-se em estudos que demonstraram que esta dose é efetiva na proteção de danos oxidativos (Cho et al., 2009; Tupe et al., 2011). A niacina foi adicionada na água de beber de forma a evitar possíveis interações entre esta vitamina e os metais durante a administração destes por gavagem. Nas primeiras duas semanas de tratamento, o

consumo de água com e sem niacina foi avaliado por meio da verificação do volume de água restante nas mamadeiras. Não houve diferença significativa entre eles, indicando a aceitação da água adicionada de niacina pelos animais (dado não apresentado).

3.1.2 Animais e descrição do tratamento

Foram utilizados 48 ratos machos albinos (*Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar*) com 122 ± 11 gramas provenientes do Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O protocolo de pesquisa foi encaminhado à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-USP) para apreciação e, após aprovação com o número 12.1.1599.53.8 (certificado anexo), os experimentos foram seguidos. Os animais foram alojados três por gaiola, de acordo com o tipo de grupo de tratamento, e alimentados com ração e água *ad libitum*. As gaiolas foram mantidas em salas com ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura controlada (22-25°C). Os ratos foram divididos em oito grupos com seis animais em cada ($n = 48$) e o tratamento procedeu conforme descrito a seguir:

- ❖ Grupo Controle ($n=6$): Os animais foram tratados com água habitual por gavagem;
- ❖ Grupo MeHg ($n=6$): Os animais foram tratados com solução de metilmercúrio (140 $\mu\text{g/Kg/dia}$ de CH_3HgCl) por gavagem;
- ❖ Grupo Pb ($n=6$): Os animais foram tratados com solução de chumbo (648 $\mu\text{g/Kg/dia}$ de $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$) por gavagem;
- ❖ Grupo MeHg + Pb ($n=6$): Os animais foram tratados com solução contendo metilmercúrio e chumbo nas concentrações correspondentes aos grupos MeHg e Pb, respectivamente, por gavagem;
- ❖ Grupo NA ($n=6$): Os animais receberam suplementação de niacina (50 mg/Kg/dia) adicionada na água e água habitual por gavagem;
- ❖ Grupo NA + MeHg ($n=6$): Os animais receberam suplementação de niacina (50 mg/Kg/dia) adicionada na água e solução de metilmercúrio (na concentração correspondente ao grupo MeHg) por gavagem;
- ❖ Grupo NA + Pb ($n=6$): Os animais receberam suplementação de niacina (50 mg/Kg/dia) adicionada na água e solução de chumbo (na concentração correspondente ao grupo Pb) por gavagem;

- ❖ Grupo NA + MeHg + Pb (n=6): Os animais receberam suplementação de niacina (50 mg/Kg/dia) adicionada na água e solução contendo metilmercúrio e chumbo nas concentrações correspondentes aos grupos MeHg e Pb, respectivamente.

Com o intuito de mimetizar uma exposição crônica, o tratamento teve duração de 92 dias e durante este período foram realizadas pesagens quinzenais dos ratos. Ao fim do tratamento os animais foram anestesiados por via peritoneal com cloridrato de xilazina (30 mg kg⁻¹) e cloridrato de quetamina (300 mg kg⁻¹). Posteriormente, as cavidades peritoneal e torácica foram expostas para rompimento do diafragma. O sangue foi coletado com seringa e transferido para dois tubos, um deles contendo o anticoagulante EDTA e outro sem anticoagulante para a obtenção de sangue total e soro, respectivamente. Em seguida, o sangue total foi dividido em duas alíquotas, uma para a realização de ensaios nesta matriz e outra, que foi rapidamente centrifugada em centrífuga refrigerada, para obtenção do plasma. Após a coleta de sangue, os animais foram decapitados por guilhotina para coleta do cérebro e, em seguida, foram coletadas amostras de rim (direito), fígado e osso fêmur (direito). As amostras de tecidos e as alíquotas de sangue total, soro e plasma foram primeiramente colocadas em nitrogênio líquido e a seguir armazenadas a -80 °C até o momento das análises.

3.2 Equipamentos e acessórios

Para a determinação de colesterol total (TC), lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), triglicerídeos (TG), glicemia, atividade das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), hemoglobina, proteínas, tióis totais, espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT), foi utilizado um espectrofotômetro da marca Perkin Elmer® (EUA), modelo Lambda 25 Ultravioleta/Visível (UV/Vis). Este equipamento está instalado no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP.

Para a quantificação de malondialdeído (MDA), utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) Knauer®, modelo WellChrom HPLC Pump K-1001

(Alemanha). Estas análises foram realizadas pelo grupo de pesquisa da professora Solange Cristina Garcia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Para a determinação da concentração de NO utilizou-se o equipamento Sievers® Nitric Oxide Analyzer 280 (GE Analytical Instruments, Boulder, CO. EUA). Estas análises foram realizadas no laboratório da professora Evelin Capellari Cárnio da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto (EERP-USP).

As lâminas do Ensaio do Cometa foram analisadas em microscópio de fluorescência Zeiss Axiostarplus® (Alemanha) utilizando o software *Comet Assay IV* (Perceptive Instruments Ltd., Suffolk, Reino Unido). Estas análises foram realizadas em parceria com o grupo de pesquisa da professora Lusânia Maria Gregg Antunes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP.

As análises para quantificação de mercúrio e chumbo foram realizadas utilizando um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) com cela de reação dinâmica (DRC-ICP-MS ELAN DRCII, PerkinElmer, SCIEX, Norwalk, CT, EUA) operando com argônio de alta pureza (99,999%, Praxair - White Martins, Brasil) e equipado com cone de amostragem e *skimmer* de platina (PerkinElmer, Norwalk, EUA). O sistema de introdução de amostra foi composto por uma câmara de nebulização de quartzo tipo ciclônica e um nebulizador de Meinhard® conectados por tubos Tygon® a bomba peristáltica do ICP-MS. O equipamento foi conectado em um computador Dell Pentium 4 com o *software* Elan® (versão 3.4). Este equipamento encontra-se instalado no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, em uma sala limpa classe “1000”.

Também foi utilizado destilador de quartzo para ácidos (Marconi, Brasil), liofilizador (Liobrás, Brasil) e centrífuga (Bioanalítica, Brasil).

3.3 Reagentes

Água deionizada de alta pureza (resistividade 18,2 MΩ cm) obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore®) foi utilizada em todo o trabalho. Cloreto de metilmercúrio (CH₃HgCl), acetato de chumbo [Pb(CH₃COO)₂] e niacina (ácido nicotínico) para tratamento dos animais foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Fosfato de potássio mono e dibásico, glicina, epinefrina, 5-5-ditio-bis-2-ácido

nitrobenzóico (DTNB), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido tricloroacético (TCA), 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), dodecil sulfato de sódio (SDS), ácido etilenodiamino tetra- acético (EDTA), ácido fosfórico (H_3PO_4), hidróxido de sódio (NaOH), glutatona reduzida (GSH), glutatona redutase (GR), Triton[®] X-100, ácido tiobarbitúrico (TBA), malondialdeído dimetilacetal (MDA), azida sódica, nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato reduzido (NADPH), ditioneitol (DTT), agarose LMP (low melting point), agarose NMP (normal melting point), dimetilsulfóxido (DMSO), *gel red*, hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Os demais reagentes utilizados foram todos de grau analítico.

3.4 Metodologias

3.4.1 Quantificação de colesterol total (TC), lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos (TG) em soro

A quantificação de colesterol total, HDL, LDL e TG foi realizada em soro por método enzimático espectrofotométrico com a utilização de *Kits* comerciais Wiener Lab[®]. O método para a determinação de CT consiste na hidrólise dos ésteres de colesterol, pela ação da colesterol esterase, formando colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase a colest-4-en-3-ona e H_2O_2 . Na presença de peroxidase e H_2O_2 , o fenol e a 4-aminofenazona são oxidados formando a quinoneimina, composto de coloração vermelha que é lido em 505 nm. A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração de colesterol total.

Para a determinação das lipoproteínas de alta densidade (HDL) o soro foi tratado com fosfotungstato na presença do íon magnésio. Assim, as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e as de muito baixa densidade (VLDL) foram precipitadas. O HDL, dissolvido no sobrenadante, foi determinado pela mesma reação descrita para o CT e o LDL, por sua vez, foi obtido pela subtração do HDL do colesterol total.

O método para a quantificação de TG consiste na utilização de lipases para a hidrólise dos triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos livres. Na presença de ATP e glicerol quinase, o glicerol é fosforilado a glicerol-3-fosfato, que é então oxidado pela glicerol fosfato oxidase, originando fosfato de dihidrogênio e H_2O_2 . O H_2O_2 segue a mesma reação descrita para o método do CT, também sendo lida em 505 nm.

3.4.2 Determinação de glicose em soro

A avaliação de glicemia foi realizada em soro por método enzimático espectrofotométrico a 505 nm, com a utilização do *Kit* glicemia Wiener Lab®. O método baseia-se na oxidação da glicose, pela enzima glicose oxidase, com formação de H₂O₂. Este composto reage com 4-aminoantipirina e fenol, pela ação catalisadora de peroxidase e em temperatura de 37 °C, formando um composto de coloração vermelha cuja concentração é proporcional à concentração de glicose na amostra. Neste método, a concentração de glicose na amostra foi determinada pela utilização de um fator de calibração obtido a partir da análise do padrão de glicose, nas mesmas condições.

3.4.3 Determinação da atividade das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) em soro

A determinação da atividade das enzimas aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT) foi realizada em soro por método espectrofotométrico com a utilização de *Kit* comercial Wiener Lab®. A AST catalisa a reação do aminoácido L-aspartato com α -cetoglutarato formando glutamato e oxalacetato. Já a ALT catalisa a reação da L-alanina com α -cetoglutarato formando glutamato e piruvato. O piruvato formado (o oxalacetato é instável e transforma-se em piruvato) reage com a 2,4-dinitrofenilhidrazina produzindo, em meio alcalino, um composto colorido que é medido a 505 nm.

3.4.4 Quantificação de hemoglobina em sangue total

A determinação espectrofotométrica a 540 nm de hemoglobina em sangue total foi realizada no mesmo dia da eutanásia devido a curta estabilidade da amostra. Esta análise foi realizada com a utilização do *kit* comercial Hemoglobina Bioclin®. O método baseia-se na oxidação do átomo de ferro (Fe²⁺) da molécula de hemoglobina pelo ferricianeto de potássio em pH fracamente alcalino, formando a meta-hemoglobina que é convertida em ciano-meta-hemoglobina após a reação com o cianeto de potássio. O composto formado apresenta coloração avermelhada, estável por 60 minutos, sendo sua concentração proporcional à concentração de hemoglobina na amostra. Esta, então, foi determinada com a utilização de um fator

de calibração calculado a partir da análise do padrão de hemoglobina, também constituinte do *Kit*.

3.4.5 Preparo do homogenato de tecidos e quantificação de proteínas

Para a determinação de marcadores de estresse oxidativo no fígado e cérebro dos animais fez-se necessária uma etapa prévia de homogeneização destes tecidos. Para isso, os tecidos foram pesados e homogeneizados em tampão Tris/HCl 50 mM (pH 7.4) como auxílio de um homogeneizador. Foram utilizadas as seguintes proporções: 1 g de cérebro para 5 mL de tampão e 1 g de fígado para 10 mL de tampão. Após a homogeneização, os homogenatos foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm. Ao fim da centrifugação, o sobrenadante foi coletado, fracionado em alíquotas e o precipitado formado foi descartado.

Os resultados obtidos nos ensaios que utilizaram os homogenatos de tecidos foram corrigidos pelo conteúdo de proteínas totais presente nestes. A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976). Este método é baseado na interação entre o corante *Coomassie brilliant blue* BG-250 e macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve luz em 595 nm (Bradford, 1976).

3.4.6 Quantificação de tióis totais (GSH) em sangue total e tecidos

A determinação de tióis totais reduzidos pode ser representada pela quantificação de glutathiona reduzida (GSH), considerando que esta é o principal tiol intracelular. A quantificação de GSH foi realizada por espectrometria UV-VIS segundo metodologia descrita por Ellman (1959) e Sedlak e Lindsay (1968) em amostras de sangue total, fígado e cérebro. O sangue total ou homogenato de tecido, sempre mantido em banho de gelo, foi hemolisado com Triton X-100 e precipitado com ácido tricloroacético (TCA) 30% v/v. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 4000 rpm e os sobrenadantes separados. Após esta etapa, os sobrenadantes foram diluídos em tampão fosfato 1 mol L⁻¹ (pH 7,4) e adicionados do reativo DTNB (5-5-ditio-bis-2-ácido nitrobenzóico) para a ocorrência de uma reação colorimétrica. A curva padrão foi

preparada com GSH nas concentrações 5, 10, 25, 50 e 100 μM . A leitura da curva e das amostras foi realizada em 412 nm e os resultados foram expressos em μM (sangue) ou nmol/mg proteína (tecidos).

3.4.7 Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em sangue total

A atividade da SOD foi determinada em sangue total baseada na quantificação da inibição de 50% da oxidação da epinefrina dependente de superóxido de acordo com McCord e Fridovich (1969). A atividade foi monitorada por espectrofotometria em comprimento de onda de 480 nm e os resultados foram expressos em USOD/mg hemoglobina.

3.4.8 Determinação da atividade da enzima glutathiona peroxidase (GSH-Px) em sangue total e fígado

A atividade da enzima GSH-Px foi avaliada em amostras de sangue total e fígado de acordo com metodologia proposta por Paglia e Valentine (1967) e Flohé e Günzler (1984). O método foi baseado na oxidação de NADPH a 25 °C na presença de amostra diluída, GSH, GR, NADPH, azida sódica e H_2O_2 . Assim, a atividade da enzima foi monitorada durante 2 minutos por espectrofotometria em comprimento de onda de 340 nm. Através da medida do decaimento da absorbância do NADPH foi possível determinar a atividade enzimática, já que esta é proporcional ao consumo de NADPH. Os resultados foram expressos em nmol NADPH/min/g hemoglobina e nmol NADPH/min/mg proteína (tecido).

3.4.9 Determinação da atividade da enzima catalase (CAT) em sangue total e tecidos

A determinação da atividade de CAT foi realizada em amostras de sangue total, fígado e cérebro. O ensaio enzimático para avaliação da atividade desta enzima, descrito por Aebi (1984), utiliza H_2O_2 em concentração elevada como substrato e meio tamponado com tampão fosfato de potássio (pH 7,0; 50 mmol L^{-1}), EDTA e Triton[®] X-100. Com o decorrer da reação, ocorre decomposição de H_2O_2 por ação da enzima e

este processo pode ser detectado pelo decaimento da absorbância monitorada, durante 5 minutos, por espectrofotometria em comprimento de onda de 240 nm. Uma constante de variação (κ), relacionada com a hemoglobina (Hb), serviu para expressar os valores da atividade no sangue (κ/g Hb). Para o fígado e cérebro, os valores foram corrigidos pela concentração de proteínas no homogenato.

3.4.10 Quantificação de malondialdeído (MDA) em plasma e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em tecidos

A quantificação do malondialdeído (MDA) em plasma foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – UV/VIS segundo a metodologia descrita por Grotto e colaboradores (2007). O plasma foi hidrolisado com NaOH, desproteinizado com H_3PO_4 e derivatizado com TBA, a uma temperatura de 90°C por 45 min. Antes da injeção no cromatógrafo, as amostras foram extraídas em n-butanol. As condições cromatográficas utilizadas foram coluna de sílica de fase reversa C18; fase móvel [2,5 mmol L⁻¹ de fosfato de potássio pH 7.0 e metanol (50:50, v/v)]; tempo de corrida de 8 min e fluxo de 0,6 mL min⁻¹. A coluna foi mantida a 40°C durante as análises e a absorbância foi monitorada em 532 nm. Os resultados foram expressos em μM .

A avaliação da indução de lipoperoxidação no fígado e cérebro dos animais foi realizada por meio da determinação da concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) segundo o método de Draper e Hadley (1990). Desta forma, o homogenato do tecido foi pipetado em tubo de ensaio contendo ácido tiobarbitúrico, tampão ácido acético e dodecil sulfato de sódio. Em seguida, os tubos de ensaio foram mantidos em banho-maria à 95°C por duas horas. Após esfriar, os testes foram lidos em espectrofotômetro a 532 nm. Os resultados foram expressos em nmol TBARS/mg proteína.

3.4.11 Determinação da concentração plasmática de óxido nítrico (NO)

Sabendo-se da meia-vida biológica curta e das pequenas concentrações de NO produzidas *in vivo*, quantificações de espécies relacionadas ao NO têm sido usadas para avaliar sua produção, entre elas os nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-). Para a determinação indireta de NO plasmático foi utilizada a técnica de quimioluminescência

NO/ozônio. Alíquotas de 20 µL de amostras de plasma foram desproteinizadas com etanol absoluto, agitadas, mantidas em freezer (- 20 °C) por 30 min, e em seguida, submetidas à centrifugação (4.000 g, 10 min, 25° C). Das amostras desproteinizadas, utilizou-se o volume de 5,0 µL para injetar na câmara de reação do analisador, que contém um agente redutor (0,8% de cloreto de vanádio em 1N de HCl à 95°C) que converte o nitrato em NO, em quantidades equimolares. O NO é sugado para a câmara de quimioluminescência do analisador, que por sua vez, reage com o ozônio (O₃), formando dióxido de nitrogênio (NO₂⁻). O NO₂⁻ apresenta-se numa forma instável e tem a capacidade de emitir fótons que se chocam contra uma superfície fotossensível de uma célula fotomultiplicadora. O fóton emitido pela reação é detectado e convertido em sinal elétrico. A corrente de elétrons é captada, amplificada e processada por um transdutor analógico-digital, dando origem a um traçado gráfico, em que a área sob a curva gerada pela corrente elétrica corresponde à concentração de nitrato na amostra. A curva padrão foi preparada com nitrato de sódio nas concentrações 5, 10, 15, 25, 50 e 100 µM. Os valores de NO foram expressos em µM.

3.4.12 Avaliação da genotoxicidade por meio do Ensaio Cometa

O princípio básico do Ensaio Cometa (ou “*Single Cell Gel Electrophoresis*”) é a migração do DNA em uma matriz de agarose sob condições eletroforéticas. Quando observadas em microscópio, os nucleoides tem a aparência de um cometa, com cabeça (a região nuclear) e uma cauda contendo os fragmentos de DNA que migraram em direção ao pólo positivo. O teste é muito utilizado na identificação de agentes com atividades genotóxicas (Tice et al., 2000). Neste estudo foi utilizada a versão alcalina (pH > 13 do tampão de eletroforese) do teste que é capaz de detectar danos ao DNA do tipo quebras de fita simples, sítios álcali lábeis, pontes entre DNA-DNA e DNA-proteína. As análises foram realizadas segundo metodologia descrita por Singh, McCoy, Tice e Schneider (1988) e Tice (2000). Assim, uma alíquota de 20 µL de sangue foi misturada com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão em tampão fosfato, aplicada sobre lâminas microscópicas previamente revestidas com agarose normal (1,5%) e incubadas em geladeira por 5 min. As lâminas foram, em seguida, imersas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10% DMSO, 1% Triton X-100, 10 mM Tris, pH 10) por 22 horas a 4°C.

Decorrido o tempo de lise, as lâminas foram transferidas para um recipiente contendo solução de eletroforese (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) por 20 minutos para permitir a desnaturação do DNA. Em seguida, as lâminas foram submetidas a um campo elétrico de intensidade 0,78 V/cm (25 V e 300 mA) por 20 minutos. Após esse período, as lâminas foram mergulhadas em uma solução de neutralização (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) por 5 minutos. Depois de secarem a temperatura ambiente, as lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 2 minutos e armazenadas até o momento da análise. Antes da análise, as lâminas foram coradas com o agente intercalante de DNA Gel RED TM ($0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 3 minutos. Foram analisadas 100 imagens de nucleoides para cada animal de forma aleatória com o auxílio do microscópio de fluorescência (Carl Zeiss, Axiostar Plus) utilizando filtro 516-560 nm, barreira de filtro de 590 nm, com aumento original 400x. Os cometas foram avaliados por meio do software de análise de imagem *Comet Assay IV*, versão 4.3 (Perceptive Instruments Ltd.), sendo analisado o parâmetro *Tail intensity*, referente à porcentagem de DNA na cauda (% DNA).

3.4.13 Determinação da concentração de mercúrio e chumbo em sangue total e tecidos por ICP-MS

A determinação das concentrações de mercúrio e chumbo em sangue total e tecidos coletados dos animais foi realizada por ICP-MS cujas condições operacionais estão descritas na Tabela 1. Para análise de sangue, o método utilizado foi o proposto por Palmer e colaboradores (2006). Curvas de calibração com ajuste de matriz foram utilizadas. Assim, sangue caprino (sangue base) foi diluído 50 vezes em uma solução contendo 0,01% de Triton® X-100 e 0,5% de HNO₃. As curvas de calibração variaram de 0 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. Ródio (Rh), na concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, foi utilizado como padrão interno com a finalidade de minimizar possíveis erros analíticos. Os coeficientes de correlação das curvas foram sempre melhores ou iguais a 0.9999. As amostras de sangue dos ratos foram preparadas usando o mesmo diluente e o mesmo fator de diluição.

As amostras de tecidos coletadas dos ratos foram previamente liofilizadas e, em seguida, preparadas para análise segundo metodologia proposta por Batista, Grotto, Rodrigues, Souza, & Barbosa (2009). Assim, 1 mL de TMAH 50% v/v foi adicionado à aproximadamente 75 mg de cada tecido liofilizado. Esta mistura foi mantida em rotação

overnight a temperatura ambiente. Após esta etapa de solubilização, completou-se o volume para 10 mL com solução contendo 0,01% v/v de Triton® X-100 e 0,5% v/v de HNO₃. Rh, na concentração de 10 µg L⁻¹, foi utilizado como padrão interno para minimização de possíveis variações durante as análises. A curva de calibração foi preparada utilizando padrões de Hg e Pb no intervalo de concentração de 1 a 20 µg L⁻¹. Os coeficientes de correlação das curvas foram sempre melhores ou iguais a 0.9999.

Materiais de referência certificados de sangue e tecidos de animais contendo mercúrio e chumbo, provenientes da *National Institute of Standards and Technology* (NIST) e do Departamento de Saúde do Estado de Nova Iorque, foram analisados, juntamente com as amostras em estudo, para o controle dos resultados obtidos.

Tabela 1 – Condições operacionais do ICP-MS para determinação da concentração de mercúrio e chumbo.

Potência de rádio frequência	1200 W
Modo de varredura	<i>Peak hopping</i>
Vazão do gás (Ar)	Plasma 15 L min ⁻¹ ; Auxiliar 1,2 L min ⁻¹
Vazão do gás de nebulização (Ar)	0,56-0,98 L min ⁻¹
Rotação bomba peristáltica	20 rpm
Padrão interno	¹⁰³ Rh (10 µg L ⁻¹)
Isótopos	²⁰² Hg e ²⁰⁸ Pb
Interface	Cones de Platina
Cone de Amostragem	1,1 mm
<i>Skimmer</i>	0,9 mm
Resolução	0,7u
Replicatas, Sweeps e Leituras	3, 40, 1; respectivamente

3.5 Análises estatísticas

As variáveis foram submetidas aos testes de Normalidade e apresentaram distribuição normal. Assim, foi aplicado teste ANOVA-uma via seguido por teste *post hoc* de Duncan. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente diferentes. Os resultados foram analisados com o auxílio do programa Statistica® 8.0 (Statsoft software-EUA) e os gráficos foram construídos utilizando-se o programa GraphPad Prism® 5. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Variação da massa corporal dos animais

Durante o tratamento a massa corporal dos ratos foi verificada quinzenalmente conforme apresentado na Figura 3. De acordo com a figura, os diferentes grupos de animais apresentaram um ganho de massa corporal semelhante durante toda a duração do experimento, indicando que nenhum dos tratamentos interferiu neste parâmetro de avaliação. Ademais, o consumo de água, contendo ou não niacina, foi verificado diariamente por meio da aferição dos volumes remanescentes nos bebedouros durante todo o tratamento (dado não apresentado). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os volumes aferidos, o que indica que os animais se adaptaram bem à água contendo niacina.

Figura 3 – Variação da massa corporal dos ratos dos diferentes grupos de tratamento ao longo do experimento. Valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. ANOVA uma-va, seguida por teste *post hoc* de Duncan com $p < 0,05$. Nenhuma diferença estatística foi encontrada ($p > 0,05$).

4.2 Avaliação do perfil lipídico (TC, HDL, LDL e TG), glicemia, função hepática (AST e ALT) e concentração de hemoglobina

A avaliação de parâmetros bioquímicos simples como perfil lipídico, glicemia, atividade de enzimas hepáticas (AST e ALT) e hemograma pode ser relevante na

exposição a elementos tóxicos como mercúrio e chumbo, dentre outros. A quantificação destes marcadores faz parte dos exames de rotina solicitados na maioria das consultas médicas e qualquer alteração percebida precocemente pode dar início a maiores investigações. Um exemplo é o quadro de anemia provocado pela exposição ao chumbo (Waldron, 1966) que pode ser percebido por meio de um hemograma. Neste estudo foi avaliado o perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL e TG) dos animais e outros parâmetros bioquímicos como glicemia, atividade de AST e ALT e concentração de hemoglobina. Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 2 e 3.

A Tabela 2 apresenta os resultados da quantificação de colesterol total, HDL, LDL e TG no soro dos diferentes grupos de animais utilizados no experimento. Como pode ser observado, os grupos tratados com MeHg e Pb, individualmente e associados, não apresentaram perfil lipídico alterado ($p > 0,05$) quando comparados ao grupo controle. O mesmo resultado foi encontrado para os grupos que receberam niacina isolada e associadamente aos metais.

Tabela 2 – Avaliação do perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL e TG) no soro dos animais de diferentes grupos após o término do tratamento. Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão. ANOVA uma-*via*, seguida por teste *post hoc* de Duncan com $p < 0,05$. Nenhuma diferença estatística foi encontrada ($p > 0,05$).

GRUPOS	PERFIL LIPÍDICO (mg dL ⁻¹)			
	Colesterol total	HDL	LDL	TG
Controle	63 $\pm$ 5	28,4 $\pm$ 1,7	17,7 $\pm$ 5,1	66 $\pm$ 13
MeHg	56 $\pm$ 7	26,5 $\pm$ 4,4	20,7 $\pm$ 3,5	52 $\pm$ 09
Pb	58 $\pm$ 5	26,6 $\pm$ 1,5	18,2 $\pm$ 3,8	61 $\pm$ 11
MeHg + Pb	61 $\pm$ 8	28,7 $\pm$ 4,8	15,7 $\pm$ 2,9	74 $\pm$ 14
NA	56 $\pm$ 4	30,4 $\pm$ 1,1	14,9 $\pm$ 2,0	67 $\pm$ 12
NA + MeHg	56 $\pm$ 4	26,3 $\pm$ 3,6	17,0 $\pm$ 8,2	53 $\pm$ 7
NA + Pb	57 $\pm$ 6	29,0 $\pm$ 1,2	14,1 $\pm$ 5,5	70 $\pm$ 29
NA + MeHg + Pb	64 $\pm$ 3	27,8 $\pm$ 2,6	18,3 $\pm$ 4,2	67 $\pm$ 21

NA: niacina

A análise do perfil lipídico inclui a quantificação do colesterol total, colesterol HDL, popularmente conhecido como o “bom colesterol”, colesterol LDL, conhecido

como “mau colesterol”, e triglicerídeos. Elevações nos valores destes parâmetros estão relacionadas a um aumento no risco de doenças cardiovasculares (Castelli, 1996).

Embora a exposição ao metilmercúrio na dose avaliada ($100 \mu\text{g Kg}^{-1}$) não tenha causado alterações no perfil lipídico dos ratos utilizados neste estudo, Moreira e colaboradores (2012) demonstraram que este metal é capaz de induzir dislipidemia em camundongos *Swiss* em doses elevadas. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram que o tratamento com MeHg ($6,0 \text{ mg Kg}^{-1}$) aumentou as concentrações de colesterol total, HDL, LDL e TG no plasma de camundongos que receberam o metal na água de beber por 28 dias. Adicionalmente, os autores sugeriram que a hipercolesterolemia observada, associada à redução na concentração de NO endotelial (de Marco, Antunes, Tanus-Santos, & Barbosa, 2012), constitua um dos mecanismos de ação responsáveis pelos danos cardíacos provocados pelo MeHg. Ressalta-se que alterações lipídicas semelhantes possam não ter sido observadas em nosso estudo devido à dose consideravelmente baixa de MeHg empregada, 60 vezes menor que a utilizada por Moreira e colaboradores (2012), além da utilização de espécies experimentais diferenciadas, camundongos e ratos.

Em relação à exposição ao chumbo, Heidarian e Rafieian-Kopaei (2013) observaram aumento nas concentrações de TG e redução nas concentrações de colesterol total e LDL no soro de ratos *Wistar* tratados com acetato de chumbo (500 mg Kg^{-1} de dieta) durante 6 semanas. Entretanto, os autores do estudo não explicaram este padrão de alteração no perfil lipídico encontrado nos animais expostos ao metal. Já em relação à exposição simultânea ao chumbo e ao metilmercúrio, não foram encontrados outros estudos na literatura que avaliaram alterações de perfil lipídico neste tipo de exposição.

Embora a niacina seja utilizada como fármaco no tratamento de dislipidemias (Alberto et al., 2011; Lukasova, Hanson, Tunaru, & Offermanns, 2011), não foram encontradas concentrações de colesterol total, HDL, LDL e TG estatisticamente menores nos grupos que receberam suplementação desta vitamina em comparação aos que não receberam (Tabela 2). Tal achado pode ser explicado pelo fato de não ter ocorrido aumento nestes marcadores nos grupos tratados com os metais em comparação ao grupo controle, inviabilizando a avaliação do efeito protetor da niacina neste caso.

A Tabela 3 apresenta os resultados de determinação da glicemia e atividade das enzimas AST e ALT no soro e da concentração de hemoglobina no sangue dos animais utilizados no experimento. Como pode ser observado, não foram encontradas alterações significativas de glicemia comparando-se os grupos ($p > 0,05$).

O tratamento com MeHg e Pb, individualmente e associados, não provocou alterações na atividade da enzima AST em comparação ao grupo controle. Entretanto, um aumento significativo ($p < 0,05$) na atividade da enzima ALT foi encontrado no grupo tratado apenas com MeHg.

Tabela 3 – Determinação de glicemia e atividade da aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) no soro e da concentração de hemoglobina (Hb) no sangue dos diferentes grupos de animais após o término do tratamento. Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão. ANOVA uma-via, seguida por teste *post hoc* de Duncan com $p < 0,05$.

GRUPOS	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS			
	Glicemia ¹	AST ²	ALT ²	Hb ³
Controle	229 $\pm$ 21	67 $\pm$ 7	68 $\pm$ 7	13,3 $\pm$ 0,4
MeHg	243 $\pm$ 26	70 $\pm$ 4	83 $\pm$ 12 ^a	12,7 $\pm$ 0,4
Pb	238 $\pm$ 21	66 $\pm$ 8	78 $\pm$ 10	11,7 $\pm$ 0,7 ^a
MeHg + Pb	208 $\pm$ 56	62 $\pm$ 7	71 $\pm$ 9	12,4 $\pm$ 0,9
NA	192 $\pm$ 32	62 $\pm$ 6	80 $\pm$ 10	12,9 $\pm$ 0,6
NA + MeHg	240 $\pm$ 44	64 $\pm$ 5	79 $\pm$ 14	13,1 $\pm$ 0,3
NA + Pb	211 $\pm$ 30	69 $\pm$ 6	74 $\pm$ 9	12,6 $\pm$ 0,3
NA + MeHg + Pb	210 $\pm$ 37	69 $\pm$ 15	77 $\pm$ 4	13,0 $\pm$ 0,5

¹ (mg dL⁻¹); ² (U L⁻¹); ³ (g dL⁻¹). ^a Média estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$).

AST e ALT são transaminases intracelulares utilizadas como biomarcadores de hepatotoxicidade. Concentrações elevadas destas enzimas no soro indicam que houve dano nas células hepáticas com consequente aumento na permeabilidade da membrana plasmática (Pal & Ghosh, 2012a). Corroborando o resultado observado para o grupo de animais exposto ao metilmercúrio, Pal e Ghosh (2012) encontraram um aumento na concentração plasmática de AST e ALT em ratos tratados com 5 mg/kg/dia de cloreto de MeHg, dose aproximadamente 35 vezes maior que a utilizada neste estudo.

Os grupos de animais que receberam niacina, isoladamente e associada aos metais, não apresentaram atividade de AST e ALT alteradas ($p > 0,05$) quando comparados ao grupo controle. A atividade de ALT determinada para o grupo tratado com MeHg associado a niacina (NA + MeHg) não foi estatisticamente diferente da observada para o grupo tratado apenas com o metal (MeHg) mas também não apresentou diferenças em relação ao grupo controle. Este resultado indica que a administração desta vitamina foi capaz de reverter o aumento da atividade de ALT provocado pela exposição isolada ao metal. Embora a niacina seja ocasionalmente referenciada como um possível agente causador de hepatotoxicidade (Ali, McJunkin, Jubelirer, & Hood, 2013; Guyton & Bays, 2007), o resultado encontrado indica uma proteção dos danos hepáticos promovidos pelo metilmercúrio.

Em relação às concentrações de hemoglobina encontradas na análise de sangue total, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados e o grupo controle, exceto para o grupo que recebeu apenas chumbo como tratamento. Os animais expostos ao chumbo apresentaram uma redução significativa na concentração de hemoglobina em relação ao grupo controle, o que pode ser comparado com dados da literatura (Farooq, Hussain, & Aleem, 2013; H. Gurer, Ozgunes, Neal, Spitz, & Ercal, 1998).

Os resultados do estudo de Farooq, Hussain e Aleem (2013) mostraram redução no número de células vermelhas, no valor de hematócrito e na concentração de hemoglobina, bem como desenvolvimento de anemia normocítica e hipocrômica associados a exposição de ratos ao chumbo (10 mg/Kg de peso corpóreo/semana) por via intraperitoneal durante 6 semanas. Gurer e colaboradores (1998) já haviam observado evidências de anemia como anisocitose e alterações de hemoglobina e hematócrito em ratos tratados com acetato de chumbo (2000 mg/L) na água de beber por 5 semanas.

O sistema hematológico é um dos mais conhecidos alvos da toxicidade provocada pelo chumbo. Os danos neste sistema ocorrem principalmente por meio da redução da produção de hemoglobina e alteração da morfologia e sobrevivência dos eritrócitos (H. Gurer et al., 1998).

O chumbo interfere na produção de hemoglobina por meio da inibição da atividade de enzimas envolvidas na biossíntese do heme, dentre elas a mais sensível a ação deste metal é a ácido δ -aminolevulínico desidratase (ALAD). O chumbo também inibe a atividade da ferroquelatase na última etapa da síntese.

Falhas na condensação de duas moléculas de ácido δ -aminolevulínico (ALA) para formar porfobilinogênio pela ALAD e para inserir ferro na protoporfirina pela ferroquelatase resultam na redução da formação do heme. Por sua vez, a redução na síntese do heme estimula, por *feedback* negativo, a atividade da enzima ALA sintetase, primeira enzima da via de formação do heme. Como consequência, o estímulo na produção de ALA e a redução de sua condensação em porfobilinogênio resultam em aumento considerável na quantidade deste composto na circulação. O ALA está envolvido na geração de estresse oxidativo, responsável por causar danos nos eritrócitos bem como em outras células do organismo (Bechara, 1996; Hande Gurer & Ercal, 2000; Monteiro, Abdalla, Augusto, & Bechara, 1989). Os eritrócitos, além de terem grande afinidade pelo Pb, ligando-se a maior parte de metal presente no sangue, também apresentam grande vulnerabilidade ao estresse oxidativo (Hande Gurer & Ercal, 2000).

A associação da niacina ao chumbo foi capaz de reverter a redução da concentração de hemoglobina provocada pelo tratamento com o metal (Tabela 3). O resultado observado pode ser explicado pelo fato de a niacina estar envolvida na manutenção das concentrações saudáveis de hemoglobina, uma vez que a anemia é um dos sintomas da deficiência desta vitamina em humanos (Spivak & Jackson, 1977), e ainda devido à sua ação antioxidante (Maiese et al., 2009) que pode proteger as membranas dos eritrócitos da ação do chumbo.

Considerando a exposição simultânea ao chumbo e metilmercúrio, não foram encontrados outros trabalhos na literatura que avaliaram alterações de glicemia, função hepática (AST e ALT) e concentração de hemoglobina diante deste contexto.

4.3 Marcadores relacionados ao estresse oxidativo

Conforme citado anteriormente, o estresse oxidativo ocorre como resultado de um desequilíbrio entre a geração de radicais livres e o sistema de defesa antioxidante do organismo e é apontado como um dos principais mecanismos envolvidos na toxicidade do metilmercúrio e chumbo (Jomova & Valko, 2011). Diversos estudos mostraram que a exposição a ambos os metais resulta na geração de ROS e/ou RNS que podem causar danos ao DNA, lipídios e proteínas nos organismos expostos (Crespo-López et al., 2009; G. Flora et al., 2012). Os marcadores de estresse oxidativo avaliados no presente estudo incluem

concentração de glutathiona reduzida (GSH), peroxidação lipídica (MDA e TBARS) e atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GSH-Px). Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 4, 5, 6 e 7.

4.3.1 Glutathiona

A glutathiona (γ -glutamil-L-cisteinil-glicina, GSH) é considerada o principal composto celular livre não proteico com grupamento tiólico (-SH) e também o principal antioxidante endógeno do organismo (CECONI et al., 1988), atuando, desta forma, como a primeira linha de defesa celular contra efeitos de compostos potencialmente tóxicos. Este mecanismo de ação protetor faz com que as reservas de GSH diminuam e que o organismo fique susceptível ao dano oxidativo pelo acúmulo de ROS e RNS, normalmente neutralizadas pela GSH (Sarafian, 1999). A glutathiona existe em duas formas distintas, a glutathiona reduzida é comumente referida apenas como glutathiona e abreviada como GSH; e a outra forma, “oxidada”, é conhecida como glutathiona dissulfido ou GSSH (Kidd, 1997). A diminuição nas reservas da forma reduzida (GSH) pode ser considerada um importante marcador de estresse oxidativo (Spear & Aust, 1995). No presente estudo, a concentração de GSH foi avaliada em amostras de sangue, fígado e cérebro dos animais utilizados no experimento e os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.

O grupo de animais tratado apenas com MeHg apresentou concentração de GSH significativamente ($p < 0,05$) reduzida no sangue e fígado mas não no cérebro, onde foram encontradas concentrações de GSH semelhantes entre este grupo e o controle. De modo oposto, o grupo de animais que recebeu apenas chumbo como tratamento apresentou redução significativa de GSH apenas no cérebro. Já os ratos que foram expostos simultaneamente ao MeHg e Pb (MeHg + Pb) não apresentaram alteração nos valores de GSH em nenhum tecido/órgão estudado, mas sim concentrações semelhantes às observadas para os seus respectivos controles.

Figura 4 – Concentração de glutathiona reduzida (GSH) (μM) em amostras de sangue (A), fígado (B) e cérebro (C) (nmol/mg proteína) dos diferentes grupos de animais após o término do tratamento. ANOVA uma-*via*, seguida por teste *post hoc* de Duncan com $p < 0,05$. ^a Média estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$); ^b Média estatisticamente diferente do grupo MeHg ($p < 0,05$); ^c Média estatisticamente diferente do grupo Pb ($p < 0,05$).

Vários estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que tanto a exposição ao metilmercúrio (Barcelos et al., 2011; Denise Grotto, Vicentini, et al., 2011; Pal & Ghosh, 2012b; Sumathi & Christinal, 2015) quanto ao chumbo (Gurer-Orhan, Sabir, & Özgüneş, 2004; Hunaiti & Soud, 2000; Shukla, Khanna, Khan, & Srimal, 2003) causam redução nas reservas de GSH, em acordo com o resultado observado neste estudo. A ligação dos metais ao grupo tiol (-SH) da GSH causa um desequilíbrio entre a proporção de GSH oxidada (GSSH) e reduzida (GSH), diminuindo o poder antioxidante desta molécula e, conseqüentemente, tornando o organismo mais susceptível aos danos oxidativo provocados por estes compostos (Clarkson & Magos, 2006; G. Flora et al., 2012).

Grotto e colaboradores (2011) encontraram redução nas reservas de GSH no sangue de ratos *Wistar* que receberam MeHg (140 $\mu\text{g/Kg}$ de peso corpóreo/dia) por via oral durante 100 dias. Em outro experimento, conduzido por Barcelos e colaboradores (2011), o MeHg foi administrado a ratos na dose de 30 $\mu\text{g/Kg}$ de peso

corpóreo/dia durante 45 dias. Os autores também observaram redução (17%) nas concentrações sanguíneas de GSH bem como na atividade da GSH-Px.

Neste estudo, além da redução nas concentrações sanguíneas de GSH, os animais expostos ao MeHg apresentaram também queda nas reservas hepáticas desta molécula, corroborando o resultado observado por Pal e Ghosh (2012). Pal e Ghosh (2012) reportaram redução na concentração de GSH no fígado de ratos da linhagem Charles Foster que receberam cloreto de metilmercúrio (5 mg/Kg de peso corpóreo) durante 15 dias.

Considerando as reservas de GSH no cérebro, neste estudo a exposição ao MeHg na dose avaliada não causou alterações nas concentrações desta molécula, contrapondo-se ao observado por Sumathi e Christinal (2015). No referido estudo, Sumathi e Christinal (2015) administraram metilmercúrio por via oral na dose de 5 mg/Kg de peso corpóreo a ratos *Wistar* durante 21 dias. Ao final do tratamento, os autores encontraram redução da concentração de GSH e das atividades de SOD, GSP-Px e CAT no cerebelo e córtex dos animais expostos ao toxicante. É possível sugerir que a dose utilizada no presente estudo não tenha sido suficiente para causar depleção significativa nas reservas de GSH do cérebro, considerando que esta é cerca de 35 vezes menor que a utilizada no estudo acima.

Embora o chumbo também apresente grande afinidade pelos grupamentos sulfidrílicos da GSH (G. Flora et al., 2012), este metal não causou depleção nas reservas desta molécula no sangue e fígado dos ratos do presente estudo. Considerando que o fígado é responsável pela síntese de GSH e que este órgão juntamente com o sangue apresentam as maiores concentrações de GSH reduzida do organismo (Kidd, 1997), a baixa dose de chumbo administrada (648 µg de acetato de Pb/Kg/dia) pode não ter sido suficiente para causar depleção nas reservas de GSH no sangue e fígado dos animais avaliados. Entretanto, este metal causou redução nas concentrações de GSH no cérebro dos animais do estudo.

O resultado obtido está de acordo com o encontrado por Shukla e colaboradores (2003) que reportaram redução nas concentrações de GSH em diferentes regiões cerebrais (cerebelo, corpo estriado, hipocampo e córtex frontal) de ratos *Wistar* tratados com 50 mg/Kg de peso corpóreo de chumbo durante 45 dias. Os autores deste estudo observaram ainda indução de lipoperoxidação e redução na atividade de SOD e CAT no cérebro dos animais expostos.

O cérebro é considerado o órgão mais vulnerável à ação tóxica do chumbo (ATSDR, 2007; Klaassen, 2008) e o estresse oxidativo é apontado como sendo o principal mecanismo envolvido nesta neurotoxicidade (G. Flora et al., 2012). Estudos em humanos demonstraram que mesmo concentrações de chumbo no sangue inferiores a 5 µg/L podem causar problemas cognitivos (Kim et al., 2010; Lucchini et al., 2012), sendo as crianças mais susceptíveis aos efeitos tóxicos deste metal. Kim e colaboradores (2010) reportaram sintomas de hiperatividade e dificuldade de aprendizagem em crianças coreanas de idade entre 8 e 10 anos que apresentavam concentrações sanguíneas de chumbo inferiores a 5 µg/L.

Embora estudos prévios tenham demonstrado os efeitos provocados pelo metilmercúrio e chumbo no sistema antioxidante GSH em diferentes órgãos (Denise Grotto, Vicentini, et al., 2011; Pal & Ghosh, 2012b; Shukla et al., 2003), esta é, de acordo com o nosso conhecimento, a primeira vez que este marcador é avaliado em animais expostos simultaneamente aos dois metais. Considerando o resultado obtido, ocorreu um efeito antagônico entre os dois metais visto que a associação ao Pb reverteu a redução de GSH provocada pelo tratamento com o MeHg no sangue e fígado dos animais, enquanto que no cérebro a associação do MeHg ao Pb reduziu o efeito tóxico (depleção de GSH) causado por este metal isoladamente.

Em relação à administração da niacina, as concentrações de GSH determinadas em amostras de sangue, fígado e cérebro dos ratos que receberam o tratamento com niacina isoladamente (NA) e associada aos metais (NA + MeHg, NA + Pb e NA + MeHg + Pb) foram semelhantes às observadas para o grupo controle de cada tecido/órgão (Figura 4). Ainda, o grupo que recebeu niacina adicionalmente ao metilmercúrio (NA + MeHg) apresentou concentrações de GSH no sangue e fígado estatisticamente maiores que as observadas para o grupo de animais tratado apenas com o metal. No cérebro, a administração desta vitamina simultaneamente ao chumbo (NA + Pb) também apresentou um efeito antioxidante revertendo a redução de GSH provocada pelo tratamento com o metal isoladamente.

Durante o estresse oxidativo, a GSH é oxidada a GSSG que pela ação da enzima glutatona redutase (GR) é novamente convertida a sua forma reduzida, formando um ciclo redox. Para reduzir a GSSG a GSH, a GR utiliza como fonte de elétrons a coenzima NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida) vinda principalmente da via das pentoses fosfato (Kidd, 1997). Conforme mencionado, a niacina é precursora de NAD⁺ e responsável pelo aumento na

concentração desta coenzima no meio celular (Alberto et al., 2011; Maiese et al., 2009; Yan et al., 1999). Ainda, Yan e colaboradores (1999) demonstraram que a niacina aumenta a concentração intracelular de NADPH via supra regulação da expressão da glicose-6-fosfato desidrogenase, enzima limitante na via das pentoses fosfato e principal fonte celular de NADPH. Portanto, é possível inferir que a niacina aumentou a disponibilidade de NADPH tanto através deste mecanismo quanto sendo precursora de NAD^+ , utilizado como substrato na produção de NADPH. Por conseguinte, o aumento nas concentrações de NADPH promovido pela suplementação desta vitamina foi utilizado pela GR para restaurar a fração de GSH oxidada pela ação do metilmercúrio e chumbo. Em estudo realizado por Ganji e colaboradores (2009) utilizando células endoteliais humanas o tratamento com niacina aumentou as concentrações de NADPH em 54% e de GSH reduzida em 98%.

4.3.2 Enzimas antioxidantes

Os antioxidantes são compostos que atuam no sistema de defesa do organismo frente aos radicais livres. Além da GSH, principal antioxidante endógeno, nosso organismo apresenta outras importantes defesas antioxidantes como as enzimas SOD, GSH-Px e CAT. Os resultados da determinação da atividade destas enzimas nos ratos expostos a diferentes tratamentos estão apresentados nas Figuras 5 e 6.

A GSH-Px é uma selenoproteína com estrutura tetramérica. Esta enzima reduz lipídeos ou hidroperóxidos não lipídicos bem como H_2O_2 enquanto oxida duas moléculas de GSH a GSSG. A SOD é uma metaloproteína e possui a capacidade de converter o radical superóxido (O_2^-) em outro radical menos reativo (H_2O_2) e oxigênio molecular. Já a enzima CAT é uma hemoproteína cuja principal função é converter o H_2O_2 , gerado pela SOD nas células em decorrência de estresse oxidativo, em água e oxigênio (Matés et al., 1999). Desta forma, células com diferentes concentrações desta enzima possuirão diferenças de sensibilidade frente a exposição a metais tóxicos como o mercúrio e o chumbo.

A Figura 5 representa graficamente a atividade da enzima SOD, determinada em sangue, e da enzima GSH-Px determinada em amostras de sangue e fígado dos animais do presente estudo. Como pode ser observado, nenhum dos tratamentos causou

alteração na atividade destes antioxidantes em comparação ao grupo controle ($p > 0,05$).

Figura 5 – Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (U SOD/mg Hemoglobina) no sangue (A) e glutathione peroxidase (GSH-Px) ($\mu\text{mol NADPH/min/g Hemoglobina}$) no sangue (B) e fígado (C) (nmol NADPH/min/mg proteína) dos diferentes grupos de animais após o término do tratamento. ANOVA uma-*via*, seguida por teste *post hoc* de Duncan com $p < 0,05$.

Os gráficos que compõem a Figura 6 representam a atividade da catalase determinada em amostras de sangue, fígado e cérebro dos animais do estudo. Como pode ser observado, nenhum dos tratamentos alterou a atividade desta enzima no sangue e fígado dos diferentes grupos em comparação ao grupo controle ($p > 0,05$). Entretanto, considerando a avaliação deste parâmetro no cérebro, foi observada redução significativa ($p < 0,05$) de atividade nos grupos de animais tratados com MeHg e Pb, isoladamente e associados. Em relação à administração de niacina, nenhuma diferença significativa na atividade cerebral da catalase foi observada entre o grupo tratado apenas com a vitamina (NA) e o grupo controle. Também não foram observadas diferenças na atividade desta enzima entre os grupos que receberam MeHg e niacina (NA + MeHg) e MeHg associado ao Pb e à niacina (NA +

MeHg + Pb) em comparação ao grupo controle. Este último resultado indica que a administração da niacina foi capaz de reverter a inibição da atividade da catalase que havia sido observada nos grupos de animais expostos unicamente aos metais. Entretanto, a coadministração desta vitamina com o chumbo (NA + Pb) não foi capaz de reverter a redução na atividade desta enzima observada no grupo de ratos exposto exclusivamente ao metal.

Figura 6 – Atividade da enzima catalase (CAT) (k/g Hemoglobina/min) em amostras de sangue (A), fígado (B) e cérebro (C) (U CAT/mg proteína) dos diferentes grupos de animais após o término do tratamento. ANOVA uma-*via*, seguida por teste *post hoc* de Duncan com $p < 0,05$. ^a Média estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$); ^b Média estatisticamente diferente do grupo MeHg ($p < 0,05$); ^c Média estatisticamente diferente do grupo MeHg + Pb ($p < 0,05$).

Em acordo com o resultado observado neste experimento, Sumathi e Christinal (2015) encontraram redução na atividade de CAT no córtex e cerebelo de ratos *Wistar* que receberam MeHg (5mg/Kg de peso corpóreo) por via oral durante 21 dias. Os autores observaram ainda inibição da atividade de SOD e GSH-Px, redução na concentração de GSH e lipoperoxidação no cérebro dos animais. Corroborando o resultado obtido para a atividade da CAT em sangue, Barcelos e

colaboradores (2011) não encontram redução da atividade desta enzima em ratos tratados com MeHg (30 µg/Kg de peso corpóreo/dia) durante 45 dias.

A diminuição na atividade de CAT em ratos expostos ao chumbo também já havia sido descrita na literatura. Recentemente (P. K. Singh et al., 2015) reportaram inibição na atividade desta enzima em ratos *Wistar* expostos a acetato de chumbo (3 mg/Kg de peso corpóreo/dia) por um período de 90 dias. Entretanto, de acordo com nosso conhecimento, esta é a primeira vez que a redução na atividade desta enzima é reportada em animais expostos simultaneamente ao chumbo e metilmercúrio.

Em relação à suplementação de niacina, a dose administrada desta vitamina demonstrou não ser tóxica ao sistema antioxidante dos animais do experimento visto que não causou alterações nas reservas de GSH (Figura 4) e nas atividades de SOD, GSH-Px (Figura 5) e CAT (Figura 6) nos órgãos/tecidos avaliados. Além de não causar toxicidade, a niacina ainda apresentou atividade protetora considerando que sua administração reverteu a inibição da atividade de CAT observada nos grupos de animais expostos ao metilmercúrio isoladamente e associado ao chumbo. Entretanto, a coadministração desta vitamina com o chumbo (NA + Pb) não foi capaz de reverter a redução na atividade desta enzima observada no grupo de ratos exposto exclusivamente ao metal.

4.3.3 Peroxidação lipídica

Por fim, o último marcador relacionado ao estresse oxidativo avaliado neste estudo foi a capacidade de indução de peroxidação lipídica. Peroxidação lipídica ou lipoperoxidação é o processo mediado por ROS no qual ocorre a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, incluindo aqueles que compõem a membrana das células e organelas. Como consequência, ocorrem transtornos nas funções exercidas pela membrana plasmática tais como seletividade e transporte ou até mesmo liberação do conteúdo de organelas, como enzimas hidrolíticas dos lisossomos (Halliwell & Chirico, 1993).

O malondialdeído (MDA) é o principal aldeído produzido durante a peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas biológicas. A determinação direta de sua concentração é utilizada como biomarcador de lesões nas membranas celulares. Em condições de pH baixo e temperatura elevada, o MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) gerando um composto vermelho fluorescente

que pode ser medido espectrofotometricamente (Janero, 1990). No presente estudo, o potencial de indução de lipoperoxidação do metilmercúrio, chumbo, niacina e associações foi avaliado por meio da quantificação de MDA no plasma e de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado e cérebro dos animais expostos. Os resultados obtidos estão representados na Figura 7.

Figura 7 – Biomarcadores de peroxidação lipídica: Concentração de malondialdeído (MDA) (μM) no plasma (A) e de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (nmol/mg proteína) em amostras de fígado (B) e cérebro (C) dos diferentes grupos de animais após o término do tratamento. ANOVA uma-va, seguida por teste *post hoc* de Duncan com $p < 0,05$. ^a Média estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$); ^b Média estatisticamente diferente do grupo MeHg ($p < 0,05$); ^c Média estatisticamente diferente do grupo Pb ($p < 0,05$); ^d Média estatisticamente diferente do grupo MeHg + Pb ($p < 0,05$); ^e Média estatisticamente diferente do grupo NA ($p < 0,05$).

Como pode ser observado, os animais que foram expostos ao MeHg e Pb, associados ou não, apresentaram elevação significativa ($p < 0,05$) nas concentrações plasmáticas de MDA. Entretanto, para os grupos tratados unicamente com MeHg e com MeHg mais Pb, o aumento nos valores de MDA foi aproximadamente 25 % maior que o observado para o grupo de animais que recebeu apenas o tratamento com Pb. Em relação à administração de niacina,

nenhuma diferença significativa nas concentrações de MDA plasmático foi observada entre o grupo tratado apenas com a vitamina (NA) e o grupo controle. Os valores de MDA do grupo tratado simultaneamente com MeHg e niacina (NA + MeHg) apresentaram-se menores que o observado para o grupo tratado somente com MeHg, mostrando que a administração de niacina reduziu significativamente (cerca de 20%) a lipoperoxidação plasmática provocada pela exposição ao MeHg. No entanto, a coadministração desta vitamina nos grupos tratados com Pb, exclusivamente e associado ao MeHg, não foi capaz de reverter o aumento nas concentrações de MDA observado nestes grupos.

O aumento nas concentrações de MDA no plasma dos ratos do experimento indica, indiretamente, a presença de ROS e/ou RNS que atacam as membranas lipídicas produzindo este composto (Halliwell, Barry & Susanna, 1993). Nossos resultados corroboram os achados de Heidarian e Rafieian-Kopaei (2013) e Grotto e colaboradores (2011) que demonstraram, respectivamente, que a exposição ao Pb e ao MeHg promove um aumento nas concentrações plasmáticas de MDA em ratos. No entanto, nosso estudo é o primeiro a demonstrar que a exposição a baixas doses de MeHg e Pb associados induz peroxidação lipídica no plasma destes animais.

Em relação às concentrações hepáticas de TBARS, representadas na Figura 7, nenhum dos tratamentos induziu aumento neste marcador em comparação ao grupo controle ($p > 0,05$). O fato de o fígado ser o órgão que possui a maior reserva do antioxidante endógeno GSH (Kidd, 1997) pode ser a explicação para este resultado negativo. A quantidade de GSH reduzida presente no fígado pode ter sido suficiente para neutralizar as ROS e/ou RNS geradas durante a exposição dos animais às baixas concentrações de metais, impedindo assim que as membranas dos hepatócitos fossem danificadas. Além disso, embora seja indispensável na metabolização e excreção de toxicantes, o fígado não é o principal órgão alvo de toxicidade do mercúrio e chumbo (Klaassen, 2008).

Considerando a avaliação deste parâmetro no cérebro, foi observado um aumento nas concentrações de TBARS nos grupos de animais tratados com MeHg e Pb, isoladamente e associados. O grupo que recebeu simultaneamente MeHg e Pb apresentou concentração deste biomarcador estatisticamente semelhante ao grupo tratado apenas com Pb, mas 30 % maior que a observada para os animais que receberam apenas MeHg. Nos grupos de ratos que receberam niacina isoladamente e coadministrada aos metais não foram observadas alterações nas concentrações

de TBARS em comparação ao grupo controle, o que indica que esta vitamina foi capaz de reverter a peroxidação lipídica observada no cérebro dos animais expostos aos metais.

Os efeitos neurotóxicos provocados pela exposição ao metilmercúrio e chumbo são bem documentados. Um amplo estudo realizado nas Ilhas Faroé reportou evidências de deficiências na memória, atenção, linguagem e percepção espaço visual em crianças expostas ao MeHg (Grandjean et al., 1997). A encefalopatia, degeneração progressiva de algumas partes do cérebro, é uma consequência direta da exposição ao chumbo e os sintomas incluem apatia, irritabilidade, falta de atenção, dor de cabeça, tremores musculares, perda de memória e alucinações. Manifestações mais graves ocorrem em exposições muito elevadas e incluem delírio, falta de coordenação motora, convulsões, paralisia, coma e ataxia (G. Flora et al., 2012).

Embora os mecanismos moleculares que medeiam a neurotoxicidade induzida pelo metilmercúrio e chumbo não estejam completamente elucidados, diversas evidências sugerem que a peroxidação lipídica representa um evento crítico relacionado aos efeitos neurotóxicos provocados por estes toxicantes (Clarkson et al., 2003; Marcelo Farina et al., 2011; Patrick, 2006a; Villeda-Hernández et al., 2001). O cérebro é particularmente sensível ao ataque de ROS/RNS geradas endogenamente devido ao fato de ser um órgão altamente oxigenado e não apresentar defesas antioxidantes em grandes quantidades. Além disso, o cérebro possui uma grande proporção de lipídeos insaturados que o torna mais susceptível à peroxidação (Kidd, 1997; Villeda-Hernández et al., 2001).

Em acordo com o resultado obtido, recentemente Yang e colaboradores (2015) reportaram aumento na concentração de MDA no cérebro (córtex) de ratos *Wistar* expostos ao MeHg (12 $\mu\text{mol/Kg}$). Adicionalmente, os autores encontraram neste mesmo tecido aumento da geração de ROS e danos oxidativo ao DNA, reportado pela quantificação de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina.

Um possível mecanismo que explica a peroxidação lipídica observada no cérebro dos animais expostos ao MeHg envolve o aumento na concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) devido a exposição a este metal (Franco et al., 2007). Embora seja reconhecido que o H_2O_2 tenha um importante papel fisiológico modulando funções celulares (Droge & Droge, 2002), concentrações elevadas deste composto são perigosas para as células, principalmente devido a formação de

radicais hidroxila via reação de Fenton (McCord & Day, 1978). As principais vias de decomposição do H_2O_2 envolve as enzimas antioxidantes GSH-Px e CAT (Marcelo Farina et al., 2011). Entretanto, a exposição ao MeHg demonstrou causar redução na atividade de ambas as enzimas GSH-Px (M. Farina et al., 2009) e CAT (Figura 6) no cérebro de animais expostos ao MeHg, consequentemente reduzindo a detoxificação do H_2O_2 neste órgão. O aumento na geração de H_2O_2 representa um importante mecanismo pelo qual ocorre a lipoperoxidação neste órgão. Embora o H_2O_2 apresente baixa efetividade na indução de peroxidação lipídica, a formação do radical hidroxila pela reação de Fenton concede uma grande tendência para a remoção de átomos de hidrogênio da cadeia alquílica dos lipídeos das membranas, o que representa um evento pivô na inicialização da lipoperoxidação (Halliwell, Barry & Susanna, 1993).

Nos animais expostos ao chumbo, a indução de peroxidação lipídica observada no cérebro pode ser explicada com sendo um efeito indireto da redução de GSH (Figura 4) e atividade de CAT (Figura 6) encontrada para este mesmo grupo de animais. Com a depleção nas reservas destes antioxidantes endógenos ocorre aumento de ROS, como o H_2O_2 , que ficam livres para atacar as membranas lipídicas do cérebro. Em acordo com o resultado encontrado neste estudo, Nehru e Kanwar (2004) observaram indução de lipoperoxidação associada a redução na atividade de CAT no cérebro de ratos *Wistar* tratados com acetato de chumbo (20 mg/Kg de peso corpóreo/dia) via intraperitoneal durante 2 semanas. Os autores reportaram ainda que o tratamento com N-acetilcisteína após a exposição ao chumbo reduziu significativamente a concentração de TBARS e aumentou a atividade de CAT, protegendo o cérebro dos animais expostos. A ação antioxidante da N-acetilcisteína foi associada, principalmente, devido ao fato de ela ser desacetilada à cisteína, aminoácido essencial para a síntese de GSH (Nehru & Kanwar, 2004). Vale ressaltar que a dose de chumbo administrada aos ratos do estudo acima é cerca de 30 vezes superior à utilizada no presente estudo.

Os resultados obtidos neste experimento corroboram a literatura que aponta a peroxidação lipídica como evento central na neurotoxicidade induzida pelo metilmercúrio e chumbo. Entretanto, de acordo com o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a demonstrar a ocorrência deste efeito em animais expostos simultaneamente a tais toxicantes. Conforme descrito acima, os ratos deste

experimento apresentaram aumento nas concentrações de MDA no plasma e TBARS no cérebro, dois marcadores de lipoperoxidação.

Conforme discutido acima, o estresse oxidativo apresenta papel importante na toxicidade induzida pelo metilmercúrio e chumbo. Em consequência, este fato sugere que a administração de antioxidantes possa atuar reduzindo a toxicidade destes compostos. Adicionalmente, diferentes estudos demonstraram o efeito protetor de antioxidantes frente à toxicidade induzida pelo metilmercúrio (Barcelos et al., 2011; Denise Grotto, Vicentini, et al., 2011) e chumbo (Hande Gurer & Ercal, 2000).

Dentre os compostos com atividade antioxidante, o selênio tem sido bastante estudado na proteção contra efeitos tóxicos desencadeados pela exposição ao MeHg (Denise Grotto, Barcelos, et al., 2009; Sakamoto et al., 2013). Esta proteção ocorre porque o Se é um importante componente de enzimas antioxidantes como a GSH-Px e, além disso, tem a capacidade de ligar-se ao mercúrio formando o complexo Hg-Se que antagoniza os efeitos tóxicos deste metal (Yoneda & Suzuki, 1997). Estudos recentes reportaram ainda a eficiência de flavonoides como a crisina (Manzoli et al., 2015), quercetina (Barcelos et al., 2011), bixina e norbixina (Barcelos et al., 2012) na redução da toxicidade do MeHg. As vitaminas C e mostraram-se eficientes na proteção contra os efeitos do chumbo sobre o balanço oxidativo (S. J. S. Flora et al., 2003).

Recentemente estudos experimentais demonstraram que a vitamina B3 (niacina) apresenta importantes propriedades antioxidantes (Atrash, Dawood, Tousson, & Salama, 2015; Dou et al., 2013; S H Ganji et al., 2009; Shobha H. Ganji et al., 2015). No presente estudo, o efeito antioxidante da niacina foi avaliado em animais expostos ao MeHg e Pb. Em resumo, a suplementação de niacina aos ratos que receberam MeHg reverteu a redução nas concentrações no GSH no sangue e fígado, o aumento de MDA no plasma e TBARS no cérebro e a redução na atividade de CAT no cérebro. Nos ratos expostos ao chumbo, esta vitamina reverteu a redução de GSH e a peroxidação lipídica no cérebro dos animais. Já considerando os animais expostos concomitantemente aos dois metais, o tratamento com niacina atuou protegendo contra a inibição de CAT e o aumento de TBARS no cérebro.

De acordo com o nosso conhecimento, esta é a primeira vez que o efeito protetor da niacina frente ao estresse oxidativo provocado pela exposição ao MeHg e/ou Pb é demonstrado. Entretanto, a niacina mostrou-se efetiva reduzindo a peroxidação lipídica no cérebro de ratos expostos ao herbicida Paraquat, composto

que assim como o MeHg e Pb é reconhecido por causar desequilíbrio oxidativo (Atrash et al., 2015). Adicionalmente, Velaga e colaboradores (2014) demonstraram que o tratamento com extrato de *Coriandrum sativum*, planta que contem niacina dentre outros oxidantes, reduziu o aumento na concentração de ROS e proteínas carboniladas, bem como a lipoperoxidação no cérebro de ratos *Wistar* intoxicados com chumbo (1000 mg/L) pela água de beber durante quatro semanas.

O principal mecanismo que elucida o efeito antioxidante da niacina ocorre por esta vitamina ser precursora para a síntese de nicotinamida adenina dinucleotídeo, NAD (H), e coenzimas relacionadas, NADP(H). O NAD atua como cofator em reações de oxirredução e como regulador do estado redox (NAD⁺/NADH) (Alberto et al., 2011; Maiese et al., 2009; Pardo, 2004). Ademais, a niacina, comparada ao controle, demonstrou aumentar a concentração de GSH em 98% em cultura de células endoteliais humanas (S H Ganji et al., 2009).

4.4 Concentração de óxido nítrico plasmático

A Figura 8 representa o resultado obtido para a determinação da concentração plasmática de NO nos diferentes grupos de animais do experimento. Como pode ser observado, a concentração de NO mostrou-se significativamente reduzida nos grupos de ratos tratados apenas com MeHg ou Pb quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,05$). No entanto, quando os metais foram administrados simultaneamente este quadro foi revertido. Assim, observou-se um efeito antagônico entre o MeHg e o Pb em relação a capacidade de causar redução na concentração plasmática de NO.

Em relação à administração da niacina, as concentrações de NO determinadas em amostras de plasma dos ratos que receberam o tratamento com niacina isoladamente (NA) e associada aos metais (NA + MeHg, NA + Pb e NA + MeHg + Pb) foram semelhantes às observadas para o grupo controle (Figura 8). Ainda, o grupo que recebeu niacina adicionalmente ao metilmercúrio (NA + MeHg) apresentou concentrações de NO no plasma estatisticamente maiores que as observadas para o grupo de animais tratado apenas com o metal. O mesmo resultado foi observado com administração desta vitamina simultaneamente ao chumbo (NA + Pb). Assim, a suplementação de niacina aos animais promoveu um efeito protetor considerando que reverteu a redução de NO encontrada nos grupos expostos exclusivamente ao MeHg ou Pb.

Figura 8 – Concentração de óxido nítrico (NO) (µM) em amostras de plasma dos ratos dos diferentes grupos após o término do tratamento. ANOVA uma-va, seguida por teste *post hoc* de Duncan com $p < 0,05$. ^a Média estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$); ^b Média estatisticamente diferente do grupo MeHg ($p < 0,05$); ^c Média estatisticamente diferente do grupo Pb ($p < 0,05$).

O NO endotelial apresenta papel fundamental na regulação do sistema cardiovascular e influencia na homeostase vascular por meio da manutenção basal da vasodilatação, agregação plaquetária, redução da adesão leucocitária ao endotélio e modulação da proliferação da musculatura lisa (Yetik-Anacak & Catravas, 2006). O mecanismo mais importante para a disfunção endotelial é a diminuição na disponibilidade de NO, ocorrendo falência dos efeitos vasoativos, anticoagulantes e anti-inflamatórios. Assim, a diminuição na produção de NO parece colaborar com o aparecimento de doenças cardíacas, como hipertensão (Cengel & Sahinarslan, 2006).

A hipertensão vem sendo associada tanto com a exposição ao chumbo quanto ao metilmercúrio e a redução na concentração de NO endotelial é apontada como sendo um dos mecanismos envolvidos (Barbosa, Sertorio, Gerlach, & Tanus-Santos, 2006; de Marco et al., 2012; Grotto et al., 2009). Os resultados obtidos neste experimento estão de acordo com estudos prévios que reportaram que a exposição ao chumbo (Vaziri, Liang, & Ding, 1999) e metilmercúrio (Grotto et al., 2009) promove redução nas concentrações plasmáticas de NO em ratos.

Em estudo realizado por Vaziri e colaboradores (1999), ratos receberam acetato de chumbo (100 mg L^{-1}) adicionado na água de beber durante 12 semanas. Os autores monitoraram a pressão sanguínea dos animais e, ao final do tratamento, determinaram a concentração plasmática de nitrotirosina, considerada um marcador da oxidação de NO por ROS. Os animais tratados com chumbo apresentaram

aumento na pressão sanguínea e na concentração de nitrotirosina no plasma. Os autores relacionaram a oxidação, e consequente inativação, do NO, provocada pelas ROS resultantes da exposição ao metal, com a hipertensão encontrada.

No estudo de Grotto e colaboradores (2009), ratos foram expostos ao metilmercúrio (100 µg/kg/dia) por via oral durante 100 dias. Ao final do tratamento, os autores observaram um aumento na pressão sistólica e nas concentrações de MDA, bem como uma redução do NO plasmático nos animais que receberam o metal. Ainda, foi encontrada uma correlação negativa entre as concentrações plasmáticas de NO e a pressão sistólica. Os autores associaram a hipertensão observada com o aumento na produção de ROS e depleção de NO.

Penumathsa e colaboradores (2009) estudaram os efeitos protetores da niacina ligada ao cromo em ratos diabéticos submetidos a injúria por isquemia-reperfusão. Os autores observaram um efeito cardioprotetor da niacina ligada ao cromo mediado, entre outros, por um aumento na ativação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Assim, no nosso estudo, a reversão da depleção de NO provocada pelo chumbo poderia ser explicada por um possível aumento na expressão da eNOS, causado pela suplementação de niacina.

4.5 Genotoxicidade

O Ensaio Cometa em células do sangue constitui uma ferramenta prática para a detecção de danos genotóxicos. Na versão alcalina do teste, são detectadas lesões por quebras das fitas de DNA e sítios álcali lábeis (Singh et al., 1988). Neste trabalho foi considerado o parâmetro *Tail Intensity*, relativo à porcentagem de DNA na cauda do cometa, de forma que, quanto maior a porcentagem de DNA na cauda maior o dano provocado. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 9.

Como pode ser observado, os animais que foram expostos ao MeHg e Pb, associados ou não, apresentaram elevação significativa ($p < 0,05$) na porcentagem de DNA na cauda dos cometas (% DNA) em comparação ao grupo controle. Este resultado obtido indica que ambos os metais foram genotóxicos aos animais do experimento. Em relação à administração de niacina, nenhuma alteração significativa na porcentagem de DNA na cauda dos cometas foi observada nos grupos de ratos que receberam o tratamento com niacina isoladamente (NA) e associada ao Pb (NA + Pb) e ao Pb e MeHg simultaneamente (NA + MeHg + Pb).

Desta forma, a niacina, na dose administrada, não causou danos ao DNA dos animais e foi capaz de reverter os danos observados nos grupos tratados com Pb e com MeHg associado ao Pb. Ainda, o grupo de animais tratados simultaneamente com MeHg e niacina (NA + MeHg) apresentou porcentagem de DNA na cauda dos cometas menor que a observada para o grupo tratado apenas com MeHg, mostrando que a suplementação de niacina reduziu significativamente (cerca de 30%) o dano genotóxico provocado pela exposição a este toxicante. Portanto, a niacina demonstrou possuir uma capacidade antigenotóxica expressiva.

Figura 9 – Marcador de danos ao DNA: Porcentagem de DNA na cauda (% DNA) no Ensaio Cometa realizado em amostras de sangue total dos diferentes grupos de animais após o término do tratamento. ANOVA uma-*via*, seguida por teste *post hoc* de Duncan com $p < 0,05$. ^a Média estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$); ^b Média estatisticamente diferente do grupo MeHg ($p < 0,05$); ^c Média estatisticamente diferente do grupo Pb ($p < 0,05$); ^d Média estatisticamente diferente do grupo MeHg + Pb ($p < 0,05$); ^e Média estatisticamente diferente do grupo NA ($p < 0,05$).

Tanto o metilmercúrio quanto o chumbo são considerados genotóxicos, sendo o primeiro classificado no grupo 2B (possível carcinógeno para humanos) e o segundo no grupo 2A (provável carcinógeno para humanos) pela Agencia Internacional para Pesquisa do Câncer IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 1993; IARC 2006). Alterações no estado redox parecem estar diretamente envolvidas com os efeitos genotóxicos/carcinogênicos provocados por metais (Valko, Morris, & Cronin, 2005).

Çelik, Ögenler e Çömelekoğlu (2005) avaliaram a frequência de micronúcleos no sangue periférico de ratos expostos semanalmente, durante dez semanas, a doses acumulativas de 140, 250 e 500 mg/kg p.c. de acetato de chumbo. Os autores

verificaram um efeito genotóxico do chumbo, em todas as doses testadas, devido a um aumento na frequência de reticulócitos micronucleados no sangue periférico dos animais expostos. Vale ressaltar que a menor dose de acetato de chumbo administrada neste trabalho é cerca de 30 vezes maior que a utilizada no nosso estudo. Assim, este é o primeiro estudo a demonstrar a indução de genotoxicidade em ratos expostos a uma dose extremamente baixa deste metal (648 µg de acetato de Pb/Kg/dia).

Em experimento realizado por Grotto e colaboradores (2011) utilizando o Ensaio Cometa, ratos tratados com MeHg (140 µg/Kg de peso corpóreo/dia) apresentaram aumento de danos ao DNA de células sanguíneas em comparação ao grupo controle. Em um trabalho de revisão, Crespo-López e colaboradores (2009) descrevem os quatro principais mecanismos que levam à genotoxicidade induzida pelo Hg: (i)-produção de ROS, as quais reagem direta ou indiretamente com o DNA; (ii)-ação direta sobre o DNA, formando ligações de DNA com espécies de Hg; (iii)-inibição dos sistemas de reparo do DNA, e (iv)-inibição da formação do fuso mitótico e segregação dos cromossomos (ação sobre os microtúbulos) (Crespo-López et al., 2009).

A capacidade de atuar na proteção a danos genotóxicos apresentada pela vitamina niacina já havia sido descrita anteriormente (Bartleman, Jacobs, & Kirkland, 2008; Kirkland, 2012). Em diferentes modelos experimentais, a deficiência de niacina tem sido relacionada a comprometimentos na parada do ciclo celular e apoptose, atraso no reparo do DNA por excisão, acúmulo de quebras das fitas de DNA, ruptura cromossomal, comprometimento do telômero e desenvolvimento de câncer (Kirkland, 2012). Por outro lado, a suplementação de niacina tem demonstrado proteção contra danos genotóxicos (Bartleman et al., 2008). Em estudo realizado por Bartleman e colaboradores (2008), a suplementação de niacina (4 g/Kg de dieta) causou redução na incidência de leucemias não linfocíticas em ratos tratados com o carcinógeno etilnitrosouréia, quando comparada a uma dieta deficiente nesta vitamina.

Os mecanismos antígeno-tóxicos da niacina podem ser resultantes dos efeitos antioxidantes desta vitamina, bem como de sua função como substrato para as enzimas nucleares poli-ADP-ribose polimerases (PARP). A niacina é precursora de NAD^+ que pode ser reduzido a NADH, ou fosforilado para contribuir para as reservas de NADP^+ e NADPH. O NAD^+ é o substrato para as enzimas PARP que catalisam a ligação da ADP-ribose a diversas proteínas cromossômicas. As proteínas poli-ADP-ribosiladas funcionam na replicação e reparo do DNA, bem como em vários processos celulares incluindo diferenciação e apoptose (Kirkland, 2012).

Existem na literatura poucos estudos abordando os efeitos genotóxicos da exposição simultânea a elementos químicos e, menos ainda, acerca da coexposição MeHg/Pb. Este trabalho demonstrou pela primeira vez que a exposição simultânea ao metilmercúrio e chumbo induz danos genotóxicos na mesma proporção que quando estes elementos são considerados isoladamente (Figura 9).

4.6 Concentração de mercúrio e chumbo em rim, cérebro, sangue e osso dos animais

Sabe-se que os elementos químicos podem competir entre si modulando a absorção, distribuição, excreção e a toxicidade um do outro (Mitchell; Frisbie; Sarkar, 2011). Os resultados da determinação da concentração de mercúrio e chumbo em amostras de rim, cérebro, sangue e osso dos animais deste estudo estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Avaliação da concentração de mercúrio (Hg) e chumbo (Pb) em amostras de rim, cérebro, sangue e osso dos animais de diferentes grupos após o término do tratamento. Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão. ANOVA uma-va, seguida por teste *post hoc* de Duncan com $p < 0,05$. ^a Média estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$).

Grupos	Rim (ng g ⁻¹) ¹		Cérebro (ng g ⁻¹) ¹		Sangue (µg L ⁻¹)		Osso (ng g ⁻¹)
	Hg	Pb	Hg	Pb	Hg	Pb	Pb
Controle	< LD ²	25 $\pm$ 3	< LD ²	15 $\pm$ 2	1 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1	9 $\pm$ 2
MeHg	38557 $\pm$ 9176 ^a	20 $\pm$ 4	1262 $\pm$ 150 ^a	14 $\pm$ 2	15019 $\pm$ 1005 ^a	8 $\pm$ 1	13 $\pm$ 2
Pb	< LD ²	644 $\pm$ 217 ^a	< LD ²	44 $\pm$ 17 ^a	3 $\pm$ 2	16 $\pm$ 2 ^a	204 $\pm$ 49 ^a
MeHg + Pb	34200 $\pm$ 12940 ^a	600 $\pm$ 42 ^a	1187 $\pm$ 59 ^a	35 $\pm$ 1 ^a	14342 $\pm$ 1732 ^a	14 $\pm$ 1 ^a	194 $\pm$ 91 ^a
NA	< LD ²	26 $\pm$ 3	< LD ²	14 $\pm$ 1	< LD ²	7 $\pm$ 1	13 $\pm$ 8
NA + MeHg	33776 $\pm$ 4732 ^a	23 $\pm$ 3	1251 $\pm$ 116 ^a	15 $\pm$ 2	15252 $\pm$ 1446 ^a	9 $\pm$ 1	11 $\pm$ 3
NA + Pb	< LD ²	569 $\pm$ 89 ^a	< LD ²	34 $\pm$ 2 ^a	2 $\pm$ 1	16 $\pm$ 2 ^a	175 $\pm$ 35 ^a
NA + MeHg + Pb	33496 $\pm$ 7911 ^a	606 $\pm$ 71 ^a	1198 $\pm$ 74 ^a	32 $\pm$ 3 ^a	14902 $\pm$ 1696 ^a	15 $\pm$ 2 ^a	188 $\pm$ 82 ^a

NA: niacina. ¹ Peso seco. ² <LD = resultado inferior ao limite de detecção do método.

De um modo geral, os resultados indicam aumento na concentração de mercúrio e chumbo em todos os tecidos avaliados comparando-se os grupos que receberam estes metais ao grupo controle. As maiores concentrações de mercúrio foram observadas no rim > sangue > cérebro. Neste estudo, a concentração de mercúrio não foi determinada no osso visto que sua distribuição para este tecido é desprezível (Klaassen, 2008). Em nenhum dos tecidos avaliados foram encontradas diferenças significativas na concentração e distribuição do mercúrio quando este foi administrado simultaneamente ao chumbo.

As maiores concentrações de chumbo foram observadas no osso > rim > cérebro > sangue. Embora o valor de concentração deste elemento no rim seja numericamente maior que no osso, na realidade o chumbo concentrou-se mais no osso que no rim. Isto pois, uma vez que o rim foi liofilizado antes da análise e, considerando que 90 % deste órgão seja constituído de água, é como se o resultado apresentado na Tabela 4 para este tecido estivesse concentrado 10 vezes.

Apesar de a determinação da concentração de chumbo no sangue ser o principal marcador da exposição a este elemento, este parâmetro reflete apenas a exposição recente ao metal. No caso de exposições crônicas, a maior parte do chumbo estará armazenada nos ossos (ATSDR, 2007), em acordo com o observado neste estudo.

Embora certos nutrientes possam interagir com elementos químicos modulando a sua biodisponibilidade e toxicidade (Passos et al., 2007), a administração de niacina aos ratos do experimento não alterou as concentrações de mercúrio e chumbo em nenhum tecido avaliado.

5 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados mostram que a exposição exclusivamente ao metilmercúrio promoveu alterações em diferentes biomarcadores. Considerando a avaliação de parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, foi observada redução na atividade da catalase no cérebro e nas concentrações de glutatona no sangue e fígado dos animais. Este toxicante também induziu peroxidação lipídica, evidenciada pelo aumento nas concentrações de MDA e TBARS, no plasma e cérebro dos ratos. Os animais expostos ao metilmercúrio apresentaram ainda atividade de ALT aumentada e concentração plasmática de NO reduzida. Por fim, mesmo administrado em baixa concentração, o metilmercúrio promoveu dano genotóxico aos animais do experimento, evidenciado pelo aumento da porcentagem de DNA danificado em células de sangue total durante o Ensaio Cometa. Em relação à distribuição do mercúrio no organismo, esta foi maior no rim, seguido por sangue e, posteriormente, cérebro.

As maiores concentrações de chumbo foram observadas no osso (fêmur) > rim > cérebro > sangue. As principais alterações sobre o sistema redox ocasionadas pela exposição exclusivamente ao chumbo foram observadas no cérebro dos animais. Estes resultados evidenciam que este metal é neurotóxico mesmo em baixas concentrações. No cérebro dos ratos o tratamento com chumbo reduziu a concentração de GSH e a atividade de CAT, além de induzir peroxidação lipídica (observada também no plasma dos animais). A exposição ao chumbo também resultou em danos ao DNA de células sanguíneas dos animais, além de redução na concentração de hemoglobina e NO.

A exposição simultânea ao metilmercúrio e chumbo não resultou em sinergismo de efeitos tóxicos em comparação ao tratamento com os metais individualmente. Ao invés disso, considerando parâmetros como concentração de NO no plasma e de GSH no sangue, fígado e cérebro, a exposição conjunta aos metais antagonizou os efeitos desencadeados por cada metal individualmente. Entretanto, a coexposição também desencadeou genotoxicidade e lipoperoxidação nos animais do experimento. Salienta-se que são necessários mais estudos a fim de elucidar os mecanismos envolvidos nestas interações.

Os dados apresentados evidenciaram que a suplementação de niacina (50 mg/Kg/dia) não foi tóxica aos ratos *Wistar* empregados no estudo, considerando os

parâmetros avaliados. Adicionalmente, a administração desta vitamina apresentou efeitos protetores relevantes frente às alterações desencadeadas pela exposição dos animais aos metais. Considerando que a suplementação de niacina não alterou a concentração e distribuição dos metais (mercúrio e chumbo) nos órgãos/tecidos dos ratos do experimento, é possível atribuir os efeitos protetores desta vitamina às suas propriedades antioxidantes e antigenotóxicas já descritas.

Nossos resultados atestam que a exposição ao metilmercúrio e chumbo até mesmo em doses consideravelmente baixas, em comparação à literatura, induz toxicidade. Adicionalmente, de acordo com o nosso conhecimento, este estudo foi pioneiro em demonstrar que a suplementação de niacina é capaz de reduzir a toxicidade induzida pela exposição a estes elementos químicos em roedores.

Finalmente, a presença ou não de nutrientes com ação protetora aos efeitos da exposição ao mercúrio e ao chumbo pode responder, em parte, pelo motivo das diferenças observadas nos efeitos tóxicos em populações expostas a estes metais. Além disso, diante da maior dificuldade em alterar hábitos no homem que estão relacionados à sua exposição aos contaminantes inorgânicos, como a dieta, por exemplo, a suplementação de nutrientes protetores seria uma boa alternativa para redução dos efeitos decorrentes da exposição.

Diante do exposto e mesmo considerando alguns fatores limitantes, o caráter inédito deste estudo contribui para questionamentos diversos e incentiva a continuidade de pesquisas futuras relacionadas aos efeitos protetores de nutrientes e à exposição simultânea a mais de um elemento químico.

REFERÊNCIAS*

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Ahamed, M., & Siddiqui, M. K. J. (2007). Low level lead exposure and oxidative stress: Current opinions. *Clinica Chimica Acta*, 383(1-2), 57–64. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2007.04.024>
- Alberto, C., Maria, B. De, & Alves, F. (2011). A intrigante bioquímica da niacina – uma revisão crítica. *Química Nova*, 34(10), 1739–1752.
- Ali, E. H., McJunkin, B., Jubelirer, S., & Hood, W. (2013). Niacin induced coagulopathy as a manifestation of occult liver injury. *The West Virginia Medical Journal*, 109(1), 12–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23413541>
- Antonio-García, M. T., & Massó-Gonzalez, E. L. (2008). Toxic effects of perinatal lead exposure on the brain of rats: involvement of oxidative stress and the beneficial role of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 46(6), 2089–2095. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2008.01.053>
- Atrash, A. El, Dawood, L., Tousson, E., & Salama, A. (2015). Neuroprotective Role of Vitamin B 3 in Experimentally Induced Oxidative Stress, 3(1), 21–25. <http://doi.org/10.12691/ijcen-3-1-4>
- Barbosa, F., Fillion, M., Lemire, M., Passos, C. J. S., Rodrigues, J. L., Philibert, A., ... Mergler, D. (2009). Elevated blood lead levels in a riverside population in the Brazilian Amazon. *Environmental Research*, 109(5), 594–9. <http://doi.org/10.1016/j.envres.2009.03.005>
- Barbosa, F., Sertorio, J. T. C., Gerlach, R. F., & Tanus-Santos, J. E. (2006). Clinical evidence for lead-induced inhibition of nitric oxide formation. *Archives of Toxicology*, 80, 811–816. <http://doi.org/10.1007/s00204-006-0111-3>
- Barcelos, G. R. M., Grotto, D., Serpeloni, J. M., Aissa, A. F., Antunes, L. M. G., Knasmüller, S., & Barbosa, F. (2012). Bixin and norbixin protect against DNA-damage and alterations of redox status induced by methylmercury exposure in vivo. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 53(7), 535–541. <http://doi.org/10.1002/em.21715>

* De acordo com o estilo APA – American Psychological Association

- Barcelos, G. R. M., Grotto, D., Serpeloni, J. M., Angeli, J. P. F., Rocha, B. A., de Oliveira Souza, V. C., ... Barbosa, F. (2011). Protective properties of quercetin against DNA damage and oxidative stress induced by methylmercury in rats. *Archives of Toxicology*, 85(9), 1151–7. <http://doi.org/10.1007/s00204-011-0652-y>
- Barreto, G. P. M., Benassi, M. T., & Mercadante, A. Z. (2009). Bioactive compounds from several tropical fruits and correlation by multivariate analysis to free radical scavenger activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(10), 1856–1861. <http://doi.org/10.1590/S0103-50532009001000013>
- Bartleman, A.-P., Jacobs, R., & Kirkland, J. B. (2008). Niacin supplementation decreases the incidence of alkylation-induced nonlymphocytic leukemia in Long-Evans rats. *Nutrition and Cancer*, 60(February 2014), 251–258. <http://doi.org/10.1080/01635580701649628>
- Batista, B. L., Grotto, D., Rodrigues, J. L., Souza, V. C. D. O., & Barbosa, F. (2009). Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. *Analytica Chimica Acta*, 646(1-2), 23–9. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2009.05.022>
- Bechara, E. J. (1996). Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et Al.]*, 29(7), 841–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9070373>
- Bellinger, D. C. (2008). Very low lead exposures and children's neurodevelopment. *Current Opinion in Pediatrics*, 20(2), 172–7. <http://doi.org/10.1097/MOP.0b013e3282f4f97b>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Carlson, L. A. (2005). Nicotinic acid: the broad-spectrum lipid drug. A 50th anniversary review. *Journal of Internal Medicine*, 258(2), 94–114. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2005.01528.x>
- Carneiro, M. F. H., Evangelista, F. S. D. B., & Barbosa, F. (2013). Manioc Flour Consumption as a Risk Factor for Lead Poisoning in the Brazilian Amazon. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues*, 76(December 2015), 206–216. <http://doi.org/10.1080/15287394.2013.752326>

- Castelli, W. P. (1996). Lipids , risk factors and ischaemic heart disease. *Atherosclerosis*, 9150, 1–9.
- CECONI, C., CURELLO, S., CARGNONI, A., FERRARI, R., ALBERTINI, A., & VISIOLI, O. (1988). The role of glutathione status in the protection against ischaemic and reperfusion damage: Effects of N-acetyl cysteine. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 20(1), 5–13. [http://doi.org/10.1016/S0022-2828\(88\)80174-3](http://doi.org/10.1016/S0022-2828(88)80174-3)
- Çelik, A., Öğenler, O., & Çömelekoğlu, Ü. (2005). The evaluation of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood of rats treated with lead acetate. *Mutagenesis*, 20(6), 411–415. <http://doi.org/10.1093/mutage/gei055>
- Cengel, A., & Sahinarslan, A. (2006). Nitric oxide and cardiovascular system. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi : AKD = the Anatolian Journal of Cardiology*, 6(4), 364–8. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/med/17162286>
- Chiodo, L. M., Jacobson, S. W., & Jacobson, J. L. (2004). Neurodevelopmental effects of postnatal lead exposure at very low levels. *Neurotoxicology and Teratology*, 26(3), 359–71. <http://doi.org/10.1016/j.ntt.2004.01.010>
- Cho, K., Kim, H., Rodriguez-Iturbe, B., & Vaziri, N. D. (2009). Niacin ameliorates oxidative stress, inflammation, proteinuria, and hypertension in rats with chronic renal failure. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 297(1), F106–13. <http://doi.org/10.1152/ajprenal.00126.2009>
- Clarkson, T. W., & Magos, L. (2006). The Toxicology of Mercury and Its Chemical Compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, 36(8), 609–662. <http://doi.org/10.1080/10408440600845619>
- Clarkson, T. W., Magos, L., & Myers, G. J. (2003). The toxicology of mercury--current exposures and clinical manifestations. *The New England Journal of Medicine*, 349, 1731–1737. <http://doi.org/10.1056/NEJMra022471>
- Crespo-López, M. E., Macêdo, G. L., Pereira, S. I. D., Arrifano, G. P. F., Picanço-Diniz, D. L. W., Nascimento, J. L. M. Do, & Herculano, A. M. (2009). Mercury and human genotoxicity: Critical considerations and possible molecular mechanisms. *Pharmacological Research*, 60, 212–220. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.02.011>
- de Marco, K. C., Antunes, L. M. G., Tanus-Santos, J. E., & Barbosa, F. (2012). Intron 4 polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene is associated with decreased NO production in a mercury-exposed population. *Science of the Total Environment*, 414, 708–712. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.11.010>

- Dou, X., Shen, C., Wang, Z., Li, S., Zhang, X., & Song, Z. (2013). Protection of nicotinic acid against oxidative stress-induced cell death in hepatocytes contributes to its beneficial effect on alcohol-induced liver injury in mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(8), 1520–8. <http://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.12.012>
- Draper, H. H., & Hadley, M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 186, 421–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2233309>
- Droge, W., & Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47–95. <http://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70–77. [http://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](http://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
- Farina, M., Aschner, M., & Rocha, J. B. T. (2011). Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 256(3), 405–417. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2011.05.001>
- Farina, M., Campos, F., Vendrell, I., Berenguer, J., Barzi, M., Pons, S., & Sunol, C. (2009). Probucol Increases Glutathione Peroxidase-1 Activity and Displays Long-Lasting Protection against Methylmercury Toxicity in Cerebellar Granule Cells. *Toxicological Sciences*, 112(2), 416–426. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfp219>
- Farooq, Y., Hussain, M. M., & Aleem, S. Bin. (2013). Evaluation of oxidative stress , liver functions and anemia in lead intoxicated Sprague Dawley rats, 38(2).
- Flohé, L., & Günzler, W. A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, 105, 114–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727659>
- Flora, G., Gupta, D., & Tiwari, A. (2012). Toxicity of lead: a review with recent updates. *Interdisciplinary Toxicology*, 5(2), 47–58. <http://doi.org/10.2478/v10102-012-0009-2>
- Flora, S. J. S., Pande, M., & Mehta, A. (2003). Beneficial effect of combined administration of some naturally occurring antioxidants (vitamins) and thiol chelators in the treatment of chronic lead intoxication. *Chemico-Biological Interactions*, 145(3), 267–280. [http://doi.org/10.1016/S0009-2797\(03\)00025-5](http://doi.org/10.1016/S0009-2797(03)00025-5)

- Franco, J. L., Braga, H. C., Stringari, J., Missau, F. C., Posser, T., Mendes, B. G., ... Farina, M. (2007). Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain mitochondria: Protective effects of quercetin. *Chemical Research in Toxicology*, 20(12), 1919–1926. <http://doi.org/10.1021/tx7002323>
- Frenedoso da Silva, R., Missassi, G., dos Santos Borges, C., Silva de Paula, E., Hornos Carneiro, M. F., Grotto, D., ... De Grava Kempinas, W. (2014). Phytoremediation potential of Maná-Cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) for the deleterious effects of methylmercury on the reproductive system of rats. *BioMed Research International*, 2014, 309631. <http://doi.org/10.1155/2014/309631>
- Ganji, S. H., Kashyap, M. L., & Kamanna, V. S. (2015). Niacin inhibits fat accumulation, oxidative stress, and inflammatory cytokine IL-8 in cultured hepatocytes: Impact on non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism*, 64(9), 982–990. <http://doi.org/10.1016/j.metabol.2015.05.002>
- Ganji, S. H., Qin, S., Zhang, L., Kamanna, V. S., & Kashyap, M. L. (2009). Niacin inhibits vascular oxidative stress, redox-sensitive genes, and monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*, 202(1), 68–75. <http://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.04.044>
- Grandjean, P., & Herz, K. T. (2011). Methylmercury and brain development: imprecision and underestimation of developmental neurotoxicity in humans. *The Mount Sinai Journal of Medicine, New York*, 78(1), 107–18. <http://doi.org/10.1002/msj.20228>
- Grotto, D., Barcelos, G. R. M., Valentini, J., Antunes, L. M. G., Angeli, J. P. F., Garcia, S. C., & Barbosa, F. (2009). Low levels of methylmercury induce DNA damage in rats: Protective effects of selenium. *Archives of Toxicology*, 83, 249–254. <http://doi.org/10.1007/s00204-008-0353-3>
- Grotto, D., De Castro, M. M., Barcelos, G. R. M., Garcia, S. C., & Barbosa, F. (2009). Low level and sub-chronic exposure to methylmercury induces hypertension in rats: Nitric oxide depletion and oxidative damage as possible mechanisms. *Archives of Toxicology*, 83, 653–662. <http://doi.org/10.1007/s00204-009-0437-8>
- Grotto, D., Santa Maria, L. D., Boeira, S., Valentini, J., Charão, M. F., Moro, a. M., ... Garcia, S. C. (2007). Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, 619–624. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.07.030>
- Grotto, D., Valentini, J., Serpeloni, J. M., Monteiro, P. A. P., Latorraca, E. F., De Oliveira, R. S., ... Barbosa, F. (2011). Evaluation of toxic effects of a diet containing fish contaminated with methylmercury in rats mimicking the exposure in the Amazon riverside population. *Environmental Research*, 111(8), 1074–1082. <http://doi.org/10.1016/j.envres.2011.09.013>

- Grotto, D., Vicentini, J., Angeli, J. P. F., Latorraca, E. F., Monteiro, P. A. P., Barcelos, G. R. M., ... Barbosa, F. (2011). Evaluation of protective effects of fish oil against oxidative damage in rats exposed to methylmercury. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(3), 487–93. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.10.012>
- Gurer, H., & Ercal, N. (2000). Can antioxidants be beneficial in the treatment of Lead poisoning? *Free Radical Biology & Medicine*, 29(10), 927–945. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00413-5](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00413-5)
- Gurer, H., Ozgunes, H., Neal, R., Spitz, D. R., & Ercal, N. (1998). Antioxidant effects of N-acetylcysteine and succimer in red blood cells from lead-exposed rats. *Toxicology*, 128, 181–189. [http://doi.org/10.1016/S0300-483X\(98\)00074-2](http://doi.org/10.1016/S0300-483X(98)00074-2)
- Gurer-Orhan, H., Sabir, H. U., & Özgüneş, H. (2004). Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology*, 195(2-3), 147–154. <http://doi.org/10.1016/j.tox.2003.09.009>
- Guyton, J. R., & Bays, H. E. (2007). Safety considerations with niacin therapy. *The American Journal of Cardiology*, 99(6A), 22C–31C. <http://doi.org/10.1016/j.amjcard.2006.11.018>
- Hageman, G. J., & Stierum, R. H. (2001). Niacin, poly(ADP-ribose) polymerase-1 and genomic stability. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 475, 45–56. [http://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00078-1](http://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00078-1)
- Halliwell, B., & Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation : its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57, 715S–725S.
- Halliwell, Barry & Susanna, C. (1993). Lipid peroxidation : and significanc & its mechanism ,. *The American Journal of Clinical Nutrition*.
- Harris, H. H., Pickering, I. J., & George, G. N. (2003). The chemical form of mercury in fish. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5637), 1203. <http://doi.org/10.1126/science.1085941>
- Hegyi, J., Schwartz, R. A., & Hegyi, V. (2004). Pellagra: dermatitis, dementia, and diarrhea. *International Journal of Dermatology*, 43(1), 1–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14693013>
- Heidarian, E., & Rafieian-Kopaei, M. (2013). Protective effect of artichoke (*Cynara scolymus*) leaf extract against lead toxicity in rat. *Pharmaceutical Biology*, 51(9), 1104–1109. <http://doi.org/10.3109/13880209.2013.777931>

- Hunaiti, A. a., & Soud, M. (2000). Effect of lead concentration on the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase and peroxidase in human blood. *Science of the Total Environment*, 248, 45–50. [http://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00548-3](http://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00548-3)
- IARC Monographs- Classifications. (n.d.). Retrieved January 12, 2016, from <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>
- Janero, D. R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 9(6), 515–540. [http://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90131-2](http://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90131-2)
- Jomova, K., & Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2-3), 65–87. <http://doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.001>
- Kidd, P. M. (1997). Glutathione: Systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Alternative Medicine Review*, 2(3), 155–176.
- Kim, Y., Cho, S.-C., Kim, B.-N., Hong, Y.-C., Shin, M.-S., Yoo, H.-J., ... Bhang, S.-Y. (2010). Association between blood lead levels (<5 µg/dL) and inattention-hyperactivity and neurocognitive profiles in school-aged Korean children. *The Science of the Total Environment*, 408(23), 5737–5743. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.070>
- Kirkland, J. B. (2003). Niacin and carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, 46(2), 110–8. http://doi.org/10.1207/S15327914NC4602_02
- Kirkland, J. B. (2012). Niacin requirements for genomic stability. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 733(1-2), 14–20. <http://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.11.008>
- Lucchini, R. G., Zoni, S., Guazzetti, S., Bontempi, E., Micheletti, S., Broberg, K., ... Smith, D. R. (2012). Inverse association of intellectual function with very low blood lead but not with manganese exposure in Italian adolescents. *Environmental Research*, 118, 65–71. <http://doi.org/10.1016/j.envres.2012.08.003>
- Lukasova, M., Hanson, J., Tunaru, S., & Offermanns, S. (2011). Nicotinic acid (niacin): New lipid-independent mechanisms of action and therapeutic potentials. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(12), 700–707. <http://doi.org/10.1016/j.tips.2011.08.002>

- Luo, W., Ruan, D., Yan, C., Yin, S., & Chen, J. (2012). Effects of chronic lead exposure on functions of nervous system in Chinese children and developmental rats. *Neurotoxicology*, 33(4), 862–71. <http://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.03.008>
- Maiese, K., Chong, Z. Z., Hou, J., & Shang, C. (2009). The vitamin nicotinamide: Translating nutrition into clinical care. *Molecules*, 14, 3446–3485. <http://doi.org/10.3390/molecules14093446>
- Manzoli, E. S., Serpeloni, J. M., Grotto, D., Bastos, J. K., Maria, L., Antunes, G., ... Barcelos, M. (2015). Protective Effects of the Flavonoid Chrysin against Methylmercury-Induced Genotoxicity and Alterations of Antioxidant Status , *In Vivo*, 2015.
- Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., & Núñez de Castro, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32(8), 595–603. [http://doi.org/10.1016/S0009-9120\(99\)00075-2](http://doi.org/10.1016/S0009-9120(99)00075-2)
- McCord, J. M., & Day, E. D. (1978). Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. *FEBS Letters*, 86(1), 139–142. [http://doi.org/10.1016/0014-5793\(78\)80116-1](http://doi.org/10.1016/0014-5793(78)80116-1)
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5389100>
- McKenney, J. (2004). New perspectives on the use of niacin in the treatment of lipid disorders. *Archives of Internal Medicine*, 164(7), 697–705. <http://doi.org/10.1001/archinte.164.7.697>
- Monteiro, H. P., Abdalla, D. S., Augusto, O., & Bechara, E. J. (1989). Free radical generation during delta-aminolevulinic acid autoxidation: induction by hemoglobin and connections with porphyriopathies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 271(1), 206–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2540713>
- Moreira, E. L., de Oliveira, J., Dutra, M. F., Santos, D. B., Gonçalves, C. A., Goldfeder, E. M., ... Farina, M. (2012). Does methylmercury-induced hypercholesterolemia play a causal role in its neurotoxicity and cardiovascular disease? *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 130(2), 373–82. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfs252>
- Nehru, B., & Kanwar, S. S. (2004). N-acetylcysteine exposure on lead-induced lipid peroxidative damage and oxidative defense system in brain regions of rats. *Biological Trace Element Research*, 101(3), 257–264. <http://doi.org/10.1385/BTER:101:3:257>

- Paglia, D. E., & Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70(1), 158–69. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6066618>
- Pal, M., & Ghosh, M. (2012a). Studies on comparative efficacy of α -linolenic acid and α -eleostearic acid on prevention of organic mercury-induced oxidative stress in kidney and liver of rat. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3-4), 1066–1072. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2011.12.042>
- Pal, M., & Ghosh, M. (2012b). Studies on comparative efficacy of α -linolenic acid and α -eleostearic acid on prevention of organic mercury-induced oxidative stress in kidney and liver of rat. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(3-4), 1066–72. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2011.12.042>
- Palmer, C. D., Lewis, M. E., Geraghty, C. M., Barbosa, F., & Parsons, P. J. (2006). Determination of lead, cadmium and mercury in blood for assessment of environmental exposure: A comparison between inductively coupled plasma–mass spectrometry and atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 61(8), 980–990. <http://doi.org/10.1016/j.sab.2006.09.001>
- Pardo, M. (2004). Efecto de *Solanum sessiliflorum* Dunal sobre el metabolismo lipídico y de la glucosa. *Ciencia E Investigación*.
- Passos, C. J., Mergler, D., Gaspar, E., Morais, S., Lucotte, M., Larribe, F., ... De Grosbois, S. (2003). Eating tropical fruit reduces mercury exposure from fish consumption in the Brazilian Amazon. *Environmental Research*, 93, 123–130. [http://doi.org/10.1016/S0013-9351\(03\)00019-7](http://doi.org/10.1016/S0013-9351(03)00019-7)
- Passos, C. J. S., Da Silva, D. S., Lemire, M., Fillion, M., Guimarães, J. R. D., Lucotte, M., & Mergler, D. (2008). Daily mercury intake in fish-eating populations in the Brazilian Amazon. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 18(1), 76–87. <http://doi.org/10.1038/sj.jes.7500599>
- Passos, C. J. S., Mergler, D., Fillion, M., Lemire, M., Mertens, F., Guimarães, J. R. D., & Philibert, A. (2007). Epidemiologic confirmation that fruit consumption influences mercury exposure in riparian communities in the Brazilian Amazon. *Environmental Research*, 105(2), 183–193. <http://doi.org/10.1016/j.envres.2007.01.012>
- Patrick, L. (2006a). Lead toxicity part II: The role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Alternative Medicine Review*, 11(2), 114–127.

- Patrick, L. (2006b). Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: Exposure, evaluation, and treatment. *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic*, 11(1), 2–22.
- Penumathsa, S. V., Thirunavukkarasu, M., Samuel, S. M., Zhan, L., Maulik, G., Bagchi, M., ... Maulik, N. (2009). Niacin bound chromium treatment induces myocardial Glut-4 translocation and caveolar interaction via Akt, AMPK and eNOS phosphorylation in streptozotocin induced diabetic rats after ischemia-reperfusion injury. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1792(1), 39–48. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.10.018>
- Rosenson, R. S. (2003). Antiatherothrombotic effects of nicotinic acid. *Atherosclerosis*, 171(1), 87–96. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14642410>
- Sakamoto, M., Yasutake, A., Kakita, A., Ryufuku, M., Chan, H. M., Yamamoto, M., ... Watanabe, C. (2013). Selenomethionine protects against neuronal degeneration by methylmercury in the developing rat cerebrum. *Environmental Science and Technology*, 47, 2862–2868. <http://doi.org/10.1021/es304226h>
- Sarafian, T. A. (1999). Methylmercury-induced generation of free radicals: biological implications. *Metal Ions in Biological Systems*, 36, 415–444.
- Sedlak, J., & Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25(1), 192–205. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4973948>
- Shukla, P. K., Khanna, V. K., Khan, M. Y., & Srimal, R. C. (2003). Protective effect of curcumin against lead neurotoxicity in rat. *Human & Experimental Toxicology*, 22(12), 653–658. <http://doi.org/10.1191/0960327103ht411oa>
- Simmons-Willis, T. A., Koh, A. S., Clarkson, T. W., & Ballatori, N. (2002). Transport of a neurotoxicant by molecular mimicry: the methylmercury-L-cysteine complex is a substrate for human L-type large neutral amino acid transporter (LAT) 1 and LAT2. *The Biochemical Journal*, 367(Pt 1), 239–46. <http://doi.org/10.1042/BJ20020841>
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184–191. [http://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](http://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Singh, P. K., Nath, R., Ahmad, M. K., Rawat, A., Babu, S., & Dixit, R. K. (2015). Attenuation of lead neurotoxicity by supplementation of polyunsaturated fatty acid in Wistar rats. *Nutritional Neuroscience*, 0(0), 150525070741003. <http://doi.org/10.1179/1476830515Y.0000000028>

- Spear, N., & Aust, S. D. (1995). Effects of glutathione on Fenton reagent-dependent radical production and DNA oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 324, 111–116.
- Spivak, J. L., & Jackson, D. L. (1977). Pellagra: an analysis of 18 patients and a review of the literature. *The Johns Hopkins Medical Journal*, 140(6), 295–309. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/864902>
- Spronck, J. C., Nickerson, J. L., & Kirkland, J. B. (2007). Niacin deficiency alters p53 expression and impairs etoposide-induced cell cycle arrest and apoptosis in rat bone marrow cells. *Nutrition and Cancer*, 57(1), 88–99. <http://doi.org/10.1080/01635580701268337>
- Sumathi, T., & Christinal, J. (2015). Neuroprotective Effect of Portulaca oleraceae Ethanolic Extract Ameliorates Methylmercury Induced Cognitive Dysfunction and Oxidative Stress in Cerebellum and Cortex of Rat Brain. *Biological Trace Element Research*. <http://doi.org/10.1007/s12011-015-0546-6>
- Surjana, D., Halliday, G. M., & Damian, D. L. (2010). Role of nicotinamide in DNA damage, mutagenesis, and DNA repair. *Journal of Nucleic Acids*, 2010. <http://doi.org/10.4061/2010/157591>
- Tang, K., Sham, H., Hui, E., & Kirkland, J. B. (2008). Niacin deficiency causes oxidative stress in rat bone marrow cells but not through decreased NADPH or glutathione status. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19, 746–753. <http://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.10.003>
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., ... Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 206–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10737956>
- Toraason, M., Andersen, M., Bogdanffy, M. S., Dankovic, D., Faustman, E., Foster, P., ... Vainio, H. (2002). Improving risk assessment: Toxicological research needs. *Human and Ecological Risk Assessment*, 8(6), 1405–1419. <http://doi.org/10.1080/20028091057439>
- Tupe, R. S., Tupe, S. G., & Agte, V. V. (2011). Dietary nicotinic acid supplementation improves hepatic zinc uptake and offers hepatoprotection against oxidative damage. *The British Journal of Nutrition*, 105(12), 1741–9. <http://doi.org/10.1017/S0007114510005520>
- Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. T. D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 1161–1208. <http://doi.org/10.2174/0929867053764635>

- Vaziri, N. D., Liang, K., & Ding, Y. (1999). Increased nitric oxide inactivation by reactive oxygen species in lead-induced hypertension. *Kidney International*, 56, 1492–1498. <http://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00670.x>
- Velaga, M. K., Yallapragada, P. R., Williams, D., Rajanna, S., & Bettaiya, R. (2014). Hydroalcoholic Seed Extract of *Coriandrum sativum* (Coriander) Alleviates Lead-Induced Oxidative Stress in Different Regions of Rat Brain. *Biological Trace Element Research*, 159(1-3), 351–363. <http://doi.org/10.1007/s12011-014-9989-4>
- Villeda-Hernández, J., Barroso-Moguel, R., Méndez-Armenta, M., Nava-Ruíz, C., Huerta-Romero, R., & Ríos, C. (2001). Enhanced brain regional lipid peroxidation in developing rats exposed to low level lead acetate. *Brain Research Bulletin*, 55(2), 247–51. [http://doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00512-3](http://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00512-3)
- Waldron, H. a. (1966). The anaemia of lead poisoning: a review. *British Journal of Industrial Medicine*, 23, 83–100. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1008379&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Yan, Q., Briehl, M., Crowley, C. L., Payne, C. M., Bernstein, H., & Bernstein, C. (1999). The NAD(+) precursors, nicotinic acid and nicotinamide upregulate glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase mRNA in Jurkat cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 255(1), 133–136. <http://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0154>
- Yang, T., Xu, Z., Liu, W., Xu, B., Deng, Y., Li, Y., & Feng, S. (2015). Alpha-lipoic acid protects against methylmercury-induced neurotoxic effects via inhibition of oxidative stress in rat cerebral cortex. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39(1), 157–166. <http://doi.org/10.1016/j.etap.2014.11.020>
- Yetik-Anacak, G., & Catravas, J. D. (2006). Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease. *Vascular Pharmacology*, 45(5), 268–76. <http://doi.org/10.1016/j.vph.2006.08.002>
- Yoneda, S., & Suzuki, K. T. (1997). Equimolar Hg-Se complex binds to selenoprotein P. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 231(1), 7–11. <http://doi.org/10.1006/bbrc.1996.6036>
- Zhang, J. Z., Henning, S. M., & Swendseid, M. E. (1993). Poly(ADP-ribose) polymerase activity and DNA strand breaks are affected in tissues of niacin-deficient rats. *The Journal of Nutrition*, 123(April), 1349–1355.

ANEXOS

ANEXO 1: Aprovação pela Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA-USP)

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

CERTIFICADO (2^a via)

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação dos efeitos tóxicos resultantes da exposição crônica a baixas doses de chumbo e metilmercúrio, associados ou não, e do possível efeito protetor da niacina diante desta exposição", protocolo nº 12.1.1599.53.8, sob a responsabilidade de Eloisa Silva de Paula e Fernando Barbosa Júnior que envolve a manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Prefeitura de Campus de Ribeirão Preto (CEUA PUSP-RP) *ad referendum*.

Vigência do Projeto	01/03/2013 a 31/12/2014
Espécie/Linhagem	Rato Wistar
Nº de animais	72
Idade/ Peso	21 dias / 60g
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da PUSP-RP

Ribeirão Preto, 26 de janeiro de 2016.

Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan
Presidente da CEUA PUSP-RP

ANEXO 2: Publicação relacionada à tese

DE PAULA, E. S.; CARNEIRO, M. F. H.; GROTTTO, D.; HERNANDES, L. C.; ANTUNES, L. M. G.; BARBOSA FJr. Protective effects of niacin against methylmercury-induced genotoxicity and alterations in antioxidant status in rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, Volume 79, Issue 2, 2016.