UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Comparação de parâmetros de estresse oxidativo entre ratos
expostos a metilmercúrio em meio aquoso e a peixes contaminados
com o metal**

Denise Grotto

Ribeirão Preto
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Comparação de parâmetros de estresse oxidativo entre ratos
expostos a metilmercúrio em meio aquoso e a peixes contaminados
com o metal**

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

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientado(a): Denise Grotto

Orientador(a): Fernando Barbosa Junior

Ribeirão Preto
2011

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.

Grotto, Denise

Comparação de parâmetros de estresse oxidativo entre ratos expostos a metilmercúrio em meio aquoso e a peixes contaminados com o metal. Ribeirão Preto, 2011. 90 p. : il. ; 30cm.

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

Orientador: Barbosa Junior, Fernando.

1. Metilmercúrio. 2. Selênio. 3. Óleo de peixe. 4. Estresse oxidativo. 5. Óxido nítrico. 6. Inflamação. 7. Genotoxicidade.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Denise Grotto

Comparação de parâmetros de estresse oxidativo entre ratos expostos a metilmercúrio em meio aquoso e a peixes contaminados com o metal.

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

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador(a): Fernando Babosa Junior

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 aos meus pais, Delcio e Vitalina, que sempre priorizaram minha educação e me fizeram acreditar nos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me iluminar e me guiar às escolhas certas.

Aos meus pais, Delcio e Vitalina Grotto, pelo exemplo de coragem, força e simplicidade, buscando sempre o melhor para mim, trabalhando muito para que eu pudesse realizar os meus objetivos.

Ao meu namorado, José Carlos, companheiro no amor, na vida e nos sonhos! Obrigada pela paciência, pelo apoio, pelas palavras de conforto e incentivo, mesmo quando eu me encontrava em momentos difíceis.

Ao meu orientador, professor Fernando Barbosa Júnior, pela oportunidade oferecida, confiança, orientação e pelo bom convívio nestes anos de trabalho. Com ele pude enriquecer meu conhecimento, com suas argumentações científicas e sugestões.

À minha co-orientadora, Solange Cristina Garcia, pelo incentivo após o término do mestrado a continuar na pesquisa, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação e pelo espaço cedido em seu laboratório para a realização de alguns experimentos.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, Juliana, Bruno, Letícia, Maria Fernanda, Rodolfo, Gustavo, Katia, Juliana Nunes, Jairo, Samuel, Juliana Maria, Taísa, Flávia e Vivian pelas sugestões, críticas e apoio demonstrados. Em especial gostaria de agradecer à Maria Fernanda e ao Bruno, pela grande amizade demonstrada.

À técnica do nosso laboratório, Vanessa, pela dedicação e ajuda nos experimentos.

Às amigas e companheiras de apartamento Juliana Mara, Lana e Patrícia, pela convivência, apoio e pelos bons momentos que passamos juntas. Com vocês cresci e aprendi muito.

Também quero agradecer à Juliana Valentini, Juliana Mara, Patrícia, Elder, Juliana Vicentini, Michele e José Pedro pela ajuda nas análises de algumas amostras deste trabalho.

Aos técnicos da FCFRP, João José Franco e José Maria Puga, pelo auxílio técnico-científico na confecção da ração dos ratos.

Às secretárias da FCFRP, Ana, Rosemary e Rosana, pelo cuidado despendido a cada aluno todos esses anos.

À professora Lusânia M. G. Antunes, pelo espaço cedido em seu laboratório para a realização de alguns experimentos.

Aos demais professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pelo agradável convívio e colaboração.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – pelo apoio financeiro.

E a todos que não estão presentes nestas linhas, mas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, dando-me incentivo, meus sinceros agradecimentos!

"A satisfação está no esforço, e não apenas na realização final."

Mahatma Gandhi

RESUMO

GROTTO, D. **Comparação de parâmetros de estresse oxidativo entre ratos expostos a metilmercúrio em meio aquoso e a peixes contaminados com o metal**. 2011. 110 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Os efeitos tóxicos decorrente do consumo de peixes contaminados com metilmercúrio (MeHg) tem sido muito discutido no Brasil, especialmente na Região Amazônica, onde estudos a esse respeito têm mostrado resultados conflitantes. Fatores nutricionais associados à exposição ao MeHg ou a forma na qual o MeHg se encontra ligada no peixe poderiam estar alterando sua toxicidade. Diante destas controvérsias, ratos foram subcronicamente expostos à solução de MeHg, selênio (Se) e óleo de peixe, ou foram alimentados com ração contendo peixes contaminados com MeHg. Biomarcadores de estresse oxidativo, presença de processo inflamatório, genotoxicidade, pressão sistólica, concentração de óxido nítrico (NO), de mercúrio (Hg) total e de Se em diferentes tecidos foram avaliados. Ratos expostos à solução de MeHg, mostraram significativa diminuição de antioxidantes endógenos, aumento na peroxidação lipídica, hipertensão, inflamação de tecidos, dano ao DNA e diminuição de NO. A associação MeHg+Se mostrou significativa proteção antioxidante e antígeno tóxica, porém não foi capaz de proteger a inflamação induzida pelo MeHg e, surpreendentemente, ratos tratados somente com Se apresentaram aumento significativo na pressão sistólica. Na associação MeHg+óleo de peixe observou-se significativa ação anti-inflamatória, antígeno tóxica e anti-hipertensiva, porém não se observou ação antioxidante do óleo de peixe. A absorção do Hg nos diferentes tecidos não foi modificada pela presença de Se ou óleo de peixe. Já em ratos que receberam ração contendo peixe contaminado com MeHg, poucas alterações foram observadas. Houve aumento do biomarcador de peroxidação lipídica malondialdeído em ratos que receberam a ração com o peixe contaminado, bem como a indução de dano no DNA. A partir da 11ª semana, hipertensão também foi observada e o NO não se alterou. Assim, observou-se que o MeHg em solução induziu efeitos oxidantes, inflamação, genotoxicidade e hipertensão, e o MeHg presente no peixe induziu efeitos consideráveis, porém menos severos. A forma química com que o MeHg está presente no peixe, combinado com os nutrientes do peixe como o Se e os ácidos graxos poliinsaturados poderiam estar contribuindo para reduzir os efeitos tóxicos desse elemento.

Palavras-chave: metilmercúrio, selênio, óleo de peixe, estresse oxidativo, óxido nítrico, inflamação, genotoxicidade.

ABSTRACT

GROTTO, D. **Comparison of oxidative stress parameters between rats exposed to methylmercury in aqueous solution and fish contaminated with the metal.** 2011. 110 f. Thesis (Ph.D., Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

The toxic effects due the consumption of fish contaminated with methylmercury (MeHg) have been widely discussed in Brazil, especially in Amazon region, where studies have shown confound results. Nutritional factors associated with MeHg exposure or the form of MeHg in fish could be changing MeHg toxicity. Thus, rats were subchronically exposed to MeHg in solution, selenium (Se) and fish oil, or rats were fed with a diet containing MeHg-contaminated fish. Oxidative stress biomarkers, presence of inflammation, genotoxicity, systolic blood pressure, nitric oxide (NO) levels and total mercury (Hg) and Se in different tissues were determined. Rats exposed to MeHg in solution showed endogenous antioxidants significantly reduced, increase of lipid peroxidation, hypertension, tissue inflammation, DNA damage and decrease of NO levels. MeHg+Se association presented antioxidant protection and antigenotoxic effect, but it was not able to protect the inflammation induced by MeHg. Surprisingly, rats treated only with Se also showed increase in systolic blood pressure. MeHg+fish oil association presented a significant anti-inflammatory and antigenotoxic effects and antihypertensive action; however it was not observed antioxidant capacity of fish oil. Hg absorption in different tissues was not modified by Se or fish oil treatments. On the other hand, rats fed with diet containing MeHg-contaminated fish presented few alterations in biomarkers. A lipid peroxidation biomarker showed significantly increased in rats fed with MeHg-contaminated fish as well as induction of DNA damage. From the 11th week, a hypertension was observed and NO levels did not change. In conclusion, it was observed that MeHg solution was able to induce oxidative effects, inflammation, genotoxicity and hypertension, and MeHg linked in fish induced considerable but mild effects. The chemical form that MeHg is present in fish combined with nutrients from fish, as Se and polyunsaturated fatty acids could contribute to reducing toxic effects of MeHg.

Keywords: methylmercury, selenium, fish oil, oxidative stress, nitric oxide, inflammation, genotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do ciclo do mercúrio (Hg) no meio ambiente, extraída do site http://sineloxigenonopodemosviver.blogspot.com/ e adaptada para o português.....	2
Figura 2. Variação da massa corporal de ratos recebendo diferentes tratamentos ao longo de três meses.....	25
Figura 3. Variação da pressão sanguínea sistólica de ratos recebendo diferentes tratamentos ao longo de três meses.....	26
Figura 4. Concentração de NO em plasma de ratos controle e ratos tratados com metilmercúrio (MeHg) e selênio (Se) em duas doses.....	33
Figura 5. Correlação negativa entre os dados da última semana de aferição da pressão sanguínea e as concentrações de NO em ratos controle e ratos tratados com metilmercúrio (MeHg).....	34
Figura 6. Escore para detecção de dano ao DNA usando o Ensaio Cometa.....	35
Figura 7. Correlação negativa entre o índice de dano no DNA e a atividade da GSH-Px.....	36
Figura 8. Histopatologia do fígado, representado por um campo de uma seção, corado com hematoxilina e eosina, mostrando os diferentes escores avaliados.....	39
Figura 9. Histopatologia do rim, representado por um campo de uma seção, corado com hematoxilina e eosina, mostrando os diferentes escores avaliados.....	40
Figura 10. Variação da massa corporal de ratos recebendo diferentes tratamentos ao longo de três meses.....	43

Figura 11. Variação da pressão sanguínea sistólica de ratos recebendo diferentes tratamentos ao longo de três meses.....	44
Figura 12. Concentração de NO em plasma de ratos controle, tratados com selênio (Se), óleo de peixe, metilmercúrio (MeHg) e em associações.....	50
Figura 13. Porcentagem de DNA na cauda (% DNA) no Ensaio Cometa.....	51
Figura 14. Correlação positiva entre pressão sanguínea sistólica e processo inflamatório no coração nos grupos controle, MeHg e MeHg+Óleo.....	55
Figura 15. Histopatologia do cérebro representado por um campo de uma seção, corado com hematoxilina e eosina.....	56
Figura 16. Histopatologia do coração representado por um campo de uma seção, corado com hematoxilina e eosina.....	67
Figura 17. Cromatograma de especiação de Hg.....	59
Figura 18. Variação da massa corporal de ratos recebendo ração habitual (controle), ração com peixe normal e ração com peixe contaminado ao longo de três meses.....	60
Figura 19. Variação da pressão sanguínea sistólica de ratos recebendo ração habitual (controle), ração com peixe normal e ração com peixe contaminado ao longo de três meses.....	61
Figura 20. Concentração de NO em plasma de ratos tratados com ração habitual (controle), ração com peixe normal e com peixe contaminado com MeHg, oriundo do Rio Tapajós.....	65
Figura 21. Porcentagem de DNA na cauda (% DNA) no Ensaio Cometa.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados dos biomarcadores do estresse oxidativo GSH (glutathiona reduzida), GSH-Px (glutathiona peroxidase), CAT (catalase), SOD (superóxido dismutase), MDA (malondialdeído), ALA-D (δ -aminolevulinato desidratase), R (reativação da ALA-D) e PC (proteínas carboniladas) do Estudo I.....	29
Tabela 2. Resultados das análises histopatológicas dos tecidos de ratos do Estudo I (n = 8, exceto nos grupos MeHg+Se 2 e 6 mg/L, onde n = 7).....	37
Tabela 3. Resultados da quantificação de Hg total do Estudo I em diferentes órgãos, sangue e plasma.....	41
Tabela 4. Resultados dos biomarcadores do estresse oxidativo GSH (glutathiona reduzida), GSH-Px (glutathiona peroxidase), CAT (catalase), SOD (superóxido dismutase), MDA (malondialdeído), ALA-D (δ -aminolevulinato desidratase), R (reativação da ALA-D) e PC (proteínas carboniladas) do Estudo II.....	46
Tabela 5. Resultados das análises histopatológicas dos tecidos de ratos do Estudo II (n = 8).....	53
Tabela 6. Resultados da quantificação de Hg total do Estudo II em diferentes órgãos, sangue e plasma.....	58
Tabela 7. Resultados dos biomarcadores do estresse oxidativo GSH (glutathiona reduzida), GSH-Px (glutathiona peroxidase), CAT (catalase), SOD (superóxido dismutase), MDA (malondialdeído), ALA-D (δ -aminolevulinato desidratase), R (reativação da ALA-D) e PC (proteínas carboniladas) do Estudo III.....	63
Tabela 8. Resultados das análises histopatológicas dos tecidos de ratos do Estudo III (n = 8).....	67

Tabela 9. Resultados da quantificação de Hg total do Estudo III em diferentes órgãos, sangue e plasma.....	69
---	----

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ALA-D	δ -aminolevulinato desidratase
CAT	catalase
DHA	ácido docosahexanóico
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DTNB	5-5-ditio-bis-2-ácido nitrobenzóico
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiamino tetra- acético
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
EPA	ácido eicosapentóico
ERNs	espécies reativas de nitrogênio
EROs	espécies reativas de oxigênio
EtHg	etilmercúrio
GSH	glutathiona reduzida
GSH-Px	glutathiona peroxidase
GSHR	glutathiona redutase
Hb	hemoglobina
Hg-i	mercúrio inorgânico
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
ICP-MS	espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LC-ICP-MS	cromatografia líquida com espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente
LMP	baixo ponto de fusão
MDA	malondialdeído
MeHg	metilmercúrio
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato reduzido
NMP	ponto de fusão normal
PC	proteínas carboniladas
r	coeficiente de correlação
R	reativação

SDS	dodecil sulfato de sódio
SeI P	selenoproteína P
SOD	superóxido dismutase
TBA	ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
TMAH	hidróxido de tetrametilamônio
USOD	unidades de SOD
UV-VIS	ultravioleta-visível

LISTA DE SÍMBOLOS

$\pm$	mais ou menos
TM	<i>trademark</i>
%	porcentagem
®	marca registrada
<	menor que
>	maior que
°C	graus Celsius
λ	lambda (comprimento de onda)

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	v
Lista de Abreviaturas e Siglas	vii
Lista de Símbolos	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O Mercúrio e suas formas de apresentação no ambiente.....	1
1.2 Exposição ao mercúrio e seus efeitos.....	3
1.3. Toxicodinâmica do mercúrio.....	4
1.3.1. Efeitos do mercúrio sobre os compostos com grupos tiólicos.....	4
1.3.2 Morte celular induzida por mercúrio.....	5
1.3.3 Oxidação de lipídios, proteínas e DNA induzidos pelo Hg.....	6
1.3.4 Efeitos do mercúrio sobre outras enzimas antioxidantes.....	7
1.3.5 Possíveis interações do MeHg com o sistema do óxido nítrico.....	8
1.4 Resultados controversos sobre efeitos tóxicos do MeHg.....	8
1.5 Selênio e Ômega-3.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 Estudo I.....	12
2.2 Estudo II.....	12
2.3 Estudo III.....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 Equipamentos.....	13
3.2 Reagentes e Soluções.....	13
3.3 Metodologias.....	14
3.3.1 Quantificação de Hg	14
3.3.2 Quantificação das proteínas carboniladas.....	15
3.3.3 Quantificação de tióis totais.....	16
3.3.4 Quantificação do MDA.....	16

3.3.5 Atividade da GSH-Px.....	16
3.3.6 Atividade da CAT.....	17
3.3.7 Atividade da SOD.....	17
3.3.8 Atividade da ALA-D.....	17
3.3.9 Concentração de NO (nitratos e nitritos).....	18
3.3.10 Avaliação do dano ao DNA.....	18
3.3.11 Análises histopatológicas.....	19
3.3.12 Análise de Materiais de Referência Certificada.....	19
3.4 Delineamento Experimental.....	20
3.4.1 Estudo I – Avaliação dos efeitos da exposição subcrônica ao MeHg administrado na forma de sal e da associação com selênio.....	20
3.4.1.1 Escolha da dose e tratamento dos animais.....	20
3.4.2 Estudo II – Avaliação dos efeitos da exposição subcrônica ao MeHg Administrado na forma de sal e da associação com óleo de peixe e com selênio.....	22
3.4.2.1 Escolha da dose e tratamento dos animais.....	22
3.4.3 Estudo III – Avaliação dos efeitos da exposição subcrônica ao MeHg através de dieta contendo peixes contaminados com o metal.....	22
3.4.3.1 Liofilização do peixe contaminado e preparo da ração contendo peixe.....	22
3.4.3.2 Tratamento dos animais.....	23
3.5 Análise Estatística.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1 Estudo I.....	25
4.2 Estudo II.....	43
4.3 Estudo III.....	59
5. CONCLUSÕES.....	71
5.1 Estudo I.....	71
5.2 Estudo II.....	71
5.3 Estudo III.....	72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

7. ANEXOS.....	89
7.1 Aprovação no Comitê de ética no Uso de Animais.....	89
7.2 Artigos Publicados.....	90

1. Introdução

1.1 O Mercúrio e suas formas de apresentação no ambiente

O mercúrio (Hg) é um elemento químico encontrado naturalmente no solo (AULA et al., 1994) e liberado da crosta terrestre em pequenas quantidades por processos naturais e em maiores quantidades pela queima de combustível fóssil, petróleo, pelo processo de mineração e desmatamento (PASSOS; MERGLER, 2008). O Hg é um dos contaminantes ambientais mais conhecidos, o qual induz severas alterações no organismo humano e de animais (STACEY; KAPPAS, 1982). A relação entre o homem e o Hg é bastante antiga, datada da pré-história, onde o homem fazia uso de uma pedra vermelha de minério de Hg, o sulfeto de mercúrio ou cinábrio (HgS) para fazer suas pinturas. O homem também fez uso de compostos mercuriais para tratar males dos olhos, ouvidos, pulmões e intestinos, e para forçar contrações uterinas em partos difíceis. Na Idade Média, o Hg passou a ser utilizado nos processos de amalgamação (formação de ligas de Hg com prata e com ouro) e só a partir de então (meados do século XVII) o Hg foi reconhecido como causador de intoxicações (AZEVEDO, 2003).

O Hg pode ocorrer nas formas orgânica e inorgânica. As formas de Hg diferem em suas propriedades, sendo, entretanto, todas tóxicas. O Hg elementar, ou vapor de Hg (Hg^0) é altamente lipofílico e facilmente absorvido pela mucosa oral e pelos pulmões. Após alcançar a corrente circulatória, o Hg^0 transpõe membranas, incluindo a barreira hemato-encefálica e a placentária e, dentro das células, é oxidado pela catalase (CAT) a mercúrio mercúrico (Hg^{2+}) (ERCAL; GURER-ORHAN; AYKIN-BURNS, 2001). Além disso, no ambiente, o Hg^0 pode se oxidar através de reações com oxidantes atmosféricos, formando o Hg^{2+} . A forma inorgânica Hg^{2+} é mais solúvel e pode se aderir a partículas na atmosfera e, com a umidade e as chuvas, depositar-se no ambiente, principalmente o aquático (FITZGERALD, 1995).

Uma vez no ecossistema aquático, o Hg^{2+} é exposto a condições físico-químicas que favorecem sua metilação a metilmercúrio (MeHg), completando o Ciclo do Mercúrio (CLARKSON; MAGOS, 2006), mostrado na Figura 1.

Figura 1. Representação esquemática do ciclo do mercúrio (Hg) no meio ambiente, extraída do site <http://sineloxigenonopodemosviver.blogspot.com/> e adaptada para o português. Sob a forma de mercúrio metálico (Hg^0), pode sofrer processo de oxidação, tornando um elemento hidrossolúvel, o mercúrio mercúrico (Hg^{2+}). Através da chuva, retorna ao solo e/ou à água e no ambiente aquático pode ser metilado por microrganismos presentes no sedimento a metilmercúrio (MetilHg). O MetilHg entra na cadeia alimentar, iniciando-se pelos plânctons, peixes herbívoros e carnívoros, e finalmente, chega ao homem através da pesca.

Após a metilação, o MeHg torna-se rapidamente biodisponível e acumula-se ao longo da cadeia trófica (MALM, 1998). Dessa forma, as algas e as plantas aquáticas apresentam concentrações de MeHg poucas vezes maiores do que as concentrações em águas. Já os peixes que consomem estas plantas têm concentrações maiores, e assim ocorre sua bioacumulação, até que os peixes do topo da cadeia alimentar sejam atingidos, apresentando concentrações de MeHg até

um milhão de vezes maiores às das águas onde vivem (GUIMARÃES; FORTI, 1999).

1.2 Exposição ao mercúrio e seus efeitos

As principais vias de exposição do homem ao Hg ocorrem pela inalação e dieta (GOCHFELD, 2003). A exposição ao vapor de Hg^0 está frequentemente relacionada à toxicologia ocupacional, enquanto que a exposição ao MeHg ocorre pela ingestão principalmente de peixes com altas concentrações deste metal (CLARKSON; MAGOS, 2006).

Após ser absorvido, o MeHg é distribuído por todos os tecidos do corpo, processo este que leva em torno de 4 dias. Nos seres humanos, o Hg orgânico tem uma meia vida biológica relativamente longa e muito variada, de 35 a 100 dias (OGA, 2008), com média de 65 dias. O MeHg pode acumular-se nos rins, fígado e cérebro e sua eliminação se dá pelos rins, glândulas sudoríparas, pele e leite (FISHBEIN, 1971).

O interesse em entender como o Hg afeta o homem de maneira tão severa se originou a partir de grandes desastres ambientais ocorridos com este metal nas décadas de 50 e 60 em Minamata, no Japão (KURLAND; FARO; SIEDLER, 1960; ETO, 2000) e mais tarde, em 1971, no Iraque (ARMIN-ZAKI et al., 1974), onde milhares de pessoas morreram de um mal que ficou posteriormente conhecido como *Doença de Minamata*.

Os efeitos tóxicos do MeHg são particularmente notáveis no cérebro, sendo os principais sintomas distúrbios visuais, parestesia, perda da audição, tremor muscular, distúrbio da motilidade, paralisia e até morte (LEBEL et al., 1996; GRANDJEAN et al., 1999; ETO, 2000) e também nos rins, causando nefrotoxicidade (KOZMA et al., 1996). Além disso, o MeHg é teratogênico (STEUERWALD et al., 2000). Em Minamata, mulheres intoxicadas por MeHg geraram crianças com severos danos cerebrais, tais como paralisia cerebral, microcefalia e retardo mental (KONDO, 2000).

Pesquisadores do mundo inteiro discutem o comportamento do MeHg e sua toxicidade, especialmente na Região Amazônica, na tentativa de se determinar o verdadeiro risco que este elemento apresenta à população local (GRANDJEAN et al., 1999; DÓREA et al., 2005; PASSOS; MERGLER, 2008).

Na Região Amazônica, a especial atenção despertada pela exposição ao Hg surgiu em meados dos anos 80, quando concentrações elevadas de Hg foram encontradas no ambiente, inicialmente associadas à atividade do garimpo de ouro e, posteriormente, à queima da floresta (MALM et al., 1990; NRIAGU et al., 1992). Além disso, estudos mostraram que o solo da região amazônica também é rico neste elemento (ROULET; LUCOTTE, 1995). Neste sentido, a contaminação de peixes pelo MeHg tem sido reconhecida como um grande problema para ribeirinhos, incluindo população indígena, que se alimentam quase que exclusivamente de peixe (LEBEL et al., 1997; DÓREA et al., 2003).

Nós últimos anos, começou-se a observar uma relação entre a exposição ao MeHg e o aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DÓREA et al., 2005). Estudos têm demonstrado que a ingestão de peixes contaminados com Hg inorgânico está relacionada, a longo prazo, à maior incidência de morte por infarto de miocárdio, doença coronariana e outras doenças cardiovasculares (SALONEN et al. 1995; SHAN; EGELAND, 2004). Os mecanismos destes efeitos cardiotóxicos ainda não são conhecidos. Entretanto, pode haver uma relação com o estresse oxidativo, inflamação e com possíveis alterações na concentração de óxido nítrico induzido pelo MeHg.

1.3 Toxicodinâmica do mercúrio

Vários são os mecanismos sugeridos para explicar os efeitos tóxicos do MeHg e do Hg inorgânico, porém acredita-se que nenhum deles atue de maneira isolada no organismo. Além disso, propõe-se que o estresse oxidativo deva estar diretamente envolvido na toxicidade induzida pelo Hg.

1.3.1 Efeitos do mercúrio sobre os compostos com grupos tiólicos

Um dos mais importantes mecanismos que explica o dano oxidativo induzido pelo MeHg é a sua alta reatividade com os grupamentos sulfidrílicos ($-SH$) (SCHURZ; SABATER-VILAR; FINK-GREMMELS, 2000). A glutathiona reduzida (GSH) - L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina - é o mais abundante e essencial tiol celular livre, e também o principal antioxidante endógeno do organismo (DRINGEN, 2000), responsável pela manutenção do estado redox normal. A GSH serve como uma primeira linha de defesa celular contra os compostos de Hg (OU et al., 1999). Tanto o Hg^{2+} quanto o MeHg conjugam-se aos grupamentos $-SH$ da GSH e também a

resíduos de cisteína de forma covalente, minimizando os efeitos deletérios deste metal. O conhecimento da afinidade do Hg pelos grupamentos –SH tem sido base para o planejamento de antídotos contra a intoxicação por este metal.

Esta ação protetora mediada pela GSH pode induzir a depleção deste antioxidante, e assim o organismo fica mais susceptível ao dano oxidativo diante do desequilíbrio entre o aumento das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs) e diminuição da GSH (SHANKER et al., 2005). Por outro lado, um estudo realizado com mineradores expostos ao Hg elementar mostrou um aumento nas concentrações de GSH (KOBAL et al., 2008), que pode ser explicado por um possível mecanismo compensatório adaptativo (LUCCHI et al., 2005).

Outras enzimas também podem proteger o organismo desse desequilíbrio oxidativo. É o caso da enzima δ -aminolevulinato desidratase (ALA-D), uma metaloenzima essencial na rota de biossíntese do heme, que requer grupamentos tiólicos reduzidos para sua atividade (SASSA, 1998). Estudos realizados com pacientes sob tratamento de hemodiálise, estado relacionado com o estresse oxidativo, mostraram inibição da atividade da ALA-D relacionada à oxidação dos grupamentos –SH (Valentini, et al., 2007, 2008). Em um estudo realizado por Perottoni e colaboradores, a atividade da enzima ALA-D também se mostrou reduzida em ratos expostos a HgCl_2 , sugerindo assim que os grupamentos –SH da enzima poderiam estar parcialmente envolvidos na inibição da ALA-D (PEROTTONI et al., 2004). Insuficiência renal crônica, Outros processos Assim, verifica-se que, além de estar envolvida na biossíntese do heme, a enzima ALA-D pode ser utilizada como marcador de estresse oxidativo.

1.3.2 Morte celular induzida por mercúrio

Outro mecanismo de toxicidade do Hg é a morte celular, principalmente de neurônios. A degeneração neuronal induzida pela exposição ao MeHg pode ocorrer tanto por necrose (CASTOLDI et al., 2000) quanto por apoptose (KUNIMOTO, 1994; CASTOLDI et al., 2000), sendo a intensidade da exposição o fator crucial para estabelecer esta diferença.

Estudos *in vitro* sugeriram que a concentração de MeHg a qual as células foram expostas seria um fator crítico, determinando o mecanismo de morte neuronal. Assim, altas concentrações de MeHg (5–10 $\mu\text{mol/L}$) causariam intenso dano mitocondrial, lise da membrana plasmática, liberação do conteúdo intracelular e

reação inflamatória local (SCHWARTZ et al., 1993), resultando em necrose celular (CASTOLDI et al., 2000). Por outro lado, exposições a baixas concentrações de MeHg ($<1 \mu\text{mol/L}$) causariam, principalmente, morte de células neuronais por apoptose (CASTOLDI et al., 2000), sem causar processo inflamatório e danos no tecido circundante.

1.3.3 Oxidação de lipídios, proteínas e DNA induzidos pelo Hg

Além de depletar a principal defesa antioxidante do organismo, a GSH, tanto o Hg inorgânico quanto o MeHg podem induzir a produção de EROs, tais como H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ e $\text{OH}^{\cdot}$ (SARAFIAN et al., 1999; CRESPO-LÓPEZ et al., 2007), causando um desequilíbrio entre as espécies antioxidantes e as oxidantes no organismo. Este desequilíbrio gera um estado pró-oxidante, também conhecido como estresse oxidativo. As EROs, então, podem atacar e provocar modificações em estruturas como lipídeos (ESTERBAUER, CHEESEMAN, 1990), proteínas celulares (HALLIWELL; CHIRICO, 1993) e DNA (MARNETT, 1999).

Um dos principais produtos da peroxidação lipídica é o malondialdeído (MDA), o qual é muito utilizado como indicador do dano da membrana celular (ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991). Em um estudo realizado por Huang e colaboradores, concentrações elevadas de MDA foram encontradas em rins, fígado e pulmão de ratos tratados com HgCl_2 (HUANG; CHENG; LIN, 1996). Perottoni e colaboradores, do mesmo modo, em estudo realizado com ratos expostos a HgCl_2 , encontraram concentrações renais de MDA aumentadas em cerca de 50% quando comparados a ratos não expostos (PEROTTONI et al., 2004). Outro estudo com Hg inorgânico também apresentou aumento da peroxidação lipídica em rim e fígado de ratos, 12 e 48h após tratamento (FARINA et al., 2003).

As proteínas também são importantes alvos celulares das EROs podendo sofrer vários tipos de modificações (NYSTRÖM, 2005). Carbonilação é uma modificação protéica irreversível e não enzimática, na qual grupamentos carbonila são introduzidos nas proteínas por uma variedade de rotas oxidativas (STADTMAN; LEVINE, 2003). Assim, as proteínas carboniladas são importantes como biomarcadores para avaliar o dano oxidativo a proteínas induzido pelas EROs geradas pelo MeHg.

O ataque das espécies reativas ao DNA frequentemente causa dano oxidativo ao mesmo, e isto foi demonstrado em ratos expostos ao MeHg (JIN et al., 2008).

Sugere-se que a geração de EROs induzida por metais tóxicos estaria relacionada com mecanismos genotóxicos em células de mamíferos (HARTWIG, 1995). Além disso, outro efeito deletério do Hg foi a inibição do sistema de reparo do DNA em pessoas expostas ao vapor de Hg (CEBULSKA-WASILEWSKA et al., 2005), contribuindo para os efeitos mutagênicos.

1.3.4 Efeitos do mercúrio sobre outras enzimas antioxidantes

Além de induzir a peroxidação lipídica, o MeHg pode atuar sobre a atividade de enzimas antioxidantes. A atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), CAT, glutathione peroxidase (GSH-Px), pode ser afetada após a exposição a este metal. Porém, na literatura, não há um consenso entre os trabalhos com relação ao aumento ou à diminuição da atividade das enzimas.

Ariza e colaboradores mostraram que o Hg inorgânico induz a formação de H_2O_2 , estimula a atividade da SOD e não afeta a atividade da CAT e da GSH-Px em cultura de células (ARIZA; BIJUR; WILLIAMS, 1998). Já em trabalhadores ocupacionalmente expostos ao Hg elementar, as atividades da SOD e da GSH-Px mostraram-se ambas diminuídas (BULAT et al., 1998), enquanto que para Hussain e colaboradores houve um aumento na atividade da CAT e da GSH-Px em fígado e rim de camundongos tratados com $HgCl_2$ (HUSSAIN et al., 1999).

Em outro estudo realizado com moradores de Wanshan, cidade chinesa contaminada pelo Hg elementar através da mineração, e com trabalhadores expostos ao Hg pelo trabalho, as atividades das enzimas SOD e GSH-Px, bem como as concentrações de GSH aumentaram. Com essas observações, os autores sugeriram que o aumento na atividade das enzimas e na concentração do antioxidante GSH poderia ser uma resposta compensatória indireta das células ao aumento do estresse oxidativo, como mecanismo de autoproteção (CHEN et al., 2005).

Além disso, há na literatura somente dois estudos epidemiológicos da população ribeirinha amazônica associando enzimas antioxidantes e exposição ao MeHg (PINHEIRO et al., 2008; GROTTTO et al., 2010). Ambos estudos mostraram que a atividade da CAT foi negativamente associada com a concentração de Hg em sangue (GROTTTO et al., 2010) ou cabelo (PINHEIRO et al., 2008), ou seja, quanto maior a concentração de Hg, menor a atividade da enzima.

1.3.5 Possíveis interações do MeHg com o sistema do óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um gás radical livre, permeável a membranas, que pode ser sintetizado por diferentes tipos de células, dentre elas as endoteliais e os macrófagos (DATTILO; MAKHOUL, 1997). O NO é responsável por numerosos processos fisiológicos, dependendo da célula que o produziu; o NO produzido pelo endotélio vascular, por exemplo, tem como funções o relaxamento da musculatura lisa vascular, a regulação da pressão sanguínea, a redução da adesão e agregação plaquetária (YETIK-ANACAK; CATRAVAS, 2006). Já o NO produzido por macrófagos está envolvido na ação citotóxica exercida por estas células, resposta imune inespecífica e cicatrização de feridas (BOSCÁ et al., 2005).

Kishimoto e colaboradores mostraram que o cloreto de MeHg reduziu a produção de NO e a atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) em cultura de células endoteliais, sugerindo que esta forma orgânica do metal poderia estar envolvida na patogênese de doenças cardiovasculares (KISHIMOTO; OGURI; TADA, 1995). Em estudo mais recente, demonstrou-se que o MeHg inibiu a produção de NO via aumento de cálcio intracelular em macrófagos, porém este mecanismo não foi bem esclarecido (KUO; HUANG; LIN-SHIAU, 2002).

1.4 Resultados controversos sobre efeitos tóxicos do MeHg

Em um estudo realizado com índios da tribo Cree, no Canadá, que estão expostos ao MeHg pela dieta, observou-se a relação entre a exposição pré-natal ao metal e o desenvolvimento neurológico, físico, mental e psicossocial de cerca de 200 crianças, com idades entre 12 e 30 meses (MCKEOWN-EYSEN; RUEDY; NEIMS, 1983). Concentrações de MeHg no cabelo das mães foram utilizados para avaliar a exposição das crianças ao MeHg. Os resultados mostraram anormalidade nos reflexos das crianças associada à exposição ao MeHg em apenas 11% dos meninos. As desordens neurológicas não foram significativas e não estiveram associadas à exposição.

Nas Ilhas Faroe, o consumo de peixes é comum. Em um estudo de coorte com cerca de 1000 crianças, sangue de cordão umbilical e cabelo das mães expostas ao MeHg foram coletados (GRANDJEAN et al., 1992; GRANDJEAN; WEIHE, 1993). As concentrações de MeHg apresentaram-se altas nas amostras biológicas em estudo, porém, ao contrário do esperado, concentrações elevadas de MeHg no sangue de cordão umbilical estavam associadas com uma maior massa

corporal das crianças ao nascer, possivelmente pelos efeitos benéficos dos constituintes dos peixes marinhos.

Outro estudo realizado também nas Ilhas Faroe avaliou a exposição das crianças ao MeHg por meio do leite materno. As capacidades básicas de desenvolvimento das crianças entre 5 e 12 meses, como sentar, engatinhar e manter-se em pé foram avaliadas, e os resultados não mostraram nenhum efeito adverso do MeHg sobre o desenvolvimento básico das crianças (GRANDJEAN; WEIHE; WHITE, 1995).

Em estudo realizado nos Estados Unidos, encontrou-se uma concentração de Hg total 15% acima do permitido em unhas dos pés de 684 voluntários com prévio diagnóstico de infarto do miocárdio em comparação a 724 voluntários sadios (GUALLAR et al., 2002).

Além deste, outro estudo, entretanto com um grupo de homens finlandeses (n=1.014), observou altas concentrações de Hg no cabelo associadas à progressão acelerada de arteriosclerose da carótida (SALONEN et al., 2000) e, ainda mais, que este elevado risco de infarto do miocárdio poderia estar relacionado à peroxidação lipídica induzida pelo Hg (SALONEN et al., 1995).

Por outro lado, em estudo realizado nos Estados Unidos, com 51.529 homens com idades entre 40 e 75 anos, nenhuma relação entre as concentrações de Hg em unhas e a incidência de doenças cardiovasculares foi encontrada (YOSHIZAWA et al., 2002), controversamente ao que propôs Guallar et al., 2002, mostrado acima.

Com relação ao Brasil, muitos são os estudos demonstrando a contaminação, com MeHg, do ecossistema da Região Amazônica e principalmente da população, que tem no consumo de peixe sua dieta básica (LEBEL et al., 1997; DÓREA et al., 2003; PASSOS et al., 2008). A maioria destes estudos, porém, só avalia as altas concentrações de MeHg em sangue, cabelo e unha desta população, associados ao alto consumo de peixes, sendo poucos os dados associados a efeitos tóxicos do metal.

Embora nenhum caso da doença de Minamata tenha sido identificado e comprovado na Amazônia, alguns sintomas foram observados por Lebel e colaboradores que avaliaram 91 habitantes ribeirinhos do Rio Tapajós e mostraram uma diminuição significativa na sensibilidade de contraste visual e na destreza manual associada à presença de Hg no cabelo (LEBEL et al., 1998). Passos e Mergler, em uma extensiva revisão, mostraram alguns estudos com populações

apresentando sintomas da doença de Minamata, ao mesmo tempo em que mostraram dados contrários (PASSOS; MERGLER, 2008). Além disso, apenas dois estudos epidemiológicos avaliaram a exposição ao MeHg pelo peixe e a ocorrência de estresse oxidativo em humanos (PINHEIRO et al., 2008, GROTTTO et al., 2010).

Ainda com relação à população ribeirinha, vale mencionar um trabalho importante que foi realizado na região do Rio Tapajós, no qual se estimulou o consumo preferencial de peixes herbívoros (menor contaminação por MeHg). Após 5 anos, foi observada uma redução em cerca de 40% da concentração de Hg no cabelo. O mesmo estudo constatou também uma melhora nas funções motoras e diminuição do Hg total no cabelo desta população (AMORIM et al., 2000; BAHIA et al., 2004). Além disso, este grupo de pesquisa mostrou que o consumo de frutas regionais poderia atuar na proteção contra os efeitos tóxicos da exposição ao MeHg (PASSOS et al., 2003).

1.5 Selênio e Ômega-3

O selênio (Se), micronutriente essencial encontrado em algumas frutas regionais como a castanha-do-Pará (IP; LISK, 1994; CHANG et al., 1995), e também em peixes (SVENSSON et al., 1992; LIMA et al., 2005) apresenta importantes funções biológicas e bioquímicas em humanos, que poderiam minimizar os efeitos tóxicos do MeHg. O Se apresenta ação antioxidante, é componente chave de algumas proteínas (selenoproteínas) e é antagonista de efeitos tóxicos de alguns metais pesados, dentre eles o Hg (YONEDA; SUZUKI, 1997a). Nos seres humanos, a enzima GSH-Px e a selenoproteína P (Sel P) são dependentes de Se (ROTRUCK, 1973).

Manter a atividade enzimática da GSH-Px é uma das formas de controle pelo organismo das concentrações de H_2O_2 e hidroperóxidos lipídicos originados do ataque de espécies radicalares a ácidos graxos polinsaturados (COHEN; HOCHSTEIN, 1963; MEISTER; ANDERSON, 1983). Entretanto, a deficiência de Se diminui diretamente a atividade desta enzima, acumulando espécies pró-oxidantes, o que leva à disfunção endotelial. Por outro lado, a ingestão de Se em quantidades apropriadas poderia ter um papel protetor contra a toxicidade do MeHg (EL-BAYOUMY, 2001; FALNOGA; TUSEK-ZNIDARIC, 2007).

Estudos vêm propondo que a detoxificação do MeHg pelo Se poderia ocorrer pela formação de um complexo entre os dois elementos (READ et al., 1990;

YONEDA; SUZUKI, 1997a,b). Yoneda e Suzuki (1997a,b) propuseram um mecanismo para detoxificação do Hg baseado na interação entre o Hg e um metabólito reduzido do selenito. Em seguida, este complexo se ligaria a Sel P, formando um novo complexo {(Hg-Se)-Sel P}, mais estável.

Além disso, apesar de o peixe ser a principal fonte de exposição ao MeHg, este é, por outro lado, uma importante fonte de ácidos graxos de cadeia longa (ômega 3) (CALDER; YAQOOB, 2009). Ácido eicosapentanóico (EPA), ácido docosahexanóico (DHA) e outros ácidos graxos poliinsaturados encontrados em peixes são necessários para o bom desenvolvimento neural do indivíduo (MARSZALEK; LODISH, 2005), além de possuir efeitos cardioprotetores, anti-inflamatórios e anticarcinogênicos já comprovados (CARROLL; ROTH, 2002; SIMOPHOULOS, 2002).

Neste sentido, diante do exposto acima, algumas perguntas sobre o efeitos tóxicos da exposição ao MeHg via peixe precisam ser respondidas:

a) A forma na qual o MeHg está presente nos peixes poderia modificar seus efeitos tóxicos?

b) Outros compostos encontrados no peixe como o selênio e o ácido graxo ômega-3 poderiam ser os responsáveis pela modulação da toxicidade do MeHg, minimizando seus efeitos?

2. Objetivos:

Este trabalho teve como objetivos avaliar alguns efeitos da exposição subcrônica a MeHg em solução, associado ou não a Se e óleo de peixe, em ratos bem como a comparação destes efeitos com aqueles produzidos por exposição a MeHg via ingestão de peixes contaminados com MeHg, oriundos do Rio Tapajós.

2.1 Estudo I:

Avaliar biomarcadores do estresse oxidativo, inflamação, genotoxicidade, pressão sistólica e a concentração de NO em ratos após exposição subcrônica a solução de MeHg, além de verificar a possível proteção de Se em duas doses diferentes.

2.2 Estudo II:

Avaliar biomarcadores do estresse oxidativo, inflamação, genotoxicidade, pressão sistólica e a concentração de NO em ratos após exposição subcrônica a solução de MeHg, verificando possível efeito protetor do óleo de peixe e sua associação com Se.

2.3 Estudo III:

Avaliar biomarcadores do estresse oxidativo, inflamação, genotoxicidade, pressão sistólica e a concentração de NO em ratos expostos a MeHg via ração contendo peixes contaminados com este metal, simulando a via de exposição da população ribeirinha amazônica.

3. Materiais e Métodos

3.1 Equipamentos

Para a quantificação da concentração de Hg total utilizou-se um espectrômetro de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) ELAN DRC II Perkin Elmer[®], Norwalk, CT (EUA). Para quantificação de MDA, utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) Knauer[®], WellChrom HPLC Pump K-1001 Berlin (Alemanha). Os demais biomarcadores do estresse oxidativo (GSH, GSH-Px, CAT, SOD, ALA-D, proteínas carboniladas) e o NO foram quantificados em espectrofotômetros Hitachi, Tóquio (Japão) e Biospectro, Biomol, Ribeirão Preto (Brasil). As lâminas de histopatologia foram analisadas em microscópio óptico Olympus CX31, São Paulo (Brasil) e as lâminas do Ensaio Cometa foram analisadas em microscópio de fluorescência Zeiss Axiostarplus[®], Oberkochen (Alemanha). Estes equipamentos foram utilizados em todos os estudos.

3.2 Reagentes e Soluções

Água deionizada de alta pureza (resistividade 18,2 M Ω .cm) obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore[®]) foi utilizada em todo o trabalho. Fosfato de potássio mono e dibásico, glicina, epinefrina, 5-5-ditio-bis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ácido tricloroacético (TCA), 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), dodecil sulfato de sódio (SDS), ácido etilenodiamino tetra- acético (EDTA), ácido fosfórico (H₃PO₄), hidróxido de sódio (NaOH), glutathione reduzida (GSH), glutathione redutase (GSHR), Triton[®] X-100, ácido tiobarbitúrico (TBA), malondialdeído dimetilacetal (MDA), azida sódica, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH), ditioneitol (DTT), ácido δ -aminolevulínico, agarose LMP (low melting point), agarose NMP (normal melting point), dimetilsulfóxido (DMSO), brometo de etídio, hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Formol, etanol, xileno, parafina, ácido nítrico (HNO₃) e todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

Todas as soluções e amostras foram armazenadas em frascos de polietileno após prévio tratamento para eliminação de contaminantes. Frascos de plástico e materiais de vidro foram mergulhados em solução contendo 10% v/v HNO₃ por 24 h,

lavados com água Milli-Q e secos em capela de fluxo laminar classe 100. Todas as operações para preparo das soluções foram realizadas em sala limpa classe 1000.

Soluções estoque de metilmercúrio (CH_3HgCl) (Perkin-Elmer, Inc.) padronizadas pela “National Institute of Standards and Technology” (NIST) foram utilizadas para o tratamento dos animais. Selênio na forma de selenato de sódio (Na_2SeO_4) foi obtido da Merck e o óleo de peixe contendo ômega-3 utilizado foi da marca comercial Sundown® Fish Oil.

3.3 Metodologias

3.3.1 Quantificação de Hg

Para a determinação das concentrações de Hg total nos fluidos biológicos, tecidos de ratos e peixe, utilizou-se espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). O sistema de introdução da amostra é composto de uma câmara ciclônica de quartzo e de um nebulizador Meinhard® ligados por tubos Tygon® à bomba peristáltica do ICP-MS.

Para análise de sangue e plasma, o método utilizado foi o proposto por Palmer e colaboradores (PALMER et al., 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 HNO_3 . A curva de calibração variou de 0 a 20 $\mu\text{g/L}$. 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.

Para análise de Hg nos órgãos dos ratos e no peixe liofilizado, o método utilizado foi proposto por Batista e colaboradores, o qual foi desenvolvido e validado em nosso laboratório (BATISTA et al., 2009). Assim, 50–75 mg do tecido ou do peixe foram pesados e transferidos para um tubo cônico e 1 mL de TMAH 50% (v/v) foi adicionado às amostras, que permaneceram 24h à temperatura ambiente. Após, completou-se o volume para 10 mL com diluente contendo 0,5% de HNO_3 (v/v) e 0,01% de Triton® X-100. Os padrões analíticos da curva de calibração variaram de 0 a 20 ng/g e usou-se o mesmo diluente acima citado. Os coeficientes de correlação das curvas foram sempre melhores ou iguais a 0.9999.

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), o termo especiação química se refere à distribuição de um elemento entre espécies químicas

definidas em um sistema, e análise por especiação química é definida como a atividade analítica de identificação e/ou determinação das quantidades de uma ou mais espécies químicas individuais em uma amostra (TEMPLETON ET al., 2000). Dessa forma, realizou-se a especiação química do Hg em peixes para confirmar a forma orgânica (MeHg) presente na via de exposição (consumo de peixe). Para a especiação química de Hg nos peixes, a quantidade total de peixe liofilizado foi misturada e homogeneizada, e cinco amostras de cerca de 50-75 mg foram coletadas e analisadas pelo método proposto por Rodrigues e colaboradores, usando cromatografia líquida com espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (LC-ICP-MS), desenvolvido e validado também em nosso laboratório (RODRIGUES et al., 2010).

3.3.2 Quantificação das proteínas carboniladas

As quantificações dos biomarcadores do estresse oxidativo foram feitas em colaboração com o Laboratório de Toxicologia – LATOX – da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A quantificação das proteínas carboniladas (PC) foi realizada por espectrofotometria UV-VIS segundo o método de Levine e colaboradores (LEVINE et al., 1990), com algumas modificações. Primeiramente, as proteínas totais foram quantificadas no plasma utilizando o corante de Coomassie Blue (BRADFORD, 1976) e foram ajustadas para uma concentração de 10 mg/mL com água deionizada. Após, as proteínas foram precipitadas com TCA 10%, centrifugadas por 5 min e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se DNPH (10 mmol/L) ao precipitado, agitando em vórtex até homogeneização e então as amostras foram incubadas por 30 min a temperatura ambiente. Após, TCA 10% foi novamente adicionado para precipitação de proteínas, seguido de centrifugação, descarte do sobrenadante e lavagem do precipitado com 1 mL de etanol:etilacetato (1:1), removendo o sobrenadante. Ao final, o precipitado foi dissolvido em solução contendo SDS, EDTA e tampão fosfato, incubado a 37°C por 10 min e a leitura foi feita em espectrofotômetro a $\lambda = 370$ nm. Os resultados foram expressos como nmol PC/mg proteína.

3.3.3 Quantificação de tióis totais

A determinação dos tióis totais foi realizada por espectrometria UV-VIS, baseado no método de ELLMAN (1959), e usou-se o termo GSH na seção “Resultados e Discussão” considerando que a GSH é o principal tiol intracelular.

O sangue, sempre mantido em banho de gelo, foi hemolisado com Triton X-100 e precipitado com TCA. As amostras foram centrifugadas por 10 min e os sobrenadantes foram separados. Os sobrenadantes foram diluídos em tampão fostato e após adicionou-se DTNB, e a leitura foi feita em 412 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/mL}$ sangue.

3.3.4 Quantificação do MDA

A determinação de MDA foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – UV/VIS segundo o método de Grotto e colaboradores (GROTTO et al., 2007). O plasma foi hidrolisado com NaOH, desproteinizado com H_3PO_4 e sofreu derivatização com TBA, a uma temperatura de 90°C por 45 min. Antes da injeção no cromatógrafo, as amostras foram extraídas em n-butanol.

Utilizou-se uma coluna de sílica de fase reversa C18 e uma guarda coluna. A fase móvel foi uma mistura de 2,5 mmol/L de fosfato de potássio pH 7.0 e metanol (50:50, v/v). O tempo de corrida foi de 8 min a um fluxo de 0,6 mL/min. A coluna foi mantida a 40°C durante as análises e a absorbância foi monitorada em 532 nm. Os resultados foram expressos em μM .

3.3.5 Atividade da GSH-Px

A atividade da enzima GSH-Px foi avaliada por espectrofotometria de UV/VIS (PAGLIA; VALENTINI, 1967). O método se baseia na oxidação do NADPH a 25°C na presença de GSH reduzida, GSH redutase, azida sódica, H_2O_2 e sangue diluído, indicando o decaimento da atividade da enzima, monitorado a 340 nm. Através da medida do decaimento da absorbância do NADPH é possível determinar a atividade enzimática, já que esta é proporcional ao consumo de NADPH. Os resultados foram expressos em nmol NADPH/min/ml sangue.

3.3.6 Atividade da CAT

A atividade da enzima catalase foi avaliada por espectrofotometria de UV/VIS utilizando método de Aebi (AEBI, 1984). O método baseia-se na decomposição do H_2O_2 pela catalase ao longo do tempo, monitorado a 240 nm. Para tanto, uma alíquota de 20 μL de sangue total foi misturada com tampão fosfato de potássio 50mM, pH 7, e 70 μL de H_2O_2 foi adicionado, dando início à reação. As mudanças na absorbância foram monitoradas por 5 min. Uma constante de variação (κ), relacionada com a hemoglobina (Hb), serviu para expressar os valores da atividade no sangue (κ/gHb).

3.3.7 Atividade da SOD

A atividade da enzima superóxido dismutase foi avaliada por espectrofotometria de UV/VIS utilizando método de McCord e Fridovich (MCCORD; FRIDOVICH, 1969), que se baseia na quantidade de enzima (unidades) que inibe a auto-oxidação da epinefrina. A reação ocorre à temperatura de 30°C, em $\lambda=480$ nm. Primeiramente adicionou-se epinefrina a um tampão glicina para verificar a oxidação máxima da epinefrina. Para as amostras, alíquotas de sangue total foram diluídas em tampão glicina, e a epinefrina foi adicionada e a inibição da sua oxidação verificada em função do tempo, relacionada ainda à concentração da Hb. Os resultados foram expressos em USOD/mgHb.

3.3.8 Atividade da ALA-D

A atividade da enzima ALA-D foi avaliada por espectrofotometria UV/VIS utilizando o método de Sassa modificado (SASSA, 1982). A atividade da ALA-D foi determinada pela formação de porfobilinogênio dentro de 1h, a 37°C, na presença e na ausência do agente redutor DTT. A reação enzimática foi iniciada após 10 min de pré-incubação da amostra, adicionando-se ALA até uma concentração final de 4 mM em tampão fosfato pH 6.8, e incubando durante 1h a 37°C, verificando a formação de porfobilinogênio a 555 nm.

O índice de reativação (R%) foi estimado usando $A-B/A \times 100$, onde A=absorbância com DDT e B=absorbância sem DDT.

3.3.9 Concentração de NO (nitratos e nitritos)

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^-). As primeiras análises de nitritos e nitratos foram realizadas por quimioluminescência segundo o método de Barbosa e colaboradores (BARBOSA et al., 2006), onde uma solução de triiodeto reduz o NO_2^- ao gás NO, o qual é analisado por quimioluminescência.

As demais, devido ao fato desta técnica precisar ser feita em outro laboratório (necessidade de equipamento que nosso laboratório não possui), foram feitas por kit comercial – Total Nitric Oxide Assay Kit, Assay Designs, Stressgen®. Nesta técnica, NO_3^- é convertido em NO_2^- . Após, através do corante de Greiss (sulfanilamida em meio ácido), NO_2^- foi detectado pela formação de um produto azo corante analisado a 540 nm. NO total foi quantificado em amostras de plasma diluído e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$.

3.3.10 Avaliação do dano ao DNA

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 nucleóides têm 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 (HARTMANN et al., 2003). O teste é muito utilizado na identificação de agentes com atividades genotóxicas (FARBAIRN et al., 1995). A versão alcalina ($\text{pH} > 13$ do tampão de eletroforese) pode ser usada para detectar danos ao DNA do tipo quebras de fita simples, sítios alcali lábeis, pontes entre DNA-DNA e DNA-proteína. As análises foram realizadas pelo método de Singh et al., 1988, modificado por da Silva et al., 2000. Assim, uma alíquota de 20 μL de sangue foi misturada com 120 μL de agarose LMP em tampão fosfato e aplicada em lâmina pré-coberta com agarose NMP e incubadas em geladeira por 5 min. As lâminas foram, em seguida, imersas em solução de lise (NaCl, Tris, EDTA, DMSO, Triton X-100, $\text{pH} 10$) por no mínimo 1h. As lâminas foram, então, incubadas por 20 min em solução de eletroforese (NaOH e EDTA, $\text{pH} > 13$), seguido de eletroforese a 25V e 300 mA por 20 min. Após, as lâminas foram neutralizadas e coradas com brometo de etídio. 100 células por animal foram analisadas a 400x usando

microscópio de fluorescência, conectado a uma câmera. As análises foram realizadas com o auxílio do software Comet Score™.

3.3.11 Análises histopatológicas

Os órgãos foram fixados em formol 10%, desidratados em álcool (série de alcoóis em concentração ascendente), clareados em xileno e parafinados. Cortes de 5 µm foram obtidos com micrótomo e as lâminas eram coradas com hematoxilina e eosina. Após coloração, as lâminas foram analisadas em aumento de 100 e 400 vezes em microscópio de luz Olympus CX31, por um biomédico, no Laboratório de Neuropatologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Os resultados das análises histopatológicas receberam um escore de acordo com um sistema de escore determinado pela severidade do dano, adaptado de RUMBEIHA et al., 2000. Um órgão normal recebeu escore de 0; órgãos com infiltração leucocitária branda recebeu +1; infiltração leucocitária moderada recebeu escore +2 e infiltração leucocitária severa recebeu escore +3.

3.3.12 Análise de Materiais de Referência Certificada

Materiais de Referência Certificada de sangue e tecidos de animais contendo Hg e Se, foram analisados previamente e posteriormente às análises das amostras em estudo, para controle dos resultados obtidos e para verificar a exatidão dos resultados, e todos os valores encontrados estavam em conformidade com os valores certificados. Fígado bovino (Standard Reference Material 1577a, do National Institute of Standards and Technologies) tem valor certificado para Hg de $0,004 \pm 0,002$ µg/g e encontrou-se $0,005$ µg/g $\pm 0,002$. Material de Referência para Metais Traço de hepatopâncreas de lagosta (TORT-2 do National Research Council Canada) tem valor certificado para Hg de $0,27 \pm 0,06$ µg/g e encontrou-se $0,22 \pm 0,08$ µg/g. Sangue Total para Elementos Traços Seronorm™ tem valor certificado para Hg de 14 µg/L e encontrou-se 23 ± 11 µg/L.

3.4 Delineamento Experimental

3.4.1 Estudo I – Avaliação dos efeitos da exposição subcrônica ao MeHg administrado na forma de sal e da associação com selênio

3.4.1.1 Escolha da dose e tratamento dos animais

Normalmente, os estudos experimentais com animais utilizam doses de MeHg muito elevadas, muitíssimas vezes superiores às concentrações em que o homem está exposto, criando situações de estudo irreais. Dessa forma, neste estudo utilizou-se dose de MeHg baseada no estudo de Passos e colaboradores, que estimaram a ingestão diária de Hg na população ribeirinha do médio Tapajós no estado do Pará (PASSOS et al., 2008). Assim, administrou-se por gavagem 140 µg/kg/dia de CH₃HgCl.

Com relação à administração de Se, foram considerados dois parâmetros para a escolha da sua concentração: 1) a razão equimolar de Hg para Se cerca de 1:1, baseada na formação do complexo Hg-Se envolvido na detoxificação do Hg (YONEDA; SUZUKI, 1997a,b) e 2) a dose recomendada diária pelo *Institute of Medicine* de 55 µg/dia e a concentração máxima tolerável de 400 µg/dia (IOM, 2000). Assim, utilizou-se doses de 2 mg/L de Na₂SeO₄, considerando um consumo de cerca de 50 – 55 ml/dia/rato de água (medida do consumo pelo restante de água na mamadeira, mencionado abaixo) e ainda uma dose três vezes maior 6 mg/L, para verificar se a proporção acima era suficiente para proteção ou se seria necessária concentração maior.

Foram utilizados ratos machos Wistar (200-220 gramas), mantidos em salas com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada (22-25°C) e alimentados com ração habitual (Purina-Labina) e água.

O CH₃HgCl foi administrado por gavagem, diariamente, enquanto que o Na₂SeO₄ foi adicionado na água de beber. Na primeiras duas semanas, os volumes de consumo das águas com e sem Se foram verificados por meio do volume de água restante nas mamadeiras, e não houve diferença significativa entre eles, mostrando que houve aceitação desta água com Se. O volume de água restante era avaliado ao final do dia, dividindo-se o volume consumido pelo número de ratos presentes nas caixas (cerca de 50 – 55 ml/dia/rato).

Os animais foram divididos em 6 grupos:

- Grupo I (n=8): controle, tratados com água e ração;
- Grupo II (n=8): água e ração + 140 µg/kg/dia de CH₃HgCl;
- (Grupo III (n=8): água com Na₂SeO₄ 2 mg/L + ração + 140 µg/kg/dia de CH₃HgCl;
- Grupo IV (n=8): água com Na₂SeO₄ 6 mg/L + ração + 140 µg/kg/dia de CH₃HgCl;
- Grupo V (n=8): água com Na₂SeO₄ 2 mg/L + ração;
- Grupo VI (n=8): água com Na₂SeO₄ 6 mg/L + ração.

Realizou-se aferição da pressão caudal e massa corporal dos ratos semanalmente. O tratamento foi de 3 meses.

Para aferição da pressão caudal, utilizou-se o método de manguito de cauda (“tail-cuff method”). Primeiramente, os ratos foram pré-acondicionados em uma caixa de madeira para serem aquecidos de madeira adequada para a realização das medidas da pressão sistólica. Após, a cauda dos animais foi encaixada a um tubo contendo uma bolsa inflável de borracha e ligado a um manômetro de coluna de mercúrio. O processo de insulflação e de desinsulflação do manguito foi feito manualmente, e o sinal de pressão foi observado de acordo com o movimento na coluna de mercúrio. Realizou-se no mínimo três aferições por rato.

Ao final do tratamento, os ratos foram eutanaziados com sobredose dos anestésicos ketamina e xilazina intraperitonal, de acordo com a aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, (Número de aprovação do processo: 07.1.1185.53.3, Anexo I). Retirou-se rim direito, coração, fígado, cérebro, sangue total e plasma. Todas as amostras foram armazenadas a -80°C até análise.

As concentrações de Hg total e Se foram determinadas em sangue, plasma e tecidos de ratos por ICP-MS, conforme mostrado a seguir, e os tecidos-alvo foram identificados por análise histopatológica.

Biomarcadores do estresse oxidativo como GSH, GSH-Px, proteínas carboniladas (PC), MDA, ALA-D, CAT, SOD, genotoxicidade (Ensaio Cometa) e NO foram analisados conforme itens 3.3.1 a 3.3.11.

3.4.2 Estudo II – Avaliação dos efeitos da exposição subcrônica ao MeHg administrado na forma de sal e da associação com óleo de peixe e com selênio

3.4.2.1 Escolha da dose e tratamento dos animais

As doses de óleo de peixe foram administradas segundo a ingestão diária recomendada pela Sundown® (duas cápsulas três vezes ao dia para adultos – 70 kg), adaptadas para o peso dos ratos. Cada cápsula (1000 mg) continha 180 mg de ácido eicosapentanoico (EPA) e 120 mg de ácido docosahexanoico (DHA). Considerando a ingestão de 6 cápsulas/dia, obteve-se 1080 mg/70kg, ou 15,5 mg/kg de EPA, e 720 mg/70kg, ou 10,3 mg/kg de DHA. A dose de MeHg administrada foi a mesma do Estudo I e a dose de Se escolhida foi de 2 mg/L, uma vez que não houve efeito dose-dependente (dados mostrados na seção de Resultados e Discussão).

Os animais foram divididos em 6 grupos:

- Grupo I (n=8): controle, tratados com água e ração;
- Grupo II (n=8): água e ração + 140 µg/kg/dia de CH₃HgCl;
- Grupo III (n=8): água com Na₂SeO₄ 2 mg/L + ração;
- Grupo IV (n=8): água e ração + óleo de peixe (conforme concentração acima)
- Grupo V (n=8): água e ração + 140 µg/kg/dia CH₃HgCl + óleo de peixe;
- Grupo VI (n=8): água com Na₂SeO₄ 2 mg/L + ração + 140 µg/kg/dia CH₃HgCl + óleo de peixe.

As mesmas aferições, coletas e armazenamento do Estudo I foram realizadas, conforme descrito acima, bem como as determinações de Hg total, Se, análises histopatológicas, de estresse oxidativo, NO e genotoxicidade.

3.4.3 Estudo III – Avaliação dos efeitos da exposição subcrônica ao MeHg através de dieta contendo peixes contaminados com o metal

3.4.3.1 Liofilização do peixe contaminado e preparo da ração contendo peixe

Peixes tucunaré e surubim – 8 kg (peixes carnívoros, pertencentes ao último nível da cadeia alimentar) foram pescados em diferentes pontos do Rio Tapajó, limpos, armazenados a -20 °C e trazidos para o laboratório para processamento.

Os peixes foram cozidos (alguns minutos em água fervente) para que o processo se aproximasse ao máximo dos hábitos da população ribeirinha. Após

cozimento, os peixes foram então triturados na água da fervura, formando desta forma uma espécie de caldo. Este caldo foi fracionado em balões e liofilizado, processo que durava em torno de 3 a 4 dias. A cada processo de liofilização utilizava-se cerca de 500g de peixe.

Passou-se o peixe liofilizado em uma peneira, para ficar com granulação uniforme. O pó dos peixes liofilizados foi homogeneizado e cinco alíquotas foram coletadas aleatoriamente e analisadas por ICP-MS para verificação do Hg total e do Se. Além disso, especiação química de Hg foi realizada nestes peixes por LC-ICP-MS, para verificar se realmente o Hg presente nos peixes era MeHg (técnica mostrada a seguir).

A ração habitual (Purina-Labina) foi moída, assemelhando-se assim à textura do peixe, e ambos foram misturados até uma concentração final similar ao consumo de peixes dos ribeirinhos (PASSOS et al., 2008). Após, a mistura foi recompatada com o auxílio de um moedor de carne adaptado. Em seguida, a ração foi secada em estufa com circulação interna de ar, à temperatura ambiente.

O mesmo processo foi realizado para os peixes não contaminados com Hg (procedentes da região sul).

3.4.3.2 Tratamento dos animais

Foram utilizados ratos machos Wistar (200-220 gramas), mantidos em salas com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada (22-25°C) e alimentados com ração e água.

Os animais foram divididos em 3 grupos:

- Grupo I (n=8): controle, tratados com água e ração habitual;
- Grupo II (n=8): água e ração de peixes não contaminados;
- Grupo III (n=8): água e ração de peixes oriundo do rio Tapajós;

As mesmas aferições, coletas e armazenamento dos outros estudos foram realizados, conforme descrito anteriormente, bem como as determinações de Hg total, Se, análises histopatológicas, de estresse oxidativo, NO e genotoxicidade.

3.5 Análise Estatística

Dados dos biomarcadores de estresse oxidativo, concentração de NO, dano no DNA e pressão sanguínea sistólica foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP).

Resultados das análises histopatológicas foram expressos conforme o escore de infiltração leucocitária mostrado no item 3.16.

Diferenças entre tratamentos foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis, para dados não-paramétricos, seguido do pos hoc Duncan. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes. Os resultados foram analisados com o auxílio do programa Statistica® 8.0 e os gráficos foram feitos com auxílio do programa GraphPad Prism® 5.

4. Resultados e Discussão

4.1 Estudo I

Durante o tratamento, tanto a massa corporal quanto a pressão caudal dos animais foram verificadas semanalmente. Com relação à massa corporal dos ratos, não houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos e o grupo controle, conforme mostra a Figura 2. A massa corporal aumentou proporcionalmente em todos os grupos.

Figura 2. Variação da massa corporal de ratos recebendo diferentes tratamentos ao longo de três meses.

Com relação à pressão sanguínea sistólica, esta pode ser acompanhada ao longo das semanas como mostrado na Figura 3. Houve um aumento significativo na pressão sistólica de todos os grupos que receberam algum tratamento, tanto MeHg quanto Se, quando comparados ao grupo controle ($p < 0.05$).

Figura 3. Variação da pressão sanguínea sistólica de ratos recebendo diferentes tratamentos ao longo de três meses. *Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0.05$). MeHg = metilmercúrio; Se = selênio

Outros estudos já haviam demonstrado uma associação entre exposição ao MeHg e doenças cardiovasculares, como hipertensão e infarto do miocárdio (UCHINO et al., 1995; GUALLAR et al., 2002). Porém, esperava-se que o tratamento simultâneo com Se revertesse este quadro de hipertensão, fato contrário ao que foi encontrado. O tratamento utilizando somente Se também fez com que a pressão sistólica dos ratos se elevasse. Este achado foi muito importante uma vez que o Se é considerado como um antagonista dos efeitos tóxicos do Hg (YONEDA; SUZUKI, 1997a,b). Por outro lado, Laclaustra e colaboradores encontraram resultados que corroboram nossos dados. Eles encontraram altas concentrações de Se associadas com uma maior prevalência de hipertensão em uma representativa amostra de adultos dos Estados Unidos ($n = 2638$ adultos, com idade igual ou superior a 40 anos). Estes autores relatam que não há um mecanismo que possa explicar os efeitos de altas concentrações de Se sobre o risco de doenças cardiovasculares; afirmam que o Se tem efeito protetor, mas que sua suplementação, com a finalidade de proteção cardiovascular, não deveria ser recomendada (LACLAUSTRA et al., 2009). Também se encontrou na população adulta dos Estados Unidos alta concentração de Se associada à concentração elevada de colesterol, triglicerídeos e apolipoproteínas A1 e B, fatores de risco cardiovascular (BLEYS et al., 2008).

Três níveis de atividade biológica do Se devem ser considerados: (1) concentração traço, essencial ao crescimento e desenvolvimento; (2) concentração moderada, para armazenamento e manutenção das funções homeostáticas; (3) concentrações elevadas, as quais podem desencadear efeitos tóxicos (HAMILTON, 2004). Além disso, o Se ocorre em vários estados de valência: -2 (H_2Se – seleneto de hidrogênio, Na_2Se – seleneto de sódio, dimetil selênio, selenomtionina); 0 (Se elementar); +4 (SeO_2 – dióxido de selênio, Na_2SeO_3 – selenito de sódio); +6 (Na_2SeO_4 – selenato de sódio), e a toxicidade do Se varia de acordo com o seu estado de valência e a solubilidade do composto. As formas mais solúveis, como o Na_2SeO_4 , são mais tóxicas que as forma de Se menos solúveis (US EPA, 1993). A toxicidade do Se pode também ser, em parte, relacionada com a capacidade de alguns compostos de Se gerarem EROs. O seleneto de hidrogênio (H_2Se) tem um papel fundamental no metabolismo do Se oriundo da dieta ou da suplementação (RAYMAN; INFANTE; SARGENT, 2008). A oxidação do excesso de H_2Se pode levar à produção do ânion superóxido e de outras EROs, associado a efeitos tóxicos (COMBS, 2001; DRAKE, 2006).

Além disso, as análises histopatológicas deste estudo (dados mostrados abaixo) demonstraram infiltração leucocitária no fígado e no coração de ratos tratados com Se. Este processo inflamatório poderia estar relacionado ao fato da pressão ter se elevado. As doses administradas de Se atingiriam um platô de atividade antioxidante (dados abaixo) e a partir disso o excesso poderia levar a efeitos tóxicos.

Neste estudo também foram realizadas as análises dos biomarcadores de estresse oxidativo GSH, GSH-Px, CAT, SOD, MDA, ALA-D, índice de reativação de ALA-D (R), PC, NO e dano no DNA. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1.

Após as análise estatística, as concentrações de tióis totais, representados pela GSH, não apresentaram diferença significativa entre os grupos estudados. Contudo, houve uma tendência à diminuição da concentração de GSH nos ratos tratados com MeHg quando comparados ao controle ($p=0.06$). A alta reatividade do Hg com grupamentos $-SH$ é estabelecida, levando à diminuição das reservas antioxidantes (RABENSTEIN; FAIRHURST 1975; LI et al. 2007). Mais ainda, a excreção biliar é a maior via de eliminação do MeHg e este mecanismo parece ser dependente da biodisponibilidade de GSH (REFSVIK, 1978; DUTCZAK; BALLATORI, 1994); por isso, a diminuição das reservas antioxidantes também pode diminuir a excreção do MeHg. Os tratamentos em associação com Se, em ambas as doses, não mostraram diferença entre os demais grupos.

A atividade da enzima GSH-Px mostrou-se significativamente inibida no grupo tratado com MeHg quando comparada ao controle e aos demais grupos ($p<0.05$). Além disso, ratos tratados com MeHg associado ao Se (2 e 6 mg/L) não sofreram alteração na atividade da enzima quando comparados ao controle, mas apresentaram alteração significativa quando comparados ao grupo tratado somente com MeHg, mostrando um efeito do Se contra a inibição enzimática induzida pelo MeHg. Sendo a GSH-Px uma enzima dependente de Se para seu funcionamento (FLOHE, 1979; HAMILTON, 2004), duas concentrações diferentes de Se foram testadas no intuito de esclarecer se concentrações elevadas deste metal essencial poderiam aumentar a atividade enzimática quando comparadas ao controle. Entretanto, observou-se que a atividade da GSH-Px não se mostrou dose-dependente de Se, provavelmente devido à saturação dos sítios ativos da enzima.

Tabela 1. Resultados dos biomarcadores do estresse oxidativo GSH (glutathiona reduzida), GSH-Px (glutathiona peroxidase), CAT (catalase), SOD (superóxido dismutase), MDA (malondialdeído), ALA-D (δ -aminolevulinato desidratase), R (reativação da ALA-D) e PC (proteínas carboniladas) do Estudo I. Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão.

GRUPOS	GSH ¹	GSH-Px ²	CAT (κ /gHb)	SOD ³	MDA (μ M)	ALA-D (UI)	R (%)	PC ⁴
Controle	1,6 $\pm$ 0,4 ^a	40 $\pm$ 17 ^a	298 $\pm$ 108 ^a	2,8 $\pm$ 0,6 ^a	23 $\pm$ 2 ^a	20 $\pm$ 2 ^a	5,6 $\pm$ 2,7 ^a	1,4 $\pm$ 0,2 ^a
MeHg	1,2 $\pm$ 0,3 ^a	24 $\pm$ 6 ^b	206 $\pm$ 89 ^a	3,1 $\pm$ 0,7 ^a	28 $\pm$ 4 ^{bc}	15 $\pm$ 1 ^b	38,3 $\pm$ 3,6 ^b	1,6 $\pm$ 0,5 ^a
MeHg + Se 2 mg/L	1,5 $\pm$ 0,3 ^a	35 $\pm$ 6 ^a	263 $\pm$ 130 ^a	3,1 $\pm$ 0,7 ^a	22 $\pm$ 5 ^a	14 $\pm$ 3 ^b	36,7 $\pm$ 5,6 ^b	1,5 $\pm$ 0,4 ^a
MeHg + Se 6 mg/L	1,6 $\pm$ 0,4 ^a	41 $\pm$ 12 ^a	216 $\pm$ 77 ^a	2,9 $\pm$ 0,6 ^a	22 $\pm$ 6 ^{ac}	13 $\pm$ 1 ^b	40,8 $\pm$ 9,9 ^b	1,3 $\pm$ 0,3 ^a
Se 2 mg/L	1,5 $\pm$ 0,4 ^a	43 $\pm$ 6 ^a	290 $\pm$ 62 ^a	2,9 $\pm$ 0,4 ^a	18 $\pm$ 3 ^a	21 $\pm$ 2 ^a	9,4 $\pm$ 2,7 ^a	1,3 $\pm$ 0,2 ^a
Se 6 mg/L	1,6 $\pm$ 0,3 ^a	38 $\pm$ 7 ^a	295 $\pm$ 70 ^a	2,6 $\pm$ 0,2 ^a	19 $\pm$ 3 ^a	18 $\pm$ 1 ^a	5,3 $\pm$ 2,5 ^a	1,4 $\pm$ 0,4 ^a

¹(μ mol/mL sangue)

²(nmol NADPH/min/ml sangue)

³(USOD/mgHb)

⁴(nmol/mg proteína)

a,b,c = Médias com letras iguais não diferem estatisticamente. Letras diferentes são estatisticamente diferentes dos outros grupos (p<0.05).

A atividade da CAT não apresentou alteração em nenhum dos grupos tratados. Houve, porém, uma tendência a uma diminuição na atividade desta enzima em ratos exposto a MeHg quando comparados com Se ($p=0,07$). Abdel-Hamid e colaboradores mostraram diminuição na atividade da CAT em trabalhadores expostos a Hg por lâmpadas fluorescentes por uma inibição direta da enzima (ABDEL-HAMID; FAHMY; SHARAF, 2001), enquanto que em estudo com camundongos tratados com $HgCl_2$ houve um aumento na atividade da CAT (HUSSAIN et al., 1999).

A atividade da enzima antioxidante SOD também não mostrou significativa diferença comparando-se os grupos ($p>0.05$). Em um estudo com ratos expostos a 5 mg/kg de $HgCl_2$, encontrou-se inibição da atividade da SOD (AUGUSTI et al., 2008), porém deve-se observar que esta dose é mais de 30 vezes maior que a nossa dose; já em estudo com cultura de células expostas a Hg^{2+} (1 μM) por 1h, encontrou-se um aumento na atividade da SOD (ARIZA; BIJUR; WILLIAMS, 1998).

Estas diferenças nas atividades da CAT e da SOD mostram que ainda há muita divergência na literatura. Por esse motivo e para melhor entendimento dos efeitos do MeHg sobre o sistema antioxidante, avaliou-se a razão entre a SOD e a CAT (SOD/CAT), uma vez que estas enzimas trabalham juntas, em seqüência, convertendo, em condições fisiológicas, o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) à H_2O_2 e este à H_2O (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Quando a razão SOD/CAT tiver um valor alto comparado ao controle, maior será a concentração de H_2O_2 , uma vez que a atividade da SOD estará aumentada e a atividade da CAT diminuída. A média da razão SOD/CAT nos ratos controles foi de $0,009 \pm 0,003$, no grupo MeHg foi $0,017 \pm 0,006$, na associação MeHg+Se 2 mg/L foi $0,013 \pm 0,006$, MeHg+Se 6 mg/L foi $0,015 \pm 0,004$, no grupo tratado com Se 2 mg/L foi $0,010 \pm 0,003$ e no grupo Se 6 mg/L foi $0,009 \pm 0,002$. A razão SOD/CAT apresentou-se significativamente aumentada no grupo tratado com MeHg comparado aos demais grupos ($p=0.007$), sugerindo, dessa forma, que a SOD está trabalhando na conversão do $O_2^{\cdot-}$ normal ou acima de sua atividade, enquanto que a CAT não está conseguindo converter todo o H_2O_2 formado.

Ali et al., 1992, observaram que o MeHg aumenta a produção de $O_2^{\cdot-}$. O ânion $O_2^{\cdot-}$ é capaz de inibir a atividade da CAT (KONO; FRIDOVICH, 1982; SHIMIZU; KOBAYASHI; HAYASHY, 1984). Uma vez que a produção de $O_2^{\cdot-}$ aumenta, há

também ativação da SOD, já que o $O_2^{\cdot-}$ é o principal ativador alostérico desta enzima (HALLIWELL, GUTTERIDGE; 1999). A ativação da SOD e a inibição da CAT, tal como ocorreu analisando a razão SOD/CAT, resulta em um aumento na concentração de H_2O_2 , e este excesso facilita a produção do radical hidroxila ($OH\cdot$), um poderoso oxidante molecular (HALLIWELL, 2006). Assim, a razão SOD/CAT apresentada por este estudo facilita a oxidação e o dano de biomoléculas. Com relação à associação de MeHg+Se, em ambas doses utilizadas, não houve diferença significativa na razão SOD/CAT tanto quando comparado ao grupo controle quanto comparado ao grupo tratado com MeHg, portanto sem influência do Se nestas enzimas.

Não houve diferença significativa nas concentrações de MDA nos ratos tratados somente com Se nas duas concentrações utilizadas quando comparados ao controle. O grupo de ratos tratado com MeHg apresentou aumento significativo na concentração de MDA ($p<0.05$) quando comparado aos grupos controle, Se (ambas concentrações) e MeHg+Se 2 mg/L, mostrando assim a presença indireta de espécies reativas que atacam a membrana lipídica, produzindo o MDA.

Associando MDA e pressão sanguínea, encontra-se uma forte correlação positiva ($r = 0.61$, $p<0.05$), ou seja, a peroxidação lipídica induzida pelas EROs está associada ao aumento da pressão. As EROs danificam o endotélio vascular promovendo agregação plaquetária, adesão celular e vasoconstrição (SHAW et al., 2005), o que pode elevar a pressão sanguínea. Nossos resultados corroboram os achados de Perottoni e colaboradores, que observaram um aumento nas concentrações de MDA em ratos tratados com Hg inorgânico, porém a dose administrada pelo grupo era muitas vezes maior (4,6 mg/kg) que a dose deste estudo (PEROTTONI et al., 2004). Além disso, os valores de MDA do grupo tratado com MeHg+Se 2 mg/L mostraram-se significativamente diferentes do grupo tratado somente com MeHg, e não se mostraram diferentes do controle, mostrando um efeito protetor do Se. Por outro lado, a concentração maior de Se (6mg/L) associada ao MeHg não se mostrou diferente do controle, nem do MeHg, mostrando-se incapaz de proteger do dano oxidativo induzido pelo MeHg.

A ALA-D é classicamente reconhecida como uma enzima inibida por Pb (CASARETT & DOULL'S, 2008). No entanto, estudos mais recentes têm apontado a ALA-D, como um biomarcador do estresse oxidativo devido ao seu grupamento sulfidrílico, altamente sensível a elementos pró-oxidantes (SILVA et al., 2007). Neste

estudo, a atividade da ALA-D apresentou significativa inibição em ratos tratados com MeHg ($p < 0.01$), bem como em ratos tratados com MeHg associado ao Se 2 mg/L e 6 mg/L (ambos com $p < 0.01$). Neste caso, o Se não mostrou ser protetor, muito provavelmente devido à atividade da enzima ALA-D não ser dependente de Se. A ALA-D é uma metaloenzima dependente de Zn, que requer grupos tióis reduzidos para sua atividade normal. Há dois mecanismos que poderiam explicar a inibição da atividade da ALA-D: afinidade do MeHg pelos grupos –SH ou ainda uma competição entre Hg e Zn, sendo que o Hg desloca o Zn e assim poderia inibir a atividade da enzima (NOGUEIRA et al., 2003).

A reativação da enzima ALA-D também é um bom parâmetro para verificar o dano oxidativo, uma vez que na reativação da enzima avalia-se a capacidade do ditioneitol (DTT) em reverter a inibição causada somente nos grupamentos tiólicos (VALENTINI et al., 2007, 2008). Desta forma, pôde-se observar que nos ratos tratados com MeHg houve uma reativação de cerca de 38% na atividade da ALA-D, ou seja, a atividade da enzima estava parcialmente inibida pela inativação dos grupos –SH, sendo que o restante da inibição pode ter ocorrido pela inativação de outro sítio ativo da enzima. Esta reativação significativa também ocorreu nos grupos tratados com a associação de MeHg e Se.

Com relação ao dano oxidativo de proteínas (proteínas carboniladas), não houve diferença significativa entre os grupos estudados ($p > 0.05$), mesmo quando avaliados somente grupos controle e tratado com MeHg. No entanto, não se pode afirmar que o MeHg não induz dano em proteínas, pois carbonilação é apenas um tipo de modificação. Em estudo com moluscos, utilizando dose sub-letal de Hg para a espécie, encontrou-se um aumento significativo da concentração de proteínas carboniladas, porém isto era o esperado, visto a concentração de Hg a qual os moluscos foram expostos (VERLECAR; JENA; CHAINY, 2008). No presente estudo, a modificação por carbonilação pode não ter acontecido devido à menor concentração administrada nos ratos, ou ainda as proteínas carboniladas poderiam já ter sido degradadas ou recuperadas (DALLE-DONNE et al., 2006), por se tratar de um estudo subcrônico.

Quanto às análises de NO, estas foram realizadas em colaboração com um laboratório, e devido à instabilidade do analito, algumas amostras foram perdidas. Uma vez que o NO é muito rapidamente oxidado a nitrato e nitrito, a determinação destes é utilizada como índice das concentrações disponíveis de NO (ELLIS et al.

1998). A utilidade deste biomarcador tem sido questionada por certos autores devido a alguns fatores de interferência (LAUER; KLEINBONGARD; KELM, 2002; ELLIS et al., 1998), porém outros autores mostram que a concentração de NO tem refletido bem a atividade da NO sintase (KLEINBONGARD et al., 2003; KELM et al., 1999). Os resultados são demonstrados na Figura 4.

Figura 4. Concentração de NO em plasma de ratos controle e ratos tratados com metilmercúrio (MeHg) e selênio (Se) em duas doses. ^{a,b}Médias com letras iguais não diferem estatisticamente. Letras diferentes são estatisticamente diferentes dos outros ($p < 0.05$).

Neste estudo, as concentrações de NO mostraram-se significativamente diminuídas em ratos tratados com MeHg quando comparadas aos ratos controle ($p < 0.05$). Já as concentrações de NO em ratos tratados com Se 2 e 6 mg/L mostraram-se semelhantes às dos ratos controles.

Uma correlação negativa foi encontrada entre os dados da última semana de aferição da pressão sanguínea e NO, comparando-se grupos controle e MeHg ($r = -0.67$, $p < 0.001$), mostrada na Figura 5, sugerindo que quanto menor concentração de NOx, maior a pressão sanguínea sistólica nos ratos que recebiam MeHg, uma vez que o NO é um potente vasodilatador e apresenta um papel fundamental no funcionamento normal do sistema cardiovascular (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 a hipertensão (CENGEL; SAHINARSLAN, 2006). Nenhuma correlação foi encontrada entre as concentrações de NO e o aumento de pressão sistólica em ratos tratados com Se.

Figura 5. Correlação negativa entre os dados da ultima semana de aferição da pressão sanguínea e as concentrações de NO em ratos controle e ratos tratados com metilmercúrio (MeHg) ($r = -0.67$, $p < 0.001$). Na figura, o círculo aberto (○) representa o grupo controle, o círculo fechado (●) o grupo tratado com MeHg.

No Ensaio Cometa, os danos nas células foram classificados por classes, 0, 1, 2 e 3. O escore total de 100 cometas foi obtido multiplicando o número de células em cada classe pelo número da classe, de acordo com uma fórmula desenvolvida por Manoharan e Banerjee, 1985:

Escore total = $(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3)$, onde n é o número de células em cada classe. Assim, o escore total pode variar de 0 a 300.

Os resultados do ensaio Cometa estão representados na Figura 6, e mostraram que a exposição ao MeHg levou a um aumento significativo na migração do DNA comparado ao grupo controle ($p < 0.0001$), indicando o efeito genotóxico do MeHg. Dano no DNA de fígado e rim de ratos expostos a MeHg também foi encontrado através do aumento da concentração de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OH-

dG), um importante marcador de dano no DNA (JIN et al., 2008). Além do dano direto ao DNA, o Hg pode inibir o sistema de reparo do DNA através da ligação do MeHg aos grupamentos –SH das enzimas de reparo (CEBULSKA-WASILEWSKA et al., 2005; AU; SALAMA; SIERRA-TORRES, 2003).

Figura 6. Escore para detecção de dano ao DNA usando o Ensaio do Cometa.
^{a,b} Médias com letras iguais não diferem estatisticamente. Letras diferentes são estatisticamente diferentes dos outros grupos ($p < 0.05$).

Já os grupos tratados com Se não mostraram diferença significativa comparados ao controle, mostrando que o Se não apresenta efeitos genotóxicos. Mais ainda, um efeito protetor do Se foi evidenciado na co-administração com MeHg, diminuindo em cerca de 35% na genotoxicidade induzida pelo MeHg em ratos tratados com 2 mg/L Se e cerca de 40% em ratos tratados com 6 mg/L de Se.

Uma vez que a associação de MeHg ao Se mostrou-se envolvida na proteção ao dano genético, uma análise de correlação entre os grupos controle, MeHg e MeHg + Se em ambas as doses verificando dano ao DNA e atividade da GSH-Px foi feita. Uma significativa correlação negativa foi encontrada ($r = -0.474$, $p < 0.05$), demonstrada na Figura 7, ou seja, a inibição da atividade da GSH-Px parece estar diretamente envolvida na indução de dano no DNA promovido pelo MeHg, e o Se poderia contribuir para a eliminação do H_2O_2 e dos peróxidos lipídicos pela modulação da atividade da GSH-Px (TRAN et al. 2007; GANTHER, 1999).

Figura 7. Correlação negativa entre o índice de dano no DNA e a atividade da GSH-Px ($r = -0.474$, $p < 0.05$). Na figura, o círculo aberto (○) representa o grupo controle, o círculo fechado (●) o grupo tratado com MeHg, o triângulo aberto (△) o grupo MeHg + Se 2 mg/L e o triângulo fechado (▲) o grupo MeHg + Se 6 mg/L.

As análises histopatológicas foram realizadas em parceria com Laboratório de Neuropatologia da FMRP-USP, e os resultados estão presentes na Tabela 2. As análises foram feitas em fígado, rim e coração. Os cérebros dos ratos tratados nesta primeira fase não foram analisados devido a pouca experiência da aluna na remoção deste órgão, procedimento que foi adquirido com a prática para o próximo estudo. As lâminas foram analisadas por um patologista, que encontrou vários níveis de infiltração leucocitária, conforme escore explicado no item 3.3.11.

Tabela 2. Resultados das análises histopatológicas dos tecidos de ratos do Estudo I (n = 8, exceto nos grupos MeHg+Se 2 e 6 mg/L, onde n = 7). Os dados estão expressos em número de ratos que apresentaram determinado escore, e os escores foram divididos em 0 (órgão normal), +1 (infiltração leucocitária branda), +2 (infiltração leucocitária moderada) e +3 (infiltração leucocitária severa).

Grupos	Número de ratos por escore			
	0	+1	+2	+3
Controle				
Fígado	8			
Rim	8			
Coração	8			
MeHg				
Fígado*		1	5	2
Rim*			5	3
Coração*		1	3	4
MeHg + Se 2 mg/L				
Fígado*	1	4	2	
Rim*	1	4	2	
Coração*		5	2	
MeHg + Se 6 mg/L				
Fígado*	1	4	2	
Rim*	1	4	2	
Coração*	1	3	3	
Se 2 mg/L				
Fígado*	2	4	2	
Rim	8			
Coração*	1	3	4	
Se 6 mg/L				
Fígado*	1	6	1	
Rim	7	1		
Coração*		6	2	

*Estatisticamente diferente do grupo controle (p<0.05).

Pôde-se observar uma significativa infiltração leucocitária no fígado, rim e coração dos ratos tratados com MeHg quando comparados com o grupo controle (p<0.001). Significativa necrose tubular renal foi encontrada em ratos expostos a HgCl₂, porém a dose utilizada era de 5 mg/kg (AUGUSTI et al., 2008). Em um estudo realizado em um período de 90 dias com cabras expostas a 150 mg de HgCl₂ por

dia, encontrou-se significativas e sérias alterações histopatológicas em fígado, pâncreas, pulmões, rins, intestino, coração e cérebro tais como necrose, edema, hemorragia (PATHAK; BHOWMIK, 1998). A dose de HgCl_2 utilizada por estes autores, era, contudo, extremamente alta. Portanto, devido à dose utilizada em nosso estudo ser menor, condizente com a exposição de ribeirinhos, os achados histopatológicos não foram extremos, mas houve claro processo inflamatório desenvolvido pela exposição ao metal.

Além disso, um importante resultado encontrado foi a presença significativa de infiltração leucocitária em fígado e coração de ratos expostos somente a Se na forma de selenato de sódio, em ambas as concentrações ($p < 0.05$). Mais ainda, uma correlação positiva foi encontrada entre pressão sistólica e infiltração leucocitária ($r = 0.648$, $p < 0.01$) nos grupos tratados com Se, comparados ao controle. O processo inflamatório gerado pela suplementação de Se poderia, dessa forma, relacionado ao aumento da pressão sistólica.

Devido à presença de infiltração leucocitária também nos grupos tratados com Se, não houve efeito protetor deste quando associados ao MeHg; porém, também não houve exacerbação do infiltrado leucocitário, ou seja, não houve um efeito sinérgico destes dois elementos. Já o rim apresentou-se normal quando tratado com Se 2 e 6 mg/L.

As Figuras 8 e 9 exemplificam, respectivamente, os níveis de infiltração leucocitária encontrados em fígado e rim em alguns dos grupos de ratos.

Figura 8. Histopatologia do fígado, representado por um campo de uma seção, corado com hematoxilina e eosina, mostrando os diferentes escores avaliados. Em A), fígado de rato controle, com escore = 0 (normal); em B) fígado de rato que recebeu MeHg+Se 6 mg/L, com escore = +1 (infiltração leucocitária leve); em C), fígado de rato que recebeu Se 2mg/L, com escore = +2 (infiltração leucocitária moderada); em D) fígado de rato tratado com MeHg, com escore = +3 (infiltração leucocitária severa). A, B e C: fotos em aumento de 400x; D: aumento de 100x.

Figura 9. Histopatologia do rim, representado por um campo de uma seção, corado com hematoxilina e eosina, mostrando os diferentes escores avaliados. Em A), rim de rato tratado com Se 2 mg/L, com escore = 0 (normal); em B) rim de rato que recebeu MeHg+Se 2 mg/L, com escore = +1 (infiltração leucocitária leve); em C), rim de rato que recebeu MeHg+Se 6 mg/L, com escore = +2 (infiltração leucocitária moderada); em D) fígado de rato tratado com MeHg, com escore = +3 (infiltração leucocitária severa). A, B e C: fotos em aumento de 400x; D: aumento de 100x.

Vários componentes da dieta podem mudar a absorção ou a distribuição de outros elementos, e no caso do MeHg podem modular sua toxicidade. Há,

entretanto, estudos controversos relatando a modificação no acúmulo do Hg após suplementação na dieta, sobretudo com Se, e estes ambivalentes resultados dependem, principalmente, da concentração do metal e da forma química empregada, tanto para Hg quanto para Se (CHAPMAN; CHAN, 2000; BEYROUTY; CHAN, 2006).

Os resultados da análise da distribuição de Hg nos diferentes órgãos, sangue e plasma estão expressos na Tabela 3. Elevadas concentrações de Hg foram encontradas no fígado e no rim, e em menores concentrações no coração, muito provavelmente por serem os dois primeiros órgãos responsáveis pela metabolização e excreção do elemento. Além disso, o sangue apresentou concentrações cerca de 200 vezes maior que as concentrações no plasma.

Tabela 3. Resultados da quantificação de Hg total do Estudo I em diferentes órgãos, sangue e plasma. Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Grupos	Fígado (ng/g)	Rim (ng/g)	Coração (ng/g)	Sangue (μ g/L)	Plasma (μ g/L)
Controle	18 $\pm$ 13	4 $\pm$ 1	7 $\pm$ 3	8 $\pm$ 3	<LD ^a
MeHg*	5854 $\pm$ 931	4493 $\pm$ 734	421 $\pm$ 43	20790 $\pm$ 2190	119 $\pm$ 20
MeHg+Se 2mg/L*	5471 $\pm$ 1424	4321 $\pm$ 849	401 $\pm$ 110	18781 $\pm$ 2344	101 $\pm$ 18
MeHg+Se 6mg/L*	6048 $\pm$ 852	4680 $\pm$ 902	390 $\pm$ 103	18124 $\pm$ 1798	114 $\pm$ 32
Se 2mg/L	27 $\pm$ 20	5 $\pm$ 3	5 $\pm$ 2	7 $\pm$ 3	<LD
Se 6mg/L	22 $\pm$ 13	6 $\pm$ 3	4 $\pm$ 3	7 $\pm$ 4	<LD

^aLD= limite de detecção; *Estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0.001$).

Não houve diferença na bioacumulação do Hg quando este era associado ao Se na forma de selenato de sódio, em ambas as concentrações. Orct e colaboradores avaliaram a influência do Se na distribuição e retenção do Hg pré-tratando ratos com Na₂SeO₃ – selenito de sódio- durante três dias antes da exposição ao HgCl₂ 6,45 μ mol (ORCT et al., 2009). Os autores encontraram uma

redistribuição do Hg nos tratamentos com Se: quanto maior a dose de Se no pré-tratamento, menor era a concentração de Hg no cérebro, rim, fígado, plasma e urina. Porém, deve-se levar em consideração que o estudo de Orct aplicou um pré-tratamento, e não uma associação como a usada neste projeto, e ainda utilizou Hg inorgânico. Por outro lado, Santos e colaboradores não encontraram diferença na distribuição do Hg em cérebro e rim de ratos co-expostos a MeHg e selenometionina (SANTOS et al., 2007). Estas diferenças entre estudos mostram a influência das formas químicas do Hg e do Se quanto à biodisponibilidade e interações.

Assim, esse primeiro estudo finaliza-se mostrando o efeito tóxico do MeHg em solução e a proteção antioxidante do Se na forma de selenato, apesar de não ter havido um efeito anti-inflamatório. Além disso, como os efeitos do Se não foram dose-dependentes, o Estudo II segue com apenas a menor dose (2 mg/L) associada a mais um componente da dieta que pode exercer efeito protetor na exposição ao MeHg.

4.2 Estudo II

No Estudo II, adicionou-se o componente nutricional óleo de peixe na dieta dos ratos, conforme especificado na seção “Escolha da dose e tratamento dos animais” já que este componente também está presente na dieta à base de peixes dos ribeirinhos da população amazônica, associando-se ainda ao Se, de modo a tentar mimetizar da melhor forma a dieta desta população.

Os resultados da variação da massa corporal semanal são mostrados na Figura 10. Não houve diferença na massa dos ratos dos diferentes tratamentos.

Figura 10. Variação da massa corporal de ratos recebendo diferentes tratamentos ao longo de três meses. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0.05$).

Já a pressão sanguínea sistólica apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, podendo ser acompanhada ao longo das semanas pela Figura 11.

Figura 11. Variação da pressão sanguínea sistólica de ratos recebendo diferentes tratamentos ao longo de três meses. *Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0.05$), #Significativamente diferente dos grupos controle e MeHg ($p < 0.05$).

Durante as cinco primeiras semanas, não houve diferença na pressão sanguínea sistólica dos ratos, apesar de já haver uma tendência ao aumento na pressão nos ratos tratados com MeHg e com Se. A partir da sexta semana, o aumento na pressão tornou-se significativo nos ratos cujos tratamentos incluíam MeHg, exceto na associação MeHg+óleo de peixe, quando comparados ao controle. Na sétima semana, o grupo dos ratos tratados somente com Se também mostrou uma significativa hipertensão comparado ao grupo controle, e manteve-se assim até o final do tratamento. Por outro lado, o tratamento com óleo de peixe não induziu um aumento na pressão, permanecendo com valores semelhantes ao controle. Mais ainda, os ratos que recebiam a associação MeHg+óleo de peixe, apesar de diferentes dos ratos controles, não atingiram os valores de pressão induzidos somente pelo MeHg, mostrando-se também diferente desse grupo. Isso mostra que o óleo de peixe foi capaz de atenuar a hipertensão dos ratos em cerca de 50%.

O efeitos anti-inflamatórios e cardioprotetores do óleo de peixe são bem conhecidos (SIMOPHOULOS, 2002; CARROLL; ROTH, 2002). Estes efeitos anti-inflamatórios poderiam estar envolvidos, então, na manutenção da pressão sistólica (tratamento com óleo de peixe) e o mais importante, na diminuição da pressão no grupo MeHg+óleo de peixe, já que o MeHg foi capaz de induzir aumento de pressão. Um estudo propôs que o uso racional de ômega-3 e ômega-6 seria tão favorável quanto o uso de medicamentos para hipertensão e doenças cardiovasculares (DAS, 2008). Outro estudo mostrou que o óleo de peixe seria efetivo em casos de hipertensão moderada como adjunto no tratamento usando medicamento (HOWE, 1995). Este mesmo estudo ressalta a necessidade de maiores estudos relacionando a eficácia do uso único de ômega-3 em doenças cardiovasculares.

Os resultados dos biomarcadores de estresse oxidativo estão presentes na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados dos biomarcadores do estresse oxidativo GSH (glutathiona reduzida), GSH-Px (glutathiona peroxidase), CAT (catalase), SOD (superóxido dismutase), MDA (malondialdeído), ALA-D (δ -aminolevulinato desidratase), R (reativação da ALA-D) e PC (proteínas carboniladas) do Estudo II. Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Grupo	GSH ¹	GSH-Px ²	CAT (κ /gHb)	SOD ³	MDA (μ M)	ALA-D (UI)	R (%)	PC ⁴
Controle	1,4 $\pm$ 0,3 ^a	37 $\pm$ 10 ^a	263 $\pm$ 45 ^a	2,6 $\pm$ 0,3 ^a	21 $\pm$ 3 ^a	21 $\pm$ 2 ^a	5,9 $\pm$ 3,8 ^a	1,6 $\pm$ 0,3 ^a
MeHg	1,1 $\pm$ 0,2 ^a	23 $\pm$ 4 ^b	171 $\pm$ 72 ^b	2,2 $\pm$ 0,7 ^a	28 $\pm$ 4 ^{bc}	14 $\pm$ 2 ^b	38,6 $\pm$ 8,4 ^b	1,4 $\pm$ 0,6 ^a
Se	1,3 $\pm$ 0,2 ^a	38 $\pm$ 12 ^a	256 $\pm$ 40 ^a	2,8 $\pm$ 0,6 ^a	22 $\pm$ 4 ^a	20 $\pm$ 2 ^a	8,0 $\pm$ 4,2 ^a	1,3 $\pm$ 0,6 ^a
Óleo de Peixe	1,4 $\pm$ 0,1 ^a	32 $\pm$ 9 ^{ab}	238 $\pm$ 52 ^{ab}	3,0 $\pm$ 0,7 ^a	26 $\pm$ 5 ^{ac}	20 $\pm$ 2 ^a	8,7 $\pm$ 3,2 ^a	1,6 $\pm$ 0,4 ^a
MeHg+Óleo	1,1 $\pm$ 0,2 ^a	23 $\pm$ 5 ^b	193 $\pm$ 40 ^{ab}	2,4 $\pm$ 0,7 ^a	27 $\pm$ 4 ^{bc}	15 $\pm$ 3 ^b	37,4 $\pm$ 8,0 ^b	1,6 $\pm$ 0,5 ^a
MeHg+Óleo+Se	1,4 $\pm$ 0,2 ^a	40 $\pm$ 7 ^a	263 $\pm$ 43 ^a	2,5 $\pm$ 0,6 ^a	25 $\pm$ 3 ^{ac}	13 $\pm$ 3 ^b	40,0 $\pm$ 13,9 ^b	1,4 $\pm$ 0,4 ^a

¹(μ mol/mL sangue)

²(nmol NADPH/min/ml sangue)

³(USOD/mgHb)

⁴(nmol/mg proteína)

a,b,c = Médias com letras iguais não diferem estatisticamente. Letras diferentes são estatisticamente diferentes dos outros grupos (p<0.05).

As concentrações de GSH não apresentaram diferença significativa entre os grupos analisados. Contudo, assim como no Estudo I, houve uma tendência à diminuição da concentração de GSH nos ratos tratados com MeHg quando comparados ao controle ($p=0.06$). O tratamento em associação com o óleo de peixe, assim como com o Se, não mostrou diferença estatística comparando com os demais grupos.

Em relação à atividade da enzima GSH-Px, o grupo tratado somente com óleo de peixe não apresentou diferença do grupo controle, corroborando com outros estudos (ERDOGAN et al., 2004; IRAZ et al., 2005), mas também não apresentou diferença quando comparado ao grupo MeHg, mantendo uma atividade intermediária entre estes dois grupos. Já o grupo tratado somente com Se manteve sua atividade inalterada, mostrando que a suplementação com Se não aumentou a atividade da enzima, já que a enzima atinge um platô de atividade e após se mantém constante (ARTHUR, 2000). Além disso, a GSH-Px apresentou-se inibida no grupo tratado com MeHg ($p<0.05$), o que pode ocorrer por uma inibição direta da enzima pelo MeHg (ABDEL-HAMID; FAHMY; SHARAF, 2001), ou ainda pela superprodução de radicais induzida pelo MeHg que poderiam, indiretamente, inibir a enzima (HUANG; CHENG; LIN, 1996; CLARKSON, 1997).

Nos tratamentos em associação, foi observado que o óleo de peixe não restabeleceu a atividade normal da enzima, porém o Se, como visto no Estudo I, retornou a atividade da GSH-Px a sua atividade normal, por ser esta uma enzima dependente de Se (FLOHE, 1979; HAMILTON, 2004), protegendo a enzima da ação do MeHg.

A atividade da CAT apresentou-se significativamente inibida em ratos tratados com MeHg, frente aos ratos controle ($p<0.05$). No Estudo I, uma tendência a essa inibição já havia sido observado, fato que possivelmente tenha ocorrido devido aos dados neste estudo serem mais homogêneos que no estudo anterior. Abdel-Hamid e colaboradores também mostraram diminuição na atividade da CAT em trabalhadores expostos a Hg por lâmpadas fluorescentes por uma inibição direta da enzima (ABDEL-HAMID; FAHMY; SHARAF, 2001), assim como Pinheiro e colaboradores que observaram diminuição na atividade da enzima na população ribeirinha amazônica (PINHEIRO et al., 2008). No grupo tratado com MeHg associado ao óleo de peixe, a atividade da enzima permaneceu significativamente inibida ($p<0.01$), sem efeito antioxidante. Iraz e colaboradores relataram capacidade antioxidante do óleo

de peixe, porém em concentração cerca de 25 vezes maior que a concentração usada neste estudo (IRAZ et al., 2005). Por outro lado, o Se mostrou seu afeito protetor, retornando a CAT a sua atividade normal mesmo quando associado a MeHg e óleo de peixe. Apesar da CAT não ser uma enzima dependente de Se, este foi capaz de diminuir o dano oxidativo causado pelo MeHg. Algumas possibilidades tem sido discutidas, e a formação de complexos Hg-Se que diminuiriam o dano oxidativo causado pelo MeHg, como na GSH-Px, tem sido sugerido (YONEDA; SUZUKI, 1997a,b).

Já a atividade da enzima antioxidante SOD não se mostrou alterada comparando-se todos os grupos ($p>0.05$). Este resultado foi explicado no Estudo I, e para melhor entendimento de como as enzimas antioxidantes atuam a razão SOD/CAT foi avaliada. As médias e desvios padrão da razão SOD/CAT no controle, MeHg, Se, óleo de peixe, MeHg+óleo de peixe e MeHg+Se+óleo de peixe foram, respectivamente: $0,010 \pm 0,002$; $0,011 \pm 0,003$; $0,013 \pm 0,004$; $0,018 \pm 0,004$; $0,013 \pm 0,005$ e $0,010 \pm 0,002$. A razão SOD/CAT apresentou-se significativamente aumentada no grupo tratado com MeHg comparado ao controle ($p=0.007$), sugerindo que a SOD está trabalhando em sua velocidade normal ou ainda acima, convertendo $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , enquanto que a CAT não está conseguindo converter todo o H_2O_2 formado, facilitando a oxidação e o dano de biomoléculas. Com relação às associações, não houve diferença significativa na razão SOD/CAT no grupo tratado com MeHg+óleo de peixe comparado ao MeHg, porém a adição de Se fez com que a razão SOD/CAT voltasse aos valores normais do controle.

As concentrações de MDA se mostraram significativamente aumentadas no grupo de ratos tratados com MeHg e com associação MeHg+óleo de peixe ($p<0.05$) quando comparadas ao grupo controle, mostrando assim que o MeHg pode induzir a produção de radicais livres (ALI; LEBEL; BONDY, 1992), que atacam a membrana lipídica produzindo o MDA, assim como foi observado no Estudo I. Não houve diferença nas concentrações de MDA entre os grupos tratados com Se e o controle ($p>0.05$). Já os ratos tratados somente com óleo de peixe mostraram resultados dúbios, pois não apresentaram diferença significativa quando comparado ao controle, mas também não apresentaram diferença quando comparados ao grupo tratado com MeHg. Observando os resultados, percebe-se uma tendência de o MDA elevar-se com o tratamento com óleo de peixe, sem contanto ser diferente do grupo controle. Vossen e colaboradores mostraram que a peroxidação de fosfolípidios

aumentava com o aumento do conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados que eram adicionados a um meio de cultura e ainda que a sensibilidade desses ácidos graxos à peroxidação era diretamente proporcional ao número de duplas ligações presentes (VOSSSEN et al., 1995). Farina e colaboradores encontraram maiores concentrações de MDA em ratos alimentados com uma dieta contendo óleo de soja, comparados a ratos alimentados com dieta contendo óleo de coco (óleo de soja contém Ômega-3,6 e 9, todos com duplas ligações; já o óleo de coco contém somente Ômega-6 e 9, e em menores concentrações) (FARINA et al., 2003). Considerando que neste estudo foi utilizado óleo de peixe contendo o ácido eicosapentanoico e o ácido docosahexanoico e estes apresentam, respectivamente, 20 carbonos e 5 duplas ligações, e 22 carbonos e 6 duplas ligações (CALDER; YAQOOB, 2009), essa tendência em aumentar o MDA em ratos tratados com óleo de peixe pode ser devido ao maior número de duplas ligações quando comparados ao Ômega-6 e 9, sendo assim mais suscetível ao dano oxidativo.

Além disso, a associação MeHg+óleo de peixe também provocou aumento na concentração de MDA quando comparado ao controle. Por outro lado, a associação do Se ao MeHg+óleo de peixe não diferiu do controle, e também não se mostrou diferente do grupo tratado somente com MeHg. No Estudo I, observou-se que o Se na concentração de 2 mg/L era capaz de reverter os efeitos oxidativos causados pelo MeHg. Já a associação MeHg+Se+óleo de peixe continuou apresentando concentração intermediária de MDA encontrada no grupo óleo de peixe, ou seja, o Se não conseguiu proteger o dano oxidativo frente a dois possíveis indutores de peroxidação lipídica.

A enzima ALA-D não apresentou mudança na sua atividade no sangue dos ratos tratados somente com Se ou somente com o óleo de peixe quando comparada aos ratos controle. Já em ratos tratados com MeHg, a atividade da enzima apresentou significativa inibição ($p < 0.01$), bem como nas associações MeHg+óleo de peixe e MeHg+Se+óleo de peixe (ambos com $p < 0.05$). Como visto no Estudo I, o Se não mostrou ser protetor, muito provavelmente devido à atividade da enzima ALA-D não ser dependente de Se, e o óleo de peixe também não mostrou proteção antioxidante.

Com relação à porcentagem de reativação da enzima ALA-D, no grupo tratado com MeHg houve uma reativação de cerca de 38%, ou seja, a atividade da enzima estava 38% inibida pela inativação dos grupos -SH, sendo que o restante da

inibição pode ter ocorrido pela inativação de outro sítio ativo da enzima. Nos grupos MeHg+óleo de peixe e MeHg+Se+óleo de peixe, a enzima estava 37% e 40% inibida, respectivamente. Estes valores não são significativamente diferentes do grupo MeHg, o que significa que o Se e o óleo de peixe não foram capazes de reverter a inibição dos grupamentos –SH provocada pelo MeHg.

Com relação ao dano oxidativo de proteínas (proteínas carboniladas), não houve diferença significativa entre os grupos estudados ($p>0.05$), mesmo quando avaliados somente grupos controle e tratado com MeHg, conforme encontrado no Estudo I, mostrando que o MeHg não foi capaz de causar este tipo de modificação em proteínas.

Os resultados das concentrações de NO estão mostrados na Figura 12.

Figura 12. Concentração de NO em plasma de ratos controle, tratados com selênio (Se), óleo de peixe, metilmercúrio (MeHg) e em associações. ^{a,b}Médias com letras iguais não diferem estatisticamente. Letras diferentes são estatisticamente diferentes dos outros grupos ($p<0.05$).

Pôde-se observar uma significativa diminuição na concentração de NO em ratos tratados com MeHg comparado ao controle ($p<0.05$). Esta redução do NO pode ter ocorrido em função da inibição da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) pelo MeHg, conforme mostrado em cultura de células endoteliais (KISHIMOTO; OGURI; TADA, 1995). Por outro lado, óleo de peixe e Se não foram

capazes de modificar as concentrações de NO, mantendo valores semelhantes ao controle. Já os grupos que receberam MeHg associado ao óleo de peixe ou ao Se não mostraram diferença na concentração de NO quando comparados ao grupo que recebeu somente MeHg, mostrando que estes componentes da dieta não atuaram no sistema do NO.

No Estudo II, a análise da migração do DNA não foi mais realizada visualmente, por meio de escores, como no Estudo I, mas avaliadas com o auxílio do software Comet Score™, sem perdas para o estudo. O dano no DNA foi quantificado pela porcentagem de DNA na cauda (% DNA). Os resultados do Ensaio Cometa estão na Figura 13, e mostraram que o óleo de peixe e o Se não foram genotóxicos, uma vez que os resultados destes grupos não diferiram do controle. Em contraste, um aumento significativo na migração do DNA no grupo tratado com MeHg foi encontrado quando comparado ao grupo controle ($p < 0.001$), indicando um efeito genotóxico do MeHg, assim como o efeito encontrado e explicado no Estudo I.

Figura 13. Porcentagem de DNA na cauda (% DNA) no Ensaio Cometa.
^{a,b}Médias com letras iguais não diferem estatisticamente. Letras diferentes são estatisticamente diferentes dos outros grupos ($p < 0.05$).

Em uma recente revisão, um esquema sobre os quatro principais mecanismos que levam à genotoxicidade induzida pelo Hg foi apresentado: (i)-produção de

EROs, 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).

Ainda sobre o Ensaio Cometa, ambos Se e óleo de peixe mostraram ser protetores contra o dano no DNA causado pelo MeHg. A associação MeHg+óleo de peixe reduziu em torno de 32% o dano causado pelo MeHg. Este resultado corrobora o estudo do grupo de Kikugawa que mostrou que ácidos graxos poli-insaturados diminuem o dano ao DNA em células de fígado de ratos (KIKUGAWA et al., 2003). Este efeito protetor do óleo de peixe, contudo, não mostrou estar ocorrendo via marcadores do estresse oxidativo, já que o óleo de peixe não mostrou capacidade antioxidante nos marcadores avaliados neste trabalho. No Estudo I, a associação MeHg+Se 2 mg/L já havia mostrado redução no dano ao DNA em cerca de 35%, mostrando o efeito protetor do Se, proposto por ser antioxidante, diminuindo assim o dano oxidativo provocado pelo MeHg. Porém, quando se associou o MeHg a ambos óleo de peixe e Se, não houve um efeito sinérgico destes dois elementos na proteção do dano induzido pelo MeHg, uma vez que a redução foi de 40%. Houve uma tendência na associação MeHg+Óleo+Se ter maior efeito protetor, mas o resultado não foi significativo ($p=0.06$).

Os resultados referentes às análises histopatológicas estão presentes na Tabela 5. Foi observada uma significativa infiltração leucocitária em todos os órgãos dos ratos tratados com MeHg quando comparados com o grupo controle ($p<0.05$), conforme ocorrido no Estudo I, já discutido anteriormente, assim como infiltração leucocitária significativa no fígado e no coração ($p<0.05$) dos ratos expostos a Se. Já o rim e o cérebro de ratos tratados com Se não apresentaram diferença do controle.

Tabela 5. Resultados das análises histopatológicas dos tecidos de ratos do Estudo II (n = 8). Os dados estão expressos em número de ratos que apresentaram determinado escore, e os escores foram divididos em 0 (órgão normal), +1 (infiltração leucocitária branda), +2 (infiltração leucocitária moderada) e +3 (infiltração leucocitária severa).

Grupos	Número de ratos por escore			
	0	+1	+2	+3
Controle				
Fígado	8			
Rim	8			
Coração	8			
Cérebro	8			
MeHg				
Fígado*		3	4	1
Rim*			6	2
Coração*		2	2	4
Cérebro*	3	2		3
Se				
Fígado*	1	6	1	
Rim	6	2		
Coração*		5	3	
Cérebro	8			
Óleo de Peixe				
Fígado	6	2		
Rim	6	2		
Coração	8			
Cérebro	7	1		
MeHg + Óleo de Peixe				
Fígado**	5	3		
Rim**	4	4		
Coração**	4	3	1	
Cérebro	7	1		
MeHg + Óleo de Peixe+Se				
Fígado**	4	4		
Rim**	5	2	1	
Coração**	6	2		
Cérebro	8			

*Estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0.05$); #estatisticamente diferente do grupo tratado com MeHg ($p < 0.05$).

Por outro lado, o tratamento com óleo de peixe não induziu inflamação, apesar de rim, fígado e cérebro apresentaram infiltração leucocitária branda, porém

sem diferença estatística quando comparados ao controle. Nos tratamentos associados ao óleo de peixe, tanto MeHg+óleo de peixe quanto MeHg +óleo de peixe+Se, uma significativa proteção foi observada. Estes dois grupos mostraram ser diferentes do controle e também do MeHg, o que significa que houve a ação anti-inflamatória (quando difere do MeHg), mas que os órgãos ainda não se encontram completamente normais (diferindo do controle). Já que não foi observada capacidade antioxidante do óleo de peixe, sugere-se que o mecanismo pelo qual o óleo de peixe exerceu seu efeito protetor poderia estar relacionado ao seu efeito anti-inflamatório (SIMOPOULOS, 2002). O ácido graxo ômega-3 EPA compete com o ácido araquidônico (um ômega-6) pelo metabolismo enzimático, induzindo a produção de derivados menos anti-inflamatórios, ou seja, EPA e DHA diminuem a produção de metabólitos de prostaglandinas, de tromboxano A2 (um potente agregador plaquetário e vasoconstritor), de leucotrienos (indutor de inflamação e da aderência leucocitária) (SIMOPOULOS; KIFER; MARTIN, 1986; LEAF, 1990, CALDER; YAQOOB, 2008).

Este mecanismo poderia estar relacionado com a ausência ou infiltração leucocitária branda nos tecidos de ratos tratados com óleo de peixe e a reversão dos efeitos deletérios do MeHg nos grupos associados ao óleo de peixe, inclusive com as três associações. Mais ainda, encontrou-se uma correlação positiva entre a pressão sanguínea sistólica e o processo inflamatório ($p < 0.01$, $r = 0.825$) nos grupos controle, MeHg e MeHg+Óleo (Figura 14), mostrando redução na inflamação e na pressão sistólica em ratos que receberam óleo de peixe associado ao MeHg.

Figura 14. Correlação positiva entre pressão sanguínea sistólica e processo inflamatório no coração ($p < 0.01$, $r = 0.825$) nos grupos controle, MeHg e MeHg+Óleo. Na figura, o círculo aberto ($\circ$) representa o grupo controle, o círculo fechado ($\bullet$) o grupo tratado com MeHg e o triângulo aberto (Δ) o grupo MeHg.

As Figuras 15 e 16 exemplificam, respectivamente, os níveis de infiltração leucocitária encontrados em cérebro e coração em alguns dos grupos de ratos.

Figura 15. Histopatologia do cérebro representado por um campo de uma seção, corado com hematoxilina e eosina. Em A), cérebro de rato controle, com escore = 0 (normal); em B) cérebro de rato que recebeu óleo de peixe, com escore = 0 (normal); em C) cérebro de rato tratado com MeHg, com escore = +3 (infiltração leucocitária severa); em D), cérebro de rato que recebeu associação Metilmercúrio+óleo de peixe, com escore = +1 (infiltração leucocitária leve). A, B, C e D: fotos em aumento de 400x.

Figura 16. Histopatologia do coração representado por um campo de uma seção, corado com hematoxilina e eosina. Em A) coração de rato controle, com escore = 0 (normal); em B) coração de rato que recebeu Selênio, com escore = +1 (infiltração leucocitária leve); em C) cérebro de rato tratado com Metilmercúrio, com escore = +2 (infiltração leucocitária moderada); em D), cérebro de rato que recebeu associação Metilmercúrio+Selênio+óleo de peixe, com escore = +0 (normal). A, B, C e D: fotos em aumento de 400x.

Os resultados da determinação de Hg em fígado, rim, coração, cérebro, sangue e plasma estão expressos na Tabela 6. Elevadas concentrações de Hg foram encontradas no fígado e no rim, e em menores concentrações no coração. Neste estudo também foi analisado Hg no cérebro dos ratos, órgão que não havia sido analisado no experimento anterior, observando-se significativa presença de Hg.

Tabela 6. Resultados da quantificação de Hg total do Estudo II em diferentes órgãos, sangue e plasma. Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Grupos	Fígado (ng/g)	Rim (ng/g)	Coração (ng/g)	Cérebro (ng/g)	Sangue (μ g/L)	Plasma (μ g/L)
Controle	18 $\pm$ 17	4 $\pm$ 1	7 $\pm$ 4	2 $\pm$ 1	8 $\pm$ 3	2 $\pm$ 2
MeHg*	5.304 $\pm$ 1.258	4.671 $\pm$ 520	421 $\pm$ 33	267 $\pm$ 24	20.511 $\pm$ 2.370	124 $\pm$ 19
Se	14 $\pm$ 10	4 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	6 $\pm$ 4	3 $\pm$ 2
Óleo peixe	26 $\pm$ 14	4 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	7 $\pm$ 5	3 $\pm$ 2
MeHg+Óleo peixe*	5.154 $\pm$ 887	4.287 $\pm$ 1.192	471 $\pm$ 76	236 $\pm$ 44	17.798 $\pm$ 2.888	104 $\pm$ 33
MeHg+Óleo peixe+Se*	6.460 $\pm$ 1.512	3.941 $\pm$ 1.246	396 $\pm$ 101	267 $\pm$ 23	18.395 $\pm$ 2.650	95 $\pm$ 14

* Estatisticamente diferente do grupo controle.

Não houve diferença na bioacumulação do Hg quando este era ou não associado ao óleo de peixe. Também não houve diferença na associação MeHg+Se+óleo de peixe, corroborando com os achados do Se do Estudo I.

Há controvérsias quando se relaciona absorção, distribuição e bioacumulação de Hg associado a outros elementos da dieta. Porém, deve-se levar em consideração a modulação da toxicidade do MeHg. O óleo de peixe não foi capaz de diminuir a concentração de Hg nos fluidos biológicos e nos tecidos, mas foi capaz de reduzir a infiltração leucocitária, a hipertensão e a genotoxicidade causada pelo MeHg. O Se, da mesma forma, não alterou a distribuição do Hg, mas mostrou capacidade antioxidante e antígeno tóxica frente aos danos oxidativos ocasionados pelo MeHg.

4.3 Estudo III

Neste estudo, a especiação de Hg foi realizada em amostras de peixes liofilizados oriundos do Pará e do sul do Brasil, a fim de verificar se a forma de Hg presente seria mesmo MeHg.

A Figura 17 mostra um cromatograma com adição de padrões de Hg (Hg inorgânico, metilmercúrio e etilmercúrio) – Figura 17A – e um cromatograma com amostra de peixe oriundo do Rio Tapajós (Figura 17B).

Figura 17. Cromatograma de especiação de Hg. Em A, separação de padrões analíticos de três formas químicas de Hg: inorgânico (Hg-i), metilmercúrio (MeHg) e etilmercúrio (EtHg). Em B, especiação de peixe liofilizado procedente do Rio Tapajós, Pará, confirmando a presença exclusiva de MeHg.

A concentração de MeHg encontrada no peixe do Rio Tapajós foi de $1,95 \pm 0,09 \mu\text{g/g}$; já no peixe procedente do sul do Brasil (Paraná) foi de $0,023 \pm 0,002 \mu\text{g/g}$, cerca de 100 vezes menor do que aquela encontrada no peixe do Rio Tapajós.

Assim, a partir dessa concentração de MeHg no peixe liofilizado, a ração dos ratos foi feita de maneira a mimetizar a dieta do ribeirinho, conforme item 3.4.3.1. Confeccionou-se, ainda, ração com peixe não contaminado, e o grupo controle recebeu ração habitual.

A massa corporal dos ratos foi verificada semanalmente, e não apresentou diferença entre os tratamentos e o grupo controle, conforme mostra na Figura 18. A massa corporal aumentou proporcionalmente em todos os grupos, mostrando aceitação da ração por parte dos ratos.

Figura 18. Variação da massa corporal de ratos recebendo ração habitual (controle), ração com peixe não contaminado e ração com peixe contaminado ao longo de três meses.

Já na pressão sanguínea sistólica (Figura 19), um aumento significativo pôde ser observado nas duas últimas semanas de tratamento com ração contendo peixe contaminado com MeHg comparado ao controle.

Figura 19. Variação da pressão sanguínea sistólica de ratos recebendo ração habitual (controle), ração com peixe não contaminado e ração com peixe contaminado ao longo de três meses. *Estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0.05$).

Este aumento de pressão, apesar de significativo, foi brando quando comparado ao aumento de pressão induzido pelo MeHg em solução. Além disso, é importante ressaltar que nos estudos conduzidos pela solução MeHg, a pressão sistólica começava a elevar-se na 6ª semana de tratamento, enquanto que no estudo com ração contendo peixe a pressão só elevou-se a partir da 11ª semana. Este retardo pode estar relacionado com os nutrientes encontrados no peixe, tal como o ômega-3, já que o peixe é considerado protetor de doenças cardíacas (CARROLL; ROTH, 2002). No Estudo II a hipertensão induzida pelo MeHg havia sido menor nos ratos tratados com a associação MeHg+Óleo de peixe, corroborando com os resultados aqui discutidos. Mais ainda, um estudo envolvendo 251 ribeirinhos do Rio Tapajós, que tem fatores de risco mínimo para a hipertensão, mostrou pressão arterial relativamente baixa, com apenas 8% de hipertensão, porém com uma significativa relação dose-efeito entre a exposição ao Hg e a pressão arterial (FILLION et al., 2006). Esta situação real apóia os resultados encontrados neste Estudo III: os ratos inicialmente mantiveram pressão normal e com o tempo, se alimentando sempre desta ração com peixe contaminado, a pressão sistólica elevou-se. Os biomarcadores de estresse oxidativo analisados neste estudo então detalhados na Tabela 7, e, de uma maneira geral, é possível observar que não houve diferença na indução de estresse oxidativo entre o grupo controle, o grupo que recebeu ração com peixe não contaminado e o grupo que recebeu ração com peixe contaminado.

As concentrações de GSH mantiveram-se semelhantes, mostrando que o MeHg presente no peixe não foi capaz de se ligar aos grupamentos -SH da GSH. Entretanto, é importante lembrar que o MeHg em solução também não havia sido capaz de reduzir as concentrações de GSH. Como a coleta do sangue foi realizada ao final do experimento, é possível que a concentração de GSH tenha diminuído no início do experimento, mas com o tempo o organismo, juntamente com os nutrientes do peixe, tenha restabelecido as concentrações. Lucchi e colaboradores já haviam mencionado um mecanismo adaptativo da GSH frente a um estado de estresse oxidativo, no caso deles a hemodiálise (LUCCHI et al., 2005).

Tabela 7. Resultados dos biomarcadores de estresse oxidativo GSH (glutathiona reduzida), GSH-Px (glutathiona peroxidase), CAT (catalase), SOD (superóxido dismutase), MDA (malondialdeído), ALA-D (δ -aminolevulinato desidratase), R (reativação da ALA-D) e PC (proteínas carboniladas) do Estudo III. Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Grupos	GSH ¹	GSH-Px ²	CAT (κ /gHb)	SOD ³	MDA (μ M)	ALA-D (UI)	R (%)	PC ⁴
Controle	1,1 $\pm$ 0,3 ^a	38 $\pm$ 8 ^a	294 $\pm$ 31 ^a	2,3 $\pm$ 0,4 ^a	18 $\pm$ 3 ^a	19 $\pm$ 4 ^a	6,2 $\pm$ 3,3 ^a	1,6 $\pm$ 0,3 ^a
Peixe não contaminado	1,0 $\pm$ 0,2 ^a	35 $\pm$ 6 ^a	283 $\pm$ 24 ^a	2,2 $\pm$ 0,2 ^a	22 $\pm$ 4 ^a	18 $\pm$ 3 ^a	7,1 $\pm$ 3,0 ^a	1,3 $\pm$ 0,6 ^a
Peixe contaminado	0,9 $\pm$ 0,2 ^a	40 $\pm$ 6 ^a	298 $\pm$ 40 ^a	2,1 $\pm$ 0,3 ^a	26 $\pm$ 4 ^b	20 $\pm$ 4 ^a	7,4 $\pm$ 2,9 ^a	1,6 $\pm$ 0,4 ^a

¹(μ mol/mL sangue)

²(nmol NADPH/min/ml sangue)

³(USOD/mgHb)

⁴(nmol/mg proteína)

a,b = Médias com letras iguais não diferem estatisticamente. Letras diferentes são estatisticamente diferentes dos outros grupos ($p < 0.05$).

A enzima GSH-Px manteve sua atividade em valores semelhantes ao grupo controle nos outros demais grupos, mostrando que mesmo a dieta feita a base de peixe contaminado com MeHg não foi capaz de alterar a atividade desta enzima. Vale lembrar que o peixe é fonte de Se e a GSH-Px dependente deste micronutriente (HAMILTON, 2004); assim, sua atividade poderia não ter se alterado pois a presença de MeHg estaria sendo compensada pela presença de Se ou de outro nutriente do peixe. Os Estudos I e II já haviam mostrado um efeito protetor do Se contra a inibição enzimática induzida pelo MeHg e este Estudo III veio então para confirmar que o Se presente no peixe contribui para a manutenção do estado oxidante normal do organismo.

A atividade da CAT também não apresentou diferença comparando grupos controle e tratados com peixes. Estudos epidemiológicos com a população ribeirinha amazônica mostraram atividade da CAT negativamente associada com a concentração de Hg em sangue (GROTTO et al., 2010) ou cabelo (PINHEIRO et al., 2008). Neste estudo com ratos, porém, nenhuma associação foi observada.

Da mesma forma, a atividade da SOD não mostrou alteração comparando-se os três grupos, dados que são semelhantes aos encontrados nos Estudos I e II, nos quais os ratos recebiam como tratamento solução de MeHg.

Com relação ao MDA, seus valores mostraram-se significativamente aumentados em ratos que receberam a ração contendo o peixe contaminado com o MeHg ($p < 0.05$), indicando aumento da peroxidação lipídica e corroborando os achados dos estudos anteriores, onde a concentração de MDA mostrou-se elevada em ratos que receberam solução de MeHg. No Estudo II, os ratos que receberam somente óleo de peixe tiveram uma tendência ao aumento na concentração do MDA. Este estudo com a ração de peixes mostrou que, se tratando da dieta e não do óleo, a concentração de MDA não se elevou em decorrência do aumento do conteúdo de ácidos graxos, mas sim devido ao MeHg, já que os ratos que receberam ração com peixe não contaminado mantiveram a concentração de MDA semelhante ao controle. A atividade da enzima ALA-D não apresentou alterações em nenhum grupo que recebeu ração com peixes comparado ao grupo controle. Da mesma forma, a reativação da enzima em todos os grupos foi semelhante, já que não houve inibição, e, conseqüentemente, sua reativação. Os grupos que haviam recebido MeHg em solução, nos estudos anteriores, tinham mostrado uma inibição

na atividade da ALA-D. Isso mostra que o MeHg, na forma como ele estaria no peixe, não foi capaz de mostrar efeito oxidativo neste marcador.

Além disso, as proteínas carboniladas também não mostraram diferença de concentração comparando-se os grupos, dados que são semelhantes aos encontrados nos ratos que receberam como tratamento solução de MeHg.

Os resultados das concentrações de NO estão apresentados na Figura 20. Não houve diferença estatística entre os grupos controle e os que receberam ração com peixe contaminado ou não.

Figura 20. Concentração de NO em plasma de ratos tratados com ração habitual (controle), ração com peixe não contaminado e com peixe contaminado com MeHg, oriundo do Rio tapajós. Médias com letras iguais não diferem estatisticamente.

O resultado do dano ao DNA, representado pela porcentagem de DNA na cauda, está presente na Figura 21. Pode-se observar que não houve diferença estatística entre o grupo tratado com ração habitual e o grupo tratado com ração de peixe. Por outro lado, o grupo que recebeu dieta contendo peixe com MeHg mostrou um aumento leve, mas significativo, na migração do DNA comparado ao grupo controle ($p < 0.05$), indicando efeito genotóxico decorrente da exposição alimentar ao MeHg. Além disso, comparando os Estudos I, II e III, pôde-se observar que a

porcentagem de dano no DNA encontrada em ratos tratados com a ração contendo MeHg foi menor que a porcentagem encontrada nos ratos tratados com a solução de MeHg, assemelhando-se aos resultados encontrados nos ratos que receberam a associação MeHg+Óleo de peixe+Se. Isso mostra que, apesar do MeHg, os nutrientes do peixe foram capazes de prevenir um dano maior ao DNA.

Figura 21. Porcentagem de DNA na cauda (% DNA) no Ensaio Cometa.
^{a,b}Médias com letras iguais não diferem estatisticamente. Letras diferentes são estatisticamente diferentes dos outros grupos ($p < 0.05$).

Amorim e colaboradores mostraram uma associação entre concentrações de Hg no cabelo da população amazônica abaixo de 50 $\mu\text{g/g}$ e dano citogenético em linfócitos, tais como aumento do número de células poliplóides, trocas de cromátides irmãs e diminuição do índice mitótico nestes indivíduos (AMORIM et al., 2000). Além disso, um recente estudo, também com a população amazônica, mostrou um aumento no número de aberrações cromossômicas em linfócitos e diminuição no índice mitótico desta população quando comparada a populações não expostas ao metal (CRESPO-LÓPEZ et al., 2011).

Os resultados deste estudo III mostraram que os ratos tratados com o peixe contaminado com MeHg tiveram poucas alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, concentração de NO e dano no DNA quando comparados aos ratos tratados com solução de MeHg. Isso sugere que a forma do MeHg em solução e a

forma com que o MeHg estaria presente no peixe modificaria de alguma forma sua toxicidade, reduzindo os efeitos deletérios deste elemento na sua forma orgânica. Assim, conhecer a natureza química de um elemento tóxico é essencial para entender suas propriedades tóxicas.

Os resultados referentes às análises histopatológicas estão presentes na Tabela 8.

Tabela 8. Resultados das análises histopatológicas dos tecidos de ratos do Estudo III (n = 8). Os dados estão expressos em número de ratos que apresentaram determinado escore, e os escores foram divididos em 0 (órgão normal), +1 (infiltração leucocitária branda), +2 (infiltração leucocitária moderada) e +3 (infiltração leucocitária severa).

Grupos	Número de ratos por escore			
	0	+1	+2	+3
Controle				
Fígado	8			
Rim	8			
Coração	8			
Cérebro	8			
Peixe normal				
Fígado	8			
Rim	7	1		
Coração	8			
Cérebro	8			
Peixe contaminado				
Fígado	8			
Rim	7	1		
Coração*	5	3		
Cérebro*	5	3		

*Estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0.05$).

Tecidos de ratos tratados com peixe não contaminado com MeHg não apresentaram infiltração leucocitária significativa quando comparados ao controle. Por outro lado, cérebro e coração de ratos tratados com peixes contaminados com MeHg apresentaram branda infiltração leucocitária, estatisticamente diferente dos grupos controle e peixe normal. Comparando os três estudos deste trabalho, observa-se que a infiltração encontrada no coração e no cérebro induzida pelo

MeHg presente no peixe é muito menor do que o processo inflamatório induzido pela solução aquosa de MeHg. Porém, vale ressaltar que esse processo inflamatório brando poderia estar relacionado com o leve aumento da pressão sistólica ao final do experimento. Além disso, os efeitos do MeHg sobre o sistema nervoso central são muito bem estabelecidos (ETO, 2000) e apesar de não haver casos de Doença de Minamata na região amazônica, alguns sintomas como diminuição do contraste visual, diminuição na destreza manual e distúrbios no desenvolvimento neurológico em crianças foram relatos (LEBEL, et al., 1998; CORDIER et al., 2002). Assim, pode-se sugerir que a forma na qual o MeHg está ligado ao peixe, bem como a presença dos nutrientes do peixe, estariam contribuindo para a modulação dos efeitos tóxicos do MeHg e mais ainda, que a presença de processo inflamatório em cérebro e coração poderia estar relacionado com o aumento de pressão sistólica e com alguns sintomas brandos encontrados na população ribeirinha.

Harris e colaboradores, com o auxílio da espectroscopia de absorção por raio-X, analisaram amostras de peixes com alta concentração de MeHg para identificar a forma química com que o Hg se apresentava no peixe (HARRIS; PICKERING; GEORGE, 2003; GEORGE et al., 2008). O espectro de absorção do peixe foi comparado com outros espectros padrões, mostrando-se semelhante ao padrão MeHg-cisteína. Assim, nossos achados corroboram com os deste grupo que propôs que a forma pela qual o MeHg estaria ligada às proteínas do peixe poderia deixar o metal menos tóxico. O grupo de Harris mostrou que MeHg-cisteína é muito menos tóxico que o CH_3HgCl , composto utilizado nos Estudos I e II para a confecção da solução de MeHg.

Isto estaria relacionado com os efeitos tóxicos mais brandos encontrados nos estudos epidemiológicos da população ribeirinha amazônica, bem como de outras populações que estão expostas ao MeHg pela ingestão de peixe contaminado. O MeHg estaria em uma forma menos tóxica, além de outros nutrientes do peixe atuarem como protetores antioxidante ou antiinflamatório.

As concentrações de Hg no sangue, plasma, fígado, rim, coração e cérebro estão presentes na Tabela 10. Observa-se que os ratos que receberam ração contendo peixe contaminado com MeHg apresentaram concentração de Hg total significativamente mais elevadas que os ratos controle. Também se pôde ver que os ratos que receberam a ração com o peixe não contaminado apresentaram leve

aumento na concentração de Hg no fígado, rim e no sangue, devido à concentração de MeHg no peixe oriundo da região sul ser bem menor.

Além disso, quando comparados ratos que receberam solução de MeHg e ratos que receberam ração de peixe contendo MeHg, constatou-se que a concentração de Hg total em tecidos e fluidos foi menor neste último grupo, apesar das doses administradas serem as mesmas. Este fato também poderia estar relacionado com a forma química com que o MeHg está ligado ao peixe. É possível que o complexo MeHg-cisteína seja menos absorvido, ou ainda que esteja menos biodisponível nos tecidos, sangue e plasma, reduzindo assim seus efeitos tóxicos.

Tabela 9. Resultados da quantificação de Hg total do Estudo III em diferentes órgãos, sangue e plasma. Os dados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Grupos	Fígado (ng/g)	Rim (ng/g)	Coração (ng/g)	Cérebro (ng/g)	Sangue (μ g/L)	Plasma (μ g/L)
Controle	15 $\pm$ 5	10 $\pm$ 5	6 $\pm$ 4	4 $\pm$ 1	4 $\pm$ 3	4 $\pm$ 2
Peixe não contaminado	28 $\pm$ 5*	173 $\pm$ 43*	13 $\pm$ 5	5 $\pm$ 2	43 $\pm$ 10*	10 $\pm$ 7
Peixe contaminado	3712 $\pm$ 813*	2099 $\pm$ 547*	190 $\pm$ 33*	100 $\pm$ 20*	13254 $\pm$ 2041*	108 $\pm$ 42*

* Estatisticamente diferente do grupo controle.

Na literatura, há apenas dois trabalhos que empregaram a exposição de camundongos ao MeHg através de uma dieta contendo o próprio peixe contaminado, sendo eles trabalhos muito recentes (BOURDINEAUD et al., 2008; BOURDINEAUD et al., 2010). Os biomarcadores avaliados e as concentrações de MeHg nas dietas foram diferentes daqueles analisados neste estudo, e mostraram implicações associadas à exposição ao MeHg em concentrações mais baixas do que a concentração empregada aqui. No primeiro estudo, Bourdineaud e colegas basearam-se em uma população de índios da Guiana Francesa expostos a peixes contaminados com MeHg e a partir disso examinaram dietas contendo várias concentrações de MeHg no peixe. Os resultados encontrados pelo grupo mostraram

efeitos maléficos para todos os marcadores analisados, porém quando se analisa somente a menor dose do estudo, que realmente reflete a exposição daquela população de índios, os resultados foram mais brandos. A expressão de alguns genes relacionados com estresse oxidativo, respiração mitocondrial, intoxicação por metal divalente, mostraram, porém, diferenças significativas em praticamente todas as concentrações de MeHg empregadas nas dietas quando comparadas ao grupo controle (BOURDINEAUD et al., 2008).

Já no segundo estudo, Bourdineaud e colaboradores basearam-se no consumo de peixe na Europa e mostraram resultados significativos nos marcadores analisados em camundongos alimentados com peixes contaminados com MeHg. Estes dados chamam a atenção pelo fato de que a concentração de MeHg no peixe a qual os camundongos foram expostos foi menor que a concentração usada neste estudo e mesmo assim efeitos deletérios do MeHg foram observados. O grupo de Bourdineaud sugeriu uma influência positiva dos nutrientes do peixe no metabolismo dos camundongos, porém esse efeito poderia não ter sido suficiente para conter todos os efeitos tóxicos do MeHg (BOURDINEAUD et al., 2010). Apesar da semelhança quanto a via de exposição do MeHg dos estudos acima com este trabalho, é importante lembrar que os estudos do grupo de Bourdineaud diferiam quanto aos animais utilizados e ainda quanto a forma de avaliação dos biomarcadores, uma vez que eles empregaram a expressão de genes antioxidantes, e neste estudo avaliou-se a atividade das enzimas antioxidantes.

Nesse sentido, vale ressaltar que os resultados divulgados aqui aludem à exposição da população ribeirinha amazônica ao MeHg e mostram que, para os biomarcadores analisados, o sal de MeHg apresenta efeitos deletérios, e que a forma com que se encontra no peixe reduz esses efeitos.

5. Conclusões

5.1 Estudo I

A administração da solução de CH_3HgCl foi capaz de produzir efeitos deletérios oxidativos no sistema biológico, alterando enzimas antioxidantes, induzindo peroxidação lipídica, causando dano ao DNA, aumento da pressão sanguínea sistólica e inflamação. O Se, por outro lado, mostrou capacidade antioxidante, inibindo a peroxidação lipídica e protegendo algumas enzimas dos efeitos oxidantes do MeHg. Além disso, o Se mostrou ser antígeno-tóxico, reduzindo o dano no DNA e não alterou as concentrações de NO nem a distribuição de Hg total nos tecidos analisados. Estes efeitos do Se não mostraram ser dose-dependente, ou seja, concentrações maiores de Se não foram capazes de aumentar a proteção frente ao dano oxidativo.

Surpreendentemente, apesar destes efeitos benéficos do Se, encontrou-se um aumento na pressão sistólica e ainda presença de infiltração leucocitária em coração de ratos tratados com selenato de sódio. Assim, nesta forma química e por um tempo mais longo de exposição (o aumento da pressão foi significativo a partir da 6ª semana), sugere-se cuidado com a suplementação de Se, uma vez que a dieta muitas vezes já completa as necessidades diárias recomendadas para Se.

5.2 Estudo II

Assim como no Estudo I, observou-se significativo efeito oxidante da solução contendo CH_3HgCl . Outro composto importante da dieta foi adicionado neste estudo, o óleo de peixe, e este mostrou ser antígeno-tóxico, protegendo o DNA do dano causado pelo MeHg, além de ter efeitos anti-inflamatório e anti-hipertensivo significativos.

O óleo de peixe não mostrou capacidade antioxidante, ou seja, não foi capaz de reverter os efeitos deletérios oxidativos causados pela solução contendo MeHg. Além disso, não alterou as concentrações de NO e também não foi capaz de modificar a distribuição de Hg total nos tecidos, sangue e plasma.

Mais ainda, a administração conjunta de Se e óleo de peixe não foi capaz de modificar a distribuição e acúmulo do Hg em tecidos de ratos e também não mostrou efeito cumulativo protetor sobre o dano ao DNA.

Apesar deste efeito não cumulativo da administração conjunta destes dois nutrientes, observou-se que suas vias de proteção são diferentes: Se como antioxidante e óleo de peixe como antiinflamatório e anti-hipertensivo.

5.3 Estudo III

Neste estudo, onde se administrou aos ratos uma ração com peixe contaminado com MeHg, observou-se um aumento da pressão sistólica no final do experimento – 11^a semana – sugerindo que a exposição em longo prazo, como é o caso da população amazônica, poderia desencadear hipertensão.

Além disso, houve indução da peroxidação lipídica em ratos tratados com a ração de peixe contaminados com MeHg. Os demais biomarcadores de estresse oxidativo, por outro lado, não se alteraram, bem como a concentração de NO. Também houve indução de dano ao DNA, apesar deste dano ser menor do que o dano induzido pela mesma concentração de MeHg em solução. E ocorreu ainda presença de infiltração leucocitária branda em coração e cérebro, que poderia estar relacionada com o aumento da pressão.

Assim, o MeHg presente no peixe mostrou alguns efeitos deletérios nos ratos, sendo porém esses efeitos menos tóxicos do que o MeHg em solução, lançando algumas hipóteses e sugestões: a forma química do MeHg no peixe, ligado à cisteína, seria menos tóxica; os nutrientes do peixe, como por exemplo os ácidos graxos poliinsaturados e o Se, estariam contribuindo para a diminuição da toxicidade do MeHg, por isso a população ribeirinha amazônica não estaria apresentando casos de Doença de Minamata, mas apenas efeitos menores, mesmo com altas concentrações deste metal.

6. Referências Bibliográficas

ABDEL-HAMID, H.A.; FAHMY, F.C.; SHARAF, I.A. Influence of free radicals on cardiovascular risk due to occupational exposure to mercury. **The Journal of the Egyptian Public Health Association**, Cairo, v. 76, p. 53-69, 2001.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, New York, v. 105, p. 121-126, 1984.

ALI, S.F.; LEBEL, C.P.; BONDY, S.C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**, Amsterdam, v. 13, p. 637-648, 1992.

AMORIM, M.I.M. et al. Cytogenetic damage related to low levels of methylmercury contamination in the Brazilian Amazon. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 72, p. 497-507, 2000.

ARIZA, M.E.; BIJUR, G.N.; WILLIAMS, M.V. Lead and mercury mutagenesis: role of H₂O₂, superoxide dismutase, and xanthine oxidase. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 31, p. 352-361, 1998.

ARMIN-ZAKI, L. et al. Intra-uterine methylmercury poisoning in Iraq. **Pediatrics**, Springfield, v. 54, p. 587-595, 1974.

ARTHUR, J.R.; MCKENZIE, R.C.; BECKETT, G.J. Selenium in the immune system. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 133, p. 1457-1459, 2003.

AU, W.W.; SALAMA, S.A.; SIERRA-TORRES, C.H. Funcional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays, **Environmental Health Perspectives**, North Carolina, v. 111, p. 1843-1850, 2003.

AUGUSTI, P.R. et al. Effect of astaxanthin on kidney function impairment and oxidative stress induced by mercuric chloride in rats **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 212-219, 2008.

AZEVEDO, F.A. de. **Toxicologia do mercúrio**. São Carlos, RiMa; São Paulo, InterTox, 2003.

BAHIA, M.O. et al. Environmental biomonitoring using cytogenetic endpoints in a population exposed to mercury in the Brazilian Amazon. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 44, p. 346-349, 2004.

BARBOSA, F.Jr. et al. eNOS genotype-dependent correlation between whole blood lead and plasma nitric oxide products concentrations. **Nitric Oxide**, Florida, v. 14, p. 58-64, 2006.

BATISTA, B.L. et al. Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 64, p. 23-29, 2009.

BEYROUTY, P.; CHAN, H.M. Co-consumption of selenium and vitamin E altered the reproductive and developmental toxicity of methylmercury in rats **Neurotoxicology and Teratology**, Elmsford, v. 28, p. 49- 58, 2006.

BLEYS, J. et al. Serum selenium and serum lipids in US adults. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 88, p. 416-423, 2008.

BOSCÁ, L. et al. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. **Toxicology**, Amsterdam, v. 15, p. 249-258, 2005.

BOURDINEAUD, J.P. et al. Feeding mice with diets containing mercury-contaminated fish flesh from French Guiana: a model for the mercurial intoxication of the Wayana Amerindians. **Environmental Health: a global access science source**, London, v. 7, p. 53-65, 2008.

BOURDINEAUD, J.P. et al. Deleterious effects in mice of fish-associated methylmercury contained in a diet mimicking the Western populations' average fish consumption. **Environment International**, Amsterdam, *In press*, 2010.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BULAT, P. et al. Activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in workers occupationally exposed to mercury. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, Berlin, v. 71, p. 37-39, 1998.

CALDER, P.C.; YAGOOB, P. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and human health outcomes. **Biofactors**, Amstredam, v. 35, n. 3, p. 266-272, 2009.

CARROL, D.N.; ROTH, M.T. An evidence for the cardioprotecti effects of omega-3 fatty acids. **Pharmacology**, Basel, v. 36, p. 1950-1956, 2002.

CASARETT & DOULL'S. **Toxicology: the basic science of poisons**. 7th Ed. Curtis D. Klaassen, Editor. New York, McGraw-Hill Companies, 2008.

CASTOLDI, A.F. et al. Early acute necrosys, delayed apoptosis and cytoskeletal breakdown in cultured cerebellar granule neurons exposed to methylmercury. **Journal of Neuroscine Research**, New York, v. 60, p. 775-787, 2000.

CEBULSKA-WASILEWSKA, A. et al. Occupational exposure to mercury vapour on genotoxicity and DNA repair. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 586, p. 102-114, 2005.

CENGEL, A.; SAHINARSLAN, A. Nitric oxide and cardiovascular system. **Anadolu Kardioloji Dergisi**, Istanbul, v. 6, p. 364-368, 2006.

CHANG, J.C. et al. Selenium content of Brazil nuts from two geographic locations in Brazil. **Chemosphere**, New York, v. 30, n. 4, p. 801-802, 1995.

CHAPMAN, L.; CHAN, H.M. The influence of nutrition on methylmercury intoxication. **Environmental Health Perspectives**, North Carolina, v. 108, p. 29-56, 2000.

CHEN, C. et al. Increased oxidative DNA damage, as assessed by urinary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine concentrations and serum redox status in persons exposed to mercury. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 51, p. 759-767, 2005.

CLARKSON, T.W. The toxicology of mercury. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Science**, Cleveland, v. 34, p. 369-403, 1997.

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

COHEN, G.P. Glutathione Peroxidase: The primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. **Biochemistry**, Washington, v. 2, p. 1420-1428, 1963.

COMBS, G.F.Jr. Selenium in global food systems. **The British Journal of Nutrition**, New York, v. 85, p. 517-547, 2001.

CORDIER, S. et al. Neurodevelopmental Investigations among Methylmercury-exposed Children in French Guiana. **Environmental Research, Section A**, New York, v. 89, p. 1-11, 2002.

CRESPO-LÓPEZ, M.E. et al. Methylmercury genotoxicity: a novel effect in human cells lines of the central nervous systems. **Environment International**, Amsterdam, v. 33, p. 141-146, 2007.

CRESPO-LÓPEZ, M.E. et al. Mercury and human genotoxicity: Critical considerations and possible molecular mechanisms. **Pharmacological Research**, London, v. 60, p. 212-220, 2009.

CRESPO-LÓPEZ, M.E. et al. Genotoxicity of mercury: Contributing for the analysis of Amazonian populations. **Environmental International**, Amsterdam, v. 37, n. 1, p. 136-141, 2011.

DA SILVA, J. et al. An alkali single-cell gel eletroforesis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, p. 241-245, 2000.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Bucharest, v. 10, n. 2, p. 389-406, 2006.

DAS, U.N. Essential fatty acids and their metabolites could function as endogenous HMG-CoA reductase and ACE enzyme inhibitors, anti-arrhythmic, anti-hypertensive, anti-atherosclerotic, anti-inflammatory, cytoprotective, and cardioprotective molecules. **Lipids in Health and Disease**, London, v. 15, p. 7-37, 2008.

DATTILO, J.B., MAKHOUL, R.G. The role of nitric oxide in vascular biology and pathobiology. **Annals of Vascular Surgery**, Detroit, v. 11, p. 307-314, 1997.

DÓREA, J. et al. Mercury in hair and in fish consumed by Riparian women of the Rio Negro, Amazon, Brazil. **International Journal of Environmental Health Research**, London, v. 13, p. 239-248, 2003.

DÓREA, J.G. et al. Hair mercury (signature of fish consumption) and cardiovascular risk in Mundurucu and Kayabi Indians of Amazonia. **Environmental Research**, New York, v. 97, p. 209-219, 2005.

DRAKE, E.N. Cancer chemoprevention: selenium as a prooxidant, not an antioxidant. **Medical Hypotheses**, New York, v. 67, p. 318-322, 2006.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress in Neurobiology**, New York, v. 62, p. 649-671, 2000.

DUTCZAK, W.J.; BALLATORI, N. Transport of the glutathione–methylmercury complex across liver canalicular membranes on reduced glutathione carriers. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, p. 9746-9751, 1994.

EL-BAYOUMY, K. The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 475, p. 123-139, 2001.

ELLIS, G. et al. Nitrite and nitrate analyses: a clinical biochemistry perspective. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 31, p. 195-220, 1998.

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 82, p. 70-77, 1959.

ERCAL, N.; GURER-ORHAN, H.; AYKIN-BURNS, N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal induced oxidative damage. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 1, p. 529-539, 2001.

ERDOGAN, H. et al. Is the Negro River Basin (Amazon) impacted by naturally occurring mercury? **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 275, p. 71-82, 2001.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186, p. 407-421, 1990.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R.J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal malondialdehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 11, p. 81-128, 1991.

ETO, K. Minamata disease. **Neuropathology**, Sendai, v. 20, p. 14-19, 2000.

FALNOGA, I.; TUSEK-ZNIDARIC, M. Selenium-mercury interactions in man and animals. **Biological Trace Element Research**, London, v. 119, p. 212-220, 2007.

FARBAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. The Comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 339, p. 37-59, 1995.

FARINA, M. et al. In vitro effects of selenite and mercuric chloride on liver thiobarbituric acid-reactive substances and non-protein thiols from rats: influences of dietary cholesterol and polyunsaturated and saturated fatty acids. **Nutrition**, Califórnia, v. 19, p. 531-535, 2003.

FILLION, M. et al. A preliminary study of mercury exposure and blood pressure in the Brazilian Amazon. **Environmental Health: a global access science source**, London, v. 10, p. 5-29, 2006.

FISHBEIN, L. Chromatographic and biological aspects of organic mercury. **Chromatographic Reviews**, Amsterdam, v. 15, p. 195-238, 1971.

FITZGERALD, W. Is mercury increasing in the atmosphere? The need for an atmospheric mercury network (AMNET). **Water, Air, and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 80, p. 245-254, 1995.

FLOHE, L. Glutathione peroxidase: fact and fiction. **Ciba Foundation Symposium**, Amsterdam, v. 65, p. 95-122, 1979.

GANTHER, H.E. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. **Carcinogenesis**, New York, v. 20, p. 1657-1666, 1999.

GEORGE, G.N. et al. Chemical forms of mercury and selenium in fish following digestion with simulated gastric fluid. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, DC, v. 21, p. 2106-2110, 2008.

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

GRANDJEAN, P. et al. Impact of maternal seafood diet on fetal exposure to mercury, selenium, and lead. **Archives of Environmental Health**, Chicago, v. 47, p. 185-195, 1992.

GRANDJEAN, P.; WEIHE, P. Neurobehavioral effects of intrauterine mercury exposure: potential sources of bias. **Environmental Research**, New York, v. 61, p. 176-183, 1993.

GRANDJEAN, P.; WEIHE, P.; WHITE, R.F. Milestone development in infants exposed to methylmercury from human milk. **Neurotoxicology**, Amsterdam, v. 16, p. 27-33, 1995.

GRANDJEAN, P. et al. Methyl mercury neurotoxicity in Amazon children downstream from gold mining. **Environmental Health Perspectives**, North Carolina, v. 107, p. 587-591, 1999.

GROTTO, D. et al. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography – visible detection. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**, London, v. 43, p. 619-624, 2007.

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

GUALLAR, E. et al. Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 347, p. 1747-1754, 2002.

GUIMARÃES, J.R.D.; FORTI, M.C. Mercury in human and environmental samples from two lakes in Amapá, Brazilian Amazon. **Ambio**, Oslo, v. 28, p. 296-301, 1999.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry**, London, v. 97, p. 1634-1658, 2006.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 57, p. 715-725, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals Biology and Medicine**. Oxford: Science Publications; 1999.

HAMILTON, S.J. Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 326, p. 1-31, 2004.

HARRIS, H.H.; PICKERING, I.J.; GEORGE, G.N. The chemical form of mercury in fish. **Science**, Washington, v.301, p. 29, 2003.

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, Swansea, v. 18, p. 45-51, 2003.

HARTWIG, A. Current aspects in metal genotoxicity. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 8, p. 1-3, 1995.

HOWE, P.R. Can we recommend fish oil for hypertension? **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, Oxford, v. 22, n. 3, p. 199-203, 1995.

HUANG, Y.L.; CHENG, S.L.; LIN, T.H. Lipid peroxidation in rats administrated with mercury chloride. **Biological Trace Element Research**, London, v. 52, p. 193-206, 1996.

HUSSAIN, S. et al. Accumulation of mercury and its effect on antioxidant enzymes in brain, liver, and kidneys of mice. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, London, v. 34, p. 645-660, 1999.

IOM - **Institute of Medicine** – United States. Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. Washington DC: National Academy Press; 2000: 384–324.

IP, C.; LISK, D.J. Bioactivity of selenium from Brazil nut for cancer prevention and selenoenzyme maintenance. **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, v. 21, n. 3, p. 203-212, 1994.

IRAZ, M. et al. Omega-3 essential fatty acid supplementation and erythrocyte oxidant/antioxidant status in rats. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, Philadelphia, v. 35, p. 169-173, 2005.

JIN, X. et al. Dietary fats modulate methylmercury-mediated systemic oxidative stress and oxidative DNA damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v. 46, p. 1706-1720, 2008.

KELM, M. et al. Serum nitrite sensitively reflects endothelial NO formation in human forearm vasculature: evidence for biochemical assessment of the endothelial L-arginine–NO pathway. **Cardiovascular Research**, London, v. 41, p. 765-772, 1999.

KIKUGAWA, K. et al. Protective effect of supplementation of fish oil with high n-3 polyunsaturated fatty acids against oxidative stress-induced DNA damage of rat liver in vivo. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, p. 6073-6079, 2003.

KISHIMOTO, T.; OGURI, T.; TADA, M. Effect of methylmercury (CH₃HgCl) injury on nitric oxide synthase (NOS) activity in cultured human umbilical vascular endothelial cells. **Toxicology**, Amsterdam, v. 103, p. 1-7, 1995.

KLEINBONGARD, P. et al. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 35, p. 790-796, 2003.

KOBAL, A.B. et al. Glutathione levels after long-term occupational elemental mercury exposure. **Environmental Research**, New York, v. 107, p. 115-123, 2008.

KONDO, K.J. Congenital Minamata disease: warnings from Japan's experience. **Journal of Child Neurology**, Littleton, v. 15, p. 458-464, 2000.

KOMO, Y.; FRIDOVICH, I. Superoxide radical inhibits catalase. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 257, p. 5751-5754, 1982.

KOZMA, L. et al. Induction of renin release from isolated glomeruli by inorganic mercury(II). **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 85, p. 49-54, 1996.

KUNIMOTO, M. Methylmercury induces apoptosis of rat cerebellar neurons in primary culture. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 204, p. 310-317, 1994.

KUO, T.C.; HUANG, C.L.; LIN-SHIAU, S.Y. Methylmercury inhibits nitric oxide production mediated by Ca(2+) overload and protein kinase A activation. **Toxicology**, Amsterdam, v. 176, p. 113-122, 2002.

KURLAND, L.T.; FARO, S.N.; SIEDLER, H. Minamata disease. **World Neurology**, Minneapolis, v. 1, p. 370-395, 1960.

LACLAUSTRA, M. et al. Serum selenium concentrations and hypertension in the US Population. **Circulation. Cardiovascular Quality and Outcomes**, Hagerstown, v. 2, p. 369-376, 2009.

LAUER, T.; KLEINBONGARD, P.; KELM, M. Indexes of NO bioavailability in human blood. **News in Physiological Sciences**, Bethesda, v. 17, p. 251-255, 2002.

LEAF, A. Cardiovascular effects of fish oils. Beyond the platelet. **Circulation**, Dallas, v. 82, p. 624-628, 1990.

LEBEL, J. et al. Evidence of early nervous system dysfunction in Amazonian populations exposed to low-levels of methylmercury. **Neurotoxicology**, Amsterdam, v. 7, p. 157-167, 1996.

LEBEL, J. et al. Fish diet and mercury exposure in a riparian Amazonian population. **Water, Air, and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 97, p. 31-44, 1997.

LEBEL, J. Et al. Neurotoxic effects of low-level methylmercury contamination in the Amazonian Basin. **Environmental Research. Section A**, New York, v. 79, p. 20-32, 1998.

LEVINE, R.L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified protein. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186, p. 464-478, 1990.

LI, Y. et al. Human serum albumin–mercurial species interactions. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 6, p. 2277-2286, 2007.

LIMA, A.P.S. et al. Mercury and selenium concentrations in fish samples from Cachoeira do Piriá Municipality, Para State, Brazil. **Environmental Research**, New York, v. 97, p. 236-244, 2005.

LUCCHI, L. et al. Erythrocyte susceptibility to oxidative stress in chronic renal failure patients under different substitutive treatments. **Artificial Organs**, Cleveland, v. 29, p. 67-72, 2005.

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

MALM, O. Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon. **Environmental Research**, New York, v. 77, p. 73-78, 1998.

MANOHARAN, K.; BANERJEE, M.R. b-Carotene reduces sister chromatid exchange induce chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. **Cell Biology International Report**, London, v. 9, p. 783-789, 1985.

MARNETT, L.J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 424, p. 83-95, 1999.

MARSZALEK, J.R.; LODISH, H.F. Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are food for you. **Annual review of cell and developmental biology**, California, v. 21, p. 633-657, 2005.

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MCKEOWN-EYSEN, G.E.; RUEDY, J.; NEIMS, A. Methyl mercury exposure in northern Quebec: II. Neurologic findings in children. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 118, p. 470-479, 1983.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 52, p. 711-760, 1983.

NOGUEIRA, C.W. et al. 2, 3- Dimercaptopropane -1- sulfonic acid and meso -2, 3- dimercaptosuccinic acid increase mercury- and cadmium-induced inhibition of α -aminolevulinic acid dehydratase. **Toxicology**, Amsterdam, v. 184, p. 85-95, 2003.

NRIAGU, J.O. et al. Mercury pollution in Brazil. **Nature**, London, v. 356, p. 389, 1992.

NYSTRÖM, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 24, p. 1311-1317, 2005.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo, Atheneu, 2008.

ORCT, T. et al. Influence of selenium dose on mercury distribution and retention in suckling rats. **Journal of Applied Toxicology**, Philadelphia, v. 29, n. 7, p. 585-589, 2009.

OU, Y.C. et al. The role of intracellular glutathione in methylmercury-induced toxicity in embryonic neuronal cells. **Neurotoxicology**, Amsterdam, v. 20, p. 793-804, 1999.

PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N. Study on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxide. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, St. Louis, v. 70, p. 158-169, 1967.

PALMER, C.D. et al. Determination of lead, cadmium and mercury in blood for assessing environmental and occupational exposures: a comparison between inductively coupled plasma-mass spectrometry and atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta. Part B**, London, v. 61, p. 980-990, 2006.

PASSOS, C.J.S. et al. Eating tropical fruit reduces mercury exposure from fish consumption in the Brazilian Amazon. **Environmental Research**, New Your, v. 93, p. 123-130, 2003.

PASSOS, C.J.S.; MERGLER, D. Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, p. 503-520, 2008.

PASSOS, C.J. et al. Daily mercury intake in fish-eating populations in the Brazilian Amazon. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, New York, v. 18, p. 76-87, 2008.

PATHAK, S.K.; BHOWMIK, M.K. The chronic toxicity of inorganic mercury in goats: clinical signs, toxicopathological changes and residual concentrations. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 22, p. 131-138, 1998.

PEROTTONI, J. et al. Effects of mercury and selenite on delta-aminolevulinate dehydratase activity and on selected oxidative stress parameters in rats. **Environmental Research**, New York, v. 95, p. 166-173, 2004.

PINHEIRO, M.C.N. et al. Mercury exposure and antioxidant defenses in women: A comparative study in the Amazon. **Environmental Research**, New York, v. 107, p. 53-59, 2008.

RABENSTEIN, D.L.; FAIRHURST, M.T. Nuclear magnetic resonance studies of the solution chemistry of metal complexes XI. Binding of methylmercury by sulfhydryl-containing amino acids and by glutathione. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 97, p. 2086-2092, 1975.

RAYMAN, M.P.; INFANTE, H.G.; SARGENT, M. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. **British Journal of Nutrition**, New York, v. 100, p. 238-253, 2008.

READ, R. et al. Selenium and amino acid composition of selenoprotein P, the major selenoprotein in rat serum. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 265, p. 17899-17905, 1990.

REFSVIK, T. Excretion of methyl mercury in rat bile: the effect of diethylmaleate, cyclohexene oxide and acrylamide. **Acta Pharmacologica et Toxicologica**, København, v. 42, p. 135-141, 1978.

RODRIGUES, J.L. et al. Methylmercury and inorganic mercury determination in blood by using liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry and a fast sample preparation procedure. **Talanta**, London, v. 80, n. 3, p. 1158-1163, 2010.

ROTRUCK, J.T. Selenium: biochemical role as a component of Glutathione Peroxidase. **Science**, Washington, v. 179, p. 588-590, 1973.

ROULET, M.; LUCOTTE, M. Geochemistry of mercury in pristine and flooded ferrallitic soils of a tropical rain forest in French Guiana, South America. **Water, Air, and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 80, p. 1079-1088, 1995.

RUMBEHIA, W.K. et al. Augmentation of mercury-induced nephrotoxicity by endotoxin in the mouse. **Toxicology**, Amsterdam, v. 151, p. 103-116.

SALONEN, J.t. et al. Intake of mercury from fish, lipid peroxidation and the risk of myocardial infarction and coronary, cardiovascular and any death in eastern Finnish men. **Circulation**, Dallas, v. 91, p. 645-655, 1995.

SALONEN, J.T. et al. Mercury accumulation and accelerated progression of carotid atherosclerosis: a population-based prospective 4-year follow-up study in men in astern Finland. **Atherosclerosis** Amsterdam, v. 148, p. 265-273, 2000.

SANTOS, A.P.M. et al. Biomarkers of exposure and effect as indicators of the interferente of selenomethionine on methylmercury toxicity. **Toxicology Letters**, Ámsterdam, v. 169, p. 121-128, 2007.

SARAFIAN, T.A. Methylmercuty-induced generation of free radical: biological implications. **Metal Ions in Biological Systems**, New York, p. 36, p. 415-444, 1999.

SASSA, S. Delta- aminolevulínico acid dehydratase assay. **Enzyme**, New York, v. 28, p. 133-145, 1982.

SASSA, S. ALA-D Porphyria. **Seminars in Liver Disease**, New York, v. 18, p. 95-101, 1998.

SCHURZ, F.; SABATER-VILAR, M.; FINK-GREMMELS, J. Mutagenicity of mercury chloride and mechanisms of cellular defense: the role of metal-binding proteins. **Mutagenesis**, Amsterdam, v. 15, p. 525-530, 2000.

SCHWARTZ, L.M., et al. Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, p. 980-984, 1993..

SHAN, H.M.; EGELAND, G.M. Fish consumption, mercury exposure and heart diseases. **Nutrition Reviews**, Baltimore, v. 62, p. 68-72, 2004.

SHANKER, G. et al. Modulatory effect of glutathione status and antioxidants on methylmercuryinduced free radical formation in primary cultures of cerebral astrocytes. **Molecular Brain Research**, Amsterdam, v. 137, p. 11-22, 2005.

SHAW, C.A. et al. Nitric oxide and the resolution of inflammation: implications for atherosclerosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, p. 67-71, 2005.

SHIMIZU, N.; KOBAYASHI, K.; HAYASHI, K. The reaction of superoxide radical with catalase. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.259, p. 4414- 4418, 1984.

SILVA, A.C. et al. Oxidative stress and d-ALA-D activity in chronic renal failure patients. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, New York, v. 61, p. 180–185, 2007.

SIMOPOULOS, A.P.; KIFER, R.R.; MARTIN, R.E. **Health Effects of Polyunsaturated Fatty Acids in Seafood**. Orlando, Academic Press, 1986.

SIMOPOULOS, A.P. Omega-3 fatty acids in inflammation autoimmune diseases. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v. 21, n. 6, p. 495-505, 2002.

SINGH, N.P. et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 5, p. 184-191, 1988.

STACEY, N.H.; KAPPAS, H. Cellular toxicity and lipid peroxidation in response to mercury. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 63, p. 29-35, 1982.

STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino Acids**, Wien, v. 25, p. 207-218, 2003.

STEUERWALD, U. et al. Maternal seafood diet, methylmercury exposure and neonatal neurologic function. **The Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 136, p. 599-605, 2000.

SVENSSON, B.G. et al. Fish as a source of exposure to mercury and selenium. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 126, p. 61-74, 1992.

TEMPLETON, D.M. et al. Guidelines for terms related to chemical speciations and fractionation of elements: definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000), **Pure Applied Chemistry**, London, v. 72, p. 1453-1470, 2000.

TRAN, D. et al. Protective effects of selenium on mercury-induced DNA damage in mussel haemocytes. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 84, p. 11-18, 2007.

UCHINO, M. et al. Neurological features of chronic Minamata disease (organic mercury poisoning) and incidence of complications with aging. **Journal of Environmental Science and Health. Part B**, New York, v. 30, p. 699-715, 1995.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Toxicity profiles** by Dennis M. Opresko, Ph.D, Chemical Hazard Evaluation Group, Oak Ridge, Tennessee, 1993.

VALENTINI, J. et al. Human erythrocyte σ -aminolevulinate dehydratase activity and oxidative stress in haemodialysis patients. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v.40, p. 591-594, 2007.

VALENTINI, J. et al. The influence of the hemodialysis time treatment under oxidative stress biomarkers in chronic renal failure patients. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, New York, v. 62, p. 378-382, 2008.

VERLECAR, X.N.; JENA, K.B.; CHAINY, G.B. Modulation of antioxidant defences in digestive gland of *Perna viridis* (L.), on mercury exposures. **Chemosphere**, Oxford, v. 71, n.10, p. 1977-1985.

VOSSEN, R.C. et al. Differential effects of endothelial cell fatty acid modification on the sensitivity of their membrane phospholipids to peroxidation. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, Edinburgh, v. 52, n. 5, p. 341-347, 1995.

YETIK-ANACAK, G.; CATRAVAS, J.D. Nitric oxide and the endothelium: History and impact on cardiovascular disease. **Vascular Pharmacology**, New York, v. 45, p. 268-276, 2006.

YONEDA, S.; SUZUKI, K.T. Equimolar Hg-Se complex binds to selenoprotein P. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 231, p. 7-11, 1997a.

YONEDA, S.; SUZUKI, K.T. Detoxification of Mercury by Selenium by Binding of Equimolar Hg-Se Complex to a Specific Plasma Protein. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 143, p. 274-280, 1997b.

YOSHIZAWA, K. et al. Mercury and the risk of coronary heart disease in men. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 347, p. 1755-1760, 2002.

7. Anexos

Aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais

Protocolo número 07.1.1185.53.3

Artigos publicados

Grotto D, Barcelos GR, Valentini J, Antunes LM, Angeli JP, Garcia SC, Barbosa F Jr. Low levels of methylmercury induce DNA damage in rats: protective effects of selenium. Arch Toxicol. 83(3):249-54, 2009.

Grotto D, de Castro MM, Barcelos GR, Garcia SC, Barbosa F Jr. Low level and sub-chronic exposure to methylmercury induces hypertension in rats: nitric oxide depletion and oxidative damage as possible mechanisms. Arch Toxicol. 83(7):653-62, 2009.

Grotto D, Vicentini J, Friedmann Angeli JP, Francisco Latorraca E, Pontes Monteiro PA, Mazzaron Barcelos GR, Somacal S, Emanuelli T, Barbosa F Jr. Evaluation of protective effects of fish oil against oxidative damage in rats exposed to methylmercury. Ecotoxicol Environ Saf. 74(3):487-93, 2011.