



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E
BIOLOGIA CELULAR
(ÁREA DE CONCENTRAÇÃO NEUROCIÊNCIAS)

MÁRCIA CRISTINA FREITAS DA SILVA

ALTERAÇÕES HEPÁTICAS POR EXPOSIÇÃO A BAIXAS DOSES
DE METILMERCÚRIO EM MACACOS PREGO, *Cebus apella*
(Linnaeus 1758)

Belém

2011

MÁRCIA CRISTINA FREITAS DA SILVA

**Alterações Hepáticas Por Exposição a Baixas Doses de Metilmercúrio
em Macacos Prego, *Cebus apella* (Linnaeus 1758)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular (Área de Concentração Neurociências), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Silveira.

Belém

2011

SILVA, Márcia Cristina Freitas da

Alterações Hepáticas Por Exposição a Baixas Doses de Metilmercúrio em Macacos Prego, *Cebus apella* (Linnaeus 1758) / Márcia Cristina Freitas da Silva. – 2011.

74 f.: il. color.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Silveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Pará, Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular (Área de Concentração Neurociências), 2011.

1.Hepatotoxicidade. 2. Metilmercúrio. 3. Fígado. 4. Macaco prego. 5. *Cebus*. 6. Primatas neotropicais. 7. Primatas da Amazônia. I. Silveira, Luiz Calos de Lima. II. Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas. III. Título

CDD –



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular

ATA DE DEFESA DE TESE PARA O DOUTORADO



Programa: Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular

Área de concentração: NEUROCIÊNCIAS

Candidata: MÁRCIA CRISTINA FREITAS DA SILVA

Tema: "Alterações Hepáticas Devidas à Exposição ao Metilmercúrio em Macaco

Prego, *Cebus Apella* (Linnaeus, 1758)"

Data: 16 de setembro de 2011, às 9h

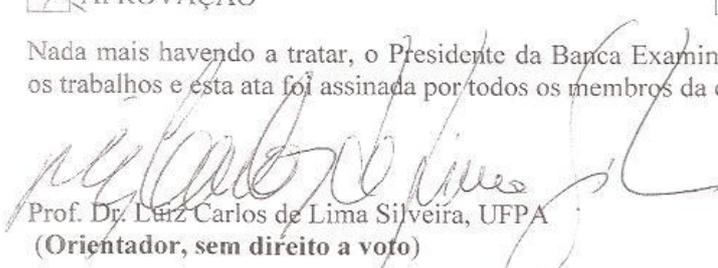
Local: Auditório Leônidas Dias/Núcleo de Medicina Tropical - UFPA

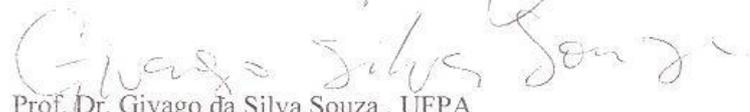
Após a candidata apresentar os resultados do seu estudo e responder às perguntas dos examinadores, a comissão examinadora reuniu-se e resolveu pela sua:

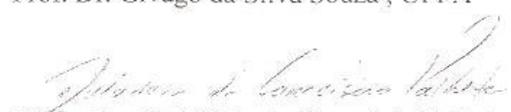
APROVAÇÃO

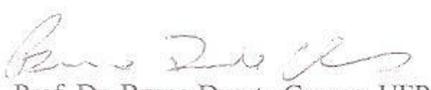
REPROVAÇÃO

Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Banca Examinadora deu por encerrado os trabalhos e esta ata foi assinada por todos os membros da comissão examinadora.


Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Silveira, UFPA
(Orientador, sem direito a voto)


Prof. Dr. Givago da Silva Souza, UFPA


Profa. Dra. Dulcideia da Conceição Palheta, UFPA


Prof. Dr. Bruno Duarte Gomes, UFPA


Profa. Dra. Maria da Conceição Nascimento Pinheiro

Dedico a minha família (Lemuel, Gabrielle e Giovanni) por acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por nos permitir começar agora e fazer um novo fim.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Silveira, meu orientador, pela transmissão de conhecimentos, pelas sugestões e críticas em todas as etapas do meu aprendizado científico.

A Professora Dra. Conceição Pinheiro, não só por sua orientação acadêmica ou pela referência pessoal e profissional que é, mas também por sua amizade e oportunidades ao longo destes anos.

Ao Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma pela amizade e ajuda.

Aos funcionários do laboratório do HUIBB pela valiosa contribuição na realização dos exames laboratoriais.

Aos funcionários do Biotério do ICB pela valiosa ajuda na manipulação dos primatas.

Aos amigos Ademir Junior e Andréia Campos pela maravilhosa amizade nesses anos para uma vida.

Aos membros do Laboratório de Toxicologia Humana e Ambiental (Claudinha, Ana Paula, Andreia e Dario) pela convivência diária, amizade, credibilidade e confiança.

Aos professores e funcionários do Núcleo de Medicina Tropical, que contribuíram de forma positiva com seus conhecimentos.

A Universidade Federal do Pará, ao biotério do Instituto de Ciências Biológicas, ao Núcleo de Medicina Tropical, ao Hospital Universitário João de Barros Barreto pela oportunidade e contribuição significativa durante a realização deste estudo.

Enfim, a todos aqueles que, de uma maneira direta ou indireta, contribuíram em minha vida científica e pessoal.

A verdadeira
felicidade está na
própria casa, entre
as alegrias da
família.
Léon Tolstoi

RESUMO

Cebus apella foram expostos a 1,5 ppm de metilmercúrio (metilHg) na dieta por 120 dias. Foi investigado a hepatotoxicidade do metilHg, as concentrações no sangue total foram monitoradas a cada 30 dias usando espectrofotômetro de absorção atômica a vapor frio Hg201, as transaminases (ALT e AST) e bilirrubina total (BT) foram dosadas no decorrer da exposição. O fígado foi fixado com formaldeído 10%, e preparado por protocolos da histopatologia. Foi observada diferença significativa entre os grupos exposto e controle, quanto aos níveis de Hgtotal, nos períodos de 60, 90 ($P < 0,05$) e 120 dias ($P < 0,01$). A histopatologia revelou esteatose moderada e degeneração hidrópica, um achado comum em exposição ao metilmercúrio em muitas outras espécies. Não foi observada diferença significativa entre os níveis de AST ($p= 0.38$), ALT ($p= 0.83$) e BT ($p= 0.07$) do grupo controle e exposto. A correlação de Pearson com Hgtotal demonstrou correlação negativa (AST $r= -0,7$; ALT $r=0,07$; BT $r= -0,3$ e $p > 0,05$), o que sugere a necessidade de novos estudos para esclarecer o nível de alerta da concentração de mercúrio e das dosagens hepáticas.

Palavras chaves: Hepatotoxicidade, Metilmercúrio, Fígado, Macaco prego, Esteatose.

ABSTRACT

Cebus apella were exposed to 1,5 ppm methylmercury (methylHg) in the diet for 120 days. Hepatotoxicity was investigated, concentrations of mercury in total blood were monitored each 30 days using atomic absorption spectrometry with cold vapor Hg201, aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT) and total bilirubin (BT) were determined. Liver was fixed by formaldehyde 10% and prepared by histopathology protocols. Significant difference was observed in groups exposed and control about total mercury (Hgtotal) in the periods of 60, 90 ($P < 0,05$) and 120 days ($P < 0,01$). The histopathology revealed moderate steatosis and hydropic degeneration, common in methylHg exposed in other species. No Significant difference between the levels of AST ($p= 0.38$), ALT ($p= 0.83$) and BT ($p= 0.07$) in groups exposed and control. The Pearson correlation with Hgtotal was negative (AST $r= -0,7$; ALT $r=0,07$; BT $r= -0,3$ e $p > 0,05$), suggests another studies to clarify the alert levels of mercury concentrations and liver dosages.

Keywords: Hepatotoxicity, Methylmercury, Liver, Capuchin, Steatosis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 1 - | Cebus apella | 3 |
| Figura 2 - | Representação esquemática do ciclo biogeoquímico do mercúrio..... | 9 |
| Figura 3 - | Resíduos da indústria química de acetaldeído – Chisso..... | 13 |
| Figura 4 - | Digestão ácida das amostras em chapa aquecedora..... | 21 |
| Figura 5 - | Equipamento Hg201..... | 22 |
| Figura 6 - | Registradora com os picos de concentração de mercúrio..... | 24 |
| Figura 7 - | Fotomicrografia (Figura 7, A e B) | 31 |
| | Fotomicrografia (Figura 7, C, D e E)..... | 32 |
| | Fotomicrografia (Figura 7, F, H e G)..... | 33 |
| | Fotomicrografia (Figura 7, Ia e Ib)..... | 34 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | | |
|-------------|--|----|
| Gráfico 1 - | Correlação Linear de Pearson, níveis de Hgtotal e transaminases nos <i>Cebus apella</i> expostos ao metilHg..... | 30 |
| Gráfico 2 - | Correlação Linear de Pearson, níveis de Hgtotal e bilirrubina total nos <i>Cebus apella</i> expostos ao metilHg..... | 30 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Níveis de Hg total em Cebus apella controle e expostos ao metilHg.28

Tabela 2 – Níveis de AST, ALT e bilirrubina em Cebus apella controle e expostos ao metilHg.29

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| RESUMO | |
| ABSTRACT..... | |
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES..... | |
| LISTAS DE GRAFICOS..... | |
| LISTA DE TABELAS..... | |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 O MACACO PREGO (<i>CEBUS APELLA</i>)..... | 1 |
| 1.2 MORFOFISIOLOGIA HEPÁTICA..... | 3 |
| 1.3 O MERCÚRIO E SEUS COMPOSTOS..... | 8 |
| 1.4 TOXICOCINÉTICA DO MERCÚRIO..... | 11 |
| 1.5 INTOXICAÇÃO HUMANA POR MERCÚRIO..... | 12 |
| 1.6 EFEITOS DO METILMERCÚRIO EM MODELOS EXPERIMENTAIS..... | 15 |
| 2. OBJETIVOS | 17 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 17 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 17 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 18 |
| 3.1 CARACTERÍSTICAS DO ESTUDO..... | 18 |
| 3.2 MODELO ANIMAL..... | 18 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 3.3 | EXPOSIÇÃO AO METILMERCÚRIO..... | 19 |
| 3.4 | COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE..... | 19 |
| 3.5 | ANÁLISES DO Hg TOTAL NAS AMOSTRAS DE SANGUE..... | 20 |
| 3.5.1 | Procedimentos pré – analíticos..... | 20 |
| 3.5.1.1 | Descontaminação das vidrarias..... | 20 |
| 3.5.1.2 | Processamento da amostra..... | 20 |
| 3.5.1.3 | Preparação das soluções para a curva de calibração..... | 21 |
| 3.5.2 | Características e fundamento do equipamento | 22 |
| 3.5.2.1 | Procedimentos de análise no equipamento..... | 23 |
| 3.5.2.2 | Procedimentos de controle de qualidade analítica..... | 24 |
| 3.6. | DOSAGENS BIOQUIMICAS..... | 24 |
| 3.6.1 | Quantificação da atividade da bilirrubina total..... | 24 |
| 3.6.2 | Quantificação da atividade da aspartato transaminase (AST)..... | 25 |
| 3.6.3 | Quantificação da atividade da alanina transaminase (ALT)..... | 25 |
| 3.7 | PROCEDIMENTOS ANESTÉSICOS E CIRÚRGICOS | 26 |
| 3.8 | PROCEDIMENTOS HISTOPATOLÓGICOS..... | 26 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 3.8.1 | Coloração pelo Método de Hematoxilina e Eosina..... | 27 |
| 3.8.2 | Coloração pelo Método de Gomori (PERLS)..... | 27 |
| 3.8.3 | Coloração pelo Método de Reticulina..... | 27 |
| 3.8.4 | Coloração pelo Método de Tricrômico de Masson..... | 27 |
| 3.9 | PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS..... | 27 |
| 4. | RESULTADOS..... | 28 |
| 5. | DISCUSSÃO..... | 35 |
| 6. | CONCLUSÕES..... | 38 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 39 |
| | ANEXO 1 - PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO..... | 53 |
| | ANEXO 2 - ITENS E FUNDAMENTO DO EQUIPAMENTO..... | 55 |
| | ANEXO 3 - FÓRMULA PARA CÁLCULO DA CONCENTRACAO DE MERCÚRIO TOTAL..... | 56 |
| | ANEXO 4 - PROTOCOLOS DE HISTOPATOLOGIA..... | 57 |

1. INTRODUÇÃO

O organismo humano recebe diariamente, seja pela alimentação, sejam por outras vias de contato, uma série de substâncias químicas, algumas necessárias e outras não. A forma de processamento dessas substâncias implica nos processos metabólicos com a ajuda dos sistemas enzimáticos presentes no organismo (LOPES & GRAFF, 2006; OGA et al., 2008).

Os processos de biotransformação de um xenobiótico estão muito relacionados com o tempo de permanência no organismo. Esta circunstância, no âmbito toxicológico, tem importância por duas razões. Em primeiro lugar, a magnitude do dano produzido pela atividade do xenobiótico será tanto maior quanto mais prolongada seja a exposição ao mesmo. Em segundo lugar, a estabilidade química de um xenobiótico no organismo pode dar lugar à acumulação, que permitirá alcançar os níveis tóxicos requeridos depois de um tempo mais ou menos prolongado (HODGSON, 2004; OGA, 2008).

A avaliação farmacológica ou toxicológica dos xenobióticos é realizada em cultura de células ou animais experimentais, e o uso de primatas não humanos nas experimentações biomédicas tem ocorrido de forma freqüente nas áreas de anatomia, fisiologia e etologia, e também em pesquisas médicas. E o *Cebus* tem sido foco de maior atenção em tais pesquisas devido à sua alta ocorrência na América do Sul e também devido à escassez de estudos nesta espécie.

1.1 - O macaco prego (*Cebus apella*)

A Ordem *Primates* é composta por dois grupos (Infra-Ordens) classificados em primatas do Novo Mundo (*Platyrrhini*) e primatas do Velho Mundo (*Catarrhini*) (BUFFON, 1767, apud FORD, 1986). Os platirríneos representam 35% de todos os primatas existentes e estão distribuídos da América Central, no México

Meridional, até a Argentina na América do Sul formando um grupo monofilético (ROSENBERG, 1984). Esta Infra-Ordem divide-se em calitriquídeos (marmosets e tamarins) e os cebídeos (não-marmosets) devido à distinção quanto ao tamanho do corpo, forma dentária e presença ou ausência de garras (ROSENBERG, 1981).

Segundo Rosenberg (1981) a família *Cebidae*, através de características morfológicas (caracteres cranianos, dentais e medidas corporais) foi dividida em duas Subfamílias, *Callitrichinae* e *Cebinae* com sete gêneros. A Subfamília *Cebinae* é composta pelos gêneros *Cebus* e *Saimiri*.

O gênero *Cebus* possui uma longa história evolutiva. Foi um dos que primeiro divergiu durante a diferenciação dos *Platyrrhini*, de acordo com análises morfométricas (KAY, 1990). Possui tamanho médio variando de 70 a 100 cm, em geral apresentam cabeça arredondada e corpo robusto, a pelagem varia na textura e coloração entre as espécies e subespécies. O arranjo dos pêlos da parte superior da cabeça é variável mostrando diferenças constantes entre as espécies reconhecidas e a região da face é desprovida de pêlo (HILL, 1960).

O macaco-prego habita as matas ciliares dos rios, é arbóreo e vive em bandos ou em grupo de 10 indivíduos, normalmente, liderados por um macho dominante (Figura 1). Apresenta pronunciada destreza manual, cérebro grande e circunvolucionado, alta sociabilidade, terrestrialidade e dieta onívora (DEFLER, 1979; FREESE & OPPENHEIMER, 1981; AURICCHIO, 1995; NOWAK, 1999; SUSSMAN, 2000; DEFLER, 2004).



Figura 1 – *Cebus apella*

Fonte: [http://www.biophotoassociates/science source](http://www.biophotoassociates/science-source).

O parênquima hepático do macaco-prego mostrou-se semelhante às observações feitas para o homem (BATES, 2004) e os relatos da literatura para cães e gatos (PARTINGTON & BILLER, 1996; NYLAND et al., 2002). Ao exame ultrassonográfico caracterizou-se como um órgão de arquitetura parenquimal grosseira (ALVES et al, 2007). Em alguns momentos este se mostrou hiperecogênico, constituindo-se como um achado normal e observado também em procedimentos pós-anestesia (PENNICK et al., 1991; PATTERSON, 1996).

1.2- Morfofisiologia hepática

O fígado geralmente ocupa toda a extensão do abdome cranial, em íntimo contato com a cúpula diafragmática, é anatomicamente dividido por sulcos profundos em dois grandes lobos (direito e esquerdo) e dois lobos menores (caudado e quadrado), esta divisão é para demonstrar a relação com outros órgãos abdominais. A divisão que caracteriza o suprimento sanguíneo e a drenagem da bile (funcional ou cirúrgica) é a que apresenta importância clínica (ROSS & PAWLINA, 2008).

Os principais componentes celulares do parênquima hepático são as células hepáticas propriamente ditas (hepatócitos) que se dispõem organizadas em lâminas separadas por sinusóides; células endoteliais, localizadas nos sinusóides; células de

Kupffer localizadas na periferia dos sinusóides. As células de Ito, lipócitos diferenciados que produzem colágeno e tecido conectivo responsáveis pela sustentação do parênquima, juntamente com as células de defesa como as NK (natural killer) e linfócitos citotóxicos, que também formam o parênquima hepático (WISSE *et al.*, 1997).

As lâminas de hepatócitos são separadas por sinusóides, estas células estão dispostas em lóbulos, com formato hexagonal refletindo uma forma poliédrica tridimensional. A cada ângulo de margem do lóbulo hepático há um espaço porta com ramos terminais da artéria hepática e da veia porta e um coletor, o ducto biliar (SCHUPPAN *et al.*, 2001).

A unidade funcional é o ácino hepático que compreende massa de parênquima dependente do suprimento sangüíneo através do trato porta. As células estão dispostas em zonas concêntricas que cercam os vasos aferentes terminais. Zona 1 (periportal) – mais próxima ao espaço porta, é a primeira a receber sangue com alto conteúdo de oxigênio, insulina e glucagon. Tem alta taxa metabólica e é a última a sofrer necrose e a primeira a mostrar sinais de regeneração e são mais resistentes à hipoxia. Zona 2 (mediolobular) – recebe sangue com conteúdo intermediário de oxigênio. Zona 3 (centrilobular) – mais próxima às veias hepáticas terminais, pobres em oxigênio, são mais susceptíveis à lesão isquêmica. Aqui estão muitas das enzimas que participam de biotransformação (NADPH citocromo P450-redutase). São funcionalmente distintos, conferindo ao órgão uma heterogeneidade funcional (ROSS & PAWLINA, 2008).

Na unidade acinar, o sangue é direcionado dos espaços-porta, passando por meio dos sinusóides que banham as traves de hepatócitos, até a veia centro-lobular. Devido às anastomoses entre o sistema portal e arterial, nos capilares sinusóides o sangue venoso e

arterial se misturam. Posteriormente, o sangue é drenado em direção à veia centrolobular que por fim busca as veias hepáticas. Os espaços existentes entre o hepatócito e o endotélio sinusoidal denominam-se espaços de Disse (ROSS & PAWLINA, 2008).

A biotransformação de substâncias estranhas seja por oxidação, redução, hidrólise ou conjugação ocorre nos hepatócitos perivenosos (OGA et al., 2008). E lesões pela toxicidade do mercúrio são distribuídas no trato gastrointestinal, rim e cérebro. E incluem ulcera gástrica, congestão da mucosa intestinal e palidez hepática. Os achados histopatológicos incluem ulcerações, necrose da mucosa intestinal, degeneração tubular renal e necrose do epitélio tubular proximal e degeneração do hepatócito. Na exposição crônica, observa-se glomerulonefrite devido à deposição de complexos antígeno-anticorpo (SEBASTIAN, 2007).

Quando o Hg entra na circulação se agrega na superfície dos glóbulos sanguíneos, se organizando em microesferas pelo mecanismo de pinocitose. O fígado é quem captura em 89% do Hg circulante. O segundo órgão a capturar o Hg é o rim seguido do baço. No rim o Hg é eliminado na forma de Hg-proteinúria causando danos nos glomérulos renais; o baço é o terceiro órgão a capturar moléculas de Hg que por fazer parte do sistema retículo endotelial tem importante função imunológica e é particularmente vascularizado (CUNHA, 2008).

A maior parte dos estudos sobre regeneração hepática está centralizada nos hepatócitos, entretanto todas as células hepáticas participem do fenômeno regenerativo. As células estreladas também denominadas células de Ito ou células armazenadoras de lipídeos, encontram-se localizadas no espaço de Disse, em contato direto com os hepatócitos e com o epitélio sinusoidal. Essas células podem ser ativadas a um fenótipo semelhante a miofibroblastos, que se caracteriza por maior capacidade de proliferação,

motilidade, contratilidade, e síntese de colágenos e demais componentes da matriz extracelular (FRIEDMAN, 1993; 2000).

As células estreladas desempenham importante papel nos mecanismos de injúria, regeneração e fibrose hepáticas, sintetizando fatores de crescimento, prostaglandinas, citocinas e diversas outras substâncias bioativas. Estas células apresentam processos citoplasmáticos contráteis envolvendo os sinusóides hepáticos, regulando o fluxo sanguíneo sinusoidal (FRIEDMAN, 1993, 2000; TSUKADA et al., 2006).

A injúria hepática leva a ruptura da homeostase no fígado, resultando em estresse oxidativo com maior produção e liberação de radicais livres extracelulares, citocinas e moléculas sinalizadoras. A lesão hepática é tipicamente inflamatória. O fígado contém macrófagos e células natural killers (NK) residentes que constituem a primeira resposta a reação inflamatória local. O processo inflamatório, a despeito de sua causa, é o principal estímulo para a resposta fibrogênica (FRIEDMAN, 1993; 2000).

Uma lesão hepática transitória pode evoluir com restituição completa da integridade do parênquima. Contudo, a persistência da agressão resulta em dano tissular. No processo fibrogênico, os componentes da membrana basal, como o Colágeno -IV, a laminina (LN) e outros, são produzidos em maior quantidade e formam uma estrutura semelhante a uma membrana nos espaços de Disse. Ocorrem modificações na conformação dos sinusóides e redução de suas fenestrações, fenômeno denominado “capilarização”, pois a estrutura alterada dos sinusóides assemelha-se a dos capilares (FRIEDMAN, 2000).

A função do fígado é regular a concentração sérica de várias espécies químicas de importância fisiológica, como regulação dos níveis séricos de carboidratos, de lipídios, de proteínas e dos produtos do seu metabolismo, síntese de proteínas,

inativação de drogas e de toxinas e excreção dos produtos da degradação, excreção de produtos do metabolismo da hemoglobina (bilirrubina), e produção de enzimas (ROSS & PAWLINA, 2008).

A bilirrubina é um produto intermediário da hemólise, é produzida pelo sistema retículoendotelial é removida do organismo pelo fígado, que a excreta para a bile. É encontrada, geralmente, em pequena quantidade no soro. Poderá haver aumento nos níveis séricos se houver destruição excessiva de hemácias ou se o fígado for incapaz de excretar as quantidades normais de bilirrubina produzidas. Há duas formas de bilirrubina no organismo: a direta ou conjugada que circula livremente no sangue até alcançar o fígado e se ligar a glucuronosiltransferase e depois excretada para a bile; a indireta ou não conjugada ligada a proteínas e associada à hemólise (LIMA et al., 2001; MOURA et al., 2002).

Aspartato Transaminase (AST) é uma enzima presente em tecidos de elevada atividade metabólica (coração, fígado, rim, cérebro, músculo esquelético, pâncreas, baço e pulmões). É liberada para a circulação após a lesão ou morte das células. A quantidade de AST no sangue está diretamente relacionada ao número de células lesadas e ao tempo decorrido entre a lesão tecidual e o exame. É útil na avaliação de doenças hepáticas e cardíacas. A alanina transaminase (ALT) existe em alta concentração no fígado, enquanto concentrações relativamente baixas são encontradas no coração, músculo e rim. É usado para diagnosticar hepatopatia e diferenciar a icterícia hemolítica da icterícia causada por hepatopatia (LIMA et al., 2001).

O processo de biotransformação do mercúrio no fígado ocorre principalmente dos derivados organomercuriais, que pode levar a: 1. Ruptura da ligação carbono-mercúrio e liberação de mercúrio inorgânico; 2. Ionização do composto

organomercurial; 3. Biotransformação no grupo orgânico da molécula do organomercurial (AZEVEDO, 2003).

1.3- O mercúrio e seus compostos

O mercúrio de símbolo Hg (do latim hydrargirus, prata líquida), é líquido à temperatura ambiente e congela como um sólido mole próximo a -39°C . Tem cor prateada brilhante, mas oxida-se lentamente ao ar úmido, adquirindo uma cobertura opaca e manchas escuras (BERLIN, 1986). É um metal pesado, ou seja, metal com gravidade elevada que possui forte atração por estruturas de tecidos biológicos e eliminação lenta. O mercúrio é um elemento químico que não possui função biológica e causa efeitos deletérios e, por essas razões, arrolado como metal tóxico (GOYER, 1996). Foi utilizado desde a Idade Média como princípio ativo ou ingrediente de drogas, participando de modelos efetivos e específicos de terapia por décadas (WALDRON, 1983), é catalisador em processos eletroquímicos ou químicos de separação de minérios, entre os quais o ouro (GUIMARÃES, 1989).

Este metal é encontrado sob a forma de sulfeto (HgS), um cristal vermelho (cinábrio) e em estado metálico sob a forma de gotas ou massas fluidas presentes em minas próximas a vulcões ou fontes térmicas, e liberado por processos naturais como erosão e vulcanismo assim como por mineração. As atividades que manufaturam e distribuem este metal e a combustão dos combustíveis fósseis contribuem com a grande quantidade de mercúrio no meio ambiente (Figura 2) (GOCHFELD, 2003).

Apresenta-se em três estados de valência: mercúrio elementar (Hg°), mercúrio univalente (Hg^{+}) e mercúrio divalente (Hg^{++}) podendo ser encontrado sob a forma inorgânica ou orgânica (BERLIN, 1986; DOREA et al., 2006; OGA et al, 2008). A propriedade de solubilidade em água desses vários compostos e a incorporação à cadeia

trófica dos ecossistemas são os fatores determinantes para os riscos de contaminação dos seres vivos (LINDSTRÖM et al., 1991; BARBOSA et al., 2003; DOREA et al., 2006).

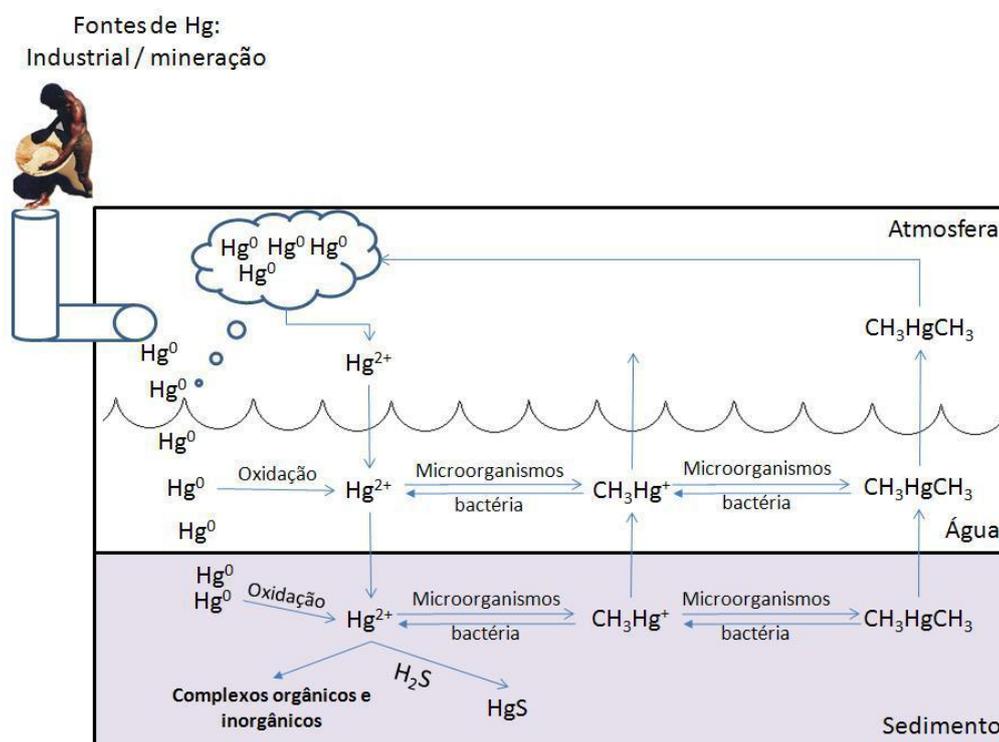


Figura 2 - Representação esquemática do ciclo biogeoquímico do mercúrio.
Fonte: SANTANA, 2009.

O Mercúrio Elementar é o mais volátil das formas inorgânicas do metal, sendo ligeiramente solúvel em água, 0.08 mg/l a 25°C (ATSDR, 2000). Uma pequena fração pode ser tirada da atmosfera durante os eventos de precipitação, podendo ocorrer uma oxidação do Hg^0 para Hg^{2+} por reação com oxidantes atmosféricos como oxigênio, ozônio e cloro. Nesta nova forma o mercúrio é muito mais solúvel e mais precipitável na atmosfera (FITZGERALD, 1995; GOCHFELD, 2003).

Os Sais de Mercúrio inorgânico existem em dois estados de oxidação, como sais mercuriosos monovalentes e mercúricos bivalentes, podem acarretar a síntese de metalotineína nos rins por serem solúveis em água. O cloreto mercurioso ou calomelano,

o mais conhecido composto mercurioso, foi usado em alguns cremes de pele como anti-séptico e empregado também como diurético e catártico. O nitrato de mercúrio, por sua vez, representou um risco industrial comum na fabricação de chapéus de feltro por mais de 400 anos (AZEVEDO, 2003).

A forma mercúrica apresenta sua toxicidade intrínseca, mas também é atribuída à ela a toxicidade do mercúrio elementar e, parcialmente, a do metilmercúrio, uma vez que, por oxidação e desmetilação, ambas as formas são convertidas em Hg^{2+} (COUNTER & BUCHANAN, 2004). As alterações provocadas pela exposição de organismos vivos ao mercúrio são inúmeras. Dados da literatura relatam modificações no peso corporal (SAKAMOTO et al., 1993; ROCHA et al., 1995), no peso, na histologia e na fisiologia de alguns órgãos (ROCHA et al., 1995).

Os organomercuriais, particularmente, o metilmercúrio apresenta a maior toxicidade. O metilmercúrio é a forma mais comum encontrada no meio ambiente devido ao seu uso indiscriminado e a biometilação pela ação das bactérias aeróbicas e anaeróbicas (BERLIN, 1986; WHO, 1991; ATCHISON & HARE, 1994; LEBEL et al., 1998; GOCHFELD, 2003; BARBOSA et al., 2003; DOREA et al., 2006), tornando-se disponível para os organismos aquáticos e sendo assim biomagnificado através dos níveis tróficos da cadeia alimentar, afetando mais os animais do topo da cadeia, os peixes predadores e o homem.

1.4- Toxicocinética do mercúrio.

O metilHg devido a sua grande solubilidade é absorvido facilmente pelo trato gastrointestinal, 90% do ingerido é absorvido. No sangue, fixa-se a hemoglobina e é transportado pelos eritrócitos, estudos *in vitro* mostraram a associação do metilHg no plasma ocorre com fração lipoproteica de alto peso molecular (AZEVEDO, 2003; CUNHA, 2008).

O transporte pelos tecidos se dá pela formação de complexo cisteina-metilmercúrio semelhante estruturalmente à metalotioneína . O metilmercúrio também pode combinar-se aos grupos tióis de proteínas e aminoácidos e assim cruzar a barreira hematoencefálica por transporte ativo secundário. Esta é a forma de maior deposição cerebral, depositando-se na fração protéica do citoplasma e em pequenas quantidades no núcleo de neurônios (AZEVEDO, 2003).

A biotransformação dos organomercuriais leva a ruptura da ligação carbono-mercúrio com a liberação de mercúrio inorgânico, ou ionização do composto ou biotransformação do grupo orgânico da molécula (AZEVEDO, 2003; SÁ et al.,2006). A conversão do CH_3Hg a Hg^{++} é fundamental para o processo da neurotoxicidade por ser lento, e com isto grande quantidade de MetilHg deposita-se nos órgãos alvos na forma orgânica e lá é convertido a forma inorgânica (WHO, 1991; USEPA, 1997).

1.5- Intoxicação humana por mercúrio

A intoxicação humana pode ocorrer tanto por exposição aguda ou crônica. Os casos mais catastróficos dos efeitos deletérios em humanos foram registrados nos incidentes do Japão, do Iraque e do Canadá (HARADA et al, 1995).

No Japão, em 1953, ocorreu exposição aguda devido ao consumo em grande escala de peixes contaminados com metilmercúrio oriundo dos resíduos da indústria química de acetaldeído – Chisso (Figura 3) (HARADA, 1995). O primeiro doente foi descoberto em 1956 em Minamata, na província de Kumamoto.

No período, ocorreram três tipos de exposição: a aguda/subaguda, crônica e congênita. A primeira fase da exposição (aguda/subaguda) atingiu pescadores e suas famílias, eles apresentaram a síndrome de Hunter-Russell ou doença de Minamata (HARADA, 1995) enquanto, a exposição congênita foi observada a partir de 1962, e a

crônica apresentou-se com uma variedade de sintomas. Em 1965, foram encontrados novos pacientes apresentando o quadro clínico da doença de Minamata na localidade de Niigata (HARADA et al.,1995).



Figura 3 – resíduos da indústria química de acetaldeído – Chisso.

Fonte: Museu de Minamata – 2009.

No Iraque, em 1971, ocorreram 459 óbitos devido a grãos de cevada e trigo tratados com metilmercúrio que eram destinados ao plantio e foram ingeridos pela população na forma de pães e farinha (AZEVEDO, 2003).

Na exposição crônica, os sintomas começam a aparecer de forma não específica na fase inicial, mas tornam-se cada vez mais evidentes à medida que aumenta o tempo de exposição, e geralmente se dá pelo consumo de alimentos (WHO, 1989). No Canadá, uma fábrica de soda cáustica também causou a contaminação mercurial, através da metilação do mercúrio inorgânico na natureza (AZEVEDO, 2003).

Na região amazônica, vários estudos têm confirmado a contaminação de mercúrio principalmente em peixes (BARBOSA et al., 1995; LACERDA et al., 1991;

MALM et al., 1990; MARTINELLI et al., 1988; PALHETA & TAYLOR, 1995; PFEIFFER et al., 1989,1991,1993; DOLBEC et al., 2000; DÓREA et al., 2006; DÓREA & BARBOSA, 2007). Esta contaminação se deu principalmente devido a extração artesanal do ouro que foi uma das principais fontes de movimentação de renda. Mas, nesta região há também a derrubada da floresta pelos projetos de agricultura (LACERDA *et al.*, 2004; KEHRIG *et al.*, 2006), as hidrelétricas e a riqueza de mercúrio naturalmente no solo (ROULET *et al.*, 1998; FADINI & JARDIM, 2001; KEHRIG *et al.*, 2008).

Uma das causas para esta preocupação é o grande despejo na natureza de toneladas de mercúrio por ano. Existe uma parcela da população que possui como atividade ocupacional o garimpo artesanal do ouro e que, em função desta atividade, fica exposta aos efeitos nocivos do mercúrio utilizado em uma das etapas da purificação do ouro, a “queima do azougue”. A outra parcela é formada pelos ribeirinhos que se alimentam de peixe. Nas áreas próximas a casa de queima, o mercúrio volatilizado pode depositar-se nos rios, ficando retido nos sedimentos bênticos, onde sofre metilação. O vapor de mercúrio que se espalha na atmosfera circula pelo globo, e nos locais onde ocorre chuva ácida retorna para o solo ou sedimento (AZEVEDO, 2003).

Estudos realizados em vários locais de extração de ouro na Amazônia, confirmaram que a ameaça à saúde das pessoas que vivem nestes locais é real (AKAGI et al., 1995, 1996; BRABO et al., 2000; PINHEIRO et al., 2000a, 2000b; SANTA ROSA et al., 2000; DÓREA et al., 2006; DÓREA & BARBOSA, 2007; KEHRIG et al., 2008), pois estes estudos mostraram, por exemplo, que as amostras de peixes coletadas na região de Itaituba, Rio Tapajós, tinham concentração de mercúrio superior ao limite de referência da OMS (2008), 0,5 ppm para peixe herbívoro e 1,0 ppm para o piscívoro.

1.6- Efeitos do metilmercúrio em modelos experimentais

No peixe, há uma ligação direta entre a exposição mercurial e o estresse oxidativo em fígados de peixes silvestres. A toxicidade hepática é diretamente resultante do estresse oxidativo (DREVNICK et al., 2008) A exposição mercurial nos peixes de água doce da espécie *Esox lucius* (predador) e outros da América do Norte pode levar a toxicidade hepática e inibir a capacidade reprodutiva quando a concentração de mercúrio é elevada (SCHEUHAMMER et al., 2007). O peixe *Danio rerio* que possui similaridades fisiológicas e moleculares no metabolismo de xenobióticos com os mamíferos (CARVAN et al., 2000 a,b; HILL et al., 2005) apresentou mecanismo de hepatotoxicidade ao mercúrio com alterações na fosforilação oxidativa, no sistema complemento, na resposta de fase aguda e no metabolismo lipídico (UNG et al., 2010).

Em roedores, o mercúrio inibe a atividade da Na⁺K⁺ ATPase na membrana plasmática (HALBACH et al., 1981; MAGOUR et al., 1987; ANNER et al., 1992), associado com inibição da atividade da Ca²⁺ ATPase no retículo sarcoplasmático nos músculos papilares (BRANDÃO et al., 2006). Também inibe a ação da miosina ATPase pois associa-se com os grupos sulfídrica da molécula de miosina no miocárdio ventricular afetando a contração e força tetânica (MOREIRA et al., 2003; ASSIS et al., 2003). A exposição ao cloreto de mercúrio leva a acumulação em níveis elevados no fígado, rim e no sangue do rato (PEIXOTO et al., 2007).

Os experimentos com macacos foram realizados na sua maioria por exposição a altos níveis intrauterina, nas quais se observava os efeitos neuroanatômicos cerebrais como redução do tamanho cerebral, danos no córtex e gânglios da base, glioses, perdas celulares, dilatação ventricular, células ectópicas desorganização de camadas cerebrais (WARFING & BRUUN, 1996).

Vários estudos com experimentação animal constataram a conversão do metilmercúrio a mercúrio inorgânico com o rompimento da ligação carbono-mercúrio da molécula, o que explica a eliminação do mercúrio pelos sais biliares, complexados com peptídeos sulfídricos além da glutatona. Uma quantidade deste mercúrio é reabsorvida pelo ciclo enterohepático e retorna a corrente sanguínea, sendo novamente convertido a inorgânico (WHO, 1990; AZEVEDO, 2003).

As funções do fígado de detoxificação, biotransformação e excreção estão relacionadas a interação com compostos mercuriais. Este órgão apresenta propriedades regenerativas únicas devido a sua exposição contínua a substâncias em geral como as toxinas ambientais. Os hepatócitos correspondem geralmente a oitenta por cento do órgão e são responsáveis parcialmente pela regeneração que ocorre na maioria das vezes, naturalmente (DEMETRIOU et al., 2004).

Os efeitos hepáticos provocados pela exposição ou intoxicação por metilmercúrio em primatas não humanos é tema relevante para melhor compreensão da toxicidade por dose baixa deste metal no local de biotransformação para mercúrio inorgânico e, avaliar se há alteração de funções hepáticas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

Descrever e avaliar características fisiológicas e histopatológicas hepáticas frente a exposição crônica ao metilmercúrio de macacos *Cebus apella*.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

Investigar o nível de intoxicação através da análise de concentração de mercúrio total no sangue total;

Identificar e descrever as alterações histopatológicas no parênquima hepático;

Investigar através de análise quantitativa, o perfil das enzimas hepáticas séricas e bilirrubina total na exposição ao metilmercúrio.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CARACTERÍSTICAS DO ESTUDO

No presente estudo, foram analisadas as alterações histopatológicas provocadas por mercúrio orgânico (metilmercúrio) no parênquima hepático de *Cebus apella*, através da quantificação da concentração de mercúrio total (HgT), análise bioquímica de enzimas hepáticas (transaminases) , bilirrubina direta e identificação de alterações teciduais.

3.2 MODELO ANIMAL

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizados 04 macacos da espécie *Cebus apella*, Linnaeus 1758 (macaco prego), machos, provenientes de criação em cativeiro do Zoológico de Piracicaba, mantidos no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

Todos os procedimentos experimentais ocorreram de acordo com as normas de ética em pesquisa com animais (Lei n. ° 6.638) e o referido trabalho foi autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais Experimentais (CEPAE/UFPA) com o código MED 002 2008.

Os animais foram mantidos em condições adequadas de alojamento e manejo, e para garantir as condições de responder de forma adequada ao experimento os mesmos receberam condicionamento do ambiente quanto à temperatura, umidade relativa, luminosidade, dieta similar a dos outros de sua espécie no biotério (banana, mamão, laranja, legumes, hortaliças e ovo cozido). A ingestão de água foi *ad libitum*.

3.3– EXPOSIÇÃO AO METILMERCÚRIO

O protocolo de exposição foi baseado em condicionamento prévio com leite condensado 40% em seringa. Posteriormente, foi adicionado ao leite cloreto de metilmercúrio PESTANAL[®] Sigma – Aldrich. Foi utilizado a concentração de 1,5 µg por ml de solução.

Os animais foram expostos por via oral, com concentrações de metilmercúrio de 1,5 µg /Kg/dia até um total de cento e vinte dias de exposição.

3.4 – COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Devido tornar-se agressivo quando acuado, utilizou-se a sedação com cetamina por via intramuscular na dose de 0,5 ml para a colheita de sangue. Após 10 minutos colhiam-se de 5 a 10 ml.

Os animais foram submetidos a exames antes, durante e após a exposição. A determinação bioquímica do sangue (valores da bilirrubina total), enzimologia clínica (aspartato transaminase - AST e alanina transaminase - ALT), com o intuito de avaliar os níveis de proteínas e enzimas no sangue úteis ao diagnóstico de hepatopatias (LIMA *et al.*, 2001; MOURA *et al.*, 2002). As amostras para os testes bioquímicos foram coletadas por punção venosa, na região inguinal.

As amostras de sangue foram armazenadas em recipientes com EDTA e congeladas (WHO, 1990; AKAGI *et al.*, 2004). No sangue, a maioria do mercúrio encontrada nos eritrócitos está na forma de metilmercúrio, e a meia vida no sangue do metilmercúrio é de 50 ± 7 dias (IPCS, 1990; CERNICHIARI *et al.*, 1995b; AZEVEDO, 2003; BUDTZ-JORGENSEN *et al.*, 2005) e a meia vida de semi eliminação no macaco é de 150 dias (NRCC, 1979; AZEVEDO, 2003), assim a dosagem de mercúrio total pode avaliar a exposição ao metilmercúrio.

Os procedimentos analíticos para determinação do mercúrio total (Hg_{total}) foram realizados no Laboratório de Toxicologia Ambiental e Saúde Humana no Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará.

3.5- ANÁLISES DO Hg TOTAL NAS AMOSTRAS DE SANGUE

A dosagem de mercúrio total no sangue ocorreu por determinação através de digestão úmida/redução/espectrometria de absorção atômica com vapor frio (CVAAS).

3.5.1 - Procedimentos pré – analíticos

3.5.1.1 Descontaminação das vidrarias

Previamente aos procedimentos analíticos todas as vidrarias e frascos utilizados foram submersos em uma solução detergente de extran 1% por um período de 24 horas e retirada com água corrente, em seguida um leve enxague com solução de permanganato de potássio (KMnO₄), para retirada de qualquer resíduo de Hg presente nas vidrarias; após retirada do KMnO₄ com água corrente, as vidrarias foram então lavadas com solução de hidroxilamina a 1% (NH₂OH), para retirada total KMnO₄ e finalmente lavadas com água destilada (AKAGI et al.,2004).

3.5.1.2 Processamento da amostra

No laboratório, as amostras de sangue foram descongeladas e centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. Após, a amostra homogeneizada foi pesada (máximo de 0,5 g em peso úmido) em um frasco de digestão de amostra.

Em cada balão foi acrescentado um ml de água destilada, dois ml de ácido nítrico e perclórico (HNO₃-HClO₄) na proporção de 1:1(um para um) e cinco ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄). Depois, as amostras foram submetidas ao processo de digestão ácida, que tem com intuito eliminar elementos interferentes presentes na amostra, como a presença de outros metais (Figura 4).

A digestão ácida foi realizada em uma chapa aquecedora a uma temperatura de 210°C por 30 minutos. Quando as amostras digeridas chegaram à temperatura ambiente estas foram aferidas com água destilada até o volume final de 50 ml.



Figura 4 - Digestão ácida das amostras em chapa aquecedora.

Fonte: SILVA, 2011.

3.5.1.3 Preparação das soluções para a curva de calibração

Foram criados quatro pontos para a curva de calibração, 0, 20, 50 e 100. A curva de calibração é utilizada para avaliar os resultados das amostras assim como a estabilidade do equipamento (AKAGI et al.,2004).

Para o preparo das soluções padrões referente à curva de calibração da análise de mercúrio total é necessário o preparo de uma solução padrão de metilmercúrio (MetilHg) de 100 ppm (parte por milhão), uma solução padrão de MetilHg 1 ppm (1 ml da solução de 100 ppm) , uma Solução de L-Cysteina 0,01% (Anexo 1).

3.5.2 Características e fundamento do equipamento

Para análise de Hg_{total} foi utilizado um Espectrofotômetro de Absorção Atômica disponível comercialmente como Analisador Semi-Automático de Mercury Modelo Hg 201 (Sanso Seisakusho Co. Ltd. Tokyo, Japan) (Figura 5).

Este método é aplicado em amostras biológicas como peixe, molusco, sangue humano, urina e tecidos como cordão umbilical (AKAGI et al.,2004).

É um equipamento que utiliza espectrometria de absorção atômica por vapor frio, no qual, o mercúrio bivalente (Hg^{2+}) é convertido em vapor de mercúrio elementar (Hg^0) no evento de óxido – redução ocasionado pelo Estanho ($\text{Sn}^{2+} \rightarrow \text{Sn}^{4+}$). É um sistema aberto de circulação de ar. Neste equipamento, o vapor de mercúrio gerado é circulado em uma bomba de diafragma a uma taxa de 1-1,5 l/min por 30 segundos para homogeneizar. Então, a válvula é acionada e gira 90° para entrar na célula de foto absorção para a medida de absorbância a 253,7 nm (AKAGI *et al*, 2004) (Anexo 2).



Figura 5: Equipamento Hg201.

Fonte: SILVA, 2009.

O método analítico para mercúrio total utiliza espectrometria de absorção atômica por vapor frio, no qual o mercúrio é convertido em vapor de mercúrio elementar para ser introduzido em uma célula de absorção para determinação da quantidade do elemento em partes por bilhão (ppb) ou ng/L e/ou partes por milhão (ppm) ou $\mu\text{g/L}$.

3.5.2.1 Procedimentos de análise no equipamento

Durante o procedimento da análise foi transferido suavemente volumes fixos de 5mL com uma pipeta volumétrica de cada uma das soluções de branco ou padrão ou da amostra no equipamento. Foi adicionado um ml de solução de SnCl_2 (solução de cloreto estanhoso) 10% para o início do processo analítico.

Ao final da análise de cada elemento da curva de calibração ou de cada amostra os resultados (o pico de concentração de mercúrio total) foram registrados em uma impressora conectada ao equipamento Hg201, o registro ocorreu na forma de uma reta, medida com régua em cm (Figura 6).

Posteriormente, a concentração em valor numérico de Hg total foi calculada através de fórmula matemática (Anexo 3) e com o auxílio dos valores obtidos pelos elementos da curva de calibração.



Figura 6 – Registradora com os picos de concentração de mercúrio.

Fonte: SILVA, 2009.

3.5.2.2 Procedimentos de controle de qualidade analítica

O controle de qualidade analítico e a validação da metodologia, quanto à precisão e à exatidão para a determinação de Hg total em sangue, foram feitos por meio da análise de material de referência com valor certificado BLOOD (Toxic Metal in Bovine Blood) do National Institute of Standards and Technology. Os valores obtidos pelo padrão certificado ficaram dentro do intervalo de confiança de $\pm 10\%$ do valor de referência. $2.73\mu\text{g.L}^{-1}$.

3.6 - DOSAGENS BIOQUIMICAS

Os exames de análises clínicas foram feitos no laboratório do Hospital João de Barros Barreto. E seguiram os protocolos de Moura e colaboradores (2002)

3.6.1 - Quantificação da atividade da bilirrubina total

O método utilizado foi o sistema colorimétrico (Berthelot) para quantificação da bilirrubina total no soro *in vitro*, utilizando kits Celm®. Fundamenta-se no fato que a bilirrubina total, através da reação de acoplamento com o ácido sufânico diazotado forma um complexo de coloração vermelha (azobilirrubina). A bilirrubina (direta e indireta) é dosada em presença de um acelerador (caféina e benzoato) que permite a

solubilização da bilirrubina indireta (não conjugada) insolúvel em água. A bilirrubina direta (conjugada), é dosada em meio aquoso. O valor de normalidade da bilirrubina total no soro é até 1,0 mg/ dL .

3.6.2- Quantificação da atividade da aspartato transaminase (AST)

O método utilizado para dosagem da AST foi o cinético ultra-violeta (UV) feito pelo autoanalisador marca Alcyon 300®, utilizando kits Analisa Diagnóstica®, no soro para diagnóstico *in vitro*.

O método fundamenta-se no fato da AST catalisar a transferência do 24 amina do aspartato para o cetoglutarato com formação de glutamato e oxalacet qual é reduzido a malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto que, a coenzima NADH é oxidada a NAD⁺. A atividade da AST na amostra é calculada com base na redução, do NADH que se transforma em NAD⁺. O Valor de normalidade da AST no soro ou plasma é até 40 U/L.

3.6.3 - Quantificação da atividade da alanina transaminase (ALT)

O método utilizado para dosagem da ALT foi o cinético ultra-violeta (UV) feita pelo autoanalisador marca Alcyon 300®, no soro somente para diagnóstico *in vitro*.

O método fundamenta-se no fato da ALT catalisar a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato com formação de glutamato e piruvato, o qual é reduzido a lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD⁺. A atividade da ALT na amostra é calculada com base na

redução do NADH que se transforma em NAD⁺. O valor de normalidade da ALT no soro é de até 40 U/L.

3.7 – PROCEDIMENTOS ANESTÉSICOS E CIRÚRGICOS

Após a fase de exposição, os animais foram levados ao laboratório para o procedimento cirúrgico e análises histológicas do fígado, que seguiu as normas do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

Os animais foram anestesiados com uma mistura de três partes de solução de cloridrato de cetamina (Ketalar, König) para uma parte de solução de cloridrato de xilazina (Kenzol, König), na dose de 0,4 ml/Kg de peso corporal, por via intramuscular. Após os procedimentos anestésicos, foi realizada a perfusão intracardíaca com sol 25 salina tamponada, pH=7,4 (PBS) e paraformaldeído a 4% em tampão fosfato s 0,1M.

3.8– PROCEDIMENTOS HISTOPATOLÓGICOS

O fígado foi coletado e fixado em formalina a 10%, processado rotineiramente e incluído em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados em cortes de 6 µm e corados pelas técnicas de hematoxilina-eosina, Tricrômico de Masson, Reticulina e Gomori (Pearls). A avaliação deste material foi feita pela análise semiquantitativa de parâmetros discriminados em protocolo específico, sob a responsabilidade do médico patologista Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma.

A descrição dos protocolos das colorações encontram-se no ANEXO 4.

3.8.1- Coloração pelo Método de Hematoxilina e Eosina

Este teste, descrito por Behmer et al (1976), baseia-se na avaliação histológica de espécimes fixados em formol a 10% e embebidos em parafina, autoprocesados e corados pela hematoxilina-eosina (HE).

3.8.2- Coloração pelo Método de Gomori (PERLS)

Este tipo de coloração através da reação do azul da prússia precipita o ferro livre em pequenos grânulos azuis ou azul-esverdeados.

3.8.3- Coloração pelo Método de Reticulina

Neste teste, observa-se o conteúdo de fibras reticulares no fígado pela impregnação do nitrato de prata.

3.8.4- Coloração pelo Método de Tricrômico de Masson

26

Esta técnica permite a observação do colágeno e muco em azul para quantidade desta fibra, e assim analisar a existência de fibrose no parênquima hepático.

3.9- Procedimentos Estatísticos

Os dados foram apresentados em tabelas e gráficos. As variáveis numéricas foram apresentadas por média, desvio-padrão, mínimo e máximo. A análise estatística dos resultados obtidos de Hgtotal do grupo expostos e do controle, e a análise dos níveis das transaminases e bilirrubina total foram realizadas através do *teste Kruskal Wallis*, adotando-se o nível alfa de significância de 0,05 ($P < 0,05$). Para verificar a relação entre o teor de transaminases e bilirrubina total com os níveis de Hgtotal das amostras estudadas, foi utilizado o teste de *correlação de Pearson*. O programa estatístico utilizado foi o BIOSTAT 5.3 (AYRES, 2011).

4. RESULTADOS

Os resultados da avaliação de mercúrio total no sangue dos primatas deste estudo constam da tabela 1.

Tabela 1- Níveis de Hg total em *Cebus apella* controle e expostos ao metilHg.

| Grupo | HgT($\mu\text{g/g}$) X \pm d.p | Mínimo - Máximo |
|--------------|---|------------------------|
| Controle | 0,48 \pm 0,65 | 0,0 – 1,37 |
| Exposto | | |
| 30 d | 0,06 \pm 0,08 | 0,0 – 0,17 |
| 60 d | 0,10 \pm 0,06 | 0,01– 2,75 |
| 90 d | 1,5 \pm 1,0 | 0,03–5,75 |
| 120 d | 2,0 \pm 0,2 | 0,06–7,2 |

Teste Kruskal Wallis: Exp. 30d x controle P > 0,05

Exp. 60d, 90d x controle P < 0,05

Exp. 120d x controle P < 0,01

Foi observado diferença significativa entre o grupo exposto e o grupo controle, quanto aos níveis de Hgtotal, nos períodos de 60, 90 ($P < 0,05$) e principalmente 120 dias ($P < 0,01$). A exposição de 30 dias não demonstrou diferença significativa com o grupo controle ($P > 0,05$).

Tabela 2 – Níveis de AST, ALT e bilirrubina em *Cebus apella* controle e expostos ao metilHg no período de 120 dias.

| Grupo | AST | Min-Max | ALT | Min-Max | BT | Min-Max |
|----------|-------------|---------|-----------|---------|-------------|-----------|
| | X ± d.p | | X ± d.p | | X ± d.p | |
| Controle | 31.6 ± 3.78 | 29 – 36 | 37 ± 11.2 | 30 – 50 | 30.23 ± 0.5 | 0.2 – 0.3 |
| Exposto | 20.8 ± 4.5 | 16 – 25 | 21.3 ± 7 | 14 – 28 | 30.5 ± 0.26 | 0.3 – 0.8 |

* Os valores de referência para as transaminases são de até 40 UI/mL e para a bilirrubina total é de até 1,0 mg/dL.

Teste Kruskal wallis: AST exp. x AST controle P > 0,05

ALT exp. x ALT controle P > 0,05

BT exp. x BT controle P > 0,05

O emprego de teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis foi utilizado para análise estatística da função hepática. Não foi observada diferença significativa entre os níveis de AST (p= 0.38), ALT (p= 0.83) e BT (p= 0.07) do grupo controle e experimental. Observando-se que a exposição ao metilHg não interferiu nas provas da função hepática.

Os níveis das transaminases (AST e ALT) séricas, enzimas sintetizadas pelos hepatócitos, quando correlacionados com os níveis de HgT no sangue dos primatas através do teste de correlação de Pearson para avaliar se o nível de HgT interferiu nos níveis destas enzimas neste tipo de experimento revelaram o demonstrado no gráfico 1.

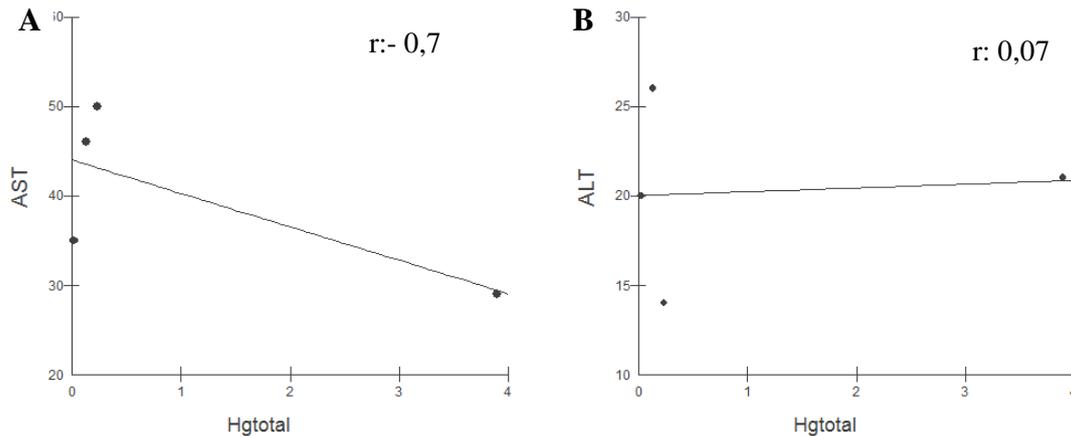


Gráfico 1- Correlação Linear de Pearson, níveis de Hgtotal e transaminases nos *Cebus apella* expostos ao metilHg. Os resultados de AST (A) são expressos em $r = -0,7$; $p > 0,05$ e os de ALT (B) em $r = 0,07$; $p > 0,05$. * $r = 1,0$. Correlação negativa.

Neste estudo, foi observado correlação negativa entre os níveis de transaminases e níveis de HgT, com AST demonstrando o $P = 0,29$ e ALT $P = 0,92$. Caracterizando que não houve correlação entre a síntese das transaminases e a concentração de mercúrio nos macacos expostos.

A bilirrubina total dos macacos expostos foi correlacionada ao nível de HgT no sangue, e o resultado é observado no gráfico 2.

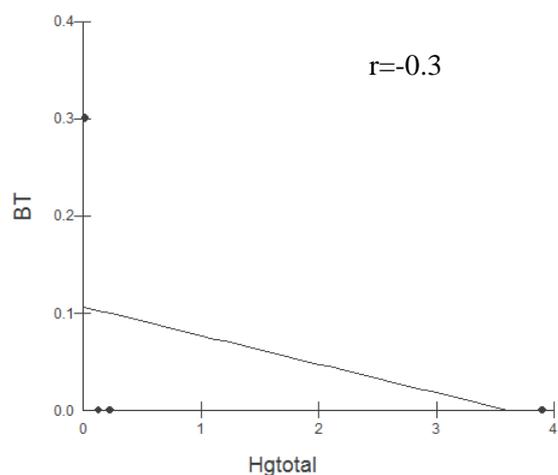
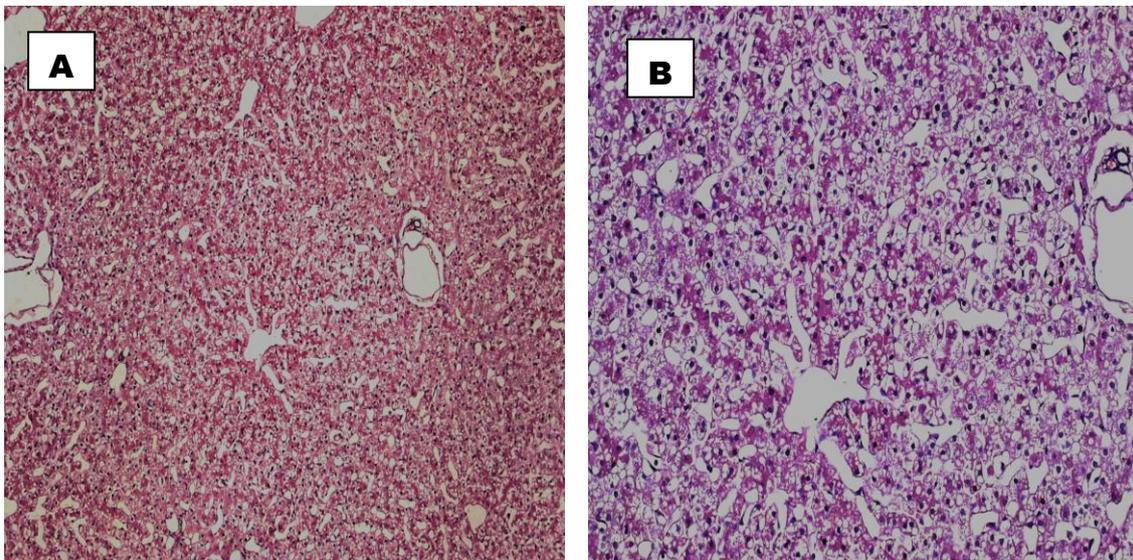
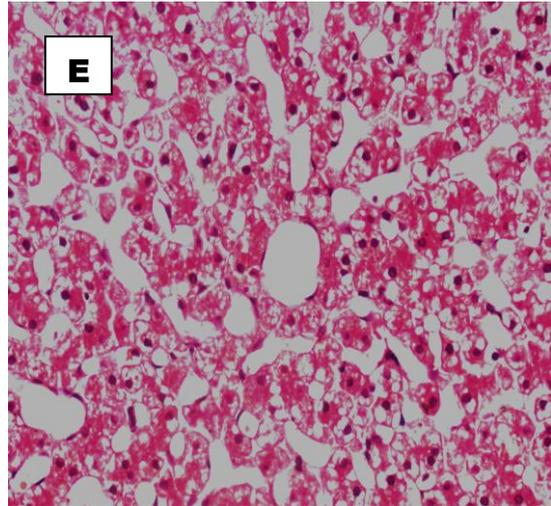
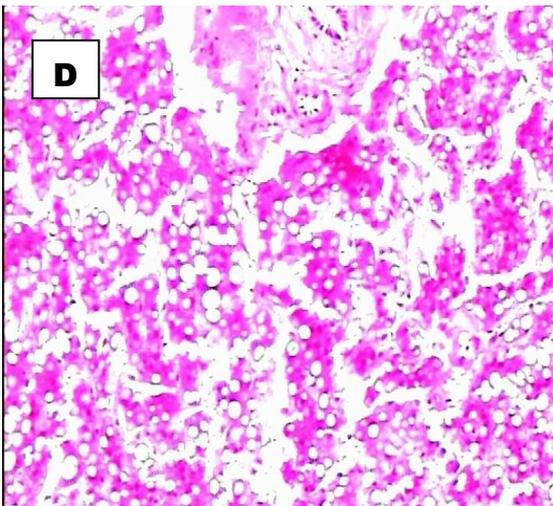
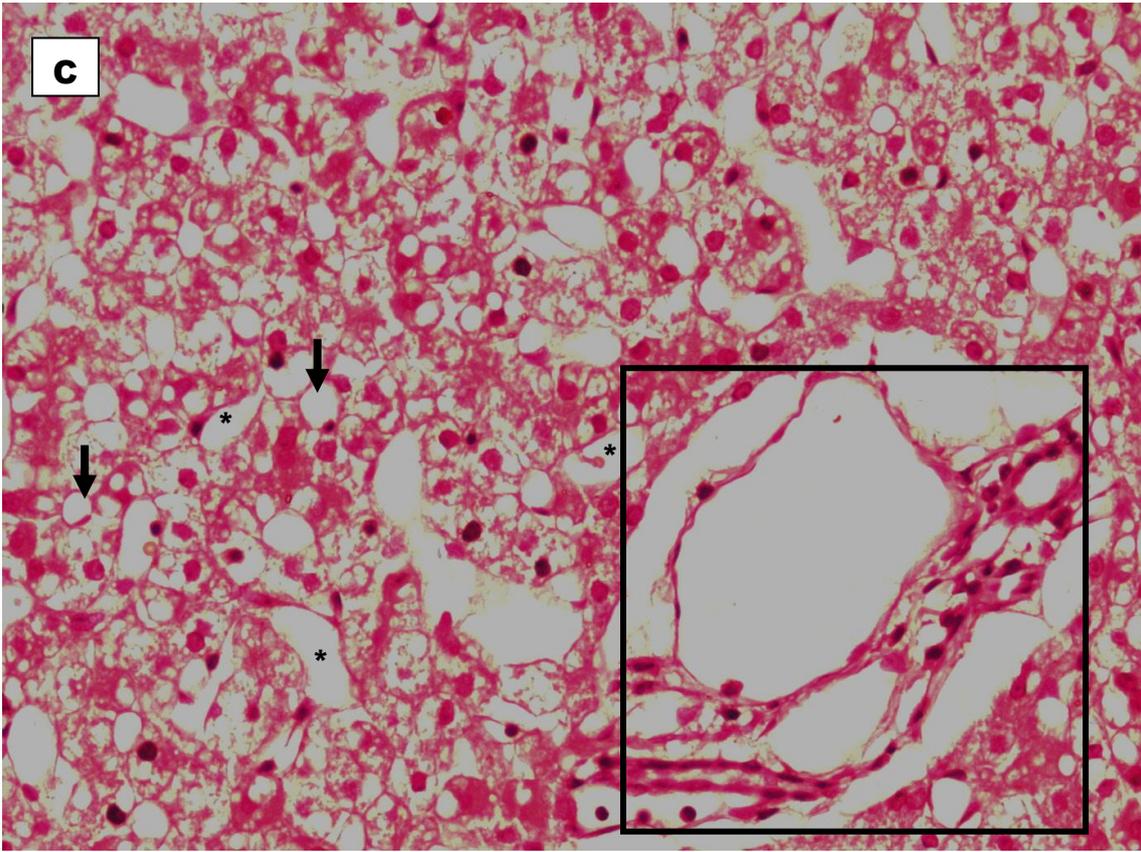


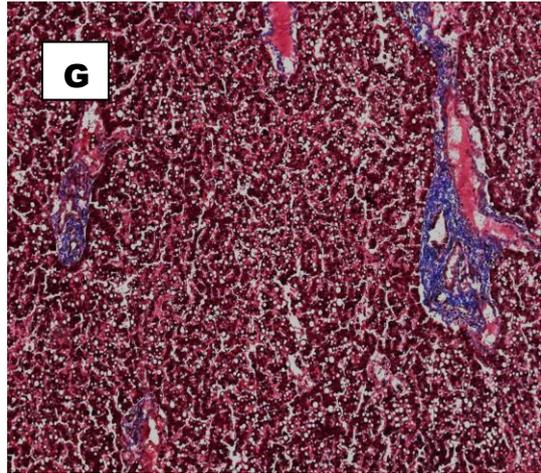
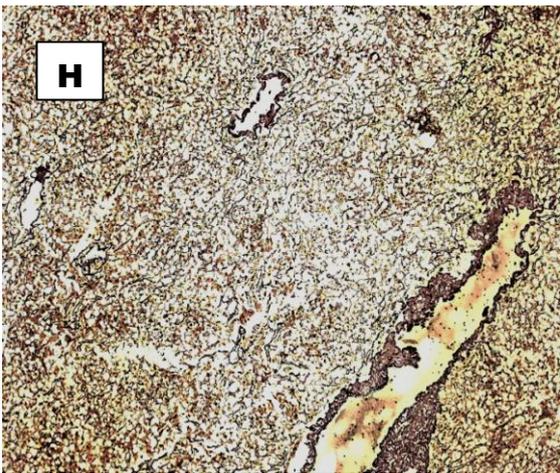
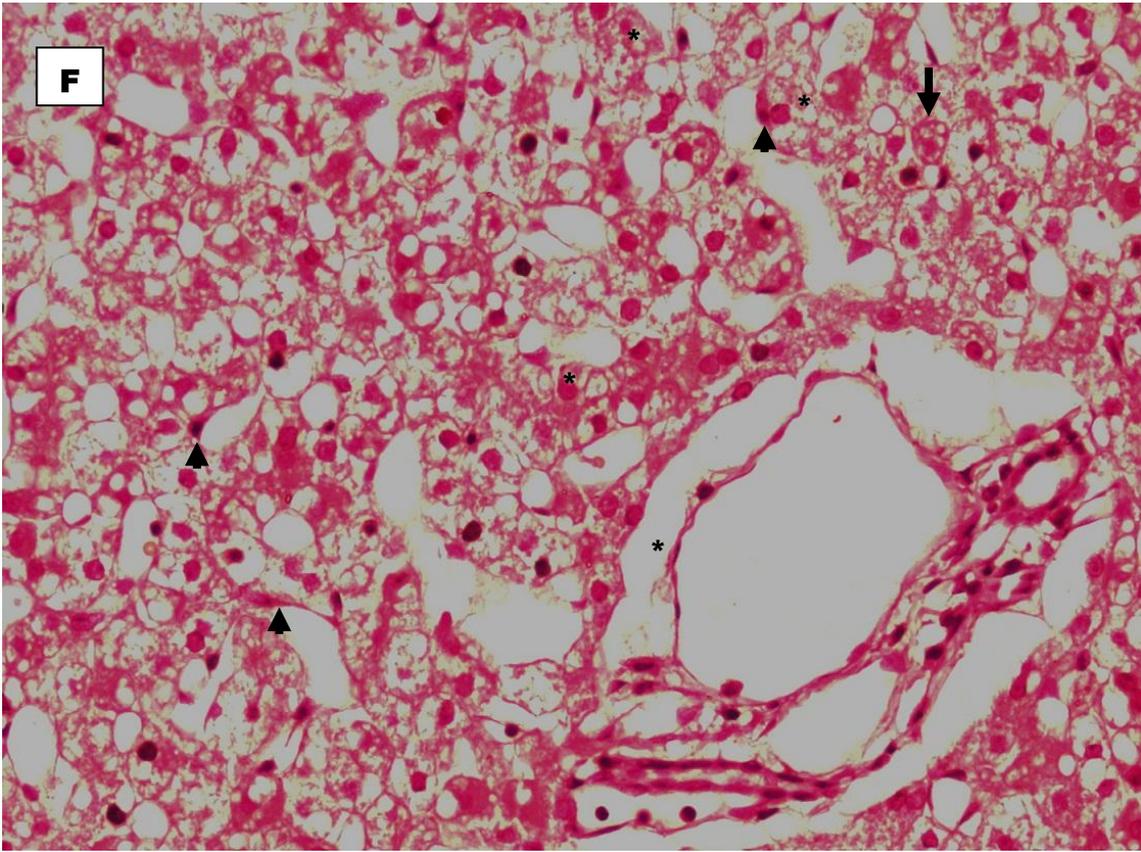
Gráfico 2. Correlação Linear de Pearson, níveis de Hgtotal e bilirrubina total nos *Cebus apella* expostos ao metilHg. Os resultados de BT são expressos em $r = -0,3$; $p > 0,05$. * $r = 1,0$. Correlação negativa.

A avaliação de correlação entre BT e HgT, neste estudo, foi negativa com o $P > 0,05$ (0,6) e $r = -0,3$. Os níveis normais da BT excluem qualquer comprometimento significativo da função excretora do fígado ou hemólise excessiva das hemácias.

Os resultados da avaliação patológica do fígado dos animais expostos apresentaram hepatócitos com núcleos típicos (Figura 7, A, B e E). Alguns hepatócitos apresentaram presença de vacúolos claros, os quais rebateram o núcleo para a periferia caracterizando esteatose moderada (Figura 7, C (setas) e D), e também se observou tumefações em algumas áreas semelhantes à degeneração hidrópica. Ocorreu discreto infiltrado linfomononuclear nos espaços porta (Figura 7, C, área do quadrado). Não foi observado formação de fibrose ou pontes fibróticas (Figura 7, G e H).







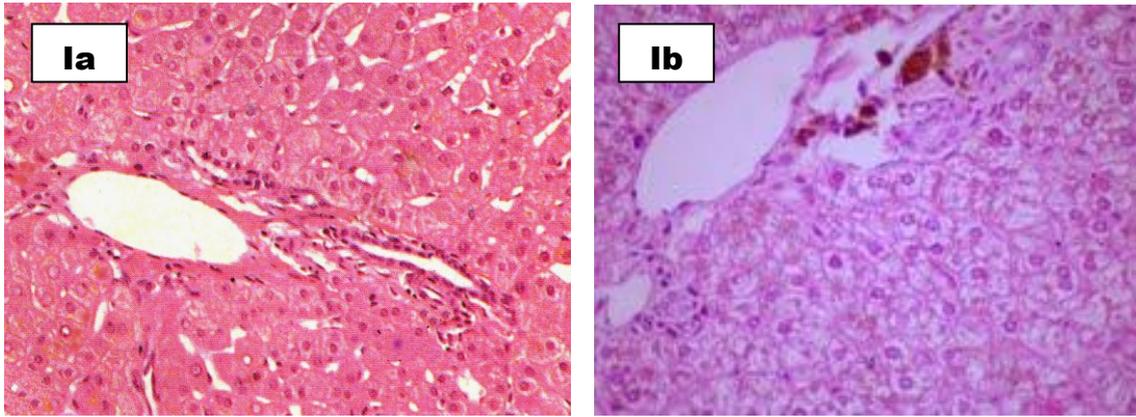


Figura 7: Fotomicrografia de fígado onde se observa presença de hepatócitos com núcleos reativos e típicos (**A**, **B** e **E**), por vezes apresentando alterações regenerativas e formando traves que delimitam sinusóides com manutenção da arquitetura tecidual (***C** e **E**). Os hepatócitos mostram presença de vacúolos claros que por vezes rebatem o núcleo para a periferia (**C seta** e **D**), assumido algumas vezes aspecto apoptótico (**F seta**) com espaços porta apresentando discreto infiltrado linfomononuclear (**C quadrado**) e veias centrolobulares sem alterações (**E**). Os hepatócitos apresentam-se ainda tumefeitos com poucas células inflamatórias no sinusóide e hipertrofia da célula de kupffer (**F cabeça de seta**). As colorações para Tricrômio de Masson e Reticulina não mostraram formação de fibrose ou pontes fibróticas (**G** e **H**). No fígado controle, os hepatócitos são grosseiramente cúbicos, eosinofílicos, citoplasma claro devido grande quantidade de glicogênio, núcleos centrais com membrana nuclear bem definida (**Ib**), o espaço porta com morfologia normal (**Ia**).

5. DISCUSSÃO

Estudos sobre os efeitos lesivos dos organomercuriais nos sistemas biológicos ocorrem a décadas, mas geralmente no sistema nervoso com doses altas e exposição aguda. Avaliações sobre características histopatológicas de sistemas não neurais e características bioquímicas em exposição crônica com baixas doses são relevantes para se observar as alterações primárias.

Os níveis de Hgtotal dos expostos quando comparados com os níveis do controle demonstraram que a concentração de mercúrio total no sangue foi significativa ($P < 0,05$) nos períodos de 60 dias ($P = 0,01$), 90 dias ($P = 0,03$) e 120 dias ($P = 0,0007$), sugerindo que este modelo de exposição pode causar alterações hepáticas devido à detoxificação necessária para biotransformar o mercúrio concentrado.

Neste estudo, a exposição foi de $1,5 \mu\text{g/g}$ e a concentração de Hgtotal no sangue dos expostos ($0,002$ a $7,19 \mu\text{g/L}$) apresentou-se próximo do limite normal de até $3,0 \mu\text{g/L}$ (ANH et al., 2001; BUTLER et al., 2006; WHO, 2008).

As transaminases e a bilirrubina total dos expostos e do controle através do teste estatístico apresentaram $P > 0,05$, ou seja, os testes de função hepática estavam nos limites de normalidade apesar da exposição ao metilmercúrio. Oliveira Ribeiro e colaboradores (2002) sugerem que o aumento no metabolismo lipídico é resposta primária dos hepatócitos frente à agressão por metais pesados, mas que isto pode refletir ou não nos processos fisiológicos destas células.

A análise de correlação de Pearson confirmou a não dependência (relação de causa e efeito) entre AST, ALT e BT e níveis de concentração de Hgtotal ($P > 0,05$) em exposição crônica com dose de $1,5 \mu\text{g/kg/dia}$ de metilmercúrio. Ashour e colaboradores (1993) observaram aumento das transaminases, porém, utilizaram várias concentrações

de mercúrio e as que efetivamente acarretaram alterações das transaminases foram as de 10 e 100 ppm em cultura de hepatócitos de rato em uma exposição subcrônica.

Tan e colaboradores (2009) demonstraram que os efeitos pró oxidante do metilmercúrio geram estresse oxidativo, que indiretamente provoca desordens metabólicas, principalmente lipídicas produzindo a degeneração gordurosa.

A exposição ao metilmercúrio no período de 120 dias ocasionou degeneração gordurosa moderada (esteatose moderada) e degeneração hidrópica no fígado dos macacos expostos, um achado comum em exposição ao metilmercúrio em muitas outras espécies (ASHOUR et al., 1993; CARVAN et al., 2000; ANH et al., 2001; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2002; UNG et al., 2010).

A esteatose é um fator sensibilizante (SILVA & ESCANHOELA, 2009), ocorre como resultado da beta oxidação mitocondrial que conduz ao acúmulo de ácidos graxos na forma de triglicerídeos e formação de gotículas no citosol do hepatócito (FROMENTY & PESSAYRE, 1995).

Este tipo de degeneração ocorre no fígado, mas também nos túbulos renais, miocárdio, pâncreas e cérebro. Lesão semelhante à encontrada neste estudo foi observada por Magno (2009) no miocárdio de *Cebus apella* exposto ao metilmercúrio.

Na histopatologia, também foi observado degeneração hidrópica ou vacuolar, característica mencionada por Silva e Escanhoela (2009) como um estágio secundário à esteatose. A degeneração hidrópica observada nas lâminas dos animais expostos ocorreu em função da não regulação do volume celular, isto relacionado, ao controle das concentrações de sódio (Na⁺) e potássio (K⁺) no citoplasma (HALBACH et al., 1990; MAGOUR et al., 1987; KUMAR et al., 2005). Houve influxo e retenção de Na⁺ no

citoplasma, e efluxo de K^+ . O Na^+ ao atravessar a membrana plasmática carrega água e com isto há um aumento hídrico no citoplasma dos hepatócitos.

A exposição a doses elevadas de MetilHg, que levam a concentrações teciduais elevadas acima do nível de alerta (30 $\mu g/L$) leva a redução da atividade da membrana plasmática e da Na^+ / K^+ ATPase, amplifica a liberação de cálcio (BRUNDER et al., 1988; ABRAMSON & SALAMA, 1989; PRABHU & SALAMA, 1990; BORASO & WILLIAMS, 1994; KUMAR et al., 2005) e provoca disfunção mitocondrial (ATCHISON & HARE, 1994; SHANKER et al., 2005; DREIEM & SEEGAL, 2007).

Os resultados apresentados aqui demonstram que mesmo exposições a baixas doses de metilmercúrio podem levar a eventos patológicos.

6. CONCLUSÕES

Nosso estudo revelou que a hepatotoxicidade por mercúrio pode estar associada a desordens metabólicas dos lipídeos. Os resultados corroboram com a literatura sobre a esteatose ser a resposta primária das células hepáticas frente a lesões por metais.

Os níveis de Hgtotal no sangue dos animais expostos revelaram-se próximo do limite de normalidade.

A ausência de correlação entre os níveis de Hgtotal, transaminases e bilirrubina total sugerem a necessidade de novos estudos para esclarecer o nível de alerta da concentração de mercúrio e das dosagens enzimáticas e bioquímicas hepáticas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABRAMSON, J.J., SALAMA, G. Critical sulfhydryls regulate calcium release from sarcoplasmic reticulum. *J Bioenerg Biomembr.* 21(2):283-94,1989.

AYRES,M. Elementos de Bioestatística- Seiva do Açaizeiro.5 ed.522p., 2011

AKAGI, H., MALM, O. KINJO, Y., HARADA, M., BRANCHES, F. P. J., PFEIFFER, W. C., KATO, H. Methylmercury pollution in Amazon, Brazil. *Sci. Total Environ.* 175: 85-95, 1995.

ALVES, F.R., COSTA, F.B., AROUCHE, M.M.S., BARROS, A.C.E., MIGLINO, M.A., VULCANO, L.C. E GUERRA, P.C. Avaliação ultra-sonográfica do sistema urinário, fígado e útero do macaco-prego, *Cebus apella*. *Pesq. Vet. Bras.* 27(9):377-382, setembro 2007.

ANH, L.L., LOI, V.D., MON, P.G., PHU, N.L., NGOC, D.M., TUY, P.: Determination of lead and mercury in clinical samples during work and accidental exposure in Vietnam. *Anal Sci* 2001, 17:a37-a39.

ARAUJO NETO H, ET ALL. Projeto de avaliação da poluição causada pelo mercúrio na Serra Pelada. Relatório preliminar, fase I. Brasília DNPM/DF, PM,18p, 1987.

ASHOUR, H., ABDEL-RAHMAN, M., KHODAIRB, A. The mechanism of methyl mercury toxicity in isolated rat hepatocytes. *Toxicology Letters*, 69 (1993) 87-96.

ASSIS, GPS, SILVA, CEC, STEFANONA, I, VASSALLO, DV. Effects of small concentrations of mercury on the contractile activity of the rat ventricular myocardium. *Comparative Biochemistry and Physiology* part c 134, 375–383, 2003.

ATCHISON, W. D., HARE, M. F. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity. *FASEB J.* 8: 622-629, 1994.

ATSDR. Toxicologic Profile for Mercury. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry**, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, 2000.

AURICCHIO, P.. **Primatas do Brasil**. São Paulo, Terra Brasilis, 168p, 1995.

- AZEVEDO, F.A. **Toxicologia do mercúrio**. São Paulo: Intertox, 2003.
- BARBOSA, A. C., BOISCHIO, A. A., EAST, G. A., FERRARI, I., GONÇALVEZ, A., SILVA, P. R. M., DA CRUZ, T. M. E. Mercury contamination in the Brazilian Amazon. Environmental and occupational aspects. *Water Air Soil Pollut*, 80: 109-121, 1995.
- BARBOSA, A.C., DE SOUZA, J., DÓREA, J.G., JARDIM, W.F., FADINI, P.S. Mercury Biomagnification in a Tropical Black Water, Rio Negro, Brazil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 235–246, 2003.
- BATES J.A. Abdominal Ultrasound: how, why and when. 2nd ed. **Churchill Livingstone**, London, 2004.
- BERLIN, M. in Handbook on the Toxicology of metals. L. Friberg, G. R. Nordberg and V. B. Vouk, eds. p. 387-445, **Elsevier**, New York, 1986.
- BERLIN, M; GRANT, C.A; HELBERG, J; HELLSTRÖM, J and SCHÜTZ, A: Neurotoxicity of methylmercury in squirrel monkeys. Cerebral cortical pathology, interference with scotopic vision and changes in operant behavior. *Arch. Environ. Health.* 30:340-348, 1975.
- BORASO, A., WILLIAMS, A.J. Modification of the gating of the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-release channel by H₂O₂ and dithiothreitol. *Am J Physiol.* 1994;267(3 Pt 2):H1010-6
- BUDTZ-JORGENSEN,E., GRANDJEAN P., JORGENSEN, P J. WEIHE, P. L. AND KEIDING, N. Association between mercury concentrations in blood and hair in methylmercury-exposed subjects at different ages. *Environmental Research* 95, 385–393, 2004.
- BRABO, E. S., SANTOS, E. D., DE JESUS, I. M., MASCARENHAS, A. F. S., FAIAL, K. D. Mercury contamination of fish and exposures of an indigenous community in Para State, Brazil. *Environ. Res.* 84: 197-203, 2000.

BUFFON (1767) apud FORD, S.M. Systematics of the New World Monkeys. In: **Comparative Primate Biology: Systematics, Evolution and Anatomy**. Vol. 1.

D.R. Swindler & J. Erwin (eds.). Alan R. Liss, inc., New York, 73-145, 1986.

BRUNDER, D.G., DETTBARN, C., PALADE, P. Heavy metal-induced Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 1988, 15;263(35):18785-92.

BUTLER, W.J., HOUSEMAN, J., SEDDON, L., MCMULLEN, E., TOFFLEMIRE, K., MILLS, C., CORRIVEAU, A., WEBER, J.P., LEBLANC, A., WALKER, M., DONALDSON, S.G., VAN OOSTDAM, J.: Maternal and umbilical cord blood levels of mercury, lead, cadmium, and essential trace elements in Arctic Canada. *Environ Res*, 100:295-318, 2006.

CARVAN MJ, DALTON TP, STUART GW, NEBERT DW: Transgenic zebrafish as sentinels for aquatic pollution. *Acad Sci*, 919:133-147, 2000 a.

CARVAN MJ, SOLIS WA, GEDAMU L, NEBERT DW: Activation of transcription factors in zebrafish cell cultures by environmental pollutants. *Arch Biochem Biophys*, 376:320-327, 2000b.

CASTOLDI, A. F., BARNI, S., TURIN, I., GANDINI, C., MANZO, L. Early acute necrosis, delayed apoptosis and cytoskeletal breakdown in cultured cerebellar granule neurons exposed to methylmercury. *J. Neurosc.* Mar 15;59(6):775-87, 2000.

CASTOLDI, A. F., COCCINI, T., CACCATELLI, S., MANZO, L. neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. *Brain Research Bulletin*. 55(2): 197-203, 2001.

CERNICHIARI, E., TORIBARA, T.Y., LIANG, L., MARSH, D.O., BERLIN, M., MYERS, G.J., COX, C., SHAMLAYE, C.F., CHOISY, O., AVIDSON, P.W. The biological monitoring of mercury in the Seychelles study. *Neurotoxicology* 16, 613-628, 1995b.

COSTA, L. G., ASCHENER, M., VITALONE, A., SYVERSEN, T., SOLDIN, O. P. Developmental neuropathology of environmental agents. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44: 87-110, 2004.

CHANG, L. W. Neurotoxic effects of mercury. A review. *Environmental. Research*, v. 14, p. 329-373, 1977.

CLARCKSON, T.W. The pharmacology of mercury compounds. *Annual Review of pharmacology*, 12: 375-405, 1972.

COUNTER, S. A., BUCHANAN, L. H. Mercury exposure in children: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 198, p. 209-230. 2004.

CUNHA, M.E.S; Interação entre Mercúrio e Sistemas Biológicos Dissertação (Doutorado em ciências Biomédicas)-Portugal, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto, 67p, 2008.

DEFLER, T.R. On the ecology and behavior of *Cebus albifrons* in eastern Colombia. *Primates*, Tokyo, 20: 475-502, 1979.

DEFLER, T.R.. **Primates of Colombia**. Bogotá, Conservation International, 550p, 2004.

DEMETRIOU, A.A., BROWN JR., R.S., BUSUTTIL, R.W., FAIR, J., MCGUIRE, B.M. Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure, *Ann. Surg.* 239, 660–667 discussion 667–670, 2004.

DREIEM, A., SEEGAL, R.F. Methylmercury-induced changes in mitochondrial function in striatal synaptosomes are calcium-dependent and ROS-independent. *Neurotoxicology*, 2007;28(4):720-6.

DOREA, J.G., BARBOSA, A.C., SILVA, G. S. Fish mercury bioaccumulation as a function of feeding behavior and hydrological cycles of the Rio Negro, Amazon. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. Vol. 142 (3-4), 2006, 275 – 83.

DREVNICK, PE, ROBERTS, AP, OTTER, RR, HAMMERSCHMIDT, CR., KLAPER, R, ORIS JT. Mercury toxicity in livers of northern pike (*Esox lucius*) from Isle Royale, USA. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C 147 331–338, 2008.

FREESE, C.H. & J.R. OPPENHEIMER. 1981. The capuchin monkeys, genus *Cebus*, p. 331-389. In: A.F. COIMBRA-FILHO & R.A. MITTERMEIER (Ed.). Ecology and behavior of Neotropical primates. Rio de Janeiro, *Academia Brasileira de Ciências*, 496p.

FORD, S. M.; DAVIS, L. C. Systematics and body size: implications for feeding adaptations in New World monkeys. *American Journal of Physical Anthropology*, v. 88, p. 415-468, 1992

FITZGERALD, W. Is mercury increasing in the atmosphere? The need for an atmospheric mercury network (AMNET). *Water, Air and Soil Pollution*, 80 (1): 245-254, 1995.

FRIEDMAN SL The Cellular Basis of Hepatic Fibrosis - Mechanisms and Treatment Strategies. *N. Eng. J. Med.*, 328(24): 1828-35, 1993.

FRIEDMAN SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J. Biol. Chem.*, 275: 2247–50, 2000.

GOYER, RA. Results of lead research: prenatal exposure and neurological consequences. *Environmental Health Perspectives*, Volume 104, Number 10, October 1996.

GONÇALVES, TD. Estudo anatômico descritivo dos órgãos genitais masculinos do macaco prego (*Cebus apella*, Linnaeus 1758). Tese, **Universidade de São Paulo**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Programa de Pós graduação em Anatomia dos Animais Silvestres, 2005.

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

GRANDJEAN, P., CARDOSO, B., GUIMARES, G. Mercury poisoning. *Lancet*. 842: 991, 1993.

GUIMARÃES, G. A. A contaminação do homem e do meio ambiente causado pelo mercúrio nos garimpos de ouro da Amazônia. **IX Ciclo de Estudos de Política e Estratégia promovida pela ADESC/Pa**, 1989.

HALBACH, S. Mercury compounds: Lipophilicity and toxic effects on isolated myocardial tissue. *Arch. Toxicol.* 64, 315-319.

HARADA, M. Minamata disease: organic mercury poisoning caused by ingestion of contaminated fish. In: JELLIFFE, P. E. F., JELLIFFE, D. B. (eds.) **Adverse Effects of Foods**. Plenum Publishing, 1982.

HARADA, M., BASTOS, W. R., KATO, H. Mercury and methylmercury in fish and human hair from the Tapajós river basin, Brazil. *Science Total. Environ.* 175: 141-150, 1995.

HARADA, M. Minamata disease - methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit. Rev. Toxicol.* 25: 1-24,1995.

HENDRY S. H. C., YOSHIOKA T. A neurochemically distinct third channel in the macaque dorsal lateral geniculate nucleus. *Science* 264: 575-577, 1994.

HILL, W.C.H. Comparative Anatomy and Taxonomy, vol. IV – *Cebidae*, part A. *University Press*, Edinburgh, 1960.

HILL AJ, TERAOKA H, HEIDEMAN W, PETERSON RE. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci* 2005, 86:6-19.

HUNTER, D., RUSSELL, E. S. Focal cerebral and cerebellar atrophy in a human subject due to organic mercury compounds. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 17: 235, 1954.

HODGSON, E. A textbook of modern toxicology. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2004.

INSKIP, M. J., PIOTROWSKI, J. K. Review of the health effects of methylmercury. *J. appl. Toxicol.* 5: 113-133, 1985.

IPCS [International Programme on Chemical Safety]. Methylmercury. (**Environmental Health Criteria 101**). Geneva: World Health Organization, 1990.

Kaur, P. , Aschner , M., Syversen T. Glutathione modulation influences methyl mercury induced neurotoxicity in primary cell cultures of neurons and astrocytes. *NeuroToxicology* 27,492–500,2006

KAY, R.F. (1990). The phyletic relationships of extant and fossil Pitheciinae (*Platyrrhini*, *Antropoidea*), *Journal of Human Evolution*, 19: 175-208.

KUMAR, V., ABBAS, A.K., FAUSTO, N. Robbins & Cotran, Patologia: Bases Patológicas das Doenças. 7 ed, elsevier, 2005.

LAWRENCE, G.M., JEPSON, M.A., TRAYER, LP. The compartmentation of glycolytic and gluconeogenic enzymes in rat-kidney and liver and its significance to renal and hepatic-metabolism. *Histochemical Journal* 18, 45-53 (1986).

LACERDA, L. D., MARINS, R. V., SOUZA, C. M. M., RODRIGUES, S., PFEIFFER, W. C., BASTOS, W. C. Mercury dispersal in water, sediments and aquatic biota of gold mining tailing deposit drainage in Pocone. Brazil. *Water Air Soil Pollut*, 55: 283-294, 1991.

LARINI, L. **Toxicologia**. 3ª edição. Editora Manole, 1997. Lei Federal n.º 6.638, de 08 de Maio de 1979.

LEBEL, J., MERGLER, D., BRANCHES, F., LUCOTTE, M., AMORIM, M., LARRIBE, F., DOLBEC, J. Neurotoxic effects of low-level methylmercury contamination in the Amazonian basin. *Environ. Res*, 79: 20-32, 1998.

LIMA, A O, SOARES, J B, GRECO, JB, GALIZZI, J, CANÇADO, JR. Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica- Técnica e Interpretação, 8ªed., Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan**, 2001.

LINDSTROEM, H; LUTHMAN, J; OSKARSSON, A; SENDBERG, J and OLSON, L. Effects of long- term treatment with methylmercury on the developing of rat. *Environmental Research*, 56: 158-165, 1991.

LODENIUS, M., MALM, O. Mercury in the Amazon. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 157: 25-52, 1998.

LUNA, L.G. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3rd edition. McGraw - Hill Book Company, 1967.

MALM, O., PFEIFFER, W. C., SOUZA, C. M. M., REUTHER, R. Mercury pollution due to gold-mining in the Madeira River, Brazil. *Ambio*, 19: 11-15, 1990.

MALM O, BRANCHES FPJ, AKAGI H, CASTRO MB, PFEIFFER WC, HARADA M, BASTOS WR, AND KATO H. Mercury and methylmercury in fish and human hair from the Tapajós river basin, Brazil. *The Science of the Total Environment*. 175: 141-150, (1995b).

MARTINELLI, L. A., FERREIRA, J. R., FORSBERG, B. R., VICTORIA, R. L. Mercury contamination in the Amazon: A gold rush consequence. *Ambio*, 17: 252-254, 1988.

MATSUMURA, T AND THURMAN, R.G. Predominance of glycolysis in pericentral regions of the liver lobule. *European Journal of Biochemistry* **140**, 229-234 (1984).

MAGOUR, S., MASER, H., GREIM, H. The effect of mercury chloride and methylmercury on brain microsomal Na⁺ +K⁺ ATPase after partial delipidation with lubrol. *Pharmacol. Toxicol*, 60,184-186.

MERGLER, D. Behavioral Neurophysiology: Quantitative Measures of Sensory Toxicity. In: CHANG, SILKER (eds.) Neurotoxicology: Approaches and Methods, p. 727-736. **Academic Press**, 1995.

MÖLLER-MADSEN B (1994). Localization of mercury in CNS of the rat. V. Inhalation exposure to metallic. *Arch. Toxicol*. 66:79-89.

MOREIRA, CM, OLIVEIRA, E.M., BONANC, C.D, SARKIS, J.J.F. VASSALLO, D.V. Effects of mercury on myosin ATPase in the ventricular myocardium of the rat. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 135 (2003) 269–275.

MOURA, R. A.; WADA, C. S.; PURCHIO, A.; AMEIDA, T. V. **Técnicas de Laboratório**, 3^a ed, Atheneu, 2002.

NYLAND T.G., Matton J.S., Hergesell E.J. & Wisner E.R. Liver, p.93-127. In: Nyland T.G. (ed.), Small Animal Ultrasound. 2nd ed. Saunders Company, Philadelphia, 2002.

NOWAK, R.M. 1999. **Walker's mammals of the world**. Baltimore, The Johns Hopkins University Press, 1936p.

OGA, S., CARVALHO, M.M.A., BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de Toxicologia**. Atheneu, São Paulo, 3 ed, 2008.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., BELGER, L., PELLETIER, E., ROULEAU, C. Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Environmental Research* 90 (2002) 217–225.

PALHETA, D., TAYLOR, A. Mercury in environmental and biological samples from a gold mining área in the Amazon region of Brazil. *Sci. Total Environ.* 168: 63-69, 1995.

PARTINGTON, B.P., BILLER, D.S. Liver in: GREEN, r.w. Small animal ultrasound. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 105-130, 1996.

PFEIFFER, W. C., LACERDA, L. D. Mercury inputs into the Amazon region, Brazil. *Environ. Technol. Lett.* 9: 325-330, 1988.

PFEIFFER, W. C., LACERDA, L. D., MALM, O., SOUZA, C. M. M., SILVEIRA, E. G., BASTOS, W. R. Mercury concentrations in inland waters of gold-mining areas in Rondonia, Brazil. *Sci. Total Environ.* 87/88: 233-240, 1989.

PFEIFFER, W. C., LACERDA, L. D., SALOMONS, W., MALM, O. Environmental fate of mercury from gold-mining in the Brazilian Amazon. *Environ. Rev.*1: 26-87, 1993.

PFEIFFER, W. C., MALM, O., SOUZA, C. M. M., LACERDA, L. D., SILVEIRA, E. G., BASTOS, W. R. Mercury in Madeira River ecosystem, Rondônia, Brazil. *Forest Ecol. Manag.* 38: 239-245, 1991.

PEIXOTO, N.C., SERAFIM, M.A., FLORES, E.M.M., BEBIANNO, M.J., PEREIRA, M.E. Metallothionein, zinc, and mercury levels in tissues of young rats exposed to zinc and subsequently to Mercury. *Life Sciences* 81 (2007) 1264–1271.

- PRABHU, S.D., SALAMA, G. Heavy metal ions Ag⁺ and Hg²⁺ trigger calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys.*, 15;277(1):47-55,1990
- RICE, D. C. and Gilbert, S. G. Early chronic low-level methylmercury poisoning in monkeys impairs spacial vision. *Science*, vol. 216, 759-76, 1982.
- RICE, D. C., GILBERT, S. G. Effects of developmental exposure to methyl mercury on spatial and temporal visual function in monkeys. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 102, p. 151-163, 1990.
- ROCHA, JBT, PEREIRA, ME, EMANUELLI, T, CHRISTOFARI, RS, SOUZA, D. O. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on δ - aminoleulinic acid dehydrat are (ALE – D) activity in brain, liver, Kidney and blood of suckling rats. *Toxicology*, 100, 27 – 37, 1995.
- RODIER, P. M. Vulnerable periods and processes during central nervous system development. *Environ. Health Pperspect.* 102 (Suppl. 2): 121-24, 1994.
- ROSENBERG, A.L. Systematics: the higher taxa. In: Ecology and Behaviour of Neotropical Primates. Vol 1 (eds: Coimbra-Filho. A.F.: Mittermeier. R.A.) **Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, p. 9-27, 1981.
- ROSENBERG, A.L. (1984). Aspects of the Systematics and evolution of the marmosets. In: A Primatologia no Brasil (ed. M.T. de Mello), *Sociedade Brasileira de Primatologia*, Brasília, pp. 159-180.
- ROSS, M. H.; PAWLINA, W. Histologia - Texto e Atlas: em correlação com a biologia celular e molecular. 5.ed. **Editora Guanabara Koogan**, 2008.

SÁ, A.L.; HERCULANO, M.A.; PINHEIRO, M.C.N.; SILVEIRA, L.C.L.; NASCIMENTO, J.L.M.; CRESPO, M.H.L. Exposição Humana ao Mercúrio na Região Oeste do Estado do Pará. *Revista Paraense de Medicina*20: 5-7. 2006.

SABELAISH & HILME, G. Ocular manifestations of mercury poisoning. *Bull World Health Organ*.53 suppl: 83, 1976.

SAKAMOTO, M , NAKANO, A., KAJIWARA, Y, NARUSE, Y, FUJISAKI, T. Effects of methyl mercury in postnatal developing rats. *Environ. Res*, 61, 43 – 50, 1993.

SCHEUHAMMER, A.M., MEYER, M.W., SANDHEINRICH, M.B., MURRAY, M.W. Effects of environmental methylmercury on the health of wild birds, mammals, and fish. *Ambio* 36, 12–18, 2007.

SEBASTIAN, MM: Role of Pathology in Diagnosis, Chapter 90: pp 1100-1138, *Veterinary Toxicology: Basic & Clinical Principles*, Academic Press, San Diego, USA, February, 2007.

SHANKER, G. , SYVERSEN, T. , ASCHNER, J.L. , ASCHNER, M . Modulatory effect of glutathione status and antioxidants on methylmercury-induced free radical formation in primary cultures of cerebral astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005, 13;137(1-2):11-22.

SCHUPPAN, D., RUEHL, M. SOMASUNDARAM, R, HAN, E. G. Matrix as modulator of hepatic fibrinogenesis. *Seminars in Liver disease*, V. 11, p. 351 – 372, 2001.

SILVA, C.H., ESCANHOELA, C.A.F. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and histological findings, with emphasis on mitochondrial alterations. *Rev. Ciênc. Méd.*, Campinas, 18(5/6):269-279, 2009.

SILVEIRA, L.C. L., LEE, B. B., YAMADA, E. S., KREMERS, J., HUNT, D. M. Retinal ganglion cells responses in a dichromatic primate, *Cebus apella*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v.37, p. 1056, 1996.

STONE, T. J. BUKMAN, T.; NORDIO, P.L.; MCCONNELL, H.M. Spin Labeled biomolecules. *California Communicated*, 1965.

SUSSMAN, R.W. 2000. Primate ecology and social structure: New World monkey. *Needham Heights, Pearson Custom Publishing*, 207p.

TAN, S.W., MEILLER, J.C., MAHAFFEY, K.R.: The endocrine effects of mercury in humans and wildlife. *Crit Rev Toxicol*, 39:228-269, 2009.

TSUBAKI, T.; TAKAHASHI, H. Recent Advances in Minamata Disease Studies: Methylmercury Poisoning in Minamata and Niigata, *Japan Kodansha*, 1986.

TSUKADA S, PARSONS CJ, RIPPE RA. Mechanisms of liver fibrosis. *Clinica Chimica Acta*, 364: 33–60, 2006.

UNG, CY, LAM SH, HLAING M M, WINATA₁ CL, KORZH S, MATHAVAN S and GONG Z. Mercury-induced hepatotoxicity in zebrafish: *invivo* mechanistic insights from transcriptome analysis, phenotype anchoring and targeted gene expression validation. *BMC Genomics*, 11:212, 2010.

U.S.ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA) Mercury study report to congress. EUA, 158p.,1997.

WALDRON, H. A. Did the mad hatter have mercury poisoning? *Br. Med. J.*, v. 287, n. 6409, p. 1961, 1983.

WARFINGE, K; BRUUN, A: Mercury accumulation in the Squirrel monkey eye after mercury vapour exposure. *Toxicology*,107(3):189-200, 1996.

WISSE, E., LUO, D.Z., VERMIJLEN, D. On the function of pit cells, the liver-specific natural killer cells. *Seminars in Liver Disease* 17, 265-286, 1997.

WHO, International Program on Chemical Safety. "Environmental Health Criteria 86: Mercury-Environmental Aspects". **World Health Organization**, Geneva, 1989.

WHO, International Program on Chemical Safety. "Environmental Health Criteria 101: Methylmercury". **World Health Organization**, Geneva, 1990.

WHO, International Program on Chemical Safety. "Environmental Health Criteria: Methylmercury". **World Health Organization**, v. 118, p. 168, Geneva, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) & UNEP Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure, Geneva , Switzerland, 176p, 2008.

ANEXO 1 - PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO

- PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE 100 PPM DE METILMERCÚRIO

Será Pesado 0,01267mg/g de metilmercúrio que será transferido para um balão volumétrico de 100ml e dissolvido em uma solução de tolueno até a marca final de 100ml.

- PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE 1 PPM DE METILMERCÚRIO

Para preparar a solução padrão de metilmercúrio de 1 ppm, irá ser retirado 1 ml da solução padrão de 100 ppm e transferi-la para um outro balão volumétrico para então aferir com uma solução de tolueno até a marca de final de 100ml. Esses padrões serão mantidos acondicionados em embalagens protegidas da luz em ambientes refrigerados, como solução estoque.

- PREPARO DA SOLUÇÃO DE L-CYSTEINA DE 0,01%

Será Pesado 0,01g de em uma balança analítica L-Cysteyna monohidratada em que será dissolvido em uma solução de NAOH01N (Hidróxido de Sódio 01 normal) em um tubo de vidro de 10 ml, aferindo com a solução de NAOH01N até a marca de 10ml.

- PREPARO DA SOLUÇÃO FINAL DE USO

Em um tubo de vidro será transferido com uma pipeta volumétrica 5 ml de L-Cysteina 0,01% e 0,5 ml da solução de 1ppm de padrão de mercúrio , em seguida deverá agitar-se manualmente por 3 minutos (para que a L-Cysteina se ligue ao mercúrio presente na solução padrão), para então ser centrifugado por 3 minutos a uma rotação de 3.500 rpm, após será aspirado o com um sugador o sobrenadante (tolueno).

PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DOS PONTOS DA CURVA A PARTIR DA SOLUÇÃO FINAL DE USO

Os balões serão identificados com os pontos 0, 20, 50 e 100. Em cada balão será acrescentado 200 μl , 500 μl e 1000 μl da solução final de uso respectivamente, e também um ml de água destilada, dois ml de ácido nítrico com perclórico ($\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$) na proporção de 1:1 e 5 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4). Em seguida as soluções serão digeridas em uma chapa aquecedora a uma temperatura de 210 $^\circ\text{C}$, por 30 minutos. Quando as amostras chegarem a temperatura ambiente estas serão aferidas com água destilada até a marca fina de 50 ml dos seus respectivos balões (AKAGI et al., 2004).

ANEXO 2- ITENS E FUNDAMENTO DO EQUIPAMENTO

O equipamento possui uma bomba de diafragma, recipiente de reação, armadilha de gás ácido, armadilha de umidade (banho de gelo), e uma válvula de 4-estágios. Durante sua operação, o vapor elementar gerado pela adição de cloreto estanhoso é circulado via válvula de 4-estágios para homogeneizar a concentração na fase gasosa. A válvula de 4-estágios é então girada 90° para introduzir a fase gasosa toda de uma só vez na célula de foto-absorção. A medição é completada dentro de um minuto por amostra podendo medir até mesmo 0,1 ng de mercúrio com alta precisão (AKAGI et al., 2004).

ANEXO 3 - FÓRMULA PARA CÁLCULO DA CONCENTRACAO DE MERCÚRIO TOTAL

Concentração de mercúrio total na amostra ($\mu\text{g/L}$) =

$(\text{Ps}-\text{Pbl})/(\text{Pstd}-\text{Pbl})$ /peso da amostra (g).

Legenda da fórmula: Ps- padrão da amostra; Pbl- padrão do branco; Pstd- padrão dos pontos das curvas

ANEXO 4 – PROTOCOLOS DE HISTOPATOLOGIA

1. Coloração pelo Método de Hematoxilina e Eosina

a) Reagentes

1. Hematoxilina cristais (5,0g);
2. Alúmen de potássio (100g);
3. Óxido de mercúrio (2,5g);
4. Álcool absoluto (50 ml);
5. Água deionizada (1000 ml).
6. Eosina amarelada (10g);
7. Álcool absoluto (200 ml);
8. Água deionizada (800 ml).

a) Métodos de preparação da hematoxilina:

1. Dissolveu-se a hematoxilina no álcool e o alúmen na água deionizada;
2. Levar ao fogo, porém não ferver a água e o alúmen;
3. Retirar do fogo e misturar as duas soluções em balão apropriado;
4. Levar novamente ao fogo até a ebulição;
5. Retirar do fogo e misturar lentamente o óxido de mercúrio;
6. Levar a mistura novamente ao fogo até adquirir uma cor púrpura;
7. Retirar do fogo e mergulhar imediatamente em banho de água fria.

b) Preparação da eosina

Métodos de preparação:

1. Dissolver a eosina no álcool na água deionizada;
2. Acrescentar o álcool.

d) Procedimento

1. Desparafinar e hidratar
2. Lavar em água corrente 3 a 5 minutos.
3. Hematoxilina de Harris 3 a 5 minutos.
4. Lavar em água corrente 3 a 5 minutos
5. Mergulhar no Ácido clorídrico até cinco vezes.
6. Lavar em água corrente 3 a 5 minutos
7. Eosina 3 a 5 minutos
8. Lavar em água corrente para tirar o excesso de corante.
9. Desidratar
10. Montar com balsamo.

2- Coloração pelo Método de Gomori (PERLS)

a) Reagentes

1. Ácido clorídrico a 20%
2. Ferrocianeto de potássio a 10%

b) Metodologia

1. Desparafinar e hidratar
2. Solução de ferrocianato de potássio – ácido clorídrico por 30 minutos

3. Mergulhar várias vezes em água destilada Coloração de fundo com vermelho rápido por cinco minutos.
4. Mergulhar em água destilada
5. Desidratar em dois alcoóis 95% e dois absolutos e duas passagens no xileno.
6. Montagem em balsamo.

3- Coloração pelo Método de Reticulina

1. Desparafinar e hidratar
2. Permanganato de potássio 1 minuto
3. Alumem férrico 1 minuto
4. Nitrato de prata 3 minutos
5. Pingar formol a 10% 2 minutos
6. Cloreto de ouro 2 minutos

4- Coloração pelo Método de Tricrômico de Masson

1. Desparafinar e hidratar
2. Lavar em água destilada
3. Corar pela hematoxilina férrica 5 minutos
4. Lavar em ácido fosfomolípico 5 minutos
5. Lavar em água destilada
6. Corar pela solução de Masson 5 minutos
7. Água destilada
8. Desidratar e montar em bálsamo.