



Universidade Federal do Pará
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular

Iracina Maura de Jesus

Níveis de mercúrio, prolactina e interleucina 10 em mulheres em idade reprodutiva e puérperas dos municípios de Itaituba e Ananindeua, Pará

Belém-Pará
2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR**

Níveis de mercúrio, prolactina e interleucina 10 em mulheres em idade reprodutiva e puérperas dos municípios de Itaituba e Ananindeua, Pará

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre.

Orientador: Prof^o Dr. Domingos W. Picanço
Diniz

Belém-Pará
2012

Ficha catalográfica

De Jesus, Iracina Maura

Níveis de mercúrio, prolactina e interleucina 10 em mulheres em idade reprodutiva e puérperas dos municípios de Itaituba e Ananindeua, Pará/ Iracina Maura de Jesus. Belém: Universidade Federal do Pará, 2012.

98f.: Il.; 30cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

1. Mercúrio. 2. Prolactina. 3. Interleucina 10. 4. Saúde Pública. I. Universidade Federal do Pará. II. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 616.631. 348

Iracina Maura de Jesus

Níveis de mercúrio, prolactina e interleucina 10 em mulheres em idade reprodutiva e puérperas dos municípios de Itaituba e Ananindeua, Pará

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de mestre.

Orientador: Prof^o Dr. Domingos W. Picanço Diniz

Banca Examinadora:

Prof^o Dr. Domingos W. Picanço Diniz - Orientador
Instituição: Instituto de Ciências Biológicas-UFPA

Prof^o Dr. Cláudio Nahum Alves
Instituição: Instituto de Química-UFPA

Prof^a Dr. Maria da Conceição Nascimento Pinheiro
Instituição: Núcleo de Medicina Tropical-UFPA

Prof^o Dr. Marcelo de Oliveira Lima
Instituição: Instituto Evandro Chagas/SVS-MS

DEDICATÓRIA

Ao amigo Edilson da Silva Brabo (*in memoriam*) por compartilhar a convicção de que, ainda que as circunstâncias nos desafiem, sempre poderemos ir adiante.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua inefável graça.

Aos meus pais, David e Anastácia de Jesus, que sabem expressar amor de muitas formas e aos meus familiares, pelo apoio irrestrito.

Ao Prof^o Dr. Domingos W. Picanço Diniz, pela orientação e apoio.

Ao Instituto Evandro Chagas, na pessoa de sua Diretora, Dra. Elisabeth Santos, por apoiar de várias maneiras a realização deste estudo.

Aos Diretores e funcionários do hospital Menino Jesus (Itaituba), Hospital CLINISA e Hospital Anita Gerosa (ambos em Ananindeua) pela colaboração com este estudo.

Aos Biomédicos MSc. Renato Medeiros, MSc. Walber Victor Pinto e Maria Izabel de Jesus pelo apoio técnico em várias fases do estudo.

À equipe do Laboratório de Toxicologia/Setor de Mercúrio da Seção de Meio Ambiente/IEC, Químicos Dr. Marcelo Lima, Diomar Cavalcante, Érica Nascimento, Jamile Marinho e Clodoaldo Júnior, pelo apoio em etapas analíticas de mercúrio do estudo.

À Técnica em Patologia Clínica Emilene Serra pelo prestimoso auxílio no trabalho de campo, organização dos materiais e suporte laboratorial.

Aos técnicos em pesquisa Edna Cabral, Antonio Carlos Nascimento e Ritângela Santos pela prontidão de ajudar em vários momentos.

Às Sras. Erinete Menezes e Luciana Melo pelo apoio na digitação de dados e também pela amizade.

Aos colegas da Seção de Meio Ambiente/IEC pelo companheirismo de todos os momentos: Fafá Assis, Marluce Moraes, Dorotéa Lobato, Lena Sá, Fernanda Sagica, Kleber Faial, Bruno Carneiro, Rosivaldo Mendes, Kelson Faial, Adaelson Medeiros, Francisco Arimatéia Alves, Vanessa Costa, Samara Pinheiro, Ana Lopes, Cássia Rocha, Sílvia Lacerda e Regiane Costa.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste estudo.

Seja bendito o nome de Deus de eternidade a eternidade porque dele é a sabedoria e o poder.

Livro de Daniel, capítulo 2, versículo 20, Bíblia Sagrada.

RESUMO

Ao mercúrio tem sido atribuída a capacidade de interferir nos sistemas orgânicos imunológico e hormonal, além dos sistemas nervoso e renal frequentemente atingidos por esse agente tóxico. Mulheres em idade fértil ou grávidas constituem um grupo vulnerável a esses efeitos, em relação a si mesmas e seus conceptos. Foi avaliada a exposição ao mercúrio (Hg) e os níveis de prolactina (PRL) e interleucina-10 (IL-10) em 144 mulheres (no pós-parto e cerca de um ano depois) de Itaituba, área sob impacto ambiental do mercúrio e em mulheres de municípios da área metropolitana de Belém, sobretudo Ananindeua, área sem impacto conhecido do mercúrio (156 puérperas e 156 não puérperas). As análises de mercúrio total (Hg-t) em sangue foram feitas por Espectrometria de Absorção Atômica por Vapor Frio. As análises séricas de PRL foram feitas por Ensaio Imunoenzimático com detecção final em fluorescência e as determinações de IL-10 foram realizadas por Ensaio Imunoenzimático de Fase Sólida. Dados demográficos e epidemiológicos foram obtidos através de questionário semi-estruturado. As puérperas de Itaituba apresentaram média de Hg-t, PRL e IL-10 de 13,93 µg/l, 276,20 ng/ml e 39,54 pg/ml, respectivamente. Nas puérperas de Ananindeua as respectivas médias foram 3,67 µg/l, 337,70 ng/ml e 4,90 pg/ml. As mulheres não puérperas de Itaituba apresentaram média de Hg-t de 12,68 µg/l, média de PRL de 30,75 ng/ml e média de IL-10 de 14,20 pg/ml. As médias de Hg-t, PRL e IL-10 das mulheres de Ananindeua foram 2,73 µg/l, 17,07 ng/ml e 1,49 pg/ml, respectivamente. Os níveis de Hg-t, PRL e IL-10 foram maiores em Itaituba ($p < 0,0001$), exceto em relação à PRL das puérperas, maior em Ananindeua. Os níveis semelhantes de Hg-t nas duas avaliações das mulheres de Itaituba ($p = 0,7056$) e a correlação moderada sugerem continuidade da exposição ($r = 0,4736$, $p < 0,0001$). A principal variável preditora dos níveis de mercúrio foi o consumo de peixe nos modelos de regressão múltipla linear e logística. A paridade e os níveis de IL-10 apresentaram associação positiva com a PRL nas puérperas de Itaituba e o peso do recém-nascido e a IL-10, associação positiva com a PRL em puérperas de Ananindeua. A IL-10 apresentou associação negativa com a PRL nas mulheres não puérperas de Itaituba ($p = 0,0270$) e positiva nas mulheres de Ananindeua ($p = 0,0266$). Os níveis de Hg-t estavam associados negativamente com a PRL nas puérperas ($p = 0,0460$) e positivamente com o trabalho em garimpo ($p = 0,0173$) (este também importante para as não puérperas) em Itaituba, segundo os modelos logísticos. A IL-10 esteve associada positivamente à morbidade recente nas puérperas de Itaituba ($p = 0,0210$), negativamente ao consumo de bebida alcoólica ($p = 0,0178$) e positivamente ao trabalho em garimpo nas mulheres não puérperas ($p = 0,0199$). A exposição crônica ao Hg das mulheres de Itaituba, a diferença nos níveis dos fatores imunoendócrinos avaliados em relação às mulheres não expostas e a associação com variáveis epidemiológicas relevantes, sugerem a possibilidade de impactos da exposição no perfil imunoendócrino das mulheres de Itaituba, chamando atenção para a importância da vigilância da saúde dessa população e o possível uso de bioindicadores como a PRL em sua avaliação.

Palavras Chave: mercúrio, prolactina, interleucina 10, gravidez, exposição.

ABSTRACT

The ability of interfering in the immunological and endocrine organic systems has been attributed to the mercury (Hg), besides the nervous and renal systems frequently affected by this toxicant agent. Women in fertile age or pregnant constitute a vulnerable group for those effects, in relation to themselves and their fetus. The mercury exposure was assessed as well as the prolactin (PRL) and interleukin-10 (IL-10) levels in 144 women (in the post-partum and about one year later) of Itaituba, area under environmental Hg impact and in women of the metropolitan area of Belém, most of all from Ananindeua, area without known Hg impact (156 puerperal women and 156 non-puerperal). Total Hg (Hg-t) analyses in whole blood were carried out by Atomic Absorption Spectrometry Cold Vapor. Serum analyses of PRL were made by Enzyme Immunoassay with final detection by fluorescence and IL-10 serum analyses were accomplished by Enzyme Immunoassay of Solid Phase. Demographic and epidemiological data were obtained through semi-structured questionnaire. Puerperal women of Itaituba presented average of Hg-t, PRL and IL-10 of 13.93 µg/l, 276.20 ng/ml and 39.54 pg/ml, respectively. Puerperal women of Ananindeua presented respective Hg-t, PRL and IL-10 averages of 3.76 µg/l, 337.70 ng/ml and 4.90 pg/ml. Non-puerperal women of Itaituba presented Hg-t mean of 12.68 µg/l, PRL mean of 30.75 ng/ml and IL-10 mean of 14.20 pg/ml. Mean of Hg-t, PRL and IL-10 in non-puerperal women from Ananindeua were of 2.73 µg/l, 17.07 ng/ml and 1.49 pg/ml, respectively. Levels of Hg-t, PRL and IL-10 were higher in Itaituba ($p < 0.0001$), except in PRL levels of puerperal women, higher in Ananindeua. Similar Hg levels in women of Itaituba in two assessment ($p = 0.7056$) and positive correlation suggest continuity of exposure ($r = 0.4736$, $p < 0.0001$). The main predictor variable of mercury levels was the fish consumption in the linear and logistic multiple regression models. Parity and IL-10 levels were positively associated with PRL in puerperal women of Itaituba while newborn weight and IL-10 levels presented positive association with PRL in puerperal women of Ananindeua. IL-10 was negatively associated with PRL in non-puerperal women from Itaituba ($p = 0.0270$) and positive association in Ananindeua ($p = 0.0266$). Levels of Hg-t showed negative association with PRL in puerperal women and positive association with working in *garimpo* ($p = 0.0173$) (the last one was also important for non-puerperal women) in Itaituba, according logistic models. IL-10 was positively associated with recent morbidity in puerperal women of Itaituba ($p = 0.0210$), negatively with ingestion of alcoholic beverages ($p = 0.0178$) and positively with working in *garimpo* in non-puerperal women ($p = 0.0199$). The chronic Hg exposure of women from Itaituba, difference among the Hg, PRL and IL-10 levels in exposed women compared with non exposed group and association with relevant epidemiological variables, suggest the possibility of Hg impacts in the women's immunoendocrine system in Itaituba, calling attention for the health surveillance of this population and the possible use of assessment biomarkers as PRL.

Key Words: mercury, prolactin, interleukin 10, pregnancy, exposure.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Localização das áreas de estudo no município de Itaituba e na área metropolitana de Belém (município de Ananindeua) 41
- Figura 2- Concentrações de Hg-t em mulheres de Itaituba (IP-puérperas e INP-não puérperas) e de Ananindeua, Pará, Brasil (AP-puérperas e ANP-não puérperas), com destaque para a média. Anova um critério após transformação logarítmica. 41
- Figura 3- Concentrações de PRL em mulheres de Itaituba (IP-puérperas e INP-não puérperas) e de Ananindeua, Pará, Brasil (AP-puérperas e ANP-não puérperas), com destaque para a média. Anova um critério após transformação logarítmica. 41
- Figura 4- Concentrações de IL-10 em mulheres de Itaituba (IP-puérperas e INP-não puérperas) e de Ananindeua, Pará, Brasil (AP-puérperas e ANP-não puérperas), com destaque para a média. Anova um critério após transformação logarítmica. 42
- Figura 5- Níveis de Hg-t em sangue de acordo com a idade das mulheres puérperas e não puérperas de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil. 43
- Figura 6- Níveis séricos de PRL de acordo com a idade das mulheres puérperas e não puérperas de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil. 44
- Figura 7- Níveis séricos de IL-10 segundo a idade das mulheres puérperas e não puérperas de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil. 45
- Figura 8- Níveis de PRL e IL-10 segundo os teores de Hg-t em sangue de mulheres puérperas dos municípios de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil. 46
- Figura 9- Níveis de PRL e IL-10 de acordo com os teores de Hg-t em sangue de mulheres não puérperas dos municípios de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil. 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Características etárias e reprodutivas das mulheres puérperas dos municípios de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil	50
Tabela 2-	Características etárias e reprodutivas de mulheres não puérperas dos municípios de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil	51
Tabela 3-	Variáveis sócio-econômicas das mulheres puérperas e não puérperas dos municípios de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil	52
Tabela 4-	Variáveis epidemiológicas das mulheres puérperas e não puérperas dos municípios de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil	53
Tabela 5-	Morbidade referida pelas mulheres puérperas de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil	55
Tabela 6-	Morbidade referida pelas mulheres não puérperas de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil	56
Tabela 7-	Comparação entre a morbidade referida e os níveis de Hg-t, PRL e IL-10 nos grupos de mulheres puérperas e não puérperas dos municípios de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil	57
Tabela 8-	Comparação entre mulheres puérperas expostas (Itaituba) e não expostas (Ananindeua) ao Hg quanto às concentrações de Hg-t em sangue e níveis séricos de PRL e IL-10	39
Tabela 9-	Comparação entre mulheres não puérperas expostas (Itaituba) e não expostas (Ananindeua) ao Hg quanto às concentrações de Hg-t em sangue e níveis séricos de PRL e IL-10	40
Tabela 10-	Modelo final de regressão linear <i>Stepwise</i> das variáveis Hg-t, PRL e IL-10 nas mulheres puérperas de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil	59
Tabela 11-	Modelo final de regressão linear <i>Stepwise</i> das variáveis Hg-t, PRL e IL-10 nas mulheres não puérperas de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil	60
Tabela 12-	Modelo de regressão logística múltipla das variáveis Hg-t, PRL e IL-10 ajustado por variáveis sócio-econômicas e epidemiológicas nas mulheres puérperas de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil	62
Tabela 13-	Modelo de regressão logística múltipla das variáveis Hg-t, PRL e IL-10 ajustado por variáveis sócio-econômicas e epidemiológicas nas mulheres não puérperas de Itaituba, Pará, Brasil	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
ALA D- γ	Gama aminolevulinato desidratase
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANA	Anticorpo anti-nuclear
ANoA	Anticorpo anti-nucleolar
BCRF-1	Bam HI C fragment rightward reading frame
CMPP	Cardiomiopatia periparto
CSIF	Fator inibidor da síntese de citocina
CVAAS	Espectrometria de absorção atômica por vapor frio
EBV	Vírus Epstein Barr
EDTA	Etilenodiamino Tetracético
ELFA	Enzyme Linked Fluorescent Assay
EPA	Environmental Protection Agency
Fcy	Fração cristalizável y
GH	Hormônio do crescimento
GHR	Receptor do hormônio do crescimento
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
GSH-Px	Glutationa peroxidase
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HClO ₄	Ácido perclórico
Hg	Mercúrio
HgS	Sulfeto mercúrico
Hg-t	Mercúrio total
HNO ₃	Ácido nítrico
HRP	Horseradish peroxidase
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDESP	Instituto de Desenvolvimento Econômico Social e Ambiental do Pará
IFN γ	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E

IGF1	Fator de crescimento semelhante a Insulina
IgG	Imunoglobulina G
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IPCS	International Programme Chemical Safety
JAK2	Janus Kinase 2
KDa	Kilodalton
LDL-ox	Lactato desidrogenase oxidada
LIF	Fator inibidor de leucemia
LPS	Lipopolissacáride
MAPKS	Mitogen activated protein kinase
MeHg	Metilmercúrio
mg/m ³	Miligrama por metro cúbico
MHC	Major histocompatibility complex
MnSOD	Manganês superóxido dismutase
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
ng/ml	Nanograma por mililitro
NK	Natural killer
NR-15	Norma Regulamentadora 15
pg/ml	Picograma por mililitro
ppm	Parte por milhão
PRF	Fator liberador de prolactina
PRL	Prolactina
PRLR	Receptor de prolactina
ROS	Reactive oxygen species

rpm	Rotações por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
SOCSs	Suppressors of cytokine signalling
STAT	Signal transducer and activator of transcription
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TGF β	Transforming growth factor
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TIDA	Tuberoinfundibular dopamine neurons
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TSH	Thyroid stimulating hormone
Ug/g	Micrograma por grama
ug/l	Micrograma por litro
ug/ml	Micrograma por mililitro
UNEP	United Nations Environment Programme
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
1.1 O MERCÚRIO E SUAS APLICAÇÕES.....	16
1.2 MINERAÇÃO DE OURO COMO FONTE DE MERCÚRIO.....	17
1.3 EXPOSIÇÃO HUMANA ÀS FORMAS QUÍMICAS DE MERCÚRIO.....	18
1.4 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DO MERCÚRIO.....	19
1.5 ASPECTOS CLÍNICOS DA INTOXICAÇÃO POR MERCÚRIO.....	21
1.6 CARACTERÍSTICAS DA PROLACTINA.....	23
1.7 CARACTERÍSTICAS DA INTERLEUCINA-10.....	27
1.8 MERCÚRIO, PROLACTINA E RESPOSTA IMUNE NA GRAVIDEZ.....	29
1.9 OBJETIVOS.....	33
1.9.1 Geral.....	33
1.9.2 Específicos.....	33
2. MÉTODOS	34
2.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	34
2.2 CARACTERIZAÇÃO DOS MUNICÍPIOS DO ESTUDO.....	34
2.3 DESCRIÇÃO DO ESTUDO E CASUÍSTICA.....	37
2.4 PROCEDIMENTOS DE CAMPO.....	38
2.5 ANÁLISES LABORATORIAIS.....	39
2.5.1 Análise de Mercúrio total.....	39
2.5.2 Dosagem de Prolactina.....	40
2.5.3 Dosagem de Interleucina 10.....	41
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
3. RESULTADOS	43

3.1 PERFIL DEMOGRÁFICO E EPIDEMIOLÓGICO.....	43
3.2 NÍVEIS DE Hg-t EM SANGUE, PRL E IL-10 SÉRICAS.....	52
3.3 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE Hg-t, PRL E IL-10 EM RELAÇÃO ÀS VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS, ATRAVÉS DE MODELOS DE REGRESSÃO LINEAR E LOGÍSTICA.....	60
5. DISCUSSÃO.....	66
6. CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS	81
APÊNDICE A – Ficha epidemiológica de mulheres puérperas.....	92
APÊNDICE B - . Ficha epidemiológica de mulheres não puérperas.....	94
APÊNDICE C - . Estatística descritiva dos níveis de Hg-t, PRL e IL-10 em mulheres puérperas de Itaituba e Ananindeua, Pará.....	96
APÊNDICE D - Estatística descritiva dos níveis de Hg-t, PRL e IL-10 em mulheres não puérperas de Itaituba e Ananindeua, Pará.....	97
ANEXO A- Parecer de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisas com seres humanos	98

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Mercúrio e suas aplicações

O mercúrio (Hg) faz parte da composição geológica da terra e sua mobilidade na superfície do planeta depende de processos naturais como o vulcanismo, movimentos dos rios, lagos e oceanos, queima de biomassa, ocorrendo também por processos antropogênicos como a formação de hidrelétricas, queimadas e atividades de mineração. Existem minas de cinábrio (HgS) em algumas regiões do mundo que são importantes fontes naturais do Hg, relacionadas a rochas vulcânicas, veios ou fraturas e em áreas próximas à fontes de águas termais. Os ciclos globais naturais contribuem para o transporte e deposição do mercúrio nos compartimentos ambientais água, ar, solo, sedimento e biota. A contribuição das ações humanas para a distribuição ambiental do mercúrio e seus compostos aumentou de maneira significativa após a revolução industrial (IPCS, 2003).

As formas de mercúrio são geralmente agrupadas em mercúrio elementar, inorgânicas (tais como cloreto mercúrico, cloreto mercurioso e sulfeto mercúrico) e orgânicas (por exemplo, acetato mercúrico, cloreto de metilmercúrio, dimetil mercúrio e acetato fenilmercúrico). O mercúrio elementar ou metálico é o único metal com características líquidas em temperatura ambiente, com aspecto argênteo e inodoro. O uso industrial do mercúrio é bastante diverso, sendo uma das principais a produção de cloro e soda cáustica, em que o Hg é usado como cátodo nas células eletrolíticas. A fabricação de baterias, lâmpadas, interruptores, retificadores, manômetros, barômetros dentre outros produtos, também representam segmentos industriais que dependem do Hg nos seus processos produtivos (ATSDR, 1999). Mesmo na área de saúde, o mercúrio foi usado secularmente para o tratamento de doenças como a sífilis (O'SHEA, 1990). Atualmente, o uso de compostos mercuriais na forma de sal como nitrato, iodeto, cianeto, sulfato e tiocinato, brometo e acetato, são exemplos do seu emprego na conservação de soluções nasais, oftálmicas, vacinas e produtos injetáveis (ATSDR, 1999). Recentes acordos internacionais almejam a redução da produção e uso industrial do mercúrio, para tentar diminuir os níveis de exposição das populações humanas aos seus compostos, propondo o

inventário sobre as fontes e formas de emissão do Hg nos países e estratégias de redução ou eliminação da sua utilização (UNEP, 2011).

1.2. Mineração de Ouro como Fonte de Mercúrio

Enquanto em países industrializados, o mercúrio está relacionado ao uso industrial e combustíveis fósseis (carvão mineral, por exemplo), nos países em desenvolvimento ele ainda é muito utilizado na mineração artesanal para a extração de ouro, em vários continentes, sobretudo na África, Ásia e América do Sul (PNUMA, 2005). Vários países da Pan-Amazônia realizam esse tipo de mineração também chamada de garimpagem, incluindo o Brasil, Venezuela, Colômbia, Bolívia, Guiana Francesa, Suriname, Equador e Peru e alguns contribuem de forma importante para a produção mundial (VEIGA *et al.*, 2005). PFEIFFER *et al.* (1988), destacam a necessidade da utilização de mercúrio para recuperação de ouro no processo de amalgamação, devido ao fato de que nos depósitos de ouro secundário as partículas possuem fina granulação. No processo de mineração, as vias de liberação do mercúrio para o ambiente dependem da forma como o processo é executado e alguns autores descrevem os tipos de garimpagem de balsa e baixão como emissores de resíduos sólidos para os solos e rios e o processo de queima do amálgama ouro-mercúrio como a fonte de liberação atmosférica (LACERDA, 1990; LODENIUS e MALM, 1998). A re-queima do ouro em garimpos ou centros urbanos que comercializam o metal também contribui para a emissão atmosférica de Hg (SILVA *et al.*, 1996; CÂMARA *et al.*, 1997). Os garimpos de moinho, em que o minério de ouro é extraído com o uso de explosivos e depois é conduzido a centros de processamento para amalgamação e queima, também são praticados em países sul-americanos como a Venezuela (VEIGA *et al.*, 2005).

1.3. Exposição Humana às Formas Químicas do Mercúrio

As populações humanas podem estar expostas às diferentes formas do Hg. O mercúrio orgânico é representado principalmente pelo metilmercúrio (MeHg) e a exposição pode ocorrer devido a ingestão de alimentos contendo esse composto mercurial. Essa forma de mercúrio pode afetar os níveis tróficos da cadeia alimentar nos ecossistemas aquáticos, através dos processos de bioacumulação (absorção e acumulação do composto pelo organismo) e biomagnificação (aumento da concentração do composto ao longo da cadeia alimentar), atingindo as comunidades humanas que se alimentam de pescado ou de outros alimentos marinhos ou lacustres que apresentam o mercúrio (WHO, 1990). Na Amazônia brasileira, diversos estudos como de BOISCHIO e CERNICHIARI (1998), PINHEIRO *et al.* (2000), SANTOS *et al.* (2000) e FAIAL *et al.* (2005) tem demonstrado níveis elevados de exposição em ribeirinhos, inclusive indígenas, que têm no pescado a principal fonte proteica e em alguns casos esses teores alterados tem sido encontrados em áreas distantes de fontes antropogênicas de mercúrio. A exposição pré e pós natal tem sido avaliada considerando também a possível contribuição de outras vias de exposição ao mercúrio, como é o caso das vacinas contendo mercúrio na fórmula do preservante (MARQUES *et al.*, 2008). A legislação brasileira considera como limites referentes à presença de mercúrio em peixes não predadores 0,5 µg/g (ppm) e em peixes predadores 1,0 µg/g (BRASIL, 1999).

A exposição às formas inorgânica e elementar ocorre principalmente por exposição ocupacional de trabalhadores industriais e mineradores. Na mineração de ouro, o mercúrio é manipulado diretamente e também ocorre a queima do amálgama ouro-mercúrio. Assim, a exposição desses trabalhadores se dá principalmente pelas vias respiratória, cutânea, ocular e eventualmente, digestiva. Contudo, a exposição ao Hg na forma elementar é, sobretudo, pela via respiratória (CÂMARA, 1992; ATSDR, 1999). A NR-15 da Portaria 3214 da legislação brasileira estabelece como limite de exposição ocupacional a concentração atmosférica de 0,04 mg/m³ de Hg (BRASIL, 1978). A exposição ambiental aos vapores de Hg nas proximidades de fontes de emissão também pode atingir indivíduos da comunidade em área urbana ou adjacências de garimpos (CAMARA *et al.*, 1996). A liberação de vapor de mercúrio a partir de superfícies de restaurações dentárias também tem sido

considerada uma forma de exposição ao Hg elementar, embora geralmente não ultrapassem os limites de exposição, podendo se aproximar destes em caso de mastigação excessiva (CLARKSON, 2002).

1.4. Aspectos Toxicológicos do Mercúrio

A toxicocinética do mercúrio no organismo exposto é dependente da sua forma química. Cerca de 80% do mercúrio inalado é absorvido pelos pulmões e a absorção pelo trato gastro intestinal é muito pequena (aproximadamente 0,01%). Isso ocorreria devido à conversão para a forma divalente do Hg e a sua ligação com os grupos sulfidríla. A via dérmica contribui em menor escala para a quantidade de Hg absorvido (cerca de 2,6%) e junto com o que foi absorvido pela via inalatória, comporia a totalidade do Hg elementar ou vapor de Hg introduzido no organismo (IPCS, 2003). A absorção pulmonar do mercúrio inorgânico (sais de mercúrio) é baixa, podendo ter maior importância a via dérmica e a digestiva. A distribuição do Hg elementar é facilitada por sua afinidade lipofílica e nos pulmões e eritrócitos (e no fígado e cérebro, segundo alguns estudos) ocorre a oxidação para as forma divalentes, que podem ser difundíveis ou não (ATSDR, 1999). A concentração de Hg nos eritrócitos pode ser duas vezes a do plasma e neste, os íons mercúricos formam complexos com a albumina e globulina, predominando as formas não difundíveis. No interior das células, a oxidação é catalizada pela enzima catalase, havendo produção de peróxido de hidrogênio (CLARKSON, 2002).

Em solução, o Hg elementar é capaz de cruzar as barreiras hematoencefálica e placentária. Áreas alvo do sistema nervoso seriam o neocórtex, núcleos basais e neurônios cerebelares de Purkinje, podendo também se acumular em diversos tipos celulares das raízes ganglionares dorsais. A distribuição do Hg elementar para o cérebro é mais lenta do que para os outros órgãos, porém nesse a deposição é mais duradoura e, junto com os rins, são os principais órgãos de deposição dessa forma de Hg. Contudo, outros órgãos como pulmão, fígado e baço também podem conter quantidades de Hg detectáveis. Embora a forma inorgânica do mercúrio tenha menor capacidade de atravessar as barreiras orgânicas do que o Hg elementar, devido a sua pouca lipossolubilidade, esses compostos tendem a se acumular no

fígado e nos rins. A meia vida do Hg no sangue é de cerca de 3 dias, refletindo exposição recente (IPCS, 2003). A urina é uma das principais vias de eliminação do Hg elementar, por isso é muito utilizada para o biomonitoramento da exposição, sendo as fezes a outra via de maior importância (CLARKSON, 2002). O suor, a saliva e o ar expirado também constituem meios de saída do Hg do organismo. Em populações assintomáticas os níveis de Hg podem ser de até 10 µg/l (5 µg/l ajustado pela creatinina) (IPCS, 2003).

O mercúrio orgânico, mais relacionado à exposição ambiental, possui alta toxicidade, por ser facilmente absorvido pelo organismo, especialmente pelo trato gastrointestinal, em taxas que podem ser de cerca de 95%, se for através da ingestão de peixe. Aproximadamente 5% do MeHg absorvido é encontrado no sangue e cerca de 10% se deposita no cérebro. Os eritrócitos podem apresentar quantidades 20 vezes maiores que a do plasma e a concentração em cabelo pode ser 250 vezes maior que encontrada no sangue (CLARKSON, 2002), por isso o cabelo é uma matriz biológica importante para avaliação de populações expostas ao MeHg, junto com o sangue. O MeHg atravessa também as barreiras hematoencefálica e placentária e os níveis de MeHg em sangue de cordão umbilical podem ser bem maiores que o encontrado no sangue materno (SAKAMOTO *et al*, 2007; SANTOS *et al.*, 2007) e no cérebro fetal podem ser 5-7 vezes maior que o teor presente no sangue materno (CLARKSON *et al.*, 2002).

A demetilação ocorre principalmente na flora intestinal e limitadamente, em células fagocíticas e isso também contribui para o acúmulo de formas inorgânicas de Hg, que no cérebro, estariam em formas insolúveis ligadas ao selênio. A taxa de eliminação pela urina (10%) é pouco representativa em relação às fezes e ao movimento do mercúrio no ciclo enterohepático (responsável pelo retorno do Hg à corrente sanguínea), sendo que, a principal forma de eliminação do MeHg decorre da demetilação e excreção fecal de formas inorgânicas do Hg. A meia vida de eliminação do MeHg pode variar de 45 a 70 dias e alguns autores consideram em média 60 dias (WHO, 1990). Um estudo recente recalculou a meia vida de Hg-t como sendo 57 dias para o sangue e 64 dias para o cabelo, a partir de indivíduos japoneses expostos pelo consumo de peixe (YAGINUMA-SAKURAI *et al.*, 2012). Os complexos do MeHg são solúveis em água e se formam pela sua ligação aos grupamentos aromáticos tiol. O MeHg penetra no endotélio da barreira hematoencefálica pela formação de um complexo específico do metilmercúrio com a

L-cisteína, com uma estrutura semelhante ao do aminoácido L-metionina, utilizando transportador trans-membrana deste aminoácido (CLARKSON, 2002).

Em populações consideradas não expostas ao MeHg os níveis de Hg total em cabelo esperados são até 2 µg/g (WHO, 1990) e mais recentemente tem sido utilizado o nível de 10 µg/g para avaliação da magnitude da exposição em populações expostas na Amazônia (PINHEIRO *et al.*, 2008; BARBIERI e GARDON, 2009, GROTTTO *et al.*, 2010). Em sangue, o valor limítrofe de exposição ao Hg é de 8 µg/l (WHO, 1990), sendo que a Agência Americana de Proteção Ambiental – EPA, considera como limite seguro de exposição para adultos 5,8 µg/l e para grávidas 3,5 µg/l (MIRANDA *et al.*, 2011).

1.5. Aspectos clínicos da Intoxicação por Mercúrio

A intoxicação aguda pelo vapor de mercúrio pode se manifestar em 3 fases distintas, segundo CLARKSON (2002). Inicialmente, pode se apresentar semelhante a um quadro gripal por cerca de três dias, depois haverá sinais de toxicidade pulmonar (dispnéia, inflamação pulmonar, pneumonite química e dores torácicas) e por último tremor, gosto metálico, gengivoestomatite e eretismo, que envolve alterações psíquicas como irritabilidade, melancolia, depressão, timidez, ansiedade, indecisão, dificuldade de concentração, insônia e embotamento intelectual. A diminuição do desempenho cognitivo e motor tem sido observada em trabalhadores expostos a vapor de mercúrio na mineração de ouro (VEIGA *et al.*, 2005). A intoxicação crônica leva também a sintomatologias como fadiga e cefaléia, labilidade emocional, polineuropatia (parestesia, alterações de reflexos tendinosos, perdas sensoriais em luva e bota, diminuição da velocidade de condução nervosa sensorial e motora), alterações visuais e auditivas. Alterações cardiovasculares com aumento da pressão arterial e palpitações podem ocorrer, bem como disfunções renais com proteinúria (IPCS, 2003). O quadro crônico de exposição caracteriza uma síndrome denominada Síndrome Astênico-Vegetativa, composta por neurastenia, hipertrofia de tireóide, taquicardia, dermatografismo, gengivite, alterações hematopoiéticas e aumento da eliminação urinária de Hg (WHO, 1991).

Na intoxicação por mercúrio orgânico, o Sistema Nervoso Central constitui-se o principal órgão alvo, havendo sinais clínicos que indicam a injúria, tais como, ataxia cerebelar, parestesia, disartria, constrição do campo visual e perda auditiva, que são decorrentes de áreas anatômicas do cérebro, especificamente atingidas (CLARKSON, 2002). Os efeitos adversos dependem do tempo de exposição e das concentrações presentes nos órgãos afetados. Além do SNC, o MeHg pode produzir alterações nos sistema renal e gastrointestinal (WHO, 1990).

Graves incidentes com intoxicação por metilmercúrio ocorreram no século vinte, como o incidente do Iraque, em 1971-1972, em que populações rurais consumiram pão feito em casa, a partir de sementes de trigo que haviam sido tratadas com compostos orgânicos mercuriais anti-fúngicos e tiveram agudas manifestações da intoxicação. Os sinais e sintomas foram observados após um a dois meses da exposição, porém a latência em alguns casos variou de 15 a 100 dias. As manifestações clínicas variaram de alterações sensoriais, acompanhadas ou não por sinais cerebelares até ataxia total, perda visual e auditiva, mutismo acinético e coma. Casos de retardo mental, surdez, cegueira, atraso no desenvolvimento da fala e no desenvolvimento motor foram observados em crianças, bem como houve casos de aborto. Os níveis de Hg em sangue estavam mais elevados em crianças do que em adultos e todas as crianças com níveis de Hg-t acima de 3000 ng/ml (o mesmo que 3000 µg/l) foram gravemente afetadas. As 3 rotas principais de exposição foram o consumo do pão contaminado, a transmissão transplacentária e a amamentação (BAKIR *et al.*, 1980).

Diferente do caso do Iraque, o incidente de Minamata, Japão, ocorrido quase duas décadas antes (1956), caracterizou-se pela exposição crônica ao metilmercúrio, tornando-se um dos incidentes ambientais relacionados a poluição industrial mais conhecidos na literatura, causado pelo consumo de peixe e frutos do mar contaminados por metilmercúrio, a partir dos resíduos gerados por uma indústria de acetaldeído, que os lançava na Baía de Minamata. HARADA (1972) relatou que os pacientes da inicialmente misteriosa doença de Minamata, apresentaram sintomatologia variada, destacando-se paralisia de movimentos, desordem da fala, distúrbios sensoriais, visuais e auditivos, alterações de reflexos, rigidez muscular, tremores, convulsões (crianças), cefaléia, insônia e alterações psiquiátricas. A exposição contínua de mulheres em idade fértil levou ao aparecimento da forma congênita da doença de Minamata, devido à transferência placentária do mercúrio

orgânico ao feto e acumulação do agente nos tecidos do concepto, prejudicando o desenvolvimento embrionário e fetal, levando a danos cerebrais e interferindo na migração de neurônios para as áreas corticais periféricas (HARADA, 1972; RICE e BARONE Jr, 2000; CARPENTER, 2001). PABELLO e LAWRENCE (2006) referem que os efeitos induzidos no SNC pelo mercúrio parecem envolver mecanismos de apoptose neuronal ou necrose, alteração da homeostase do cálcio, produção de espécies reativas de oxigênio e alterações de sistemas de neurotransmissores. Os compostos mercuriais também tem sido associados a alterações nos sistemas imunológico e hormonal, aumentando a susceptibilidade a doenças auto-imune e infecções (IPCS, 2003; CARTA *et al.*, 2003; LUCHINI *et al.*, 2003; SILBERGELD, 2005), possibilitando ainda danos genotóxicos em populações expostas (CRESPO-LOPÉZ *et al.*, 2011).

Dois estudos de coorte em mulheres grávidas e recém-nascidos avaliaram possíveis impactos do consumo de alimentos marinhos contendo Hg em dois arquipélagos, Ilhas Faroe no Atlântico Norte e Ilhas Seychelles, no oceano Índico, com resultados diferentes em relação aos impactos da exposição ao MeHg. Nas ilhas Faroe, além da exposição ao Hg e um elevado consumo de mamíferos marinhos (como as baleias – piloto), também havia exposição a poluentes orgânicos persistentes como os bifenil policlorados - PCB, havendo indícios de efeitos adversos ao desenvolvimento das crianças (GRANDJEAN *et al.*, 2010). Nas Ilhas Seychelles, os níveis de exposição eram menores e não foram evidenciados efeitos adversos no desenvolvimento das crianças, mesmo no seguimento da população por mais de uma década (DAVIDSON *et al.*, 2010).

1.6. Características da Prolactina

A prolactina (PRL) é um polipeptídeo secretado principalmente por células mamotróficas ou lactotrofos, encontradas em grande quantidade na hipófise anterior, aumentando em número no período da gravidez, sob ação dos estrogênios. No genoma humano, um gene encontrado no cromossomo 6 codifica a prolactina, apresentando 10 kb em tamanho, composto por 5 exons e 4 introns. A forma predominante da prolactina, com 23 kDa é encontrada na hipófise, porém, formas

variantes do hormônio tem sido caracterizado em muitos mamíferos (FREEMAN *et al.*, 2000; GERLO *et al.*, 2006). As três maiores variantes que podem estar presente no sangue são a forma monomérica de 23 kDa (monoPRL), a chamada *big* prolactina de 48-56 kDa (bigPRL) e a forma *big big* PRL de 150-204 kDa (macroPRL) e embora existam controvérsias, uma alta concentração de macroprolactina pode estar associada a sintomas de hiperprolactinemia como galactorréia, irregularidade no ciclo menstrual e infertilidade (McCUDDEN *et al.*, 2010).

O hipotálamo exerce o controle inibitório tônico da PRL através dos sistemas dopaminérgicos hipotalâmicos e a influência inibitória ocorre principalmente via subsistema túbero infundibular – TIDA (BEN-JONATHAN e HNASKO, 2001). A PRL é liberada intensamente sob a ação de antagonistas da dopamina, tais como os agentes antipsicóticos e a sua liberação é suprimida pela ação de agonistas da dopamina, como é o caso da bromocriptina, utilizada para tratamento de acromegalia, doença de Parkinson, galactorréia e prolactinoma (este último é um tumor hipofisário que secreta PRL). A liberação da PRL é promovida principalmente pela sucção. No momento do parto, os níveis de PRL estão aumentados, iniciando a lactação e a sucção é o estímulo necessário para a secreção reflexa da PRL. Também é importante o papel do fator de liberação da prolactina (PRF – *Prolactin Releasing Factor*) produzido no hipotálamo, que pode ter sua secreção estimulada a partir dos reflexos neurais desencadeados na mama (FREEMAN *et al.*, 2000). Além disso, os estrogênios também contribuem para o aumento da secreção da PRL e da proliferação dos lactotrofos, sendo importante a liberação de um neuropeptídeo chamado galanina por um subgrupo de lactotrofos que atuaria como regulador da liberação da PRL e fator de crescimento para o lactotrofo (WYNICK *et al.*, 1998). NEVILLE *et al.* (2002) destacam que a PRL é co-responsável pela proliferação e diferenciação do tecido mamário durante a gravidez, inibindo a liberação de gonadotropina e ou a resposta dos ovários a esses hormônios, sendo um dos motivos de geralmente não ocorrer ovulação durante a amamentação, sendo uma espécie de mecanismo contraceptivo natural.

Embora seja um hormônio associado nominalmente com a lactação, são atualmente reconhecidas mais de 300 atividades biológicas diferentes de sua ação primariamente conhecida. GOFFIN *et al.* (2002) referem que além de suas funções no processo reprodutivo, a prolactina está associada a manutenção da homeostase

através da regulação do sistema imunológico, osmoregulação e angiogênese. Como mediador da resposta neuroendócrina e imunológica, a prolactina atua na regulação da resposta imune humoral e celular em estados fisiológicos e patológicos, como no caso de doenças auto-imune. A prolactina estimula a mitogênese de linfócitos T normais e em linhagens de linfoma. Os efeitos da prolactina nos linfócitos pode envolver a interleucina 2 (IL-2), uma vez que a ativação do linfócito T pela IL-2 necessita da prolactina.

Na osmoregulação, a prolactina estimula o transporte de solutos através da membrana de células epiteliais mamárias, sendo responsável também pelo transporte de fluidos, sódio, cloro e cálcio através das membranas de células epiteliais intestinais. Nos rins, a prolactina atua no túbulo contorcido proximal, promovendo a retenção de sódio, potássio e água. Na angiogênese, fragmentos de prolactina nativa são capazes de inibir o desenvolvimento de vasos sanguíneos, sendo uma possibilidade de uso terapêutico como inibidor local da proliferação de tumores (FREEMAN *et al.*, 2000). Recentemente, tem sido discutido um possível papel da PRL nas patologias cutâneas como psoríase, alopecia e dermatoses relacionadas ao estresse, para identificar potenciais alvos terapêuticos, considerando-se que a pele constitui-se um órgão-alvo de expressão dos receptores de prolactina, embora não clássico, por ser um derivado epidérmico como a glândula mamária (FOITZIK *et al.*, 2008). Isto tem sido apoiado por descobertas do papel regulador da Prl na transcrição e produção de queratina nos folículos capilares humanos (RAMOT *et al.*, 2010). A hiperprolactinemia tem sido considerada fator de risco para o desenvolvimento de doenças autoimune como lúpus eritematoso sistêmico e doença reumática. Os efeitos pleiotrópicos da PRL no sistema imune estimulariam tanto a resposta humoral quanto a celular, porém seu efeito na apresentação de antígenos e na interação dos Linfócitos T e B resultariam no aumento da resposta a auto antígenos apresentados pelo complexo de histocompatibilidade principal – MHC (*Major Histocompatibility Complex*), levando a perda da auto-tolerância (ZEN *et al.*, 2010).

O receptor celular da PRL é do tipo citocina e apresenta os domínios extracelular, transmembrana e intracitoplasmático. O gene do receptor de PRL (PRLR) está localizado no cromossomo 5, próximo ao receptor do hormônio do crescimento- GH (GHR). O PRLR pertence à sub-família I dos receptores tipo citocina que inclui GH, leptina, algumas interleucinas, eritropoetina e Fator Inibidor

de Leucemia. Os receptores são divididos em tipo I e tipo II em função da apresentação conservada do domínio extracelular. A molécula de PRL liga-se a duas do receptor e este se dimeriza, ativando a via de tirosinas cinase da família Janus - JAK2 (*Janus Family Tyrosina Kinase*), que fosforila o receptor e se autofosforila em várias tirosinas. Estas formam sítios de ligação para outras proteínas sinalizadoras, dentre as quais as tradutoras de sinal e ativadores de transcrição - STATs 1 a 5 (*Signal Transducers and Activators of Transcription*), que são fatores de transcrição citoplasmáticos latentes. As STATs são fosforiladas pela JAK-2, após a ligação ao complexo receptor e posteriormente estas se separam desse complexo, se homodimerizam ou heterodimerizam com outras STATs, migrando para o núcleo para ativar a transcrição gênica. A desativação do sistema JAK-STAT ocorre pela degradação dos receptores, defosforilação das tirosinas presentes nos receptores JAK-2 e síntese de supressores de sinalização de citocinas - SOCSs (*Supressors of Cytokine-Signaling*). A ativação constitutiva desse sistema está associada com transformação celular (GOFFIN e KELLY, 1997; GOFFIN *et al.*, 2002; BEN-JONATHAN *et al.*, 2007) e o grande aumento da expressão do receptor de PRL - PRLR em tumores ovarianos e endometriais indicam um papel crítico para a PRL no crescimento e manutenção tumoral (LEVINA *et al.*, 2009).

A secreção de prolactina, ocorre de forma pulsátil, em ritmo circadiano, aumentando durante a noite. Situações de estresse físico, tensão mental, medo, infecção, traumatismo, hipoglicemia induzida por insulina, são exemplos de condições que estimulam a secreção de prolactina. A hiperprolactinemia é reconhecida como causa de infertilidade e pode ocorrer por causas primárias, como a presença de tumores hipofisários e hiperprolactinemia secundária, associada a hipertireoidismo e insuficiência renal e ainda por causas iatrogênicas, como o uso de medicamentos tais como antidepressivos e tranqüilizantes (ALLOLIO *et al.*, 1987; SERRI *et al.*, 2003). Os valores esperados para mulheres em idade fértil, não grávidas, situam-se entre 5 a 35 ng/ml (SAPIN e SIMON, 2001).

JAFFER *et al.* (1973), FUJIMOTO *et al.* (1990), EL SHEIKH *et al.* (1994) referem que os níveis circulantes de prolactina não sofrem alterações evidentes durante o ciclo menstrual em mulheres, diferente do que ocorre em roedores, em que há um incremento pré-ovulatório no ciclo estral. Contudo, isso não altera a possibilidade da PRL afetar as funções ovarianas, uma vez que os ovários

produzem sua própria PRL, que tem uma alta expressão na glândula em pré-menopausa em relação à pós-menopausa. A PRL também já foi encontrada no fluido folicular humano e níveis elevados de PRL foram correlacionados com o sucesso na fertilização in vitro, bem como a PRL foi considerada um fator de sobrevivência contra apoptose em células granulosas (LAUFER *et al.*, 1984; SCHWARZLER *et al.* 1997; MENDOZA *et al.*, 2002). Outros estudos encontraram elevação da prolactina no meio do ciclo menstrual em mulheres normais, com uma média de PRL maior na fase luteínica do que na fase folicular (XIAO *et al.*, 1985) e sugerem uma possível ação luteotrófica da PRL no ciclo ovulatório (PANSINI *et al.*, 1987). A relação da PRL com o estradiol não é direta, porém, embora a influência de diferentes concentrações deste hormônio com a PRL durante o ciclo menstrual não seja demonstrável, altas doses orais de estradiol levaram ao aumento dos níveis de estradiol e de PRL em mulheres na pós-menopausa (ROELFSEMA *et al.*, 2012).

A influência da PRL para as alterações cardiovasculares de mulheres tem sido levantada em relação a mulheres em idade fértil e na menopausa. A cardiomiopatia periparto é uma cardiomiopatia dilatada em que a PRL parece estar envolvida, uma vez que o uso de antagonista como a bromocriptina está relacionado à melhoria prognóstica (LOK *et al.*, 2011). Na menopausa, estudos de seguimento de mulheres têm encontrado associação significativa da PRL com o desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica e com possível aceleração do processo de arteriosclerose (ZHANG *et al.*, 2010; GEORGIPOULOS *et al.*, 2010).

1.7. Características da Interleucina 10

A Interleucina 10 (IL-10) é uma citocina que se comporta em solução como homodímero, com massa de 37 kDa, com cada monodímero consistindo de 160 aminoácidos. Possui uma estrutura em domínio globular com 4 hélices e se liga a um receptor de citocinas tipo II. O gene da IL-10 humana está localizado no cromossomo 1 e codifica 5 exons (5,1 kb). A IL-10 de murino apresenta uma homologia com a IL -10 humana de cerca de 80%, existindo vários homólogos virais de IL-10, dentre os quais o homólogo relacionado ao Virus Epstein-Barr - EBV (BCRF1) é um dos mais estudados. A IL-10, denominada inicialmente de Fator

Inibidor da Síntese de Citocina (CSIF), é produzida principalmente por macrófagos, embora Linfócitos T e células não linfóides, como os queratinócitos, possam produzi-la (ASADULLAH *et al.*, 2003). A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que regula a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células Th1 - T *helper* 1 e macrófagos, contribuindo para a resposta imune do tipo Th2 – T *helper* 2 (ZEN *et al.*, 2010).

MOORE *et al.* (2001) refere que a IL-10 inibe a ativação e função efetora de células T, monócitos e macrófagos, inibindo a síntese das citocinas IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, Fator de Necrose Tumoral e Interferon gama (IFN γ). Além disso, a IL-10 regula o crescimento e ou a diferenciação de células B, células Natural Killer (NK), células T citotóxica e helper, granulócitos, células dendríticas, queratinócitos e células endoteliais. A proliferação de Células B induzida por EBV parece estar relacionada com a produção de IL-10 pelas células infectadas (BURDIN *et al.*, 1993). A função principal da IL-10 parece estar relacionada com a limitação e o término da resposta inflamatória. Os macrófagos são estimulados a produzir IL-10 pela ação de fatores endógenos e exógenos, como endotoxinas, TNF- α , catecolaminas e drogas que elevam o AMP cíclico (AMPc). ASADULLAH *et al.* (2003) relaciona o estresse e seu importante papel na regulação da expressão da IL-10 no vivo, além da inflamação do SNC por trauma, cirurgia e aumento da pressão intra-craniana. A estimulação do eixo do estresse por endotoxemia ou bacteriemia, leva a liberação de catecolaminas e estas atuam como regulação ascendente (*up* regulação) da produção de IL-10 pelos macrófagos, especialmente do fígado.

A participação da IL-10 como regulação da resposta imune tem sido estudada, inclusive em relação à indução de auto-imunidade sistêmica por metais pesados em que ratos geneticamente resistentes mostraram grande aumento na expressão de mRNA da IL-10 na indução e manifestação da autoimunidade sistêmica no modelo proposto por HAGGQVIST e HULTMAN (2005). Essa interleucina também pode ser um agente terapêutico potencial, devido às suas ações imunomoduladoras tendo sido testada (como IL-10 recombinante) por ASADULLAH *et al.* (2003) em voluntários saudáveis e pacientes com doença de Crohn, artrite reumatóide, psoríase e hepatite C. Sob determinados estímulos mitogênicos como o uso de lipopolissacáride em culturas de células, a prolactina pode estimular a produção de IL-10 (MATALKA *et al.*, 2003). A média esperada de concentração no plasma normal é de $2,5 \pm 3,2$ pg/ml, variando de 0 a 112 pg/ml (DE GROOTE *et al.*, 1994).

1.8. Mercúrio, Prolactina e Resposta Imune na Gravidez

As interações neurais e endócrinas proporcionam um sistema de regulação bem afinado e necessário para manter a condição saudável do organismo. A resposta imune direta do SNC pode ocorrer por duas vias principais, como destacam PABELLO e LAWRENCE (2006), sendo uma o eixo hipotálamo-hipófise adrenal (HHA), em que o hipotálamo e a hipófise formam uma interface complexa entre os sistemas nervoso e endócrino e o eixo se comunica com a periferia através dos hormônios hipofisários, que, entre outras funções, levam à produção de glicocorticóides pelas glândulas adrenais, geralmente com resposta imune inibitória. No hipotálamo, o núcleo primário responsável pela regulação do eixo é o núcleo paraventricular. A outra via de comunicação neuroendócrina é através do Sistema Nervoso Autônomo, sendo que o Sistema Simpático inerva os órgãos linfóides e são as catecolaminas (noradrenalina e norepinefrina), no terminal pré-sináptico, que modulam as células imunes nos órgãos linfóides.

Quando estimuladas, as catecolaminas são liberadas do terminal nervoso simpático que expressam adrenoreceptores e a estimulação desses receptores afetam a circulação e proliferação de linfócitos e isto modula a produção de citocinas. As catecolaminas inibem a produção de citocinas inflamatórias tais como Interleucina 1, TNF α , INF γ , e estimula a produção de citocinas anti-inflamatórias como Interleucina-10 e TGF β . As catecolaminas podem causar uma supressão seletiva da imunidade mediada por células (Th1) (ELENKOV *et al.*, 2000). Por sua vez, a ativação do Sistema Parassimpático, leva à liberação de acetilcolina (Ach) das fibras colinérgicas eferentes do nervo vago, o que constitui um mecanismo antiinflamatório rápido e enquanto o SNC responde aos sinais imunes periféricos, o mecanismo parassimpático é capaz de mediar atividades pró e antiinflamatórias (HASKO e SZABO, 1998). Os processos imunológicos são fortemente regulados pelo sono e sistema circadiano, devido a comunicação bidirecional entre sistema nervoso e sistema imune, mediada por neurotransmissores, hormônios e citocinas e pela inervação direta do sistema imune pelo sistema nervoso autônomo (BESEDOVSKY *et al.*, 2012).

HEO *et al.* (1997) referem que, sob condições de exposição a substâncias tóxicas como o mercúrio, o eixo HHA pode apresentar disfunção e produção aberrante de hormônios e citocinas e gerar desequilíbrio das atividades de Th1/Th2, embora o grau de desequilíbrio dessa regulação neural seja indeterminado. FITSANAKIS e ASCHNER (2005) destacam que vários sistemas de neurotransmissores podem ser afetados pelo mercúrio, incluindo os sistemas gabaérgico e glutamatérgico e o da glicina e as alterações nas concentrações de glutamato podem levar à toxicidade excitatória, como ocorre em injúrias agudas ao SNC, distúrbios psiquiátricos e doenças degenerativas. O aumento significativo da concentração de glutamato devido a exposição ao mercúrio parece resultar da alteração no processo de retirada do glutamato pelos astrócitos.

Os compostos orgânicos e inorgânicos de mercúrio tem sido considerados, a partir de estudos realizados principalmente em modelos animais, como agentes imunossupressores, havendo indícios de que os compostos orgânicos teriam maior efetividade na imunossupressão, em relação aos mercúrio inorgânico. A interação do sistema imune com o mercúrio pode levar a imunostimulação, formação de anticorpos antinucleolar, depósito sistêmico de imuno-complexos e a síndrome autoimune induzida por mercúrio (HAVARINASAB e HULTMAN, 2005).

A PRL possui receptores em linfócitos T e B e em macrófagos (estes últimos, são a maior fonte de IL-10, como dito anteriormente) e agindo através de seus receptores, a PRL modula a função do sistema imune estimulando a sobrevivência e proliferação celular, possuindo ação endócrina, parácrina e autócrina na regulação da sua função imunológica (SOARES, 2004). CLEVENGER *et al.* (1998) demonstraram o papel imunostimulatório da prolactina em modelos animais (roedores) colocados frente a antígenos ou infecções em que esses animais tratados com PRL apresentaram redução significativa da mortalidade.

A liberação coordenada e sobreposição de funções entre a prolactina e os lactógenos placentários é uma característica do período de gravidez e a transição da predominância hipofisária para o controle placentário sobre a produção do hormônio lactogênico ocorre de forma gradativa. O perfil de liberação de PRL envolve os compartimentos maternal, fetal e decidual. Os níveis de PRL sérica aumentam a partir de 6 a 8 semanas de gestação de forma progressiva até alcançar em torno de 200-300 ng/ml no final da gestação. Ocorre um aumento no número e no tamanho de lactotrofos hipofisários e evidências indiretas sugerem que o aumento da

liberação da PRL e a hiperplasia de lactotrofos são devidas a estrógenos, presumivelmente suprimindo a dopamina hipotalâmica e estimulando a proliferação dos lactotrofos (o neuropeptídeo galanina, induzido por estrógeno, estaria envolvido na proliferação de lactotrofos, como citado anteriormente). Existem lacunas no conhecimento sobre os mecanismos pelos quais o eixo hipotálamo-hipofisário, torna-se sensível ao estrógeno durante a gravidez. Na circulação fetal, a PRL aumenta a partir de 20 a 24 semanas e na gestação a termo atinge níveis similares ao da mãe, porém o aumento fetal parece ser autônomo, não havendo evidência de transferência materno fetal (ou vice-versa) da prolactina (GOFFIN *et al.*, 2002; BACHELOT e BINART, 2007).

NEVILLE *et al.* (2002) destacam que durante a vida fetal, neonatal e pré-puberal os efeitos da PRL não são expressivos nas mudanças morfológicas da glândula mamária. Contudo, os estágios da lactação: mamogênese (diferenciação lóbulo-alveolar) lactogênese (aquisição da habilidade de produção de leite), galactopoise (manutenção da secreção de leite) e involução (retorno ao estado de não lactação) são dependentes da PRL. O desenvolvimento funcional do epitélio glandular mamário na gravidez depende da sinalização da PRL, pois sua proliferação e diferenciação depende da presença do receptor PRLR e das vias de sinalização JAK2-STAT5 (BACHELOT e BINART, 2007). Durante a lactação, a PRL atua como um sensor fisiológico que responde a demandas de produção de leite retirando nutrientes do tecido adiposo para a glândula mamária. A involução da glândula mamária constitui-se de estágios em que cessa a produção de leite, ocorre apoptose de células epiteliais e remodelamento extensivo do tecido. A via de sinalização JAK-STAT é a principal via envolvida na primeira fase de involução e também é crítica a participação da STAT3, ativada pelo Fator Inibidor de Leucemia - LIF (WATSON, 2006).

Na gravidez, ocorre uma diminuição transitória da imunidade materna mediada por célula, para proteger o conceito da rejeição pelo organismo materno e essa tolerância imunológica está relacionada com a modulação da resposta imune de células T, caracterizada por uma transição de citocinas de Th1 (IL-1, interferon gama - IFN γ) para Th2 (IL-4, IL-10), mediada pelas mudanças hormonais na gestação e fatores protetores produzidos pelo feto. Uma falha nas respostas tipo Th2 está associada a abortos recorrentes e complicações na gravidez (CHAOUAT *et al.*, 1996; KRUSE *et al.*, 2000; MORELI *et al.*, 2012). PICCINI *et al.* (1998)

demonstraram que a IL-10 e o Fator Inibidor de Leucemia, um outro tipo de citocina ligada a Th2, são necessários para a implantação e o desenvolvimento do embrião, sendo ambos produzidos pela decídua. KRUSE *et al.* (2000), estudando a expressão de mRNA de várias citocinas durante a gravidez de mulheres consideradas saudáveis, encontrou uma diminuição (embora não expressiva) na expressão de IL-4 e IL-10, sendo que a primeira, diminuiu significativamente após o parto. No primeiro e segundo trimestre a relação IL-4 e IFN- γ , que indica um balanço Th2/Th1, foi marcadamente alta em relação ao terceiro trimestre, pós-parto imediato e mulheres não grávidas. Os níveis séricos de IL-10 aumentaram e estavam positivamente correlacionados com a duração da gravidez, com valores mais altos no terceiro trimestre.

A PRL e a IL-10 desempenham papéis de grande relevância na gravidez e alterações funcionais de sua regulação e produção podem colocar em risco a gestação e a saúde materno-fetal (ZEN *et al.*, 2010). Em populações expostas a contaminantes como o mercúrio, mulheres grávidas e seus conceptos representam grupos vulneráveis aos riscos de efeitos adversos. Neste tipo de população, a dosagem de biomarcadores imunológicos e endócrinos pode ser útil para avaliar possíveis alterações no comportamento fisiológico desses biomarcadores em condições de exposição ao mercúrio, permitindo condutas preventivas da exposição. No entanto, essas informações são pouco disponíveis na literatura, sobretudo em relação à prolactina. Em grupos ocupacionalmente expostos ao mercúrio inorgânico, tem sido levantada a possibilidade de impactos no sistema endócrino em relação à prolactina, associados com a exposição ao mercúrio, encontrando-se uma relação inversa entre os teores de mercúrio e os níveis de prolactina nos trabalhadores (LUCCHINI *et al.*, 2003).

No caso da exposição ambiental em adultos expostos ao mercúrio através do consumo de peixe, sem exposição ocupacional prévia ao contaminante, os mesmos autores encontraram uma significativa correlação positiva entre níveis de PRL e o desempenho anormal em testes neurocomportamentais (CARTA *et al.*, 2003). Em crianças européias residentes próximas a áreas de mineração de prata, chumbo ou zinco ativas ou não, situadas na França, República Tcheca e Polônia, a concentração de mercúrio foi associada negativamente com os níveis séricos de PRL (De BURBURE *et al.*, 2006). Assim, existe a necessidade de estudos sobre a relação da PRL com o mercúrio em grávidas e mulheres em idade fértil, que é o

objeto deste estudo, pois o conhecimento de níveis elevados de mercúrio nas populações expostas ambientalmente na Amazônia, sem a expressão clínica evidente da intoxicação pelo metilmercúrio, não significa que alterações de sistemas orgânicos, tais como o neuroendócrino e imunológico não estejam ocorrendo devido a exposição crônica, mesmo a níveis moderados de mercúrio. Deste modo, a avaliação de biomarcadores desses sistemas, como a PRL (neuroendócrino) e a IL-10 (imunológico) nesse grupo de risco, representa informação importante para os programas de saúde pública e saúde materno-infantil em populações expostas ao mercúrio na Amazônia.

1.9. Objetivos

1.9.1 Geral

Avaliar a exposição ao mercúrio em relação aos níveis de prolactina e interleucina 10 em mulheres puérperas e não puérperas do município de Itaituba e de municípios da área metropolitana de Belém, sobretudo Ananindeua.

1.9.2. Específicos

- Caracterizar o perfil epidemiológico dos grupos estudados em relação às variáveis sócio-econômicas, ocupacionais, consumo de peixe e morbidade referida;
- Verificar os níveis de mercúrio em sangue visando avaliar o nível de exposição das mulheres do estudo ao agente químico;
- Verificar os níveis de prolactina e interleucina 10 em soro das mulheres, relacionando-os com os teores de mercúrio encontrados;
- Verificar a existência de correlações e associações entre variáveis epidemiológicas e as concentrações de mercúrio, prolactina e interleucina 10, através de modelos lineares e logísticos.

2. MÉTODOS

2.1. Aspectos Éticos

A participação das mulheres no estudo teve caráter voluntário, confirmada através da assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as orientações do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos - CONEP e com aprovação do Conselho de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas. O projeto recebeu Parecer de Aprovação CEP/IEC nº 0015/2009, CAAE nº: 0018.0.072.000-09 (ANEXO A).

2.2. Caracterização dos Municípios do Estudo

Os municípios envolvidos neste estudo foram Itaituba, Belém, Ananindeua, Benevides e Marituba (Figura 1). A inclusão de Itaituba deveu-se a sua importância histórica e ainda atual como maior centro de mineração do ouro da bacia do rio Tapajós, região em que a extração de ouro se desenvolveu como atividade econômica na década de 1960, alcançando grande produção nas décadas seguintes. Desde os registros iniciais de garimpagem em 1958, um montante estimado em pelo menos 500 toneladas de ouro foram produzidos na região do Tapajós, que ainda contribui de forma importante para a produção aurífera do País (SANTOS *et al.*, 2001; CARRINO *et al.*, 2011). Além disso, diversos estudos tem apontado a contribuição de outras fontes de mercúrio, como a agricultura, o desmatamento e o transporte atmosférico para a exposição ao mercúrio nessa região (ROULET *et al.*, 2001; HACHIYA *et al.*, 2011). O município de Itaituba está localizado na porção sudoeste do Estado do Pará, na Zona Fisiográfica do rio Tapajós. Limita-se, ao norte, com o município de Aveiro, ao sul com os municípios de Novo Progresso e Jacareacanga, a leste, com os municípios de Altamira, Rurópolis e Trairão, e, a oeste, com o Estado do Amazonas. Possui uma área de

62.565 km² e cerca de 95% de suas terras são banhadas pelo rio Tapajós, enquanto os 5% restantes pertencem à bacia do rio Amana. A cidade de Itaituba, sede do município, constitui a área diretamente envolvida no estudo e está situada às margens do rio Tapajós, distante de Belém cerca de 880 km. Possui como coordenadas geográficas 04°16'34' de latitude Sul, e 55°59'06'' de longitude a Oeste de Greenwich. Sua altitude é da ordem de 45 m. Segundo o último censo nacional, a população do município de Itaituba é constituída de 97.493 habitantes (IBGE, 2010).

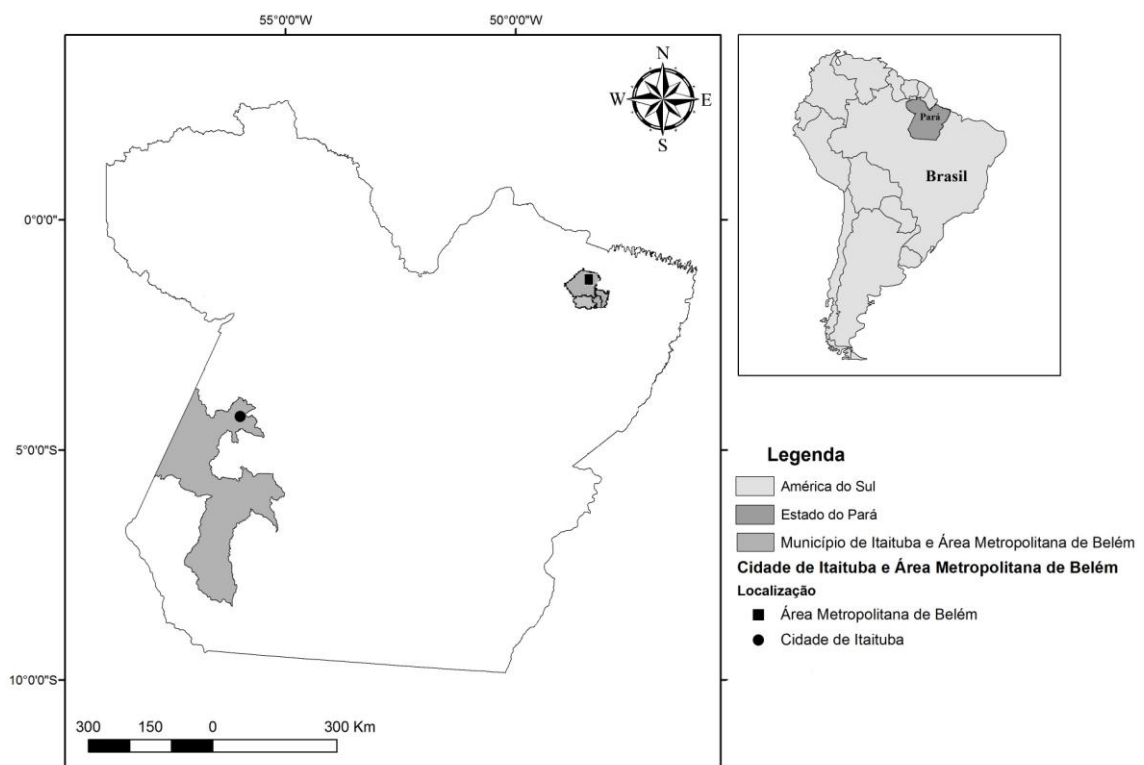


Figura 1 – Localização das áreas de estudo no município de Itaituba e na área metropolitana de Belém (município de Ananindeua).

Os demais municípios, pertencentes à zona metropolitana de Belém foram incluídos no estudo, por se tratarem de área sem mineração de ouro e sem conhecimento de outras formas de exposição ao mercúrio. A zona metropolitana de Belém, é constituída por seis municípios que totalizam 2.100.319 habitantes (IBGE, 2010), sendo Belém, com 1.392.031, Ananindeua com 471.744, Marituba com 108.251, Benevides com 51.553, Santa Bárbara com 56.776 e Santa Izabel do Pará com 239.652 habitantes. As mulheres deste estudo residem nos quatro primeiros municípios, sendo a maioria residente em Ananindeua. O município de Belém possui uma área territorial de 1.065 km², limitando-se ao Norte com a Baía do Marajó, a Leste com os municípios de Ananindeua, Santo Antônio do Tauá e Santa Bárbara do Pará, ao Sul com o município de Acará e a Oeste com a baía do Guajará e baía do Marajó. As coordenadas geográficas da sede municipal são 01°27'20" Sul e 48°30'15" Oeste de Greenwich. A altitude da sede municipal em relação ao nível do mar é de 10 metros (m) (IDESP, 2011a).

A área territorial do município de Ananindeua é de 185 km² e limita-se ao Norte com o município de Belém, ao Sul com o rio Guamá, a Leste com os municípios de Benevides e Marituba e a Oeste com o município de Belém. A sede municipal apresenta as seguintes coordenadas geográficas: 01°21'58" Sul e 48°22'22" Oeste de Greenwich e sua altitude é de 17 m (IDESP, 2011b). Marituba possui uma área territorial de 103 km² e limita-se ao Norte com o município de Benevides, ao Sul com os municípios de Acará e Belém, a Leste com o município de Benevides e a Oeste com o município de Ananindeua. As coordenadas geográficas da sede municipal são 01°21'15" Sul e 48°20'40"11 Oeste de Greenwich e sua altitude é de 18 m (IDESP, 2011c). Benevides possui uma área territorial de 188 km², limitando-se ao Norte com o município de Santa Bárbara do Pará, a Leste com o município de Santa Izabel do Pará, ao Sul com o rio Guamá e a Oeste com os municípios de Ananindeua e Marituba. Suas coordenadas geográficas são 01°21'48" Sul e 48°14'24" Oeste de Greenwich e a altitude da sede municipal é de 28 m (IDESP, 2011d).

2.3. Descrição do estudo e casuística

O estudo apresentou um desenho epidemiológico transversal e abrangeu mulheres puérperas e não puérperas residentes em áreas urbanas dos municípios selecionados. As mulheres residentes em Itaituba, área sob influência da atividade garimpeira, constituíram parte da demanda atendida no hospital urbano Menino Jesus para a realização do parto. Embora se trate de população urbana e não ribeirinha (que é reconhecida na literatura como exposta ao mercúrio na região do Tapajós), as mulheres de Itaituba estariam expostas pelo consumo de peixe procedente da área sob impacto do mercúrio, que geralmente apresenta níveis elevados de mercúrio em relação às espécies de peixes piscívoras que são consumidas em Belém (ARRIFANO, 2011). Estas mulheres fizeram parte de um estudo mais amplo realizado pelo Instituto Evandro Chagas no referido hospital no período 2005 a 2008, que avaliou os níveis de exposição ao mercúrio em mães e recém-natos. O estudo apresentou duas etapas de coleta de dados e material biológico. No caso das mulheres do presente estudo, a primeira etapa ocorreu no hospital em 2006 e 2007 e a segunda ocorreu cerca de um ano após a primeira, através de visita domiciliar. As variáveis epidemiológicas utilizadas neste estudo são referentes a dados gerais (idade, sexo, escolaridade, estado civil, naturalidade), dados ocupacionais, frequência de consumo de peixe, morbidade referida (sinais, sintomas ou doenças na gravidez no caso das puérperas e nos últimos 30 dias, no caso das mulheres não puérperas), aborto, número de filhos, peso do recém-nascido, dados de tabagismo e consumo de bebida alcoólica (etilismo).

Foram selecionadas 144 mulheres que atenderam os seguintes critérios de inclusão: tempo de residência no município igual ou superior a um ano, gravidez a termo (entre 37 e 42 semanas de gestação), ausência de morbidade na ocasião do parto, não ser portadora de doenças auto-imune e doenças crônicas (informado pela participante) e ter realizado parto vaginal. A coleta de material biológico (sangue) foi realizada até 24 horas após o parto. As hipóteses do estudo consideraram não haver diferença nos níveis de Hg-t, PRL e IL-10 nos grupos de mulheres de Itaituba e da área metropolitana de Belém, bem como não haver associação desses fatores com variáveis epidemiológicas (hipóteses de nulidade), contrapondo-se a isto as

hipóteses alternativas que consideraram existir possível diferença entre os grupos, quanto às variáveis do estudo.

Na área metropolitana de Belém, participaram do estudo 156 mulheres parturientes de dois hospitais (Hospital Anita Gerosa e Hospital de Clínicas de Ananindeua) da cidade de Ananindeua em 2009, procedentes dos municípios de Ananindeua (137 ou 87,8%), Benevides (11 ou 7,1%) e Marituba (8 ou 5,1%) e igual número de mulheres em idade reprodutiva residentes na área metropolitana de Belém, sendo 109 (69%) do município de Ananindeua, 44 (28,2%) do município de Belém e 3 (1,9%) do município de Marituba, visitadas no domicílio, as quais já haviam realizado há pelo menos um ano, exames de interesse para o pré-natal (sorologia para rubéola e citomegalovirus) no Instituto Evandro Chagas. Tendo em vista o predomínio de residentes em Ananindeua, os dois grupos da área metropolitana de Belém (puérperas e mulheres em idade fértil) foram denominados como Ananindeua, nas tabelas e gráficos da seção de resultados.

Nestes grupos de mulheres, foram utilizados os mesmos critérios de inclusão no estudo, acrescentando-se que as mulheres não puérperas estivessem dentro do período reprodutivo, com idade inferior a 40 anos, aproximando-se da faixa etária das mulheres de Itaituba, aplicando-se ainda questionário epidemiológico semelhante (APÊNDICE A e B) e utilizando-se os mesmos procedimentos de coleta de material biológico (sangue e soro).

2.4. Procedimentos de Campo

O trabalho de campo foi desenvolvido de acordo com uma sequência de procedimentos que abrangeram:

- Apresentação e assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- Preenchimento de ficha epidemiológica
- Coleta de materiais biológicos: sangue (10 ml de sangue venoso periférico, com e sem anticoagulante).

A coleta de dados foi realizada através de questionários epidemiológicos aplicados individualmente às participantes do estudo nas duas etapas desenvolvidas (hospital e domicílio).

2.5. Análises Laboratoriais

2.5.1. Análise de Mercúrio Total

As análises de mercúrio total (Hg-t) em sangue foram desenvolvidas no Laboratório de Toxicologia da Seção de Meio Ambiente do Instituto Evandro Chagas em Ananindeua, sendo realizadas por Espectrometria de Absorção Atômica por Geração de Vapor Frio - CVAAS (AKAGI *et al.*, 1996). Amostras de sangue foram coletadas de sangue periférico das mulheres (no caso das puérperas nas primeiras 24 h após o parto e das demais mulheres durante a visita domiciliar, depois da aplicação do questionário epidemiológico) utilizando seringas descartáveis e acondicionadas em tubos com EDTA 10% para a conservação das amostras. As amostras foram mantidas congeladas a -20°C até o momento das análises laboratoriais. Para a análise de mercúrio total 0,5 ml de sangue foram medidos com pipeta automática e colocados em balões volumétricos de 50 ml aos quais foi adicionado 2ml de $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ (1:1), 5ml de H_2SO_4 e 1ml de H_2O destilada e levado à placa aquecedora a 250°C por 20 minutos. Após o aquecimento, a solução da amostra digerida foi completada até 50 ml com H_2O e uma alíquota introduzida no Analisador de Mercúrio HG 201 (K.K. Sanso corp., Japão), que consiste de um Espectrômetro de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio. Para o controle de qualidade, foram utilizados materiais de referência para sangue *Whole Blood L-2* (*Seronorm*TM *Trace Elements*). A taxa de recuperação analítica na determinação de mercúrio total em sangue a partir de amostras de referência certificadas foi de 101,38%, sendo a média de concentração de $15,40 \pm 2,72$ $\mu\text{g/l}$ (concentração de referência de 15,20 $\mu\text{g/l}$), em um quantitativo de 13 amostras.

2.5.2. Dosagem de Prolactina

A determinação de prolactina em soro humano foi realizada através de método quantitativo automatizado (Sistema Vidas, Vitek Systems, Biomérieux™, França), utilizando-se ensaio imunoenzimático tipo sanduíche com uma detecção final em fluorescência (método ELFA) e limite mínimo de detecção de 0,5 ng/ml. Conforme orientação do fabricante, previamente ao início da dosagem da PRL, o cartão de especificação do lote do teste foi lido pelo equipamento por código de barra, e em seguida foi feita a análise em duplicata do calibrador, para a elaboração da curva padrão, seguida pela dosagem das amostras controle. Como componentes do sistema, foram utilizados barretes e cones individualizados para cada amostra de soro, que foram introduzidos no equipamento no momento da análise. As etapas de adição de reagente, lavagem e incubações foram realizadas de forma automatizada. As amostras de 200 µl de soro humano foram transferidas para os poços nas barretes, que continham o anticorpo anti-prolactina marcado com a fosfatase alcalina (conjugado). A mistura de amostra e conjugado foi aspirada e dispensada várias vezes no interior do cone, para aumentar a velocidade de reação, permitindo ao antígeno fixar-se, por um lado às imunoglobulinas fixadas no cone e, por outro, ao conjugado, formando um sanduíche. Durante a etapa final de revelação, o substrato (4-metil-umbeliferil fosfato) foi aspirado e dispensado pelo cone e a enzima do conjugado catalisou a reação de hidrólise do substrato em um produto (4-metil-umbeliferona) cuja fluorescência emitida foi medida a 450 nm. O valor do sinal de fluorescência, proporcional à quantidade de prolactina presente na amostra determinou a obtenção do resultado da concentração da PRL em ng/ml. No caso das puérperas com concentrações acima de 200 ng/ml, procedeu-se nova análise com diluição de 1:8, segundo recomendação do fabricante (o diluente era composto de soro humano + azida sódica 1g/l).

2.5.3. Dosagem de Interleucina 10

A dosagem de Interleucina 10 em soro foi realizada pelo método imunoenzimático (ELISA) de fase sólida com sensibilidade amplificada, (Biosource IL-10 EASIA kit, Biosource Europe S.A., Bélgica), com limite mínimo de detecção de 1 pg/ml. O ensaio consistiu em um sistema oligoclonal, no qual foi usada uma composição de anticorpos monoclonais direcionados contra distintos epítomos de IL-10 (DE GROOTE et al., 1994). Cada poço da placa recebeu 100 µl de solução tampão, inclusive o branco. Os 5 padrões (0 pg/ml, 11 pg/ml, 40 pg/ml, 120 pg/ml, 420 pg/ml e 1335 pg/ml) e 2 controles (concentrações baixa e alta) foram reconstituídos cada um com 1 ml de água destilada, conforme instrução do fabricante e depois foram transferidos, em duplicata, para os poços da placa, juntamente com as amostras (100 µl de cada padrão, controle e amostra), onde reagiram com anticorpos monoclonais de captura que revestiam os poços de microtitulação. Após incubação de 2 horas, à temperatura ambiente, em agitador horizontal a 700 rotações por minuto (rpm), o excesso ocasional de antígeno foi removido por 3 ciclos de lavagem, utilizando-se a lavadora de microplaca (TP-Washer, marca Termo Plate, China). Em seguida, foi adicionada a enzima de origem vegetal peroxidase (raiz de rábano silvestre) denominada *Horseradish Peroxidase* – HRP, com anticorpo marcado. Após um novo período de incubação de 2 horas, à temperatura ambiente e 700 rpm, ocorreu a formação de um sanduíche, composto pelo anticorpo monoclonal de captura– interleucina 10 e HRP – anticorpo marcado HRP. Então, a placa de microtitulação foi lavada novamente, para remover o anticorpo enzimático marcado e não ligado. Os anticorpos ligados foram medidos através de uma reação cromogênica em que a solução cromogênica, composta de tetrametilbenzidina e água oxigenada (TMB + H₂O₂), foi adicionada e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e 700 rpm. A reação foi então interrompida com a adição da solução de parada (H₂SO₄) e a placa de microtitulação foi lida no comprimento de onda de 450 nm, utilizando-se leitora de microplaca (modelo Vivid Vision, marca ALKA, China). A quantidade recuperada de substrato foi determinada colorimetricamente pela medida da absorbância, proporcional à concentração de IL-10, determinada pela interpolação a partir da curva – padrão estabelecida no ensaio.

2.6. Análise estatística

Os dados obtidos foram organizados em bancos de dados elaborando-se estatísticas descritivas (tendência central e dispersão), e associação de variáveis através de análise de correlação (Pearson), testes paramétricos (t - Student e análise de variância - Anova um critério) e não paramétricos (Mann Withney e Qui quadrado), utilizando-se os programas GraphPad Prisma versão 5.0, Minitab 15, e BioEstat 5.0 (AYRES *et al.*, 2007), considerando-se nível de significância de $p < 0,05$. As análises paramétricas foram feitas após transformação logarítmica dos dados, em vista do comportamento não normal das variáveis dependentes Hg, Prl e IL-10, verificadas pelo teste de Kolmogov-Smirnov ($p < 0,0001$). A partir dos resultados de regressão univariada, foram elaborados modelos de regressão linear múltipla *stepwise* regressiva (o modelo incluiu variáveis que apresentaram $p < 0,1$) e regressão logística múltipla (incluindo variáveis que apresentaram $p < 2,0$), para avaliar a relação das variáveis dependentes Hg-t, PRL, IL-10 entre si e com variáveis epidemiológicas, visando medir a possível influência entre as mesmas.

3. RESULTADOS

3.1. Perfil demográfico e epidemiológico

As mulheres puérperas de Itaituba apresentavam média de idade de 21,4 anos com variação de 16 anos, concentrando-se 76,4% delas na faixa de 15 a 24 anos. As primíparas representaram 64,6% das mulheres, sendo que 86,8% possuíam até 2 filhos e 7,6% dos recém-nascidos atuais apresentaram baixo peso ao nascer (<2,5 kilogramas). Aborto espontâneo foi referido por 14,6% das mulheres de Itaituba. Em Ananindeua a média de idade observada nas puérperas foi 22,6 anos, com amplitude de 23 anos e 70,5% das mulheres apresentavam de 15 a 24 anos. As primíparas totalizaram 47,4% e 78,2% das mulheres possuíam de um a dois filhos, sendo que 5,8% dos recém-nascidos do parto atual apresentavam baixo peso. A ocorrência de aborto foi relatada por 14,7% das participantes. Comparativamente nos dois grupos de mulheres, a idade e o número de filhos apresentaram diferença de média significativa, o que não foi observado em relação ao peso do recém-nascido e ao aborto (Tabela 1).

Nas mulheres não puérperas de Itaituba, a média de idade observada foi 22,7 anos com variação de 17 anos, sendo que 83,3% possuíam de 1 a 2 filhos e 18,0% relataram ocorrência de aborto anterior. Em Ananindeua, a média de idade das mulheres não puérperas foi 26,5 anos com variação de 21 anos e 88,5% possuíam até 2 filhos. A ocorrência de aborto foi relatada por 16,7% das mulheres. Dentre essas variáveis, apenas a idade apresentou diferença estatística significativa entre os dois grupos (Tabela 2).

TABELA 1. Características etárias e reprodutivas das mulheres puérperas dos municípios de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil

Variáveis	Itaituba	Ananindeua	p*
Idade (anos) (n, %)			0.0156
15-19	56 (38,9)	44 (28,2)	
20-24	54 (37,5)	66 (42,3)	
25-29	31 (21,5)	34 (21,8)	
≥30	3 (2,1)	12 (7,7)	
Média (máximo-mínimo)	21,4 (15-31)	22,6 (16-39)	
Paridade (nº filhos) (n, %)			0.0299
1	93 (64,6)	74 (47,4)	
2	32 (22,2)	48 (30,8)	
3	10 (6,9)	23 (14,7)	
≥4	9 (6,3)	11 (7,0)	
Média (máximo-mínimo)	1,5 (1-7)	1,8 (1-6)	
Peso do recém-nascido (g)			0,6270
<2.500 g	11 (7,6)	9 (5,8)	
2.500-2.999	53 (36,8)	50 (32,1)	
3.000-3.999	73 (50,7)	93 (59,6)	
≥4.000	7 (4,9)	4 (2,6)	
Média (máximo-mínimo)	3.120 (1.700-4.450)	3.146 (2.070-4.100)	
Aborto espontâneo			0,2624
0	123 (85,4)	133 (85,3)	
1	18 (12,5)	22 (14,1)	
2	3 (2,1)	1 (0,6)	
Média (n)	1,1 (21)	1,0 (23)	

* Teste t Student não pareado bi-caudal.

TABELA 2. Características etárias e reprodutivas das mulheres não puérperas dos municípios de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil

Variáveis	Itaituba	Ananindeua	p*
Idade (anos) (n, %)			<0,0001
15-19	36 (25,0)	8 (5,1)	
20-24	58 (40,3)	52 (33,3)	
25-29	40 (27,8)	54 (34,6)	
≥30	10 (6,9)	42 (26,9)	
Média (máximo-mínimo)	22,7 (15-32)	26,5 (17-38)	
Paridade (nº filhos) (n, %)			0,0967
1	80 (55,5)	95 (60,9)	
2	40 (27,8)	43 (27,6)	
3	13 (9,0)	11 (7,1)	
≥4	11 (7,7)	7 (4,5)	
Média (máximo-mínimo)	1,7 (1-7)	1,5 (1-4)	
Aborto espontâneo (n, %)			0,6459
0	118 (81,9)	130 (83,3)	
1	23 (16,0)	24 (15,4)	
2	3 (2,1)	2 (1,3)	
Média (n)	1,1 (26)	1,0 (26)	

* Teste t Student bi-caudal.

Em relação aos aspectos sócio-econômicos das mulheres do estudo, o estado do Pará foi a naturalidade mais referida, seguida pelo estado do Maranhão. O estado civil de casada ou amasiada foi o mais citado entre os grupos, porém, a escolaridade predominante (acima de 60%) em Itaituba foi o ensino fundamental e no caso de Ananindeua foi o ensino médio, em ambas as situações, completo ou incompleto. A ocupação do lar foi a mais referida pelas mulheres (75%), destacando-se em Itaituba um pequeno grupo de lavradoras (4,2%) (Tabela 3).

TABELA 3- Variáveis sócio-econômicas das mulheres puérperas e não puérperas dos municípios de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil

Variável	Puérperas		Não puérperas	
	Itaituba n (%)	Ananindeua n(%)	Itaituba n(%)	Ananindeua n(%)
Naturalidade				
Pará	106 (73,6)	148 (94,9)	106 (73,6)	144 (92,3)
Maranhão	27 (18,7)	7 (4,5)	7 (4,5)	7 (4,5)
Outros	11 (7,7)	1 (0,6)	27 (18,7)	5 (3,2)
			11 (7,7)	
Estado civil				
Solteira	46 (31,9)	35 (22,4)	46 (31,9)	45 (28,8)
Casada/amasiada	95 (66,0)	120 (76,9)	95 (66,0)	111 (71,2)
Separado/víúva	3 (2,1)	1 (0,6)	3 (2,1)	
Escolaridade				
Fundamental	93 (64,6)	59 (37,8)	88 (61,1)	38 (24,3)
Médio	49 (34,0)	95 (60,9)	53 (36,8)	107 (68,6)
Superior	2 (1,4)	2 (1,3)	3 (2,1)	11 (7,1)
Ocupação				
Do lar	108 (75,0)	115 (73,7)	108 (75,0)	77 (49,4)
Doméstica	12 (8,3)	13 (8,3)	8 (5,6)	8 (5,1)
Vendedor	10 (6,9)	6 (3,9)	6 (3,9)	33 (21,1)
Lavradora	6 (4,2)	1 (0,6)	10 (6,9)	
Outras	8 (5,6)	21 (13,5)	5 (3,5)	38 (24,4)
			13 (9,0)	

A ocupação anterior (recente ou não) em garimpo de ouro foi referida por 11,8% das mulheres de Itaituba, as quais não trabalhavam diretamente com a garimpagem ou queima de ouro. O consumo de peixe de 1 a 2 vezes por semana predominou em todos os grupos sendo a média da frequência de consumo semanal em Itaituba $2,6 \pm 2,4$ vezes por semana nas puérperas e $2,5 \pm 2,1$ vezes nas mulheres não puérperas. Em Ananindeua, a frequência de consumo semanal de peixe em puérperas e não puérperas foi $2,0 \pm 1,7$ e $1,5 \pm 1,2$ vezes, respectivamente. Houve diferença entre os grupos de não puérperas das duas localidades ($p < 0,0001$) e tendência de diferença significativa entre as puérperas ($p = 0,0515$). A prevalência de etilismo (relatado como ocasional, sem informação de quantidade) e tabagismo foi semelhante entre os grupos, porém, na morbidade referida nos últimos 30 dias

verificou-se diferença tanto entre puérperas ($p < 0,0001$) quanto entre não puérperas ($p = 0,0007$) (Tabela 4).

TABELA 4- Variáveis epidemiológicas das mulheres puérperas e não puérperas dos municípios de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil

Variável	Puérperas		Não puérperas	
	Itaituba n (%)	Ananindeua n(%)	Itaituba n(%)	Ananindeua n(%)
Trabalho anterior em garimpo				
Sim	17 (11,8)		17 (11,8)	
Não	127 (88,2)	156 (100,0)	127 (88,2)	156 (100,0)
Consumo semanal de peixe ^a				
<1	7 (4,9)	6 (3,8)	5 (3,5)	5 (3,2)
1-2	92 (63,9)	117 (75,0)	91 (63,2)	131 (84,0)
3-4	28 (19,4)	16 (10,3)	34 (23,6)	12 (7,7)
≥ 5	17 (11,8)	17 (10,9)	14 (9,7)	8 (5,1)
Etilismo ^b				
Sim	42 (29,2)	37 (23,7)	46 (31,9)	66 (42,3)
Não	102 (70,8)	119 (76,3)	98 (68,1)	90 (57,7)
Tabagismo ^c				
Sim	18 (12,5)	17 (10,9)	13 (9,0)	13 (8,3)
Não	126 (87,5)	139 (89,1)	131 (91,0)	143 (91,7)
Morbidade referida ^d				
Sim	31 (21,5)	71 (45,5)	25 (17,4)	6 (3,8)
Não	113 (78,5)	85 (54,4)	119 (82,6)	150 (96,2)

^a Teste de U de Mann Whitney entre puérperas, $p = 0,0515$; não puérperas $p < 0,0001$; ^{b, c} Qui quadrado $p > 0,05$; ^d Qui-quadrado entre puérperas $p < 0,0001$; não puérperas $p = 0,0007$.

A morbidade referida, incluindo a sintomatologia e alguns agravos, destaca-se em puérperas de Itaituba, pela prevalência de sinais, sintomas ou agravos que podem ocorrer no período gestacional, tais como edema de membros inferiores (12,9%), infecção do trato urinário (9,8%), anemia (9,8%) e perda sanguínea vaginal (9,8%). Nas puérperas de Ananindeua houve um percentual elevado de infecção do trato urinário (91,6%). As doenças endêmicas malária e dengue, bem como infecções de vias aéreas, predominaram nas mulheres de Itaituba, puérperas ou não grávidas. Os níveis de Hg, PRL e IL-10 em todos os grupos apresentaram grande variação em relação à morbidade (Tabelas 5 e 6).

TABELA 7. Morbidade referida pelas mulheres puérperas de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil

Morbidade	Puérperas de Itaituba n=31				Puérperas de Ananindeua n=71			
	n* (%)	Mediana ou valor			n* (%)	Mediana ou valor		
		Hg-t	PRL	IL-10		Hg-t	PRL	IL-10
Cefaléia	4 (12,9)	7,78	113,20	75,71	1 (1,4)	6,24	563,04	4,32
Edema de membros inferiores	4 (12,9)	12,34	127,8	47,01				
Malária	4 (12,9)	42,31	255,8	77,84				
Infecção urinária	3 (9,8)	3,06	112,3	25,58	69 (97,2)	3,42	310,60	0,51
Anemia	3 (9,8)	3,67	132,20	50,73	3 (4,2)	5,01	310,60	3,50
Sangramento	3 (9,8)	15,5	168,10	6,68				
Dengue	2 (6,4)	6,10	392,80	0,99				
Infecção de vias aéreas	2 (6,4)	5,30	212,40	55,55	1 (1,4)	3,57	808,27	63,48
Dor pélvica	1 (3,2)	15,50	273,07	Nd				
Condiloma	1 (3,2)	3,11	450,66	36,38				
Astenia	1 (3,2)	3,70	233,31	39,45				
Tontura	1 (3,2)	20,49	67,32	77,43				
Hipertensão arterial	1 (3,2)	8,34	569,78	62,91	1 (1,4)	6,08	358,82	Nd
Dor abdominal	1 (3,2)	3,45	50,37	59,07				
Dispneia	1 (3,2)	13,14	394,32	Nd				
Alteração plaquetária	1 (3,2)	5,55	558,25	Nd				
Gastrite	1 (3,2)	1,60	225,73	38,41				
Febre					1 (1,4)	6,24	563,04	4,32

* Algumas puérperas referiram mais de uma morbidade. Nd=não detectado.

TABELA 6. Morbidade referida pelas mulheres não puérperas de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil

Morbidade	Não puérperas de Itaituba n=25				Não puérperas de Ananindeua n=6			
	n* (%)	Mediana ou valor			n (%)	Mediana ou valor		
		Hg-t	PRL	IL-10		Hg-t	PRL	IL-10
Dengue	4 (16,0)	10,11	4,53	Nd				
Infecção de vias aéreas	4 (16,0)	6,53	15,61	2,54	1 (16,7)	1,62	6,86	Nd
Dor osteomuscular	3 (12,0)	16,6	5,08	0,22				
Alteração uterina ou menstrual	3 (12,0)	25,76	7,94	Nd	2 (33,3)	2,76	16,12	3,82
Cefaléia	2 (8,0)	6,78	25,10	4,24	1 (16,7)	3,13	11,29	10,55
Anemia	2 (8,0)	2,50	25,27	6,25				
Leucorréia	2 (8,0)	8,80	11,75	4,17				
Cisto ovariano	1 (4,0)	32,20	20,28	3,68				
Cólica renal	1 (4,0)	2,47	10,37	Nd				
Dor pélvica	1 (4,0)	11,23	13,26	1,91				
Papilomavírus	1 (4,0)	4,05	20,88	3,18				
Astenia	1 (4,0)	2,30	18,30	Nd				
Gastrite	1 (4,0)	0,81	21,82	0,91				
Labirintite	1 (4,0)	0,81	21,82	0,91				
Faringite					1 (16,7)	Nd	3,61	7,33
Astigmatismo					1 (16,7)	0,78	26,38	Nd

*Algumas mulheres informaram mais de uma morbididade. Nd=não detectado.

Houve associação entre a presença de morbidade referida e os níveis de IL-10 em puérperas de Itaituba ($p=0,0255$), bem como em relação aos níveis de PRL em não puérperas da mesma cidade ($p=0,0392$). O mesmo não ocorreu em Ananindeua em relação à PRL e IL-10. Em ambos os grupos, não se observou associação entre os níveis de Hg-t e a morbidade referida (Tabela 9).

TABELA 7. Comparação entre a morbidade referida e os níveis de Hg-t, PRL e IL-10 nos grupos de mulheres puérperas e não puérperas dos municípios de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil

Grupo de mulheres	Valor p bilateral (Teste de Mann Whitney) em relação à morbidade		
	Hg-t	PRL	IL-10
Itaituba			
Puérperas	0,3896	0,6390	0,0255
Não puérperas	0,5477	0,0392	0,1242
Ananindeua			
Puérperas	0,1809	0,7286	0,4788
Não puérperas	0,2018	0,5400	0,3129

3.2. Níveis de Hg-t em sangue, PRL e IL-10 séricas

As mulheres puérperas expostas ao mercúrio apresentaram maiores concentrações séricas de IL-10 e menores concentrações de PRL em relação às puérperas não expostas (Tabela 8). Nas mulheres não puérperas, o grupo exposto ao mercúrio também apresentou os maiores níveis de PRL e IL-10 (Tabela 9).

TABELA 8- Comparação entre mulheres puérperas expostas (Itaituba) e não expostas (Ananindeua) ao Hg quanto às concentrações de Hg-t em sangue e níveis séricos de PRL e IL-10

	Expostas	Não expostas	p*
	Média±dp	Média±dp	
Hg-t (µg/l)	13,93 ± 17,70	3,67 ± 3,29	***
PRL (ng/ml)	276,20 ± 200,50	337,70 ± 166,40	***
IL-10 (pg/ml)	39,54 ± 62,43	4,90 ± 10,75	***

* Teste t Student não pareado, bi-caudal, com transformação logarítmica. Intervalo de confiança de 95% para Hg= 0,3145 a 0,5176; PRL= -0,2277 a -0,0904 e IL-10= 0,7187 a 1,038. ***p<0,001.

TABELA 9- Comparação entre mulheres não puérperas expostas (Itaituba) e não expostas (Ananindeua) ao Hg quanto às concentrações de Hg-t em sangue e níveis séricos de PRL e IL-10

	Expostas	Não expostas	p*
	Média±dp	Média±dp	
Hg-t (µg/l)	12,68 ± 13,56	2,73 ± 2,49	***
PRL (ng/ml)	30,75 ± 37,25	17,07 ± 15,61	***
IL-10 (pg/ml)	14,20 ± 30,70	1,49 ± 3,65	***

* Teste t Student não pareado, bi-caudal, com transformação logarítmica. Intervalo de confiança de 95% para Hg= 0,4152 a 0,5939; PRL= 0,0745 a 0,2424 e IL-10= 0,2401 a 0,7120. ***p<0,001.

Considerando-se a diferença entre os grupos em cada cidade do estudo, as concentrações de Hg-t foram maiores nas mulheres de Itaituba ($p < 0,0001$) e apresentaram-se em níveis semelhantes nos grupos de puérperas e não puérperas na mesma cidade ($p = 0,7056$ em Itaituba e $p = 0,0938$ em Ananindeua) (Figura 2). As concentrações de PRL divergiram entre os quatro grupos ($p < 0,0001$), sendo maiores nas puérperas de Ananindeua e nas não puérperas de Itaituba (Figura 3). Os níveis de IL-10 também foram maiores em Itaituba. Contudo, entre as mulheres não grávidas, visitadas no domicílio em Itaituba e as mulheres puérperas de Ananindeua, verificou-se apenas uma tendência de maior concentração de IL-10 em Itaituba ($p = 0,0669$) (Figura 4).

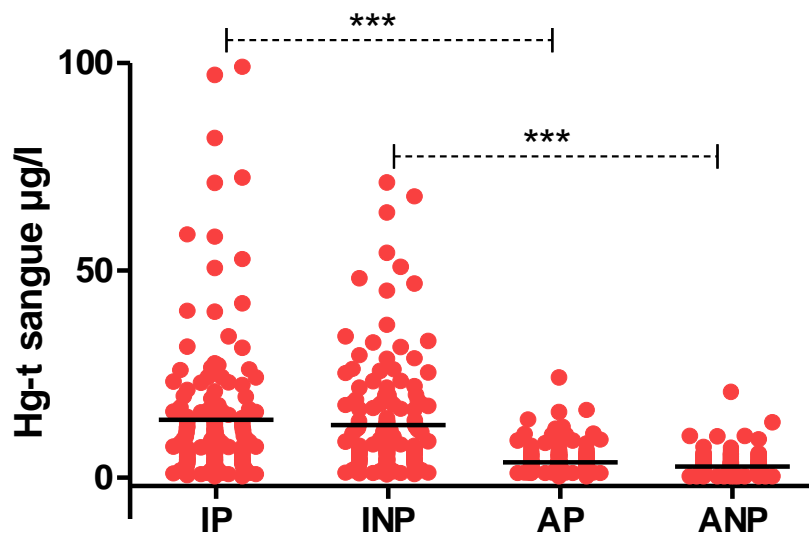


Figura 2 – Concentrações de Hg-t em mulheres de Itaituba (IP-puérperas e INP- não puérperas) e de Ananindeua, Pará, Brasil (AP-puérperas e ANP-não puérperas), com destaque para a média. Anova um critério, após transformação logarítmica *** $p < 0,001$.

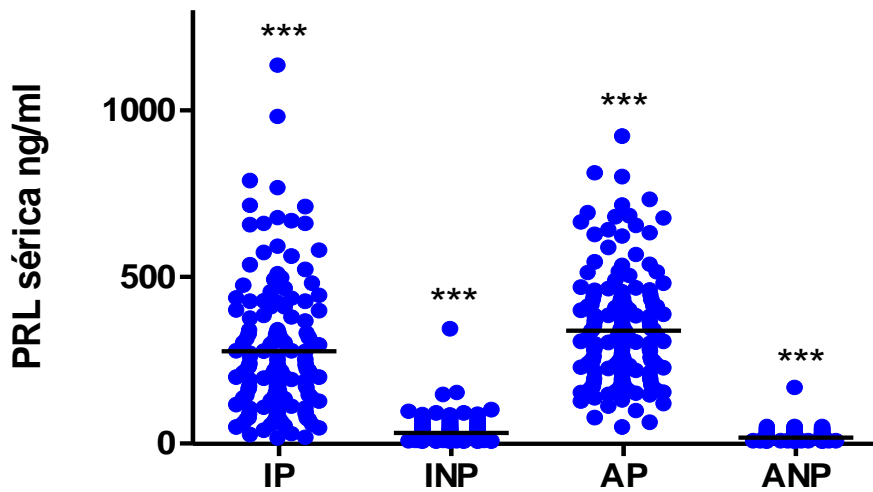


Figura 3 – Concentrações de PRL em mulheres de Itaituba (IP-puérperas e INP-não puérperas) e de Ananindeua, Pará, Brasil (AP-puérperas e ANP-não puérperas), com destaque para a média. Anova um critério, após transformação logaritmica *** $p < 0,001$.

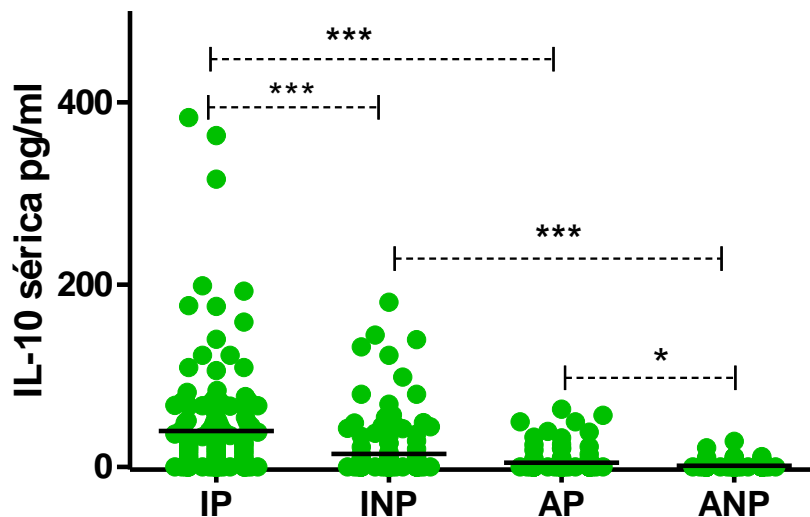


Figura 4 – Concentrações de Interleucina 10 em mulheres de Itaituba (IP-puérperas e INP-não puérperas) e de Ananindeua, Pará, Brasil (AP-puérperas e ANP-não puérperas) com destaque para a média. Anova um critério após transformação logaritmica *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$.

Os grupos de mulheres de Ananindeua apresentaram faixa etária mais abrangente (16 a 39 anos) em relação a Itaituba (15 a 32 anos). Na distribuição interquartílica de Hg-t segundo a idade das mulheres, os níveis foram mais elevados em Itaituba em todas as idades, comparando-se as faixas etárias de 15 a 20, 21 a 25 e igual ou acima de 26 anos ($p < 0,001$ ou $p < 0,01$). Em 33,3% das 18 categorias de idade das mulheres expostas ao Hg-t (nas puérperas, nas idades de 17, 21, 24, 25, 29 e 30 anos e nas mulheres não puérperas, nas idades de 19, 26, 27, 28, 29 e 32 anos) predominaram medianas acima do valor de referência de $8 \mu\text{gHg/l}$ e abaixo do limite de tolerância biológica –LTB de $30 \mu\text{gHg/l}$. Nas mulheres do grupo não exposto, os valores se localizaram abaixo de $8 \mu\text{gHg/l}$, havendo poucos valores discrepantes (Figura 5).

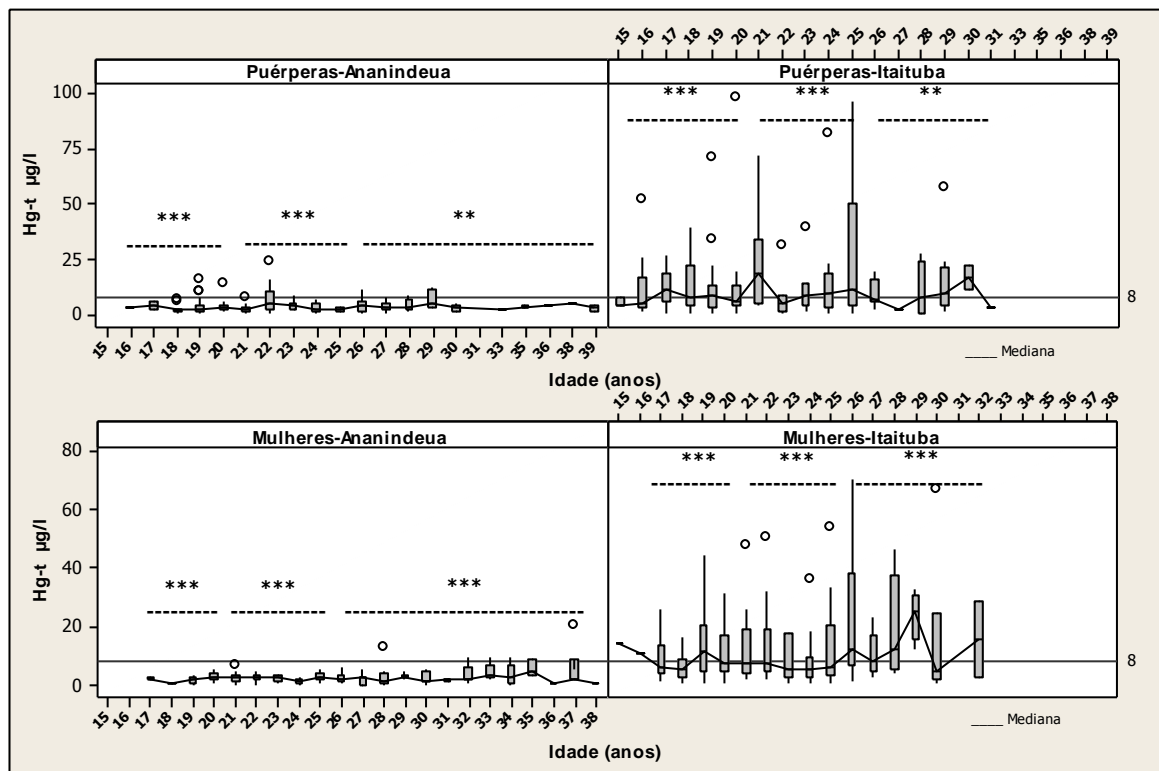


Figura 5 – Níveis de Hg-t em sangue segundo a idade das mulheres puérperas e não puérperas de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil. Todas as faixas etárias apresentaram níveis maiores em Itaituba. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ (Teste U de Mann Whitney). O valor de $8 \mu\text{gHg/l}$ representa o limite de referência para populações não expostas.

As concentrações de PRL nas puérperas de Ananindeua foram maiores em quase todas as idades, especialmente nas faixas de 15 a 20 anos ($p < 0,001$) e igual ou acima de 26 anos ($p < 0,05$). Nos grupos de mulheres não puérperas, as concentrações de PRL foram em geral maiores em Itaituba destacando-se a faixa de 21 a 25 anos ($p < 0,05$) (Figura 6).

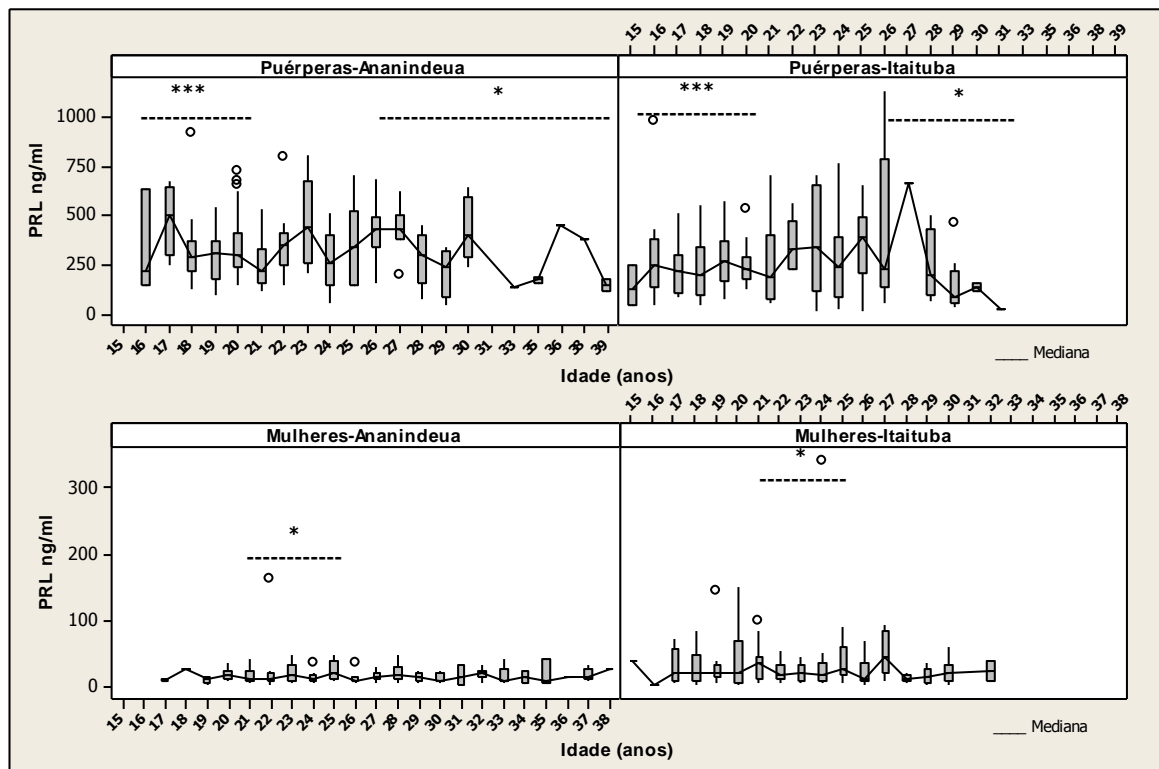


Figura 6 – Níveis séricos de PRL de acordo com a idade das mulheres puérperas e não puérperas de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil. As concentrações foram maiores nas puérperas de Ananindeua, destacando-se as faixas etárias de 15 a 20 e igual ou acima de 26 anos. Nas mulheres não puérperas, os níveis foram maiores em Itaituba, destacando-se a faixa etária de 21 a 25 anos. *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ (teste U de Mann Whitney).

Na distribuição da IL-10 segundo a idade, as concentrações da interleucina foram maiores nas puérperas de Itaituba em todas as faixas etárias ($p < 0,001$ ou $p < 0,01$). Nas mulheres não puérperas, os níveis de IL-10 também predominaram em

Itaituba ($p < 0,01$), porém na faixa etária de 15 a 20 anos, os valores encontrados em Ananindeua ficaram próximos do limite de detecção do método (1 pg/ml) (Figura 7).

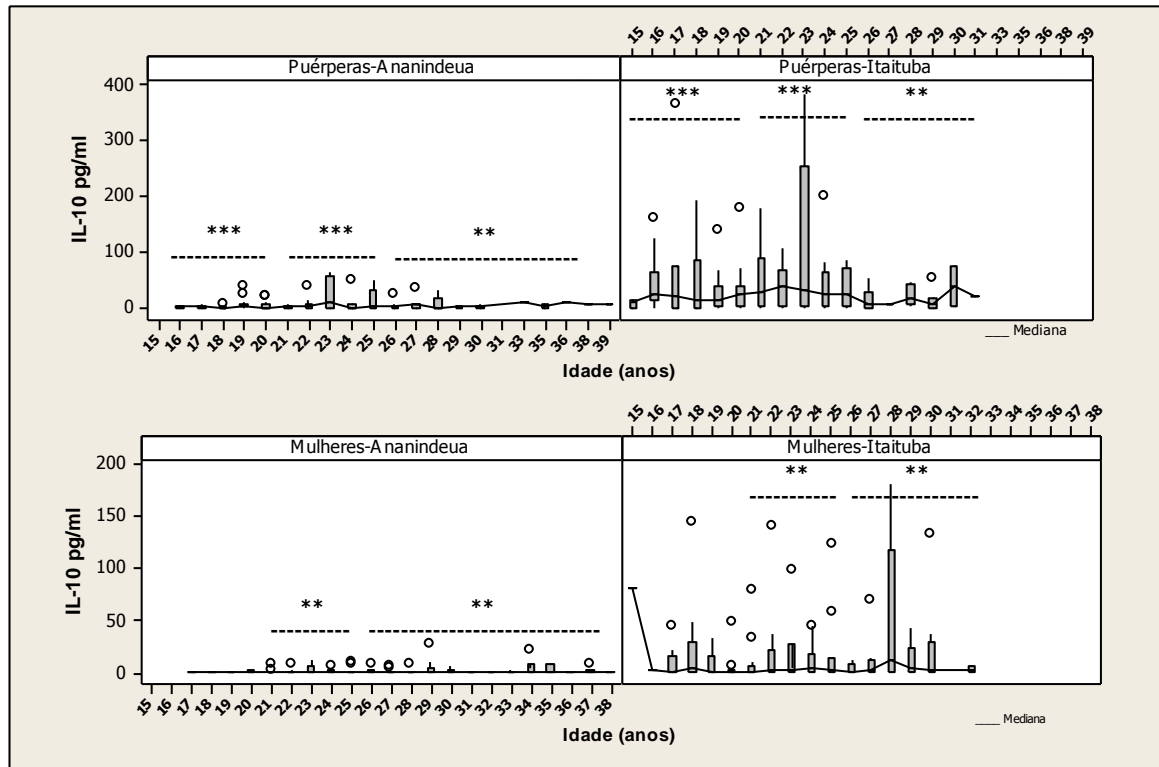


Figura 7 – Níveis séricos de IL-10 segundo a idade das mulheres puérperas e não puérperas de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil. Os níveis de IL-10 predominaram nas puérperas de Itaituba em todas as faixas etárias. Entre as mulheres não puérperas, as concentrações foram maiores nas faixas de 21 a 25 e igual ou acima de 26 anos em Itaituba. *** $p < 0,001$ e $p < 0,01$ (teste U de Mann Whitney).

A relação dos níveis de PRL e IL-10 com as concentrações de Hg-t nos grupos de mulheres puérperas demonstraram que em Itaituba, a maioria delas (79,8%) localizou-se até o nível de mercúrio de 20 $\mu\text{g Hg/l}$. Em Ananindeua, percentual semelhante de puérperas (78,8%) apresentou nível de mercúrio de até 5 $\mu\text{g Hg/l}$, o que representa quatro vezes menos o nível observado em Itaituba. A PRL correlacionou-se positivamente com a IL-10 em Ananindeua ($r = 0,1870$, $p = 0,0197$) e em Itaituba a correlação de ambas apresentou tendência de significância ($r = 0,1452$, $p = 0,0827$) (Figura 8).

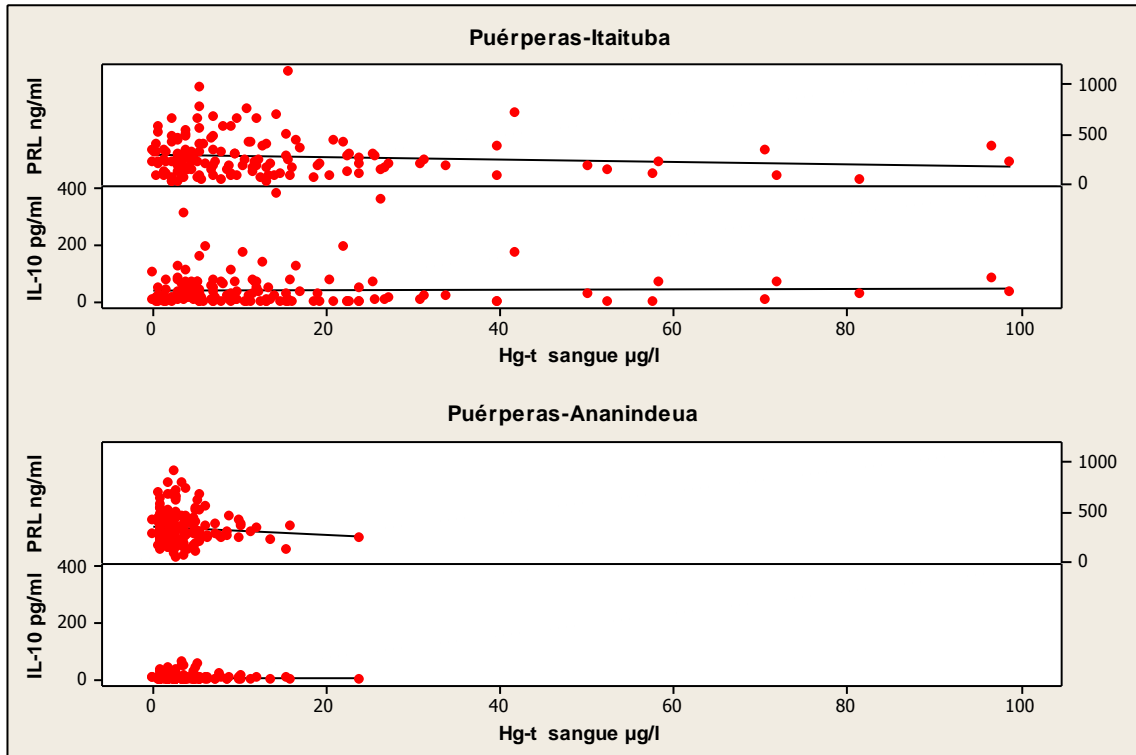


Figura 8. Níveis de PRL e IL-10 segundo os teores de Hg-t em sangue de mulheres puérperas dos municípios de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil. Em Itaituba foram encontradas as seguintes correlações: Hg e PRL $r=-0,0937$, $p=0,2641$; Hg e IL-10 $r=0,0335$, $p=0,6904$; PRL e IL-10 $r=0,1452$, **$p=0,0827$** . Em Ananindeua, as correlações foram entre Hg e PRL $r=-0,0886$, $p=0,2715$; Hg e IL-10 $r=-0,0138$, $p=0,8643$; PRL e IL-10 $r=0,1870$, **$p=0,0197$** .

Nos grupos de mulheres não puérperas, os níveis de PRL e IL-10 em relação às concentrações de Hg-t também se situaram em sua maioria até 20 µg Hg/l (81,9%) em Itaituba e até 5 µg Hg/l em Ananindeua (89,1%). Nesse grupo, as correlações verificadas mostraram-se fracas e não significantes (Figura 9).

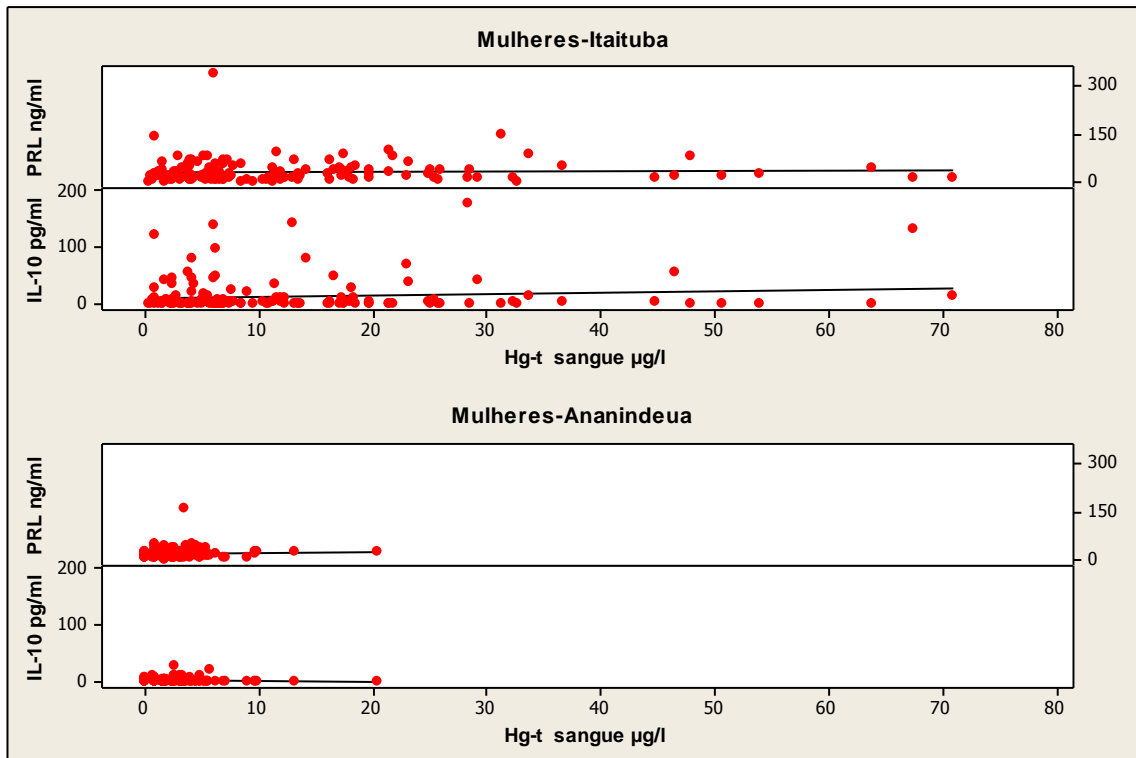


Figura 9. Níveis de PRL e IL-10 de acordo com os teores de Hg-t em sangue de mulheres não puérperas dos municípios de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil. Em Itaituba as correlações encontradas foram: Hg e PRL $r=0,0442$, $p=0,5992$; Hg e IL-10 $r=0,1131$, $p=0,1774$; PRL e IL-10 $r=-0,0036$, $p=0,9658$. Em Ananindeua, as correlações foram entre Hg e PRL $r=0,0737$, $p=0,3608$; Hg e IL-10 $r=-0,0245$, $p=0,7612$; PRL e IL-10 $r=-0,1136$, $p=0,1582$.

Os níveis de Hg-t das mulheres de Itaituba, no puerpério e na avaliação realizada nas mesmas mulheres, cerca de um ano depois no domicílio, correlacionaram-se de maneira positiva, moderada e significativa ($r=0,4736$; $p<0,0001$), sugerindo uma continuidade da exposição ambiental ao mercúrio.

3.3. Avaliação dos níveis de Hg-t, PRL e IL-10 em relação às variáveis epidemiológicas, através de modelos de regressão linear e logística

As variáveis das Tabelas 1 e 2 foram incluídas em modelos de regressão linear múltipla *stepwise* em relação às variáveis dependentes Hg-t (nesse caso, foi também incluída a variável consumo de peixe da Tabela 4), PRL e IL-10, após transformação logarítmica. As variáveis que apresentaram contribuição relevante para o modelo foram selecionadas a partir da regressão parcial ($p < 0.10$) e mantidas no modelo final (Tabelas 10 e 11).

Nas mulheres puérperas, o consumo de peixe foi positivamente associado com os níveis de Hg-t em Itaituba ($p < 0,0001$) e Ananindeua ($p < 0,0001$), explicando 11,7% e 28,5% da variação de Hg-t representada pelo modelo em cada cidade, respectivamente. No caso da PRL em Itaituba, a paridade apresentou influência positiva no modelo ($p = 0,0107$), havendo uma tendência de associação positiva com a IL-10 ($p = 0,0609$). Em Ananindeua, o peso do recém-nascido apresentou associação positiva para a PRL no modelo de regressão ($p = 0,0140$), junto com a IL-10 ($p = 0,0152$). A capacidade explicativa do modelo da PRL em Itaituba e Ananindeua foi 6,5 e 7,2%, respectivamente. Em relação a IL-10, em Itaituba observou-se uma tendência positiva na contribuição da PRL ($p = 0,0827$) e significativa contribuição para o modelo em Ananindeua ($p = 0,0197$). Percentuais de 2,1% da variação de IL-10 em Itaituba e 3,5% em Ananindeua foram observados nos modelos (Tabela 10).

Nas mulheres não puérperas, a variável dependente Hg-t mostrou-se associada positivamente ao consumo de peixe ($p = 0,0099$) e à idade das mulheres ($p = 0,0144$), com o modelo linear respondendo por 8,3% da variação de Hg-t. O mesmo ocorreu em Ananindeua em relação ao consumo de peixe ($p = 0,0170$), havendo uma tendência de associação com a idade ($p = 0,0610$). O modelo apresentou uma capacidade explicativa de 5,6%. Em relação à PRL, houve associação negativa com a IL-10 em Itaituba ($p = 0,0270$) e positiva em Ananindeua ($p = 0,0266$), respondendo os modelos por 5,0% e 3,1% da variação da PRL em cada cidade, respectivamente. De maneira similar, a IL-10 apresentou associação negativa com a PRL em Itaituba ($p = 0,0357$) e positiva em Ananindeua ($p = 0,0266$), respondendo por 3,0% da variação da IL-10 em Itaituba e 3,1% em Ananindeua.

TABELA 10. Modelo final de regressão linear *Stepwise* das variáveis Hg-t, PRL e IL-10 nas mulheres puérperas de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil

Variáveis	Coeficiente de regressão	p	Modelo de regressão		
			F	R ²	p
Itaituba					
Variável dependente: Hg-t			18,843	0,117	0,0001
Consumo de peixe	0,782	<0,0001			
Variável dependente: PRL			4,947	0,065	0,0085
Paridade	40,938	0,0107			
IL-10	0,494	0,0609			
Variável dependente: IL-10			3,059	0,021	0,0786
PRL	0,045	0,0827			
Ananindeua					
Variável dependente: Hg-t			61,450	0,285	<0,0001
Consumo de peixe	0,748	<0,0001			
Variável dependente: PRL			5,991	0,072	0,0035
Peso do recém-nascido	76,923	0,0140			
IL-10	2,964	0,0152			
Variável dependente: IL-10			5,579	0,035	0,0183
PRL	0,012	0,0197			

TABELA 11. Modelo final de regressão linear *Stepwise* das variáveis Hg-t, PRL e IL-10 nas mulheres não puérperas de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil

Variáveis	Coeficiente de regressão	p	Modelo de regressão		
			F	R ²	P
Itaituba					
Variável dependente: Hg-t			6,403	0,083	0,0026
Consumo de peixe	1,398	0,0099			
Idade	0,670	0,0144			
Variável dependente: PRL			3,765	0,050	0,0248
Paridade	-0,278	0,0876			
IL-10	-0,052	0,0270			
Variável dependente: IL-10			4,505	0,030	0,0333
PRL	-0,612	0,0357			
Ananindeua					
Variável dependente: Hg-t			4,600	0,056	0,0114
Consumo de peixe	0,435	0,0170			
Idade	0,439	0,0610			
Variável dependente: PRL			5,031	0,031	0,0247
IL-10	0,048	0,0266			
Variável dependente: IL-10			5,031	0,031	0,0247
PRL	0,649	0,0266			

Para cada grupo de mulheres foi ainda elaborado um modelo de regressão logística múltipla relacionando cada variável dependente (Hg-t, PRL e IL-10) com as variáveis sócio-econômicas e epidemiológicas apresentadas nas Tabelas 3 e 4. Foram selecionadas para o modelo, as variáveis que apresentaram inicialmente probabilidade inferior a $p < 0.200$. Em Itaituba, a concentração de PRL (abaixo ou igual à mediana e acima da mediana) ($p = 0,0460$, coeficiente de regressão = $-0,7509$) associou-se negativamente com os níveis de Hg-t. O trabalho em garimpo (sim ou não) ($p = 0,0173$, coeficiente de regressão = $1,3720$) e o consumo de peixe (duas vezes ou acima de 2 vezes por semana) ($p < 0,0001$, coeficiente de regressão = $1,8510$) associaram-se positivamente com o Hg-t, segundo o modelo

logístico. Para o modelo da PRL nenhuma das variáveis se destacou. No caso da IL-10, a ocorrência de morbidade referida influenciou positivamente o modelo ($p=0,0210$, coeficiente de regressão= $1,0691$) e o trabalho em garimpo apresentou uma tendência de associação negativa ($p=0,0672$, coeficiente de regressão= $-1,0888$). Em Ananindeua, o consumo de peixe contribuiu positivamente para os níveis de Hg-t nas puérperas ($p=0,0070$, coeficiente de regressão= $2,8602$), com a escolaridade (nível elementar e acima do elementar) tendendo à significância ($p=0,0515$, coeficiente de regressão= $1,2696$). Em relação à PRL, a referência de aborto espontâneo contribuiu para a significância do modelo ($p=0,0057$, coeficiente de regressão= $1,4770$) e no caso da IL-10, o tabagismo apresentou tendência de associação ($p=0,0791$, coeficiente de regressão= $1,0460$) (Tabela 12).

As variáveis consumo de peixe ($p=0,0069$) e trabalho anterior em garimpo ($p=0,0240$, coeficiente de regressão= $1,2989$) apresentaram associação com os níveis de Hg-t nas mulheres não puérperas de Itaituba. Em relação à PRL, houve apenas uma tendência de associação negativa com a variável ocupação (do lar e outras ocupações) ($p=0,0569$, coeficiente de regressão= $-0,7563$). Para o modelo da IL-10, houve associação positiva com a variável trabalho anterior em garimpo ($p=0,0199$, coeficiente de regressão= $1,4451$) e negativa com o consumo de bebida alcoólica (consumidora e não consumidora) ($p=0,0131$, coeficiente de regressão= $-0,9112$). A morbidade referida apresentou tendência de associação negativa com a IL-10 no modelo ($p=0,0783$, coeficiente de regressão= $-0,8398$) (Tabela 13). Em Ananindeua, nenhuma variável se destacou em relação aos modelos de Hg-t, PRL e de IL-10.

TABELA 12. Modelo de regressão logística múltipla das variáveis Hg-t, PRL e IL-10 ajustado por variáveis sócio-econômicas e epidemiológicas nas mulheres puérperas de Itaituba e Ananindeua, Pará, Brasil

Variáveis	Hg-t		PRL		IL-10	
	OR (IC 95%)	P	OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p
Itaituba						
PRL	0,471 (0,23- 0,99)	0,0460				
garimpo	3,943 (1,27-12,21)	0,0173			0,336 (0,10-1,08)	0,0672
Consumo de Peixe	6,366 (2,76-14,67)	<0,0001				
Morbidade na gravidez					2,912 (1,17-7,22)	0,0210
Ananindeua						
Escolaridade	3,559 (0,99-12,77)	0,0515				
Consumo de peixe	17,464 (2,19-139,49)	0,0070				
Tabagismo					2,846 (0,89-9,15)	0,0791
Aborto espontâneo			4,380 (1,54-12,49)	0,0057		

TABELA 13. Modelo de regressão logística múltipla das variáveis Hg-t, PRL e IL-10 ajustado por variáveis sócio-econômicas e epidemiológicas nas mulheres não puérperas de Itaituba, Pará, Brasil

Variáveis	Hg-t		PRL		IL-10	
	OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p
Garimpo	3,665 (1,19-11,32)	0,0240			4,242 (1,26-14,32)	0,0199
Consumo de Peixe	2,742 (1,32-5,70)	0,0069				
Ocupação			0,469 (0,22-1,02)	0,0569		
Etilismo					0,402 (0,19-0,85)	0,0178
Morbidade < 30 dias			0,451 (0,18-1,12)	0,0870	0,431 (0,17-1,10)	0,0783

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos a ocorrência de padrões secretórios de PRL e IL-10 em mulheres puérperas ou não, expostas ao mercúrio na região de Itaituba (Sudoeste do Pará) e em mulheres não expostas na região de Ananindeua, área metropolitana de Belém (cerca de 880 Km distante) para comparar a magnitude da resposta secretora da PRL e IL-10 sem a interferência da toxicidade mercurial. O estudo mostrou que a exposição ao Hg, quando associada a outras enfermidades de evolução flogística parece amplificar respostas regulatórias neuroimunoendócrinas pró- (liberação de PRL) e anti-inflamatórias (liberação de IL-10), em uma condição funcional crítica para o sistema imune da mãe e do neonato. Estes resultados abrem novas perspectivas para diagnósticos associativos à intoxicação mercurial. O estudo mostrou ainda a associação de fatores epidemiológicos e reprodutivos com os padrões secretórios de PRL e IL-10 nas mulheres expostas e não expostas.

A exposição sistêmica e, por conseqüência, a disponibilidade do Hg para os tecidos de mulheres adultas de faixa etária reprodutiva, em duas condições neuroimunoendócrinas de regulação da secreção de PRL e IL-10 representadas pelo puerpério e ciclo menstrual regular foi, como esperado, evidente em Itaituba, sendo aproximadamente quatro vezes a média dos níveis encontrados em Ananindeua, independentemente da condição funcional. Dois fatores podem ter sido determinantes para esse quadro: o consumo de peixe e o trabalho anterior em garimpo. No entanto, o pequeno número de mulheres (11,8%) que trabalharam em garimpo e o fato das mesmas não realizarem a queima do amálgama ouro-mercúrio, reduzem a importância da exposição ao mercúrio elementar (exposição ocupacional) e sugerem exposição ambiental preponderante ao MeHg (metilado e bioacumulado na cadeia alimentar aquática), o composto mais absorvido (via oral), de maior mobilidade e toxicidade (MAGOS e CLARKSON, 2006).

Os níveis de Hg-t em mulheres de Ananindeua constituem também um grupo com linha de base acima do esperado, considerando serem residentes permanentes de área sem evidência de fonte antropogênica de Hg. No entanto, isto sugere a disponibilidade de carga ambiental de mercúrio através da fonte alimentar representada pelo pescado, que na Amazônia pode ser mais elevada em relação a outras regiões do mundo, o que se reflete na exposição de populações ao MeHg em

áreas sem mineração de ouro, inclusive em áreas de conservação ambiental (SANTOS *et al.*, 2002; BARBIERI e GARDON, 2009). A cartografia da contaminação ambiental pelo Hg na Amazônia mostra acúmulo sedimentar historicamente elevado para regiões distantes de qualquer fonte antropogênica (ROULET *et al.*, 2001), sugerindo, emissão e distribuição difusa, provavelmente resultante da prática secular em desmatar e queimar a floresta à busca de solos umidificados, como consequência da fertilidade desgastada do solo anteriormente cultivado. Essa emissão difusa poderia justificar a detecção de níveis elevados do metal em peixes de mobilidade restrita (não migratórios) em áreas sem histórico de garimpagem, porém habitadas por povos herdeiros da cultura da queimada oriunda de povoados tradicionais. Um ponto de vista alternativo, baseia-se na movimentação eólica de massas de ar contendo mercúrio volatilizado pelo aquecimento, em um esforço de justificar a contaminação à distância (HACHIYA *et al.*, 1998), o que não explicaria a contaminação de locais com barreiras naturais à continuidade dos ventos.

A exposição humana ao Hg em Itaituba é influenciada pela atividade garimpeira remanescente da intensa atividade aurífera ocorrida nas décadas de 70 e 80, e que posteriormente tem apresentado decaimento e oscilação na produtividade (SANTOS *et al.*, 2000). De fato, a região de Itaituba parece apresentar condições propícias para concentrar maiores níveis de exposição mercurial. O Tapajós é um rio de águas relativamente lólicas, em que ocorre transição para um sistema lêntico, de correnteza mais fraca, o que favorece a sedimentação localizada (ROULET *et al.*, 2001), a despeito de terem sido registrados níveis de mercúrio em cabelo acima de 10 µg/g em comunidades próximas de sua desembocadura, como é o caso da comunidade de Ponta de Pedras, distante 20 Km da foz (AKAGI e NAGANUMA, 2000). Este pode ser o caso típico de contaminação por peixes migradores, já que esta é uma comunidade de pescadores, cuja atividade depende da captura de espécimes transeuntes, pelo fato de não existirem criatórios naturais às proximidades.

Níveis de exposição bem inferiores foram detectados em mulheres residentes em Porto Velho (Rondônia) cidade localizada às margens do rio Madeira, sujeito a efluentes de lixiviação de garimpos instalados, inclusive em seus afluentes (MARQUES *et al.* 2007; 2008). A média da concentração de Hg-t (6,03 µg/l) encontrada em sangue de cordão umbilical (considerado pelos autores como

materno), foi menor que a metade dos níveis encontrados em nosso estudo em Itaituba, onde se estima que os níveis de exposição se mantêm relativamente constantes desde a última década. No início da década de 2000 foi realizado um estudo com puérperas e recém-nascidos na cidade de Itaituba, que encontrou níveis de Hg-t em sangue materno 11,53 µg/l, e no cordão umbilical 16,68 µg/l, com forte e positiva correlação entre ambos (SANTOS *et al.*, 2007). Nosso estudo encontrou níveis em sangue materno um pouco maiores (13,93 µg/l) e não incluiu resultados para os recém-nascidos, porém os níveis encontrados nas mães podem ser considerados estimativos dos teores presentes nos filhos, pelo processo de transferência placentária do Hg, sendo que nos recém-natos, os níveis podem ser significativamente maiores que os verificados nas mães (GRANDJEAN *et al.*, 1999, BJORNBERG *et al.*, 2005, SAKAMOTO *et al.*, 2007, MIRANDA *et al.*, 2011). Curiosamente, a transferência materna de Hg para o feto parece não subtrair quantidades relevantes a ponto de alterar os níveis mensurados na mãe cerca de um ano após o parto, como observado neste estudo. Alternativamente, a exposição continuada no período poderia ter compensado essa diferença, repondo a fração transferida para o concepto. No primeiro caso, estudos em mulheres grávidas e não grávidas da mesma comunidade também não apresentaram diferença significativa entre os níveis de Hg-t (PINHEIRO *et al.*, 2005).

Em contraste, outros estudos com mulheres em idade fértil na Amazônia, utilizando o cabelo como matriz de análise, sugerem que os níveis de mercúrio podem variar, dependendo de padrões de consumo de peixe e de fatores individuais e que, durante a gravidez, podem existir momentos críticos em que os teores de Hg podem ser mais elevados (BOISCHIO *et al.*, 1998, 2000, CORDIER *et al.*, 2002, PINHEIRO *et al.*, 2007, MONRROY *et al.*, 2008, MALM *et al.*, 2010). Neste estudo, porém, não houve diferença nos teores de Hg-t entre puérperas e não puérperas dentro do grupo exposto e do grupo não exposto.

A variável mais associada com os níveis de mercúrio nos modelos de regressão linear múltipla e de regressão logística múltipla em todos os grupos de mulheres foi o consumo de peixe (Tabelas 10 a 13). Houve diferença entre o consumo nas mulheres puérperas e não puérperas, expostas e não expostas, com destaque para as não puérperas. Um estudo realizado com mulheres grávidas na cidade de Alta Floresta, Mato Grosso, verificou uma associação positiva significativa do consumo de peixe com os níveis de mercúrio em cabelo apenas na análise

univariada ($p=0,01$), perdendo importância no modelo multivariado ($p=0,164$), o que foi explicado em função do baixo consumo de peixe e preferência por carne vermelha devido aos hábitos culturais dos imigrantes de outra região do Brasil, população predominante no estudo (HACON *et al.*, 2000). Porém, a relação positiva dos teores de mercúrio em cabelo e sangue com o consumo de peixe, principalmente vinculada à exposição ao mercúrio orgânico, tem sido mostrada por muitos estudos não só na região amazônica (DOREA *et al.*, 2005; PINHEIRO *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2007; MARQUES *et al.*, 2007; BARBIERI e GARDON, 2009; MALM *et al.*, 2010;), como em outras partes do mundo (DEWAILLY *et al.*, 2008; SCHOEMAN *et al.*, 2010; DAVIDSON *et al.*, 2008; 2010; GRANDJEAN *et al.*; 2010; MOZAFFARIAN *et al.*, 2011). No modelo logístico do nosso estudo, além da frequência até duas e mais de duas refeições semanais de pescado, o trabalho em garimpo também esteve associado ao mercúrio no caso das mulheres de Itaituba, embora com menos força de associação do que a ingestão de pescado. No caso de Itaituba, onde a queima do amálgama ouro-mercúrio ocorre em ambiente de garimpo e também urbano (SANTOS *et al.*, 2003), a provável contribuição concomitante de várias formas do contaminante para a carga corpórea de mercúrio nos indivíduos residentes pode ser relevante. A idade também se mostrou importante no modelo linear das mulheres não puérperas de Itaituba ($p=0,0161$), podendo ser indicativo do tempo de exposição ao Hg.

Os níveis de PRL e de IL-10 também foram maiores nas mulheres de Itaituba em relação à Ananindeua, exceção para a PRL nas puérperas de Ananindeua que apresentaram concentrações maiores do hormônio-citocina (Tabelas 8 e 9). A distribuição por idade evidenciou que a diferença de PRL nas puérperas (maior nas mulheres de Ananindeua) ocorreu na faixa etária inicial de 15 a 20 anos e na final, a partir de 26 anos (Figuras 4 a 6). Nas mulheres não puérperas, a faixa etária intermediária, de 21 a 25 anos, apresentou concentrações maiores de PRL em Itaituba. Esses níveis secretórios podem estar relacionados com a evolução do período de fertilidade, que inicia aos 18 anos, alcança níveis ótimos na metade da década dos 20 anos e começa a decair no final dessa década (VELDE e PEARSON, 2002) e sugerem que mesmo em condições de hiperprolactinemia, é possível evidenciar diferenças de respostas secretórias da PRL em função de outros fatores que podem incluir contaminantes ambientais como o Hg. Todas as faixas etárias de mulheres, puérperas ou não, expostas ao Hg também apresentaram maiores níveis

de IL-10, à exceção das mulheres não puérperas de 15 a 20 anos, possivelmente devido ao reduzido número de mulheres nessa faixa e a ocorrência de níveis de IL-10 abaixo do limite de detecção do método. Esses resultados concordam com estudos *in vitro* e *in vivo* que demonstraram o aumento da produção de IL-10 após exposição a formas inorgânicas de Hg (VAS e MONESTIER, 2008) e orgânicas em repetidas exposições (COOPER, 2008). Contudo, outros estudos com cultura de células mononucleares de sangue periférico humano, tratadas com formas orgânicas ou inorgânicas de mercúrio, não evidenciaram o aumento da secreção de IL-10 (GARDNER *et al.*, 2010a).

Os modelos de regressão linear múltipla sugeriram uma relação quase sempre significativa entre a PRL e a IL-10, quando uma ou outra assumia a posição de variável dependente. Nas puérperas de Itaituba, essa associação foi muito próxima do limite de significância, contudo, nos demais grupos, a PRL e a IL-10 se mostraram associadas (Tabelas 10 e 11). Características maternas e do neonato influenciaram o modelo linear da PRL nas mulheres puérperas. A associação positiva entre paridade nas puérperas de Itaituba e seus níveis de PRL assemelha-se ao encontrado por ARSLAN *et al.* (2006), em mulheres de origem hispânica e diverge dos mesmos autores em relação a mulheres de origem caucasiana, asiática e afro-americana, que apresentaram associação negativa entre paridade e PRL. A associação positiva do peso do recém-nato das puérperas de Ananindeua com os níveis de PRL concorda com XU *et al.* (2003) em relação a mulheres chinesas e diverge desses autores em relação a mulheres norte-americanas.

Nos modelos logísticos, quando as variáveis binárias foram baseadas na mediana de PRL e IL-10, a relação entre ambas não se mostrou significativa e estas variáveis não permaneceram no modelo final. No entanto, os resultados observados nos modelos lineares concordam com estudos que indicam que a PRL parece contribuir na modulação da produção de citocinas pelas células do sistema imune de variadas maneiras, dependendo do estímulo. Em experimentos com sangue total humano estimulado com o mitógeno lipopolissacaride (LPS), a PRL aumentou significativamente a produção de IL-10, independente da concentração utilizada considerada fisiológica (15 ng/ml), estressora (30 ng/ml) ou elevada (100-300 ng/ml) (MATALKA, 2003). Nas puérperas de Itaituba, a presença de morbidade na gravidez influenciou positivamente a IL-10 ($p = 0,0210$) e apresentou-se próxima do limite de significância no caso de não puérperas ($p = 0,0783$), situação inversa da variável

trabalho em garimpo que mostrou associação positiva nas mulheres não puérperas ($p=0,0199$) e com tendência de associação negativa nas puérperas ($p=0,0672$).

Em relação ao mercúrio, a PRL apresentou associação negativa nas mulheres puérperas de Itaituba ($p=0,0460$). Este resultado diferiu do encontrado por CARTA e Colaboradores (2003) em indivíduos adultos do gênero masculino, expostos ao mercúrio orgânico através do consumo de peixe, que apresentaram níveis de PRL aumentados, sugerindo-se possível interferência do agente neurotóxico no sistema dopaminérgico, principal responsável pelo controle inibitório do hormônio (CARTA *et al.*, 2003). Em Itaituba, além de se tratar de uma população feminina em idade fértil, as mesmas estavam no puerpério, o que possibilita um perfil regulatório de secreção da PRL diferente do observado no grupo do estudo italiano.

A exposição crônica a contaminantes, como o mercúrio, assim como a presença de infecções de diversas etiologias, pode levar a desequilíbrio dos sistemas orgânicos. Doenças como a malária são muito prevalentes em regiões de mineração de ouro. No estudo realizado com mulheres grávidas em Alta Floresta, referido anteriormente, 35% delas já haviam tido episódios de malária antes ou ainda durante a gestação (HACON *et al.*, 2000), uma prevalência maior que a do nosso estudo em que 12,9% das mulheres com morbidade na gravidez referiram a malária. A dengue foi outra doença infecciosa muito citada em Itaituba, tanto durante a gravidez (6,4%), quanto depois (16,0%). Embora a prevalência de morbidade recente entre as puérperas tenha sido menor em Itaituba (21,5%) em relação a Ananindeua (45,5%), naquele grupo o rol de morbidade foi mais variado. Entre as mulheres não puérperas, o relato de morbidade predominou no grupo de Itaituba. Destaca-se o fato da IL-10 e da PRL apresentarem associação significativa com a morbidade em puérperas e não puérperas, respectivamente, apenas de Itaituba (Tabela 9). No seu papel imunológico, a PRL atua com potente modulação positiva em algumas infecções por protozoários, e recentemente tem sido sugerido que a PRL também atue como reguladora da atividade anti-parasitária em relação ao *Plasmodium falciparum* (LÓPEZ-MEZA *et al.*, 2010). Em mulheres grávidas sudanesas portadoras de malária por *Plasmodium falciparum*, os níveis de PRL encontravam-se diminuídos e as concentrações de IL-10 aumentadas, em relação aos controles, com uma correlação negativa significativa entre PRL e IL-10 (BAYOUMI *et al.*, 2009). No presente estudo, a associação negativa entre PRL e a

IL-10 ocorreu nas mulheres não puérperas, expostas ao Hg e a uma maior diversidade de morbidade, inclusive doenças infecciosas como dengue e malária.

Agentes etiológicos parasitários, bacterianos, fúngicos e virais, inclusive o vírus da dengue, podem se multiplicar nos macrófagos, no qual penetram pela formação de imunocomplexos com anticorpos IgG não neutralizantes, havendo ligação com receptores Fc γ (Fração c dos anticorpos que se liga na célula do sistema imune) dos macrófagos e que pode favorecer a síntese de IL-10, através da via das proteínas kinase ativada por mitógeno-MAPKs. Além disso, ao mesmo tempo que a ligação com esses receptores estimula a resposta contra os patógenos, também pode suprimir a imunidade inata influenciando a relação Th1-Th2, o que pode piorar a infecção, através do mecanismo chamado aumento intrínseco dependente de anticorpo (HALSTEAD *et al.*, 2010). Sendo um agente imunotóxico, o mercúrio também pode induzir a formação de imunocomplexos, o que é bem documentado em modelos animais, em relação a várias formas mercuriais inclusive orgânicas (HAVARINASAB, *et al.*, 2004; SILBERGELD *et al.*, 2005). Em vista disso, em uma condição ambiental em que os indivíduos estejam submetidos a exposição crônica ao mercúrio, como nas mulheres de Itaituba deste estudo, a interação dos mecanismos imunológicos envolvendo IL-10 e Hg pode ser relevante para a resposta orgânica imunocompetente do indivíduo. Esse tipo de exposição, mesmo que a baixos níveis, pode atuar como modificador de risco, alterando a susceptibilidade do indivíduo no sentido de favorecer estados mórbidos ou acelerar doenças (YUAN, 2012).

A infecção do trato urinário nas puérperas de Ananindeua destacou-se como principal morbidade, sendo relatada por mais de 90% das mulheres, possivelmente suplantando em percepção outros eventos mórbidos que as mesmas tenham tido no período e sua ocorrência está relacionada a complicações na gravidez (DUARTE *et al.*, 2002), que no entanto, não foram referidas pelas mulheres do estudo. A IL-10 também se associou positivamente com o consumo de bebida alcoólica (referido como social ou ocasional) nas mulheres não puérperas de Itaituba ($p=0,0178$), havendo uma tendência de associação positiva com tabagismo nas mulheres puérperas de Ananindeua ($p=0,0791$). O consumo abusivo de álcool tem sido relacionado com o aumento de interleucinas do tipo Th2, inclusive a IL-10, acompanhando a elevação dos níveis de IgE total (GONZALEZ-QUINTELA, *et al.*, 1999). Contudo, em modelos *in vitro*, ocorre diminuição da produção de IL-10 por

células epiteliais do trato respiratório, submetidas à fumaça de cigarro (ST-LAURENT *et al.*, 2009).

A PRL mostrou tendência de associação positiva com o tipo de ocupação ($p=0,0569$) e negativa com a morbidade recente nas mulheres não puérperas de Itaituba ($p=0,0870$) (Tabela 13). Diversas condições fisiológicas e patológicas levam ao aumento sérico da PRL, desde gravidez e lactação até infecções, traumas, tumores, distúrbios emocionais e medicamentos e ela é considerada um dos principais hormônios induzidos por estresse (LA TORRE e FALORNI, 2007). Como este estudo foi realizado em condições ambientais no hospital e no domicílio das mulheres, não foi possível avaliar objetivamente a interferência de outros aspectos, além daqueles contemplados pelo estudo, na resposta aos fatores imuno-endócrinos selecionados, porém, observa-se que as variáveis referentes às condições de vida das mulheres podem ser potenciais geradoras de estresse, e conseqüentemente, podem influenciar o seu perfil imuno-endócrino.

Estudos populacionais na região do rio Tapajós relacionados a possíveis efeitos do mercúrio como neurotóxico e imunotóxico ainda são limitados. Em grupos garimpeiros, estudos com marcadores de disfunção auto-imune como anticorpo antinuclear (ANA) e antinucleolar (ANoA), encontraram uma maior prevalência, sobretudo de ANoA, em um grupo garimpeiro da bacia do Tapajós, em relação a garimpeiros de diamante e esmeralda no estado de Goiás, bem como em relação a uma comunidade do município de Juruti, estado do Pará (SILBERGELD *et al.*, 2005). Além desses anticorpos direcionados a antígenos no núcleo ou nucléolos, o mesmo grupo quantificou citocinas pro-inflamatórias como interleucina 1β , TNF- α e IFN- γ , que também foram mais prevalentes em garimpeiros do Tapajós do que nos mineradores de diamantes ou esmeralda. Contudo, outras citocinas como IL-4, IL-17 e IL-10 foram medidas, com resultados abaixo do limite de detecção em mais de 50% das amostras, prejudicando a comparação dos grupos (GARDNER *et al.*, 2010b).

Em um subgrupo de 61 puérperas participantes do estudo desenvolvido em Itaituba em 2000-2001 mencionado acima (SANTOS *et al.*, 2007) foram quantificados os níveis de mercúrio e anticorpos ANA e ANoA, IgG total, IL-10 e IL-17 entre outras citocinas. Os teores médios de Hg-t em sangue foram menores que no presente estudo (6,90 $\mu\text{g/l}$) e apenas a IgG total mostrou correlação significativa com os níveis de mercúrio ($r=0,60$, IC 95% 0,25, 0,96). Os níveis de IL-10 e IL-17

estavam abaixo do limite de detecção (1.49 pg/ml) e por isso não foram tratados estatisticamente (NYLAND *et al.*, 2011). No presente estudo em Itaituba, cerca de 70% das mulheres puérperas (112, 77,8%) ou não puérperas (100, 69,4%) apresentaram concentrações acima do limite de detecção para IL-10 (1,0 pg/ml) e em Ananindeua, esses percentuais foram menores (96, 61,5% para puérperas e 64, 41,0% para não puérperas). As correlações lineares entre Hg-t, PRL e IL-10, não foram significantes, exceto entre PRL e IL-10 nas puérperas de Ananindeua, que apresentou uma correlação positiva ($r=0,1870$; $p=0,0197$). Contudo, o modelo logístico multivariado mostrou associação negativa do Hg-t com a PRL nas puérperas expostas. A aplicação de outros métodos de análise multivariada não linear pode ser necessária para avaliar as diferenças encontradas neste estudo, entre os níveis dos biomarcadores nas distintas populações, uma vez que os métodos lineares e logísticos apresentaram algumas limitações.

O estado de imunotolerância na gravidez se caracteriza pela modulação da resposta de células T no sentido de Th1 (que inclui citocinas como IL-2 e IFN- γ) para Th2 (IL-4, IL-10) visando proteger o embrião e a manutenção da gravidez, evitando o aborto (KRUSE *et al.*, 2000; MORELI *et al.*, 2012), havendo inclusive produção de IL-10 pelos citotrofoblastos placentários (ROTH *et al.*, 1996). Essa relação no sentido Th1-Th2 em mulheres grávidas saudáveis, representada pela razão IL-4/IFN γ , pode ser maior durante o primeiro e o segundo trimestre, quando comparado ao terceiro trimestre, o pós-parto e mulheres não grávidas. Nesse estudo, a expressão de mRNA da IL-10 teve um aumento discreto na gravidez, porém, os níveis séricos de IL-10 aumentaram mais acentuadamente, sendo os maiores valores detectados durante o terceiro trimestre e se correlacionaram de forma significativa com os níveis de 17 β estradiol, que também aumentaram no decurso da gravidez. A diferença da expressão de mRNA da IL-10 e a concentração sérica foi atribuída como tendo provável fonte os citotrofoblastos. Não houve associação da IL-10 com a prolactina (KRUSE *et al.*, 2000), diferindo do nosso estudo que, entretanto, também encontrou valores de IL-10 mais elevados no pós-parto, em relação às mulheres não grávidas. Os maiores níveis de IL-10 estavam presentes nas mulheres de Itaituba, expostas ao Hg, quando comparado com as mulheres de Ananindeua, não expostas (Tabela 8).

A prolactina como hormônio-citocina expande o seu papel na gestação, período em que as fontes extra-pituitárias como a glândula mamária, placenta e

útero contribuem para a produção da PRL pelos lactotrofos da hipófise, reconhecidos como principal fonte de PRL (BACHELOT e BINART, 2007). As necessidades metabólicas aumentadas durante a gravidez, bem como o aumento da demanda de oxigênio para os tecidos maternos e fetais elevam o estresse oxidativo nessa fase. Para proteger órgãos como o coração (que apresenta um aumento fisiológico reversível) o organismo aciona vias de sinalização como a STAT3, ativada pela prolactina, levando a produção de angiogênese no miocárdio, podendo mediar a hipertrofia do cardiomiócito. Isto pode ser estimulado por outras vias, uma vez que ratas knockout para a via STAT3 apresentaram crescimento normal desses tecidos na gravidez, porém, houve aumento da apoptose e ocorrência de dilatação e fibrose no pós-parto, sugerindo a importância dessa via para o retorno às condições fisiológicas do órgão. A STAT3 também inibe as espécies reativas de oxigênio - ROS pela regulação crescente da enzima Manganês superóxido dismutase - MnSOD. A diminuição desta enzima estimula a liberação da protease catepsina-D que leva a clivagem da forma de 23 kDa da prolactina para a forma de 16 kDa, que tem função antiangiogênica e pró-apoptótica e que, em estudos experimentais, induziu efeitos lesivos para os tecidos e para a função cardíaca em ratas grávidas ou não (LOK *et al.*, 2011). Assim, esses mecanismos relacionados à PRL podem contribuir para a manutenção e proteção dos sistemas orgânicos femininos inclusive durante a gravidez, bem como em caso de desequilíbrio (em situações de alta produção de estresse oxidativo, por exemplo) podem se tornar desfavoráveis ao organismo.

Estudos recentes tem avaliado a relação das defesas orgânicas antioxidantes com o mercúrio em comunidades do rio Tapajós. Um desses estudos, envolvendo mulheres de 13 a 65 anos, avaliou os níveis sanguíneos de glutathione-GSH (co-fator da enzima glutathione peroxidase) e a atividade da enzima catalase-CAT em relação ao mercúrio nas comunidades expostas Barreiras e São Luiz do Tapajós e em uma comunidade do rio Tocantins, área distante da bacia do Tapajós. O aumento da glutathione (possivelmente como resposta ao estresse ou por inibição da glutathione peroxidase), bem como a diminuição da atividade da catalase (possível inibição), se correlacionou de forma significativa com os níveis de mercúrio total em cabelo (PINHEIRO *et al.*, 2008). Esses e outros biomarcadores de estresse oxidativo como a atividade da glutathione peroxidase (GSH-Px), atividade e % de reativação de δ -aminolevulinato desidratase-ALA-D foram pesquisados em indivíduos de 12

comunidades da bacia do Tapajós (GROTO *et al.*, 2010), verificando-se nas mulheres média de Hg em sangue maior que o do nosso estudo (31,9 µg/l) e as mesmas apresentaram uma atividade da GSH-Px mais elevada em relação aos homens, com tendência de aumento na atividade da ALA-D. A força de associação com o Hg se fortaleceu quando os modelos de regressão múltipla incluíram o consumo de peixe (GROTO *et al.*, 2010). Esses estudos indicam a associação da exposição ao mercúrio com o estresse oxidativo nesses indivíduos (com resposta mais evidente nas mulheres) e os autores levantam a possibilidade da relação com disfunções neurológicas e cardiovasculares nessas populações. A intoxicação crônica pelo metilmercúrio pode levar a distúrbios neurológicos de longa duração. Sintomas como parestesias em partes distais das extremidades e em torno dos lábios persistiram em pessoas que haviam sido expostas por 20 anos ao mercúrio na região de Minamata, mesmo 30 anos após ter cessado a exposição (EKINO *et al.*, 2007). No presente estudo, não foi relatado pelas participantes sintomatologia sugestiva de disfunção neurológica, contudo, tendo em vista que a resposta secretória da PRL é fortemente afetada por estresse de várias etiologias, podendo ser estimulada ou inibida em função da natureza do estímulo estressante (FREEMAN *et al.*, 2000), essas populações, inclusive a do nosso estudo, podem ter as diversas funções moduladoras da PRL também afetadas, em superposição aos efeitos adversos da exposição ao mercúrio.

A PRL tem sido relacionada com alterações cardiovasculares em estudos com marcadores séricos da função cardíaca, estresse oxidativo, apoptose, remodelamento e inflamação em mulheres com cardiomiopatia periparto-CMPP (caracterizada por insuficiência cardíaca de etiologia desconhecida, que pode ocorrer até 6 meses depois do parto). Em um estudo de seguimento de 6 meses em mulheres que tiveram CMPP, tratadas com medicamentos inibidores da enzima conversora de angiotensinogênio, diuréticos e betabloqueadores, a melhora da função cardíaca mostrou associação significativa com a diminuição dos marcadores Lactato desidrogenase oxidada (LDL-ox), IFN- γ e PRL. Considerando que a PRL (principalmente a forma de 16-kD) e o IFN- γ induzem reação inflamatória no endotélio, sugere-se uma progressão crônica de característica auto-imune nas mulheres que tiveram mal prognóstico, com possibilidade de sinergia entre estresse oxidativo, inflamação e PRL no desencadeamento da CMPP (FORSTER *et al.*, 2008). Esses resultados têm sido apoiados por um estudo recente que obteve

sucesso no uso da bromocriptina, um bloqueador do receptor D2 da dopamina e inibidor da PRL, em modelo experimental de CMPP e em um estudo piloto com pacientes, para a prevenção e tratamento de CMPP, sugerindo a PRL como uma nova alternativa terapêutica para essa cardiomiopatia (YAMAC *et al.*, 2010).

A correlação significativa de hiperprolactinemia com nitrito sérico em mulheres inférteis também tem sido associada à indução de dano oxidativo pela PRL (BASKAR *et al.*, 2008). Em mulheres logo após a menopausa, níveis de PRL acima de 8,0 ng/ml foram preditores de hipertensão arterial, sugerindo-se uma possível contribuição da PRL para o processo de arteriosclerose em mulheres pós-menopausa (GEORGIOPOULOS *et al.*, 2009) e para o aumento do risco de hipertensão arterial sistêmica a partir da menopausa (ZHANG *et al.*, 2010). Os grupos de mulheres do presente estudo, não apresentavam alterações cardíacas referidas, havendo duas puérperas (uma exposta e uma não exposta ao mercúrio) com relato de hipertensão arterial, porém 12,9% das 31 mulheres puérperas de Itaituba com morbidade referida, apresentavam edema de membro inferiores, que pode estar associado a hipertensão arterial na gravidez. No entanto, embora os níveis de PRL nas puérperas expostas ao Hg sejam menores do que nas não expostas, fora da gravidez e puerpério esses níveis se mantiveram elevados de forma significativa nas mulheres expostas, mesmo considerando a possibilidade de gravidez não informada e amamentação tardia, o que pode sugerir uma condição de estresse crônico nessas mulheres, no qual o Hg e a PRL podem estar envolvidos.

A desregulação de citocinas na gravidez, incluindo a IL-10 tem sido associada a aborto recorrente e parto prematuro (LIM *et al.*, 1996; ZEN *et al.*, 2010; MORELI *et al.*, 2012), bem como níveis elevados de PRL no início da gravidez (HIRAHARA *et al.*, 1998). Além disso, os metais, incluindo o mercúrio, podem ter um impacto negativo na função hipofisária, que pode ser inversamente correlacionada com a PRL, hormônio liberador de tirotrófina - TSH e progesterona e diretamente relacionada com o estradiol, levando ainda a mudanças no sistema imune com aumento de células NK e mudança na contagem de células T *helper* e T supressoras, interferindo no desenvolvimento da gravidez, podendo favorecer abortos recorrentes (GERHARD *et al.*, 1998). Neste estudo, embora as puérperas de Itaituba tenham apresentado uma paridade maior, não houve diferença significativa entre aborto referido em mulheres expostas e não expostas ao Hg. No entanto, a PRL em mulheres puérperas de Ananindeua apresentou associação com o relato de

aborto pregresso espontâneo ($p=0,0057$). A diferença nos níveis de IL-10 e PRL, além do Hg-t, entre os grupos pode sugerir conseqüências diferenciadas para o sistema imunológico das mulheres. Um aumento persistente de PRL circulante, pode resultar em efeitos semelhantes aos que ocorrem no período do puerpério e lactação, em que existe amenorréia e a PRL diminui vagarosamente, havendo supressão gonadal, pela inibição do hormônio liberador de gonadotrofina - GnRH, com conseqüente inibição dos hormônios luteinizante e folículo estimulante. Isto leva a anovulação e amenorréia, geralmente proporcional aos níveis circulantes de PRL. A hiperprolactinemia patológica está relacionada com infertilidade feminina e masculina (BACHELOT e BINART, 2007).

A PRL e outros hormônios como os hormônios tireoidianos, o hormônio do crescimento – GH e o fator de crescimento semelhante a insulina – IGF-1, parecem se contrapor aos efeitos de mediadores regulatórios negativos que podem ser produzidos em uma reação imunológica (como os glicocorticóides) e reduzir a susceptibilidade a doenças induzidas por estresse (DORSHKIND e HORSEMAN, 2001). No caso da PRL, esse papel protetor também tem sido sugerido em relação a agentes imunotóxicos como o mercúrio, em modelo animal de forma dose-dependente (RAMALINGAN *et al.*, 2003). O seu papel de moduladora da produção de citocinas por células do sistema imune ainda está sendo esclarecido à medida que os estudos avançam, contudo, a PRL tem a capacidade de interagir com os mecanismos celulares que promovem o aumento ou a diminuição de várias citocinas, como o INF γ , TNF α , IL-12 e IL-10, conforme o estímulo utilizado (MATALKA, 2003, LAU *et al.*, 2006).

Até onde temos conhecimento, este é o primeiro estudo que inclui a prolactina como biomarcador imunoendócrino em mulheres em idade fértil, inclusive no pós-parto, expostas ao mercúrio na região amazônica. Dada as limitações deste estudo e a não inclusão de outros componentes do sistema endócrino, que possuem interação com a regulação da PRL, como o fator liberador de tireotrofina - TRH e o estradiol (ROELFSEMA *et al.*, 2012), ainda assim, os resultados permitiram tecer considerações, em vista da evidência de elevada exposição ao Hg em Itaituba, de diferenças significantes entre os níveis de PRL e IL-10 entre mulheres expostas e não expostas e a força de associação com algumas variáveis epidemiológicas. Além disso, os níveis de mercúrio em sangue encontrados em Itaituba estão acima do limite de referência internacional de 8 $\mu\text{g/l}$ (WHO, 1990) e acima dos limites

considerados de segurança para grávidas (3,5 µg/l) e para adultos (5,8 µg/l), segundo a Agência Americana de Proteção Ambiental - EPA (MIRANDA *et al.*, 2011), o que indica a necessidade de vigilância e atenção para esse grupo vulnerável aos impactos deletérios do mercúrio, que pode levar a efeitos adversos ao desenvolvimento fetal e infantil.

Assim, tendo em vista que: a) o mercúrio tem ação estressora sobre o organismo, podendo levar a disfunções de sistemas tais como o nervoso, circulatório e renal; b) a prolactina pode atuar protegendo os sistemas orgânicos quando em níveis fisiológicos e quando em níveis elevados é também capaz de favorecer o estresse oxidativo e alterar a relação Th1-Th2 do sistema imune, influenciando a produção de citocinas, com evidências de associação com doenças autoimune, como o lúpus eritematoso, em que a PRL prolonga o ciclo de vida dos linfócitos B estimulando a produção de auto-anticorpos (ZEN *et al.*, 2010) e com alterações cardiovasculares (ZHANG *et al.*, 2010), então, é sensato considerar que, em uma população exposta ao mercúrio, como as mulheres deste estudo, pode haver uma somatória de condições de risco, que a médio ou longo prazo pode contribuir para o desencadeamento de processos mórbidos crônicos e interferir na resposta a processos agudos. Assim, é possível que a PRL seja útil como um biomarcador para a vigilância da resposta funcional neuroendócrina e imunológica dos indivíduos expostos ao Hg, pois tanto o seu aumento quanto a sua diminuição em casos de exposição a diversas formas de mercúrio, podem sugerir algum tipo de impacto nos sistemas de controle hipotalâmicos da PRL (CARTA *et al.*, 2003; LUCCHINI *et al.*, 2003). Certamente, também é necessário considerar as condições e variabilidades individuais que podem interferir no perfil imunoendócrino, incluindo os eventos mórbidos a que as populações estão sujeitas, e que contribuem no balanço regulatório da PRL nesses indivíduos.

5. CONCLUSÃO

Os níveis de mercúrio total em sangue estavam acima de valores de referência internacionais (8 µg/l, OMS) e se mantiveram estáveis um ano depois, sugerindo exposição crônica.

A concentração sérica de PRL foi menor em puérperas e maior em não puérperas de Itaituba, sugerindo menor capacidade secretória em condições de hiperprolactinemia e níveis oscilantes fora da condição reprodutiva.

Por sua vez, as concentrações de IL-10 estavam elevadas nas mulheres de Itaituba comparado com Ananindeua independente da condição funcional, sugerindo associação à maior morbidade, talvez favorecida pela exposição ao mercúrio.

Como era de se esperar, dentre os fatores determinantes para a exposição ao mercúrio, o consumo de peixe seguido de moradia em garimpo foram os fatores mais relacionados à exposição mercurial.

A exposição crônica ao Hg pode estar associada a mudanças nos padrões secretórios esperados de PRL e IL10 para a condição basal e puerpério, além de sua associação à maior morbidade, sugerindo maior suscetibilidade do sistema imunoneuroendócrino em mulheres expostas cronicamente ao metal.

A PRL pode ser útil como biomarcador na avaliação e monitoramento de populações expostas ao mercúrio devido o seu papel imunomodulador como hormônio-citocina, podendo interagir em resposta a agentes toxicológicos como o mercúrio.

REFERÊNCIAS

AKAGI H.; MALM O.; BRANCHES F. J. P. Human exposure to mercury due to mining in the Amazon, Brazil - A Review. **Environmental Science**, 4:199-211, 1996.

AKAGI H.; NAGANUMA A. Human exposure to mercury and the accumulation of methylmercury that is associated with gold mining in the Amazon basin, Brazil. **Journal of Health Science**, 44(5):323-328, 2000.

ALLOLIO B. *et al.*. Size heterogeneity of immunoreactive prolactin in patients with prolactinoma. **Acta Endocrinologica**, 114: 475-482, 1987.

ARRIFANO, G. P. F. Metilmercúrio e mercúrio inorgânico em peixes comercializados nos mercado municipal de Itaituba (Tapajós) e mercado do Ver-o-Peso (Belém). Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Pará. Instituto de Ciências Biológicas. 2011. 54p.

ARSLAN, A. A. *et al.*. Effects of parity on pregnancy hormonal profiles across ethnic groups with a diverse incidence of breast cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 15(11):2123-2130, 2006.

ASADULLAH K., STERRY W.; VOLK H. D.. Interleukin-10 therapy- review of a new approach. **Pharmacological Reviews**, 55:241-269, 2003.

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological profile for mercury**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 1999. 507p.

BACHELOT A.; BINART, N. Reproductive role of prolactin. **Reproduction** 133: 361-364. 2007.

BAKIR, Farhan. *et al.*. Clinical and epidemiological aspects of methylmercury poisoning. **Postgraduate Medical Journal**, 56: 1-10, January, 1980.

BARBIERI, F. L.; GARDON, J.. Hair mercury levels in Amazon populations: spatial distribution and trends. **International Journal of Health Geographics**, 8:71, 2009. Doi 19.1186/1476-072X-8-71

BAYOUMI, N. K. *et al.*. Cortisol, prolactin, cytokines and the susceptibility of pregnant Sudanese women to Plasmodium falciparum malaria. **National Institutes of Health**, 103(2): 111-7. 2009

BEN-JONATHAN, N.; LAPENSEE, C. R.; LAPENSEE, E. W. What can we learn from rodents about prolactin in humans. **Endocrine Reviews** 29 (1):1-41. 2007.

BEN-JONATHAN, N.; HNASKO, R.. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. **Endocrine Reviews**, 22 (6): 724-763, 2001.

BESEDOVSKY, L.; LANGE, T.; BORN, J.. Sleep and immune function. **Pflugers Arch – Eur J Physiol**, 463:121-137. 2012.

BHASKAR, V. S. *et al.*. Evaluation of oxidative stress, antioxidants and prolactin and infertile women. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, 23(2): 186-190, 2008.

BJÖRNBERG, K. A. *et al.*. Methyl Mercury and Inorganic Mercury in Swedish Pregnant Women and in Cord Blood: Influence of Fish Consumption. **Environmental Health Perspectives**, Vol. 111 (4): 637-641, 2003.

BOISCHIO, A. A.; CERNICHIARI, E. Longitudinal hair mercury concentration in riverside mother along the upper Madeira river (Brasil). **Environmental Research**, v.77, n.2, p. 79-83, 1998.

BRASIL. **IBGE**- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *SITE OFICIAL*. http://www.ibge.gov.br/estatistica/populacao/censo2010/tabelas_pdf/Brasil_tab_1_14.pdf

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa Nº 42**, de 20 de dezembro de 1999. disponível em www.sips.com.br/manual_download.php?id_arquivo=227e. Acesso em 04.08.2008

BRASIL. Ministério do Trabalho. **Portaria Nº 3214 de 8 de junho de 1978**.

BURDIN, N. *et al.*. Epstein-Barr Virus Transformation Induces B Lymphocytes to Produce Human Interleukin 10. **J Exp Med**, Volume 177: 295-304, 1993.

CÂMARA, V. M. *et al.*. Study of exposure to and health effects of atmospheric metallic mercury pollution in an urban population of Poconé, Mato Grosso, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, RJ, 12 (1): 69-77, 1996.

CÂMARA, V. M. Mercúrio em Área de Garimpos de Ouro. **Série Vigilância 12**. Metepec: Centro Panamericano de Ecologia Humana e Saúde (ECO/OPS), 1993.

CÂMARA, V. M.; SILVA, A. P. Mercury exposure and health effects among urban residents bddue to gold commercialization in Poconé, MT, Brazil. **CETEM/CNPq, Série Tecnologia Mineral**, 19, p.19, 1997.

CARPENTER, D. O. Effects of metals on the nervous system of humans and animals. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*, v. 14 (3):209-218, 2001.

CARTA, P. *et al.*. Subclinical neurobehavioral abnormalities associated with low level of Mercury exposure through fish consumption. **Neurotoxicology**, 24:617-623. 2003.

CARRINO, T. A. *et al.*. Análise prospectiva para ouro nas regiões Ouro Roxo-Cantagalo e Chico Torres, Província Mineral do Tapajós. **Rev. Bras. Geof.**, 29 (1):135-154. 2011.

CHAOUAT G. *et al.*. The emerging role of IL-10 in pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology** 35 :325-329. 1996.

CLARKSON, T. W. The Three Modern Faces of Mercury. **Enviromental Health Perspectives**. V. 110, Supp.1, 2002.

CLEVENGER, C. V.; FREIER D. O.; KLINE J. B. Prolactin receptor signal transduction in cells of the immune system. **Journal of Endocrinology** 157: 187-197. 1998.

COOPER, J. F.. The effects of methylmercuric chloride exposure on immediate early gene induction in the murine brain. Ph. D. Thesis. 2008. 220 P.The State University of New Jersey - New Brunswick, USA. 2008.

CORDIER, S. *et al.*. Neurodevelopmental investigations among metjylmercury-exposed children in French Guiana. **Environ Research.**, 89 (1):1-11, 2002

DAVIDSON, P. W. *et al.*. Fish consumption, mercury exposure, and their associations with scholastic achievement in the Seychelles Child Development Study. **Neurotoxicology**, 31 (5): 439-47, 2010.

De BURBURE, C. *et al.*. Renal and Neurologic Effects of Cadmium, Lead, Mercury, and Arsenic in Children: Evidence of Early Effects and Multiple Interactions at Environmental Exposure Levels. **Environmental Health Perspectives**, Vol. 114 (4): 584-590, 2006.

DE GROOTE D. *et al.*. Characterisation of monoclonal antibodies against human interleukin-10 and their use in an ELISA for the measurement of this cytokine. **Journal of Immunological Methods**, 177:225-234.1994.

DEWAILLY, E. *et al.*. High fish consumption in French Polynesia and prenatal exposure to metals and nutrients. **Asia Pac J Clin Nutr**, 17 (3): 461-470, 2008.

DÍAZ, L. *et al.*. Influence of alcohol consumption on immunological status: a review. **European Journal of Clinical Nutrition**, 56 (3): 550-553, 2002.

DOREA, J. G. *et al.*. Hair mercury (signature of fish consumption) and cardiovascular risk in Munduruku and Kayabi Indians of Amazonia. **Environmental Research**, 97: 209-219, 2005.

DORSHKIND, K.; HORSEMAN, N. D. Anterior pituitary hormones, stress, and immune system homeostasis. **Bioessays**, 23: 288-294, 2001.

DUARTE, G. *et al.* Infecção Urinária na Gravidez: Análise dos Métodos para Diagnóstico e do Tratamento. Urinary Infection in Pregnancy: Analysis of Diagnostic Methods and Treatment. **RBGO**, Vol. 24 (7): 471-477, 2002.

EKINO, S. *et al.* Minamata disease revisited: An update on the acute and chronic manifestations of methyl poisoning. **Journal of the Neurological Sciences**, 262: 131-134, 2007.

EL SHEIKH, M. A. A. *et al.* Plasma prolactin levels during the menstrual cycle in regularly menstruating Sudanese women. **Sudan Medical Journal**, 32 (1): 34-43. 1994.

ELENKOV I. J. *et al.* The sympathetic nerve- an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. **Pharmacological Reviews**, 52: 595-638. 2000.

FAIAL, R. F. *et al.* Níveis de mercúrio em peixes do rio Trombetas no baixo Amazonas: uma área sem influência da garimpagem. **Cadernos Saúde Coletiva**, 13:237-248. 2005.

FITSANAKIS, V. A.; ASCHNER M.; The importance of glutamate, glycine and gamma-aminobutyric acid transport and regulation in manganese, mercury and lead neurotoxicity. **Toxicological Appl Pharmacological** 204: 343-54. 2005.

FOITZIK, K.; LANGAN, E. A.; PAUS, R.. Prolactin and the skin: a dermatological perspective on an ancient pleiotropic peptide hormone. **Journal of Investigative Dermatology**, 348: 2008.

FOSTER, O.; SILWA, K.; HILFIKER-KLEINER, D.. Clinical profiling of patients with peripartum cardiomyopathy and its value for translational research. **S A Heart Journal**, Vol. 5-1: 20-26, 2008.

FREEMAN, M. E.; KANYCSKA, B.; LERANT, A.;NAGY, G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. **Physiological Reviews**, vol.80 (4) 1523-1563, 2000.

FUJIMOTO V. Y. *et al.* Variability of serum prolactin and progesterone levels in normal women: the relevance of single hormone measurements in the clinical setting. **Obstetrics e Gynecology**, 76:895-6. 1990.

GARDNER, R. M.; NYLAND, J. F.; SILBERGELD, E. K.. Differential immunotoxic effects of inorganic and organic mercury species *in vitro*. **Toxicological Letters**, 198:182-190. 2010a.

GARDNER, R. M. *et al.* Mercury exposure, serum antinuclear/antinucleolar antibodies and serum cytokine levels in mining populations in Amazonian Brazil: A cross-sectional study. **Environmental Research**, 110: 345-354, 2010b.

GEORGIOPOULOS, A. G. *et al.* Prolactin and Preclinical Atherosclerosis in Menopausal Women With Cardiovascular Risk Factors. **Hypertension**, Journal of the American Heart Association, 54: 98-105, 2009.

GERHARD, I. *et al.* Impact of heavy metals on hormonal and immunological factors in women with repeated miscarriages. **Human Reproduction Update**, Vol. 4, No. 3: 301-3019, 1998.

GERLO, S. *et al.* Prolactin in man: a tale of two promoters. **Bioassays**, 28 (10): 1051-1055. 2006.

GOFFIN, V.; KELLY, P. A.. The prolactin/Growth hormone receptor family: structure/function relationship. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, 2:7-17. 1997.

GOFFIN, V.. Prolactin: The new biology of an old hormone. **Annual Review of Physiology**, 64:47-67. 2002.

GONZÁLEZ-QUINTELA, A. *et al.* Serum cytokines and increased total serum IgE in alcoholics. **Ann Allergy Asthma Immunol.** 83(1):61-7, 1999.

GRANDJEAN, P. *et al.* Methylmercury neurotoxicity in Amazonian children downstream from gold mining. **Environmental Health Perspectives**, 107(7), 587-591, 1999.

GRANDJEAN, P. *et al.* Adverse Effects of Methylmercury: Environmental Health Research Implications. **Environmental Health Perspectives**, Volume 118, Number 8, 2010.

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

HACON, S. *et al.* Exposure to Mercury in Pregnant Women from Alta Floresta - Amazon Basin, Brazil. **Environmental Research Section, A**, 84: 204-210, 2000.

HACHIYA, N. *et al.* Atmospheric Mercury concentrations in the basin of the Amazon, Brazil. **Environmental Health and Preventive Medicine**, 2: 183-187, 1998.

HAGGQVIST B., HULTMAN P.. Interleukin-10 in murine metal-induced systemic autoimmunity. **Clinical and Experimental Immunology**, 141:422-431, 2005.

HALSTEAD, S. B. *et al.* Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: disease regulation by immune complexes. **Lancet Infect Dis.** 10 (10): 712-722, 2010.

HARADA, M.. **Minamata Disease**. Minamata Disease Patients Alliance, Kumamoto, Japan, 1972. 215 p.

HASCO G.; SZABO C.. Regulation of cytokine and chemokine production by transmitters and co-transmitters of the autonomic nervous system. **Biochem Pharmacological**, 56: 1079-87. 1998.

HAVARINASAB S. *et al.*. Immunosuppressive and autoimmune effects of thimerosal in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2004.

HAVARINASAB S.; HULTMAN P.. Organic mercury compounds and autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, 4(5): 270 - 275, 2005.

HEO Y., LEE W. T.; LAWRENCE D. A.. In vivo the environmental pollutants lead and mercury induce oligoclonal T cell responses skewed toward type-2 reactivities. **Cell Immunology**, 179: 185-95. 1997.

HIRAHARA, F. *et al.*. Hyperprolactinemic recurrent miscarriage and results of randomized bromocriptine treatment trials. **Fertil Steril**, 70 (2): 346-52, 1998.

IDESP/PA - Instituto de Desenvolvimento Econômico, Social e Ambiental do Pará. *Site Oficial*. <http://iah.iec.pa.gov.br/iah/fulltext/georeferenciamento/anandindeua.pdf>. 2011. 45 p..

IDESP/PA - Instituto de Desenvolvimento Econômico, Social e Ambiental do Pará. *Site Oficial*. <http://iah.iec.pa.gov.br/iah/fulltext/georeferenciamento/belem.pdf>- 74 p. 2011.

IDESP/PA - Instituto de Desenvolvimento Econômico, Social e Ambiental do Pará. *Site Oficial*. http://www.idesp.pa.gov.br/paginas/produtos/Estatistica_Municipal/pdf/Benevides.pdf. 2011. 11.44p.

IDESP/PA - Instituto de Desenvolvimento Econômico, Social e Ambiental do Pará. *Site Oficial*. http://www.idesp.pa.gov.br/paginas/produtos/Estatistica_Municipal/pdf/Marituba.pdf. 2011. 46 p.

IPCS - International Programme on Chemical Safety. Elemental Mercury and inorganic mercury compounds: human health aspects. Concise International Chemical Assessment Document 50. **WHO Library Cataloguing - in - publication Data. World Health Organization**, 2003.

JAFFER, R. B. *et al.*. Physiologic and pathologic profiles of circulation human prolactin. **American Journal of Obstetrics e Gynecology**, 117: 757-773. 1973.

KRUSE, N. *et al.*. Variations in cytokine mRNA expression during normal human pregnancy. **Clinical e Experimental Immunology**, 119: 317-322. 2000.

LACERDA, L. D.. **Distribuição e Comportamento do Mercúrio na Ambiente Amazônico. Riscos e Consequências do Uso do Mercúrio**. Brasília. S. Hacon; L.D. Lacerda; W.C. Pfeiffer e D. Carvalho (orgs.). FINEP/IBAMA/MS/CNPq. 1990. p.80-90.

- LA TORRE, D.; FALORNI, A.. Pharmacological causes of hyperprolactinemia. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, 3(5): 929-951, 2007.
- LAU, J. *et al.*. Prolactin regulation of the expression of TNF- α , IFN- γ and IL-10 by splenocytes in murine multiple low dose streptozotocin diabetes. **Immunology Letters**, 102: 25-30, 2006.
- LAUFFER, N. *et al.*. Gonadotropin and prolactin levels in follicular fluid of human ova successfully fertilized in vitro. **J. Clin. Endocrinol Metab**, 58:430-434. 1984.
- LEVINA, V. V. *et al.*. Biological Significance of Prolactin in Gynecologic Cancers. **American Association for Cancer Research Journals**, 69 (12): 5226-33, 2009.
- LIM, K. J. H. *et al.*. Cytokines and immune-endocrine factors in recurrent miscarriage. **Humam Reproduction Update**, Vol. 2, No 6 pp.469-481, 1996.
- LODENIUS, M.; MALM, O.. Mercury in the Amazon. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.** v.157, 25-52, 1998.
- LOK, S. I. *et al.* Peripartum cardiomyopathy: the need for a national database. **Neth Hearh J**, 19:126-133, 2011.
- LÓPEZ-MEZA, J. E.; LARA-ZÁRATE, L.; OCHOA-ZARZOSA, A.. Effects of Prolactin on Innate Immunity of Infectious Diseases. **The Open Neuroendocrinology Journal**, 3: 175-179, 2010.
- LUCCHINI, R. *et al.*. Aplication of a latent variable model for a multicenter study on nearly effects due to mercury exposure. **Neurotoxicology**, v.24, 605 – 616, 2003.
- MAGOS, L.; CLARKSON, T.W.. Overview of the clinical toxicity of mercury. **The Association for Clinical Biochemistry** 43: 257-268, 2006.
- MALM, Olaf. *et al.*. Sequential hair Mercury in mothers and children from a traditional riverine population of the Rio Tapajós, Amazonia: Seasonal changes. **Environmental Research**. 110: 705-709, 2010.
- MARQUES, R. C. *et al.*. Principal component analysis and discrimination of variables associated with pre- and post-natal exposure to mercury. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 211: 606-614. 2008.
- MARQUES, R. C. *et al.*. Maternal Mercury exposure and neuro-motor development in breastfed infants from Porto Velho (Amazon), Brazil. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 210: 51-60. 2007.
- MARQUES, Rejane Corrêa. *et al.* Changes in children hair-Hg concentrations during the first 5 years: Maternal, environmental and iatrogenic modifying factors. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 49: 17-24, 2007.

MATALKA, K. Z. Prolactin enhances production of interferon- γ , interleukin-12, and interleukin-10, but not of tumor necrosis factor- α , in a stimulus-specific manner. **Cytokine**, 21: 187-194, 2003.

McCUDEN, C. R.; SHARPLESS, J. L.; GRENACHE, D. G. comparison of multiple methods for identification of hyperprolactinemia in the presence of macroprolactin. **Clin Chin Acta**, 411 (3-4): 155-160, 2010.

MENDOZA, C. *et al.* Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. **Hum. Reprod**, 17:1017-1022. 2002.

MIRANDA, M. L.; EDWARDS, S.; MAXSON, P. J.. Mercury Levels in an Urban Pregnant Population in Durham County, North Carolina. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 8: 698-712, 2011.

MONESTIER, M. e VAS, J.. Immunology of mercury. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 1143:240-267. 2008.

MONRROY, S. X. *et al.* Lifestyle and mercury contamination of Amerindian populations along the Beni river (lowland Bolivia). **J Environ Health**, 71(4):44-50, 2008.

MOORE K. W. *et al.* Interleukin-10 and the interleukin-1- receptor. **Annual Review of Immunology** 19:683 – 765, 2001.

MORELI, J. B. *et al.* Interleukin 10 and tumor necrosis factor-alpha in pregnancy: aspects of interest in clinical obstetrics. **ISRN Obstetrics and Gynecology**.V.2012. ID230742. 2012.

MOZAFFARIAN, D. *et al.* Mercury Exposure and Risk of Cardiovascular Disease in Two U. S. Cohorts. **N Engl J Med**, 364: 1116-1125, 2011.

NEVILLE, M.C.; MC FADDEN, T. B.; FORSYTH, I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, 7:49-66. 2002.

NYLAND, J. F. *et al.* Fetal and maternal immune responses to methylmercury exposure: a cross-sectional study. **Environmental Research**, 111, 584-589. 2011.

O'SHEA, J. G.. 'Two minutes with Venus, two years with mercury' - Mercury as an antisiphilitic chemotherapeutic agent. **Journal of the Royal Society of Medicine**, Vol. 83: 392-396, 1990.

PABELLO, N. G.; LAWRENCE, D. A.. Neuroimmunotoxicology: Modulation of neuroimmune networks by toxicants. **Clinical Neuroscience Research** 6:69-85, 2006.

PANSINI, F. *et al.* Prolactinemia during the menstrual cycle. A possible role of prolactin in the regulation of ovarian function. **Gynecologic and Obstetric Investigation** 23(3):172-6. 1987.

PFEIFFER, W. C.; LACERDA, D.. Mercury Inputs into the Amazon Region, Brazil. **Environmental Technology Letters**. v.9, p. 325-330, 1988.

PICCINNI, M. *et al.*. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by teidual T cells in unexplained recurrent abortions. **Nature Medicine**, 4: 1020-1023.1998.

PINHEIRO, M.C.N. *et al.*. Exposição humana ao metil mercúrio em comunidades ribeirinhas da região do Tapajós, Pará, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 33 (3):265-269. 2000.

PINHEIRO, M. C. N. *et al.*. Mercury and selenium concentrations in hair samples of women in fertile age from Amazon riverside communities. **Science of Total Environment**, 349: 284-288. 2005.

PINHEIRO, M. C. N. *et al.*. Mercury pollution and childhood in Amazon riverside villages. **Environ Int**. 33: 56-61. 2007.

PINHEIRO, M. C. N.. Mercury exposure and antioxidant defenses in women: a comparative study in the Amazon. **Environmental Research**, 107: 53- 59. 2008.

PNUMA - Programa de las Naciones Unidas Para El Medio Ambiente - Evaluación Mundial Sobre el Mercurio. **PNUMA Productos Químicos**, Ginebra, Suiza. 2005.

RAMALINGAM, V. *et al.*. Effects of mercuric chloride on circulating hormones in adult albino rats. **J Environ Biol**. 24(4): 401-4, 2003.

RAMOT, Y. *et al.*. Prolactin - a novel neuroendocrine regulator of human keratin expression *in situ*. **The FASEB Journal**, V. 24:1768-1779, 2010.

RICE, D.; BARONE Jr, S.. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence for humans and animals models. **Environmental Health Perspectives**. V. 108 (3): 511-533, 2000.

ROELFSEMA, F. *et al.*. Prolactin secretion in healthy adults is determined by gender, age and body mass index. **PloS One**, V. 7(2) e31305, 2012.

ROTH, I. *et al.*. Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. **JEM Home**, 184 (2): 539-548, 1996.

ROULET, M. *et al.*. Spatio-temporal geochemistry of Mercury in Waters of the Tapajós and Amazon Rivers, Brazil. **Limnol. Oceanogr**. 46(5):1141-1157, 2001.

SAKAMOTO, M. *et al.*. Correlations between mercury concentrations in umbilical cord tissue and other biomarkers of fetal exposure to methylmercury in the Japanese population. **Environmental Research**. 103(1), 106-111, 2007.

SANTOS, E.C.O. *et al.*. Mercury exposure in riverside Amazon communities in Pará, Brazil. **Environmental Research**, 84:100-07, 2000.

SANTOS, E. C. O. *et al.*. Correlation between blood mercury levels in mothers and newborns in Itaituba, Para State, Brazil. **Cadernos Saúde Pública**, 23 Sup 4, 4522-5629, 2007.

SAPIN R.; SIMON C.. False hyperprolactinemia corrected by the use of heterophilic antibody-blocking agent. **Clinical Chemistry**, vol 47 (12): 2184-2185, 2001.

SCHOEMAN, K. *et al.*. Hair mercury levels of women of reproductive age in Ontario, Canada: implications to fetal safety and fish consumption. **J. Pediatr.** 157 (1): 127-31, 2010.

SCHWARZLER, P. *et al.*. Prolactin gene expression and prolactin protein in premenopausal and postmenopausal human ovaries. **Fertility and Sterility**, 68:696-701. 1997.

SERRI, O. *et al.*. Diagnosis and management of hyperprolactinemia. **Canadian Medical Association Journal**, 169(6): 575-581, 2003.

SILBERGELD, E. K.; SILVA, I. A.; Nyland, J. F.. Mercury and autoimmunity: Implications for occupational and environmental health. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2005.

SILVA, A.P.. **Emissões de Mercúrio na Queima de Amálgama: Estudo da contaminação de ar, solos e poeira em domicílios de Poconé, MT.** Rio de Janeiro CETEM/CNPq, Série Tecnologia Mineral,13.1996. p.40.

SOARES, M. J.. The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 2: 51-65, 2004.

ST-LAURENT, J.. **Comparison of two in vitro models of cigarette smoke exposure.** *Inhal Toxicol.* 21(13):1148-53,2009.

UNEP - United Nations Environment Programme. Toolkit for identification and quantification of mercury releases. **UNEP Chemicals**, 1, 312 p., 2011.

VEIGA, M. *et al.*. Mercury Pollution from Artisanal Gold Mining in Block B, El Callao, Bolívar State, Venezuela. In: PIRRONE, N; MAHAFFETY K. (Eds). Dynamics of Mercury Pollution on Regional and Global Scales: Atmospheric processes, Human Exposure Around the World, p. 421-450. **Springer Publisher**, Norwell, MA, USA, 2005.

XIAO, B.L. *et al.*. The endocrinological profile of normal menstrual cycles in a population of Chinese women. **Contraception** 31(3):217-30. 1985.

XU, B. *et al.*. Maternal and gestational correlates of pregnancy prolactin and growth hormone in USA and China. **European Journal of Cancer Prevention**, 12(1):35-42. 2002.

ZEN, Margherita. *et al.*. Hormones, immune response, and pregnancy in healthy women and SLE patients. **Swiss Med Wkly**, 140 (13-14): 187-201. 2010.

ZHANG, Luxia. *et al.*. Plasma prolactin level and risk of incident hypertension in postmenopausal women. **J. Hypertens**. 28 (7):1400-1405. 2010.

YAGINUMA-SAKURAI, K. *et al.*. Hair to blood ratio and biological half-life of Mercury: experimental study of methylmercury exposure through fish consumption in humans. **J. Toxicol. Sci.** 37(1)123-130. 2012.

YAMAC, H. *et al.*. Prolactin: a new therapeutic target in peripartum cardiomyopathy. **Heart**, 96 (17): 1352-7. 2010.

YUAN, Y.. Methylmercury: a potential environmental risk factor contributing to epileptogenesis. **Neurotoxicology**. 33:119-126. 2012.

WATSON, C.J.. Post lactational mammary gland regression: molecular basis and implication for breast cancer. **Expert Reviews in Molecular Medicine** 8:1-15, 2006.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Inorganic mercury**. Geneva. Environmental Health Criteria 118. 1991. 168p.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Programme on Chemical Safety. **Methylmercury**. Geneva; 1990. (Environmental Health Criteria 101).

WYNICK, D. *et al.* Galanin regulates prolactin release and lactotroph proliferation. **Proc Natl Acad Sci**, 95: 12671-12676, 1998

APÊNDICE A - Ficha epidemiológica de mulheres puérperas



MS/SVS - INSTITUTO EVANDRO CHAGAS
SEMAM - SEÇÃO DE MEIO AMBIENTE
PROJETO MERCÚRIO
FICHA MATERNA (PUÉRPERA)

IDENTIFICAÇÃO:

Nº. _____

DATA: _____ / _____ / _____

1. Coleta de material: SANGUE: COM EDTA SEM EDTA CABELO
2. Nome: _____
3. Idade: _____ anos 4. Data do Nascimento: ____/____/____ 5. Escolaridade: _____
6. Naturalidade: _____ 7. UF: _____
8. Filiação: Pai: _____ 9. Mãe: _____
10. Endereço: _____ Bairro: _____
 Localidade: _____ Município: _____ Fone: _____
11. Tempo de moradia: _____ anos 12. Morava antes em: _____
13. Estado Civil: 1. Solteira 2. Casada/amasiada 4. Viúva 5. Separada/divorciada
14. N° de filhos: 15. Masculino: 16. Feminino:
17. Quantos dias na semana você costuma comer peixe? _____
18. Quando come, quantas vezes ao dia consome peixe? _____
19. Nomes populares dos peixes consumidos:
- | | | | | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|--|--------------------------------------|-----------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Aracu/piau | <input type="checkbox"/> Cara-Açu | <input type="checkbox"/> Filhote | <input type="checkbox"/> Mapará | <input type="checkbox"/> Piramutaba | <input type="checkbox"/> Surubim |
| <input type="checkbox"/> Arumara | <input type="checkbox"/> Cara-bararua | <input type="checkbox"/> Flexeira | <input type="checkbox"/> Pacu | <input type="checkbox"/> Piranha | <input type="checkbox"/> Tambaqui |
| <input type="checkbox"/> Barbado | <input type="checkbox"/> Carapixuna | <input type="checkbox"/> Jandia | <input type="checkbox"/> Pescada branca | <input type="checkbox"/> Pirapitinga | <input type="checkbox"/> Traíra |
| <input type="checkbox"/> Bico de pato | <input type="checkbox"/> Curvina | <input type="checkbox"/> Jaraqui | <input type="checkbox"/> Pescada amarela | <input type="checkbox"/> Pirarucu | <input type="checkbox"/> Tucunaré |
| <input type="checkbox"/> Branquinha | <input type="checkbox"/> Curimatã | <input type="checkbox"/> Jatuarana | <input type="checkbox"/> Peixe cachorro | <input type="checkbox"/> Sarda | |
| <input type="checkbox"/> Caratinga | <input type="checkbox"/> Dourada | <input type="checkbox"/> Mandii | <input type="checkbox"/> Piranambu | <input type="checkbox"/> Sardinha | |
- Outras espécies: _____
20. Além do peixe, quais os alimentos consumidos com freqüência?
- | | | | | | |
|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Feijão | <input type="checkbox"/> Arroz | <input type="checkbox"/> Farinha | <input type="checkbox"/> Macarrão | <input type="checkbox"/> Carne Boi | <input type="checkbox"/> Frango |
| <input type="checkbox"/> Caça | <input type="checkbox"/> Legumes | <input type="checkbox"/> Verduras | <input type="checkbox"/> Frutas | <input type="checkbox"/> Leite | <input type="checkbox"/> Ovos |
21. Consome bebida alcoólica? Sim Não 22. Há quanto tempo? _____ anos
23. Freqüência: n° de vezes / semana: _____ 24. N° de vezes / mês: _____
25. Você fuma? Sim Não 26. _____
- Se Sim, por quanto tempo? _____ anos 27. N° de cig. / dia: _____
28. Qual é a sua ocupação principal? _____ 29. Tempo de ocupação: _____ anos
30. Ocupação Anterior? Sim Não 31. Qual? _____
32. Já Trabalhou em garimpo com ouro? Sim Não 33. Período/ano: _____

34. Você teve algum problema de saúde durante a gravidez? Sim Não

35. Qual? _____ 36. Fez tratamento? Sim Não

37. Qual tratamento? _____

38: N° de abortos: _____

39. Aborto espontâneo: _____ 40. Período/ano: _____

41. Peso do recém-nascido: _____

Responsável pela entrevista:

APÊNDICE B - Ficha epidemiológica de mulheres não puérperas



MS/SVS - INSTITUTO EVANDRO CHAGAS
SEMAM - SEÇÃO DE MEIO AMBIENTE
PROJETO MERCÚRIO
FICHA MATERNA (NÃO PUÉRPERA)

IDENTIFICAÇÃO:

Nº. _____

DATA: ____/____/____

1. Coleta de material: SANGUE: COM EDTA SEM EDTA CABELO
2. Nome: _____
3. Idade: _____ anos 4. Data do Nascimento: ____/____/____ 5. Escolaridade: _____
6. Naturalidade: _____ 7. UF: _____
8. Endereço: _____ Bairro: _____
 Localidade: _____ Município: _____ Fone: _____
9. Tempo de moradia: _____ anos 10. Morava antes em: _____
11. Estado Civil: 1. Solteira 2. Casada/amasiada 4. Viúva 5. Separada/divorciada
12. N° de filhos: 13. Masculino: 14. Feminino:
15. Quantos dias na semana você costuma comer peixe? _____
16. Quando come, quantas vezes ao dia consome peixe? _____
17. Nomes populares dos peixes consumidos:
- | | | | | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|--|--------------------------------------|-----------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Aracu/piau | <input type="checkbox"/> Cara-Açu | <input type="checkbox"/> Filhote | <input type="checkbox"/> Mapará | <input type="checkbox"/> Piramutaba | <input type="checkbox"/> Surubim |
| <input type="checkbox"/> Arumara | <input type="checkbox"/> Cara-bararua | <input type="checkbox"/> Flexeira | <input type="checkbox"/> Pacu | <input type="checkbox"/> Piranha | <input type="checkbox"/> Tambaqui |
| <input type="checkbox"/> Barbado | <input type="checkbox"/> Carapixuna | <input type="checkbox"/> Jandia | <input type="checkbox"/> Pescada branca | <input type="checkbox"/> Pirapitinga | <input type="checkbox"/> Traíra |
| <input type="checkbox"/> Bico de pato | <input type="checkbox"/> Curvina | <input type="checkbox"/> Jaraqui | <input type="checkbox"/> Pescada amarela | <input type="checkbox"/> Pirarucu | <input type="checkbox"/> Tucunaré |
| <input type="checkbox"/> Branquinha | <input type="checkbox"/> Curimatã | <input type="checkbox"/> Jatuarana | <input type="checkbox"/> Peixe cachorro | <input type="checkbox"/> Sarda | |
| <input type="checkbox"/> Caratinga | <input type="checkbox"/> Dourada | <input type="checkbox"/> Mandii | <input type="checkbox"/> Piranambu | <input type="checkbox"/> Sardinha | |
- Outras espécies: _____
18. Além do peixe, quais os alimentos consumidos com freqüência?
- | | | | | | |
|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Feijão | <input type="checkbox"/> Arroz | <input type="checkbox"/> Farinha | <input type="checkbox"/> Macarrão | <input type="checkbox"/> Carne Boi | <input type="checkbox"/> Frango |
| <input type="checkbox"/> Caça | <input type="checkbox"/> Legumes | <input type="checkbox"/> Verduras | <input type="checkbox"/> Frutas | <input type="checkbox"/> Leite | <input type="checkbox"/> Ovos |
19. Consome bebida alcoólica? Sim Não 20. Há quanto tempo? _____ anos
21. Freqüência: n° de vezes / semana: _____ 22. N° de vezes / mês: _____
23. Você fuma? Sim Não 24.
- Se Sim, por quanto tempo? _____ anos 25. N° de cig. / dia: _____
26. Qual é a sua ocupação principal? _____ 27. Tempo de ocupação: _____ anos
28. Ocupação Anterior? Sim Não 29. Qual? _____
30. Já trabalhou em garimpo? Sim Não 31. Período: _____

32. Você teve algum problema de saúde no último mês? Sim Não

33. Qual? _____ 34. Fez tratamento? Sim Não

35. Qual tratamento? _____

36: N° de abortos: _____

37. Aborto espontâneo: _____ 38. Período/ano: _____

39. Obs: _____

Responsável pela entrevista:

APENDICE C - Estatística descritiva dos níveis de Hg-t, PRL e IL-10 em mulheres puérperas, Itaituba e Ananindeua, Pará

Variáveis	Puérperas expostas n=144			Puérperas não expostas n=156		
	Média Geométrica (n)	Mediana	Mínimo- máximo	Média geométrica (n)	Mediana	Mínimo- máximo
Mercúrio total em sangue (µg/l)	7,28	7,98	0,08- 98,80	2,79 (154)	2,71	1,79- 23,83
Prolactina sérica (ng/ml)	206,30	226,80	11,91- 1130,80	296,50	316,70	44,80- 918,30
Interleucina 10 sérica (pg/ml)	24,51 (112)	18,48	0,00- 383,40	3,24 (96)	0,970	0,00- 63,48

APENDICE D - Estatística descritiva dos níveis de Hg-t, PRL e IL- 10 em mulheres não puérperas, Itaituba e Ananindeua, Pará

Variáveis	Mulheres expostas n=144			Mulheres não expostas n=156		
	Média geométrica (n)	Mediana	Mínimo-máximo	Média geométrica	Mediana	Mínimo-máximo
Mercúrio total em sangue ($\mu\text{g/l}$)	7,58	7,03	0,39-70,89	2,35 (154)	2,34	0,00- 20,38
Prolactina sérica (ng/ml)	19,22	19,38	1,36- 339,80	13,34	13,68	2,44- 162,96
Interleucina 10 sérica (pg/ml)	5,05 (100)	2,01	0,00- 180,70	1,69 (64)	0,00	0,00- 28,16

ANEXO A - Parecer de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisas com seres humanos



Parecer de Aprovação nº 0015/2009
 Protocolo CEP/IEC - Nº 015/2009
 CAAE: 0018.0.072.000-09

Ananindeua/PA, 30 de junho de 2009.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM HUMANOS

Projeto: “Exposição ao mercúrio e níveis de prolactina e interleucina 10 em puérperas da região do Tapajós, Itaituba -Pará”.

Pesquisador Responsável: **IRACINA MAURA DE JESUS**

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, cientificamos que o projeto em epígrafe foi considerado **aprovado**. Recomendamos a coordenação que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Deverá ser encaminhado relatório anual e, ao final, elaborado um relatório consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da pesquisa.

Atenciosamente,

Manoel do Carmo Pereira Soares
 MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
 Coordenador do CEP/IEC