



LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA MOLECULAR
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

GABRIELA DE PAULA FONSECA ARRIFANO

ANÁLISE DE PARÂMETROS DE EXPOSIÇÃO MERCURIAL, SUSCETIBILIDADE
GENÉTICA E INTOXICAÇÃO EM POPULAÇÕES RIBEIRINHAS DO TAPAJÓS E
TUCURUÍ

BELÉM
2016

GABRIELA DE PAULA FONSECA ARRIFANO

ANÁLISE DE PARÂMETROS DE EXPOSIÇÃO MERCURIAL, SUSCETIBILIDADE
GENÉTICA E INTOXICAÇÃO EM POPULAÇÕES RIBEIRINHAS DO TAPAJÓS E
TUCURUÍ

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do grau de Doutora em Neurociências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Elena Crespo López.

BELÉM

2016

GABRIELA DE PAULA FONSECA ARRIFANO

ANÁLISE DE PARÂMETROS DE EXPOSIÇÃO MERCURIAL, SUSCETIBILIDADE GENÉTICA E INTOXICAÇÃO EM POPULAÇÕES RIBEIRINHAS DO TAPAJÓS E TUCURUÍ

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, da Universidade Federal do Pará – UFPA.

Orientadora: Prof.a Dr.a Maria Elena Crespo López.

Data: 30 de Agosto de 2016

Banca:

Prof.a Dr.a Maria Elena Crespo López - Laboratório de Farmacologia Molecular -UFPA

Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento - Laboratório de Neuroquímica - UFPA

Prof. Dr. José Ricardo Vieira Júnior - Laboratório de Análises Clínicas da UFPA

Prof. Dr. Marcelo Farina - Laboratório de Neurotoxicidade de Metais- UFSC

*Dedico este trabalho à minha filha Fernanda e aos
meus pais.*

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Maria Elena Crespo López, por cada momento de aprendizado ao longo destes 10 anos de caminhada. Por ser uma grande orientadora e amiga, que me ensinou a fazer ciência de forma ética e justa. Por todas as oportunidades e por ter acreditado em mim quando eu mesma não acreditei. Por me ajudar a conquistar meus objetivos.

À equipe que embarcou conosco nas expedições, deixando de lado sua família e seus compromissos, para realizar o árduo, porém prazeroso, trabalho de coleta de campo.

À Prof.^a Dr.^a Cristina Suñol e aos companheiros do Laboratório 631, Mathieu, Mireia e Esther no Instituto de Investigaciones Biomedicas de Barcelona, por todo o intenso aprendizado durante os 6 meses de doutorado-sanduíche.

À Prof.^a Dr.^a Rosa Rodriguez Martin-Doimeadios e sua equipe do Departamento de Química Analítica y Tecnología de los Alimentos da Facultad de Ciencias Ambientales da UCLM (Espanha) pela colaboração fundamental em nosso trabalho.

Aos professores doutores Ricardo Vieira, Artur Luiz, José Luiz, Ândrea Kely, Marcelo Farina, Barbarella Macchi, Rommel Burbano, Rita Ribeiro e Liz Pereira, pelas colaborações que nos permitiram realizar este trabalho.

Aos meus pais Luiz e Sandra Arrifano por todo o apoio, por cuidarem da Fernanda, por terem me permitido estudar até hoje, por terem me dado a base que me faz firme nos dias mais difíceis.

À Fernanda, que entende com todo o amor de uma criança, a minha ausência.

Ao meu noivo, companheiro e melhor amigo Marcus Oliveira pelo apoio, força, por ter feito parte da nossa equipe durante as expedições e fora delas. Por estar

sempre perto mesmo longe. Por mergulhar comigo de cabeça em busca dos meus objetivos.

Aos meus queridos avós Emília e Lélío e meus padrinhos Pedro e Socorro Pinto, por todo o apoio e por sempre torcerem por mim.

Ao amigo Rogério Monteiro que está na mesma caminhada que eu há sete anos, que está sempre presente, que torce por mim e me incentiva, que partilha comigo não só a bancada, as expedições e os artigos, mas muitos outros momentos das nossas vidas.

Ao amigo Ricardo Paraense, nosso menino de ouro, que está sempre pronto pra fazer o PCR em tempo real, pra fazer uma figura, pra comer uma coxinha. Por toda ajuda ao longo destes anos e por todo o apoio.

À amiga-hermana Elisenda Martí, que tornou meus dias longe de casa muito mais leves, que partilhou o que sabia sobre o cultivo de células e sobre a vida em Barcelona durante os seis meses do doutorado-sanduíche.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia Molecular, Núbia, Camila, Wanessa, Patrícia, Flávia, Rose, Elisabete e Ericks, pelo excelente ambiente de trabalho que temos, pelo companheirismo e pelo café do dia-a-dia.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, especialmente, meus queridos tios Emílio e Silvia, Laidinha e Eline que me acolheram em suas casas quando precisei sair da minha cidade para realizar um curso ou estágio-sanduíche.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, os voluntários, os líderes comunitários, os enfermeiros, os agentes de saúde, os radialistas, os amigos que nos receberam em suas casas durante as expedições, Seu Nonato e Seu Chicória, por terem guiado a equipe nos caminhos pelos rios da Amazônia,

e as donas-de-casa que abriram suas portas, que serviram um lanchinho para a equipe durante o trabalho. Muito obrigada!

*“Aqui, novamente somos lembrados de que na
natureza nada existe sozinho.”*

Rachel Carson, em Silent Spring, 1962.

RESUMO

O mercúrio é um metal pesado responsável por episódios de intoxicação em todo o mundo. Sua forma mais tóxica é o metilmercúrio que possui afinidade pelo Sistema Nervoso Central, apresentando reconhecida neurotoxicidade. Algumas regiões da Amazônia são bem caracterizadas por exposição mercurial em humanos, como a região do Tapajós, devido à atividade garimpeira local, por exemplo. Contudo, outras, como Tucuruí, permanecem praticamente não estudadas, com apenas um estudo em humanos até o momento. Na Amazônia, existe um grande número de estudos sobre exposição, porém, os estudos sobre a intoxicação e suscetibilidade são bem menos numerosos nas populações amazônicas, e até hoje não existe nenhum estudo que analise simultaneamente os três fatores. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar a exposição (conteúdo do agente tóxico no corpo através do nível de mercúrio em amostras de cabelo), a suscetibilidade individual (predisposição que cada indivíduo tem a sofrer um maior ou menor dano com a mesma quantidade de exposição, através da genotipagem da apolipoproteína E) e a intoxicação (quantificação da extensão do dano já provocado usando como biomarcadores a S100B e a NSE) em populações ribeirinhas amazônicas. Foram estudados 388 indivíduos, selecionados após critérios de inclusão e exclusão. Os genótipos da apolipoproteína E mais frequentes foi $\epsilon 3/\epsilon 3$, seguido pelo $\epsilon 3/\epsilon 4$. As frequências alélicas foram de 0,043:0,784:0,173 para $\epsilon 2:\epsilon 3:\epsilon 4$, respectivamente. A mediana do nível de mercúrio total no cabelo foi 4,2 $\mu\text{g/g}$ (1,9- 10,2). Uma percentagem significativa de participantes (24,8%) apresentaram níveis de mercúrio total acima de 10 $\mu\text{g/g}$, limite preconizado pela OMS, e 12,8% dos participantes mostraram um conteúdo total em mercúrio maior ou igual a 20 $\mu\text{g/g}$. Os níveis de Tucuruí foram muito maiores do que os níveis no Tapajós (área reconhecida pela presença de garimpos). Foram identificados 29% de indivíduos portadores de ApoE4 (considerados de risco) e 8 indivíduos em risco máximo (portadores de ApoE4 e com mercúrio acima do limite de 10 $\mu\text{g/g}$). Ainda, houve diferença significativa nos níveis de RNAm da proteína S100B entre os grupos expostos a níveis altos e baixos de mercúrio. Pela primeira vez, foram estudados simultaneamente marcadores das três esferas de influência em toxicologia humana (exposição, suscetibilidade e intoxicação). Nossos dados apoiam já o uso em conjunto desses marcadores para um monitoramento adequado das populações amazônicas, que assistirá o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tomada de decisões governamentais frente ao problema do impacto causado pelo mercúrio na Amazônia.

Palavras Chave: Mercúrio, Metilmercúrio, Tapajós, Tucuruí, ApoE, S100B, NSE, Amazônia

SUMMARY

Mercury is a heavy metal responsible for intoxications worldwide. Most toxic form is methylmercury that has affinity for the central nervous system, with recognized neurotoxicity. Some regions of the Amazon are well characterized by mercury exposure in humans, as the region of the Tapajós, due to local mining activity, for example. However, others, such as Tucuruí, remain virtually unstudied, with only one study in humans to date. In the Amazon, there is a large number of studies showing mercury exposure, however, intoxication and susceptibility studies are far less numerous in the Amazonian populations, and even today, there is no study analyzing simultaneously the three factors. The objective of this study was to determine the exposure (mercury content in the body by using mercury levels in hair samples), the individual susceptibility (genetic predisposition of each individual to suffer a damage because the exposure, using the genotyping of apolipoprotein E) and the intoxication (quantifying the extent of the damage already caused by using biomarkers such as S100B and NSE) in Amazonian riverside populations. Three hundred eighty-eight individuals, selected after inclusion and exclusion criteria were studied. The genotype of apolipoprotein E more frequent was $\epsilon 3/\epsilon 3$, followed by $\epsilon 3/\epsilon 4$. Allelic frequencies were 0.043: 0.784: 0.173 to $\epsilon 2$: $\epsilon 3$: $\epsilon 4$, respectively. The median level of total mercury in hair was 4.2 $\mu\text{g/g}$ (1.9- 10.2). A significant proportion of participants (24.8%) had mercury levels above 10 $\mu\text{g/g}$, as recommended by the WHO limit, and 12.8% of participants showed a total content of mercury greater or equal to 20 $\mu\text{g/g}$. Interestingly, Tucuruí levels were much higher than levels in the Tapajós (area recognized by the presence of mining gold activity). We identified 29% of patients with ApoE4 (considered at risk) and 8 maximum risk individuals (carriers of ApoE4 and mercury content above the limit of 10 $\mu\text{g/g}$). Moreover, there was a significant difference in mRNA levels of S100B protein between groups exposed to high and low levels of mercury. For the first time, markers of the three spheres of influence in human toxicology (exposure, susceptibility and poisoning) were studied. Our data already support the use of these markers to monitoring the Amazonian populations. This knowledge will assist the development of prevention strategies and making government decisions facing the problem of the impact of the mercury in the Amazon.

Keywords: Mercury, methylmercury, Tapajós, Tucuruí, ApoE, S100B, NSE, Amazon.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** O ciclo biogeoquímico do mercúrio. MeHg (metilmercúrio); DMHg (dimetilmercúrio); Hg⁰ (mercúrio metálico); Hg²⁺ (mercúrio iônico). Fonte: Modificado de Wasserman *et al.* (2001). 02
- Figura 2:** Mapa do Estado do Pará com a localização das áreas estudadas no presente estudo (Tapajós e Tucuruí), bem como a localização aproximada da área de garimpo na Bacia do Rio Tapajós (grande círculo cinza). Fonte: Imagem cedida por Maria Elena Crespo López. 07
- Figura 3:** Níveis de mercúrio total detectados durante o período de 1995 a 2010 em amostras de cabelo de populações ribeirinhas da Bacia do Rio Tapajós: Jacareacanga (J), Brasília Legal (BL), São Luiz de Tapajós (SL), Sai-Cinza (SC), Cametá (C), Barreiras (B), Rainha (R), Tabatinga (T) e outras localidades (S). Fonte: Cedido gentilmente pelos autores de Berzas-Nevado *et al.* (2010). 08
- Figura 4:** Concentrações de metilmercúrio (media ± desvio padrão) nas espécies de peixes piscívoras compradas em Itaituba (verde) e Belém (azul). O Tucunaré comprado em Belém foi originário do Lago de Tucuruí. Fonte: RODRÍGUEZ MARTÍN-DOIMEADIOS *et al.*, 2013. 10
- Figura 5:** Localização do gene da apolipoproteína E e as três isoformas da proteína com indicação do conteúdo em cisteína (Cys) ou arginina (Arg) nas posições 112 e 158. Fonte: Imagem elaborada pela autora. 13
- Figura 6:** Distribuição dos genótipos e alelos da apolipoproteína E na população mundial. Fonte: Imagem elaborada pela autora. 14
- Figura 7:** Distribuição dos genótipos e alelos da apolipoproteína E na América do Sul. Fonte: Imagem elaborada pela autora. 14
- Figura 8:** Influência dos domínios de interação na estrutura da apoE. Fonte: Imagem cedida por Ricardo Paraense Sousa de Oliveira. 15
- Figura 9:** Expressão das proteínas S100B e enolase específica de neurônio (NSE), por neurônio e astrócito, respectivamente, no cérebro normal e no cérebro após injúria. BHE: Barreira hemato-encefálica. Fonte: Imagem elaborada pela autora. 20
- Figura 10:** Mapa do Pará (A), com destaque para a região do Tapajós (B), demonstrando a localização das comunidades ribeirinhas incluídas no estudo, situadas ao longo do rio Tapajós. A área demarcada pelo círculo é a área de garimpo na região do Tapajós. Dados: IBGE, 2016. Fonte: Imagem elaborada pela autora. 24
- Figura 11.** Mapas de Brasil (A), Estado de Pará (B) e região de Tucuruí (C). No mapa C, são mostradas as localizações aproximadas da Usina Hidroelétrica (linha vermelha) e os dois compartimentos comunicados da reserva (Caraipé e o lago). Os participantes do trabalho foram de Caraipé (círculo cinza). Fonte: Imagem cedida por Maria Elena Crespo López. 25
- Figura 12:** Coleta de amostra de cabelo no posto de Saúde de Boa Vista do Tapajós (A) e no barracão comunitário no lago de Tucuruí (B). Fonte: Imagem do arquivo pessoal da autora. 27
- Figura 13:** Representação das diferentes condições enfrentadas em campo para a 27

realização da coleta de amostras de sangue em um posto de saúde (A) e em barracão comunitário (B). Fonte: Imagem do arquivo pessoal da autora.

- Figura 14:** Identificação do genótipo de cada indivíduo após o Q-PCR pelo método do TaqMan SNP Genotyping Assay. Fonte: Imagem elaborada pela autora. **29**
- Figura 15:** Proporção de indivíduos na população total do estudo (n=109) com níveis de mercúrio total no cabelo, iguais ou acima do limite de 10 µg/g e de 20 µg/g. **36**
- Figura 16:** Níveis de mercúrio total (Total Hg) e metilmercúrio (MeHg) nas amostras de cabelo de ribeirinhos nas regiões do Tapajós (n= 74) e Tucuruí (n= 35). Dados apresentados em µg/g como mediana e intervalos interquartis. **36**
- Figura 17:** Níveis das metilmercúrio e mercúrio total determinados nas amostras de cabelo de ribeirinhos das comunidades de Boa Vista do Tapajós (BVT, n=24), Barreiras (BRR, n= 28) e Pimental (PMT, n= 22). Dados apresentados em µg/g como mediana e intervalos interquartis. Teste de Kruskal-Wallis, * p<0,05 vs BVT. **37**
- Figura 18:** Níveis de mercúrio total em µg/g encontrados na populações do Tapajós (n=74) e Tucuruí (n=35) (a) e porcentagem de metilmercúrio em relação ao mercúrio total em ambas as regiões (b). Dados apresentados como mediana e intervalos interquartis (Mann-Whitney, ****p< 0,0001 e *** p=0,0001). **37**
- Figura 19:** Porcentagem de indivíduos do Tapajós e Tucuruí com níveis de mercúrio total no cabelo abaixo e maior ou igual a 10 µg/g. **38**
- Figura 20:** Distribuição dos participantes de acordo com níveis de mercúrio total no cabelo (A) e mediana e interquartis dos participantes com níveis acima e abaixo de 10 µg/g (B) e 20 µg/g (C). Teste de Mann-Whitney, ***p<0.001. **39**
- Figura 21:** Distribuição alélica da *APOE* em indivíduos com níveis de mercúrio no cabelo abaixo e igual ou maior que 10 µg/g. **42**
- Figura 22:** Distribuição alélica da *APOE* em indivíduos da população de Tucuruí com níveis de mercúrio no cabelo abaixo e igual ou maior que 10 µg/g. **42**
- Figura 23:** Níveis de mercúrio total no cabelo nos grupos com níveis de mercúrio abaixo de 7 µg/g e acima de 18 µg/g (Teste de Mann-Whitney, p<0,05;). **43**
- Figura 24:** Quantificação relativa do RNAm das proteínas S100B e NSE no sangue de indivíduos da região de Tucuruí expostos a baixos e altos níveis de mercúrio (p<0,05). Dados apresentados como vezes de diferença em relação ao grupo com baixo teor de mercúrio. Teste de Mann-Whitney. **44**
- Figura 25:** Fotos demonstrativas do processo realizado para convidar os indivíduos a participarem do projeto. (A) Equipe na sede de uma rádio local realizando o convite e (B) reunião informativa sobre projeto com a comunidade. Fonte: Imagem do arquivo pessoal da autora. **46**
- Figura 26:** Proporção de mulheres em idade fértil na população total do estudo (n=37) com níveis de mercúrio total no cabelo igual ou acima de 10 µg/g e de 5 µg/g. **51**
- Figura 27:** Médias de mercúrio total no cabelo de populações ribeirinhas da Bacia do Rio Tapajós, detectadas durante o período de 1995 a 2015. Dados coletados da literatura em cinza (AKAGI *et al.*, 1995; MALM *et al.*, 1995; KEHRIG *et al.*, 1997; LEBEL *et al.*, 1997; MALM *et al.*, 1997; LEBET *et al.*, 1998; GRADJEAN *et al.*, 1999; AMORIM *et* **52**

al., 2000; DOLBEC *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2000; DOLBEC *et al.*, 2001; HARADA *et al.*, 2001; CROMPTON *et al.*, 2002; BOISCHIO *et al.*, 2002; PASSOS *et al.*, 2003; BAHIA *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2004; PINHEIRO *et al.*, 2005; PINHEIRO *et al.*, 2006; FILLION *et al.*, 2006; LEMIRE *et al.*, 2006; PINHEIRO *et al.*, 2007; PASSOS *et al.*, 2007a; PASSOS *et al.*, 2007b; PINHEIRO *et al.*, 2008; PASSOS *et al.*, 2008; GROTTTO *et al.*, 2010) e do presente trabalho em vermelho. A linha vermelha indica o limite de 10 µg/g de mercúrio no cabelo, preconizado pela OMS.

Figura 28: Nível de mercúrio total determinado em amostras de cabelo de ribeirinhos da comunidade de Barreiras de 1994 a 2015: 1994 (PINHEIRO *et al.*, 2000); 1995 (PINHEIRO *et al.*, 2000); 1996 (HARADA *et al.*, 2001); 2003 (PINHEIRO *et al.*, 2008) e 2015 (nossos dados). A linha vermelha indica o limite de 10 µg/g de mercúrio no cabelo, preconizado pela OMS. **53**

Figura 29: Níveis de mercúrio total em µg/g encontrados na região de Tucuruí em 1995 (publicado por Leino e Lodenius, 1995; n=11) e em 2015 (presente trabalho; n=35). Dados apresentados como média e erro padrão da média. (Teste t-student, p > 0,05) **55**

Figura 30: Médias de mercúrio total no cabelo de populações ribeirinhas da Bacia do Rio Tapajós e Tucuruí, detectadas durante o período de 1995 a 2015. Dados coletados da literatura (Tapajós: AKAGI *et al.*, 1995; MALM *et al.*, 1995; KEHRIG *et al.*, 1997; LEBEL *et al.*, 1997; MALM *et al.*, 1997; LEBET *et al.*, 1998; GRADJEAN *et al.*, 1999; AMORIM *et al.*, 2000; DOLBEC *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2000; DOLBEC *et al.*, 2001; HARADA *et al.*, 2001; CROMPTON *et al.*, 2002; BOISCHIO *et al.*, 2002; PASSOS *et al.*, 2003; BAHIA *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2004; PINHEIRO *et al.*, 2005; PINHEIRO *et al.*, 2006; FILLION *et al.*, 2006; LEMIRE *et al.*, 2006; PINHEIRO *et al.*, 2007; PASSOS *et al.*, 2007a; PASSOS *et al.*, 2007b; PINHEIRO *et al.*, 2008; PASSOS *et al.*, 2008; GROTTTO *et al.*, 2010 e; Tucuruí: LEINO; LODENIUS, 1995) e do presente trabalho em 2015. A linha vermelha indica o limite de 10 µg/g de mercúrio no cabelo, preconizado pela OMS. **56**

Figura 31: Alterações causadas pelo mercúrio e/ou a presença da ApoE4. Setas vermelhas pontilhadas indicam os mecanismos compartilhados pelos dois fatores; setas cinzas e pretas mostram os mecanismos exclusivos da ApoE4 ou mercúrio, respectivamente. Fonte: Imagem elaborada pela autora. **59**

Figura 32: Distribuição de indivíduos APOE4 na população de estudo destacando os indivíduos de risco e risco máximo. **60**

Figura 33: Casa de um líder comunitário onde foram realizadas as coletas das amostras. Notar o isopor onde as amostras eram armazenadas. Fonte: Imagem do arquivo pessoal da autora. **62**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NRC	National Research Council
USEPA	United States Environmental Protection Agency
MeHg	Metilmercúrio
IHg	Mercúrio inorgânico
Total Hg	Mercúrio total
SNC	Sistema Nervoso Central
µg/g	micrograma por grama
µg/l	micrograma por litro
ppm	partes por milhão
SH	Grupamentos sulfidrilas
WHO	World Health Organization
OMS	Organização Mundial de Saúde
UCLM	Universidad de Castilla-La Mancha-Espanha
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LFM	Laboratório de Farmacologia Molecular
TMAH	Hidróxido de tetrametilamônia
ANOVA	Análise de variância

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Mercúrio	01
1.1.1 Metilmercúrio e intoxicação humana	03
1.1.2 Mercúrio e Amazônia	06
1.1.3 Metilmercúrio e Apolipoproteína E	11
1.1.4 Mercúrio e marcadores de intoxicação: S100B e Enolase Específica dos Neurônios (NSE)	18
2 OBJETIVO GERAL	23
2.1 Objetivos específicos	23
3 METODOLOGIA	24
3.1 Populações de estudo	24
3.1.1 Comunidades ribeirinhas do Rio Tapajós	24
3.1.2 Comunidades ribeirinhas de Tucuruí	25
3.2 Critérios de inclusão e exclusão	25
3.3 Aspectos éticos	26
3.4 Coleta de dados e amostras	26
3.4.1 Dados antropométricos	26
3.4.2 Amostras de cabelo	26
3.4.3 Amostras de sangue	27
3.5 Genotipagem da Apolipoproteína E	28
3.5.1 Extração de DNA	28
3.5.2 Genotipagem por PCR em tempo real	28
3.6 Quantificação de mercúrio nas amostras de cabelo	29
3.7 Quantificação relativa da expressão da S100B e NSE por PCR em tempo real	30
3.7.1 Extração de RNA	30
3.7.2 Transcrição para o cDNA	31
3.7.3 PCR em tempo real dos genes S100B e NSE	31
3.8 Análise Estatística	32
4 RESULTADOS	33
4.1 Dados antropométricos	33
4.2 Distribuição genotípica da Apolipoproteína E em comunidades da Amazônia	34
4.3 Exposição mercurial em comunidades da Amazônia	35
4.4 Identificação de indivíduos de risco	40
4.5 Expressão de S100B e NSE	42
5 DISCUSSÃO	45

5.1 Suscetibilidade genética na Amazônia: Distribuição alélica e genotípica do gene da apolipoproteína E	48
5.2 Exposição mercurial na Amazônia: Níveis de mercúrio nas Regiões do Tapajós e Tucuui	49
5.3 Identificação de indivíduos de risco de acordo à suscetibilidade e à exposição	57
5.4 Marcadores Moleculares de intoxicação mercurial nas comunidades ribeirinhas da Amazônia	61
6 CONCLUSÕES	64
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXO A - ARTIGO PUBLICADO RELACIONADO À TESE	79
ANEXO B - ARTIGOS SUBMETIDOS RELACIONADOS À TESE	81
ANEXO C - ARTIGOS PUBLICADOS NÃO RELACIONADOS À TESE	87
ANEXO D - ARTIGOS SUBMETIDOS NÃO RELACIONADOS À TESE	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 Mercúrio

O mercúrio é um dos elementos químicos mais perigosos e de mais antiga utilização pelo homem. É empregado na indústria, em lâmpadas e termômetros; na odontologia, como constituinte da amálgama dentária; na agricultura, onde faz parte da composição química de alguns agrotóxicos, em atividades de mineração primária de ouro, entre outros (CRESPO-LOPÉZ *et al.*, 2009; BERZAS-NEVADO *et al.*, 2010). A intensificação de seu uso resultou no aumento significativo da contaminação ambiental (especialmente da água e dos alimentos) e em episódios de intoxicação humana (NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC), 2001; CRESPO-LÓPEZ *et al.*, 2005; HACON *et al.*, 2008; CRESPO-LÓPEZ *et al.*, 2009; BERZAS-NEVADO *et al.*, 2010).

Em seu estado elementar, o mercúrio apresenta-se como um líquido branco-prateado, o mercúrio metálico (Hg^0). Além disso, pode se apresentar em duas formas oxidadas, o íon mercurioso (Hg^+) e o íon mercúrico (Hg^{+2}), e sob diferentes espécies orgânicas: os alcoximercuriais, fenilmercuriais e os alquilmercuriais (metilmercúrio - MeHg) (CH_3Hg) e dimetilmercúrio ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$) (NRC, 2001).

No ambiente, o mercúrio pode ser encontrado naturalmente na sua forma inorgânica nos solos (Figura 1). Por erosão/lixiviação ou desmatamento dos solos, esse mercúrio pode passar diretamente ao ambiente aquático (rios, oceanos e lagos) na sua forma inorgânica ou ao ar na forma elementar (que posteriormente, se transforma de novo em mercúrio inorgânico e cai no ambiente aquático por ação das chuvas) (WASSERMAN, 2001; CLARKSON; MAGOS, 2006; BERZAS-NEVADO *et al.*, 2010).

Uma vez no ambiente aquático, o mercúrio inorgânico é convertido em metilmercúrio pela biota aquática (arqueias metanogênicas), em um processo chamado de biotransformação (BAIRD; CANN, 2004; HACON *et al.*, 2008). Após este processo, o MeHg é incorporado na cadeia alimentar onde ocorre o processo de biomagnificação, que é a tendência do metal de se acumular nos seres vivos à medida que se avançam os níveis tróficos da cadeia alimentar. Dessa forma, a biota aquática é a principal via de transferência do mercúrio de um ambiente contaminado para os seres humanos, especialmente quando o peixe faz parte da dieta

alimentar das populações expostas (CRESPO-LÓPEZ *et al.*, 2005; PINHEIRO *et al.*, 2007; BERZAS-NEVADO *et al.*, 2010).

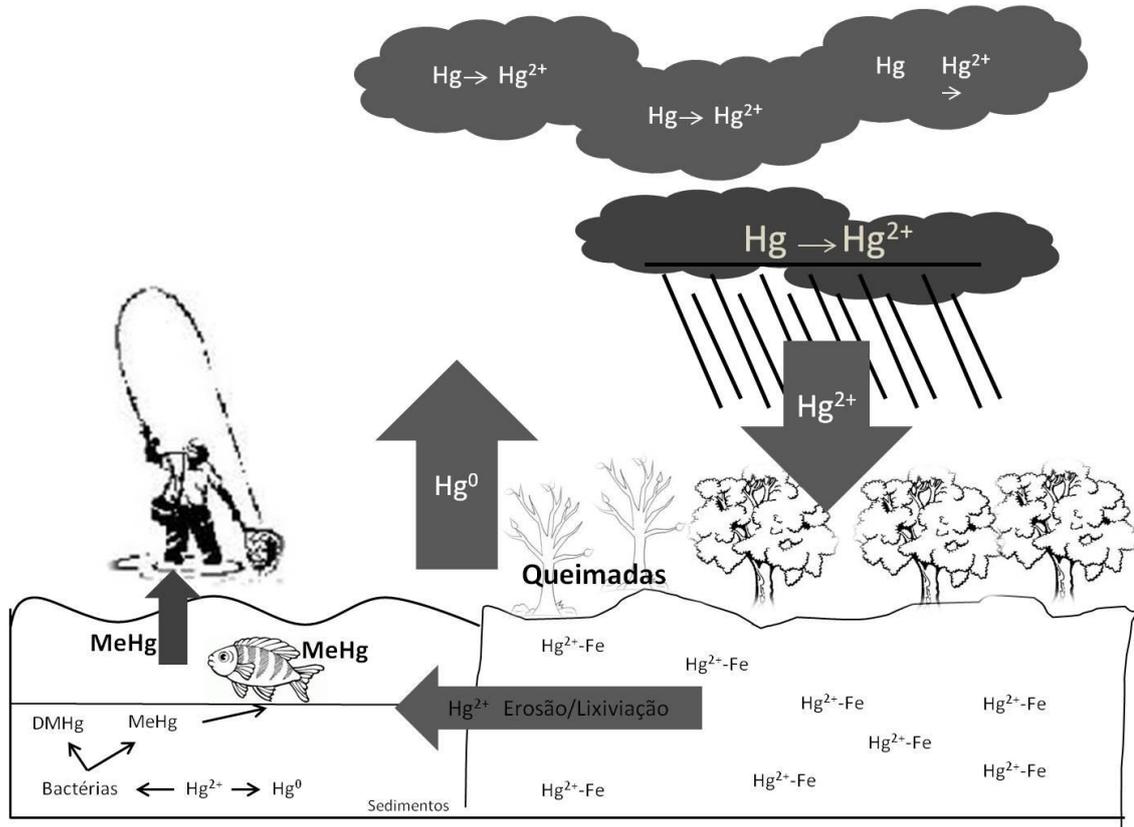


Figura 1: O ciclo biogeoquímico do mercúrio. MeHg (metilmercúrio); DMHg (dimetilmercúrio); Hg^0 (mercúrio metálico); Hg^{2+} (mercúrio iônico). Fonte: Modificado de Wasserman *et al.* (2001).

Embora todas as formas mercuriais sejam tóxicas, os alquilmercuriais (especialmente o metilmercúrio) são os de maior interesse toxicológico e de maior preocupação, em razão de sua fácil penetração através das membranas biológicas, eficiente bioacumulação, alta volatilidade e longo período de eliminação dos tecidos (CRESPO-LÓPEZ *et al.*, 2005; CLARKSON; MAGOS, 2006; BERZAS-NEVADO *et al.*, 2010).

O mimetismo molecular é um dos mecanismos responsáveis pela alta capacidade do MeHg de atravessar barreiras biológicas, o que o torna especialmente tóxico. O MeHg se liga à cisteína formando o complexo metilmercúrio-cisteína, que mimetiza o aminoácido metionina e é então transportado através dos transportadores de aminoácidos neutros (LAT), através da barreira hematoencefálica e da barreira placentária, por exemplo (BALLATORI, 2002; HOFFMEYER *et al.*, 2006).

Assim, para uma população que consome frequentemente peixe contaminado, como é o caso das populações amazônicas, o metilmercúrio é a forma predominante encontrada em amostras de cabelo, variando entre 80% a 98% do mercúrio total (HACON *et al.*, 2008; BERZAS-NEVADO *et al.*, 2010).

1.1.1 Metilmercúrio e intoxicação humana

Desde o primeiro surto de intoxicação mercurial em Minamata (Japão) em 1956, a toxicidade mercurial tem sido estudada por pesquisadores do mundo inteiro (LI *et al.*, 2010). Após a ingestão de peixes contaminados com metilmercúrio, aproximadamente 95% do MeHg é absorvido no trato gastrointestinal, já tendo sido demonstrado que a principal via para a entrada do metilmercúrio é por difusão passiva transcelular. No entanto, quando ele está ligado à cisteína a participação da difusão passiva não é grande (VÁZQUEZ *et al.*, 2014). Ainda, Mori e colaboradores (2012) sugerem a participação dos transportadores neutros de aminoácidos (LAT) na absorção do complexo MeHg-Cys por células epiteliais no intestino (MORI *et al.*, 2012). Após a distribuição a partir do sangue para todos os tecidos (um processo que dura cerca de 30-40h), uma média de 5% da dose total absorvida permanece no sangue e 10% no encéfalo (GUZZY; LA PORTA, 2008; FARINA *et al.*, 2011).

Posteriormente, o MeHg é lentamente metabolizado a mercúrio inorgânico principalmente pela flora intestinal, a uma taxa de aproximadamente 1% da carga corpórea por dia (WHO, 1990; NRC, 2000; GUZZY; LA PORTA, 2008). Em seres humanos, cerca de 90% da dose de MeHg absorvida é desmetilada e excretada nas fezes como Hg^{2+} (GUZZY; LA PORTA, 2008; LI *et al.*, 2010). Ainda, uma pequena parte do metilmercúrio pode ser transportada como um complexo com a glutatona para fora das células hepáticas, na biliar, utilizando transportadores de glutatona (GUZZY; LA PORTA, 2008; LI *et al.*, 2010). Estas vias de transporte desempenham um papel fundamental na eliminação do MeHg do corpo.

No organismo, o MeHg está presente como complexos hidrossolúveis principalmente, senão exclusivamente, ligados ao átomo de enxofre dos ligantes tióis (GUZZY; LA PORTA, 2008). Em razão desta afinidade pelos grupamentos sulfidrilas, o mercúrio interfere no metabolismo e função celular, e pode deprimir os mecanismos enzimáticos fundamentais da oxidação celular (AZEVEDO, 2003). Além disso, o MeHg forma um complexo com a L-

cisteína (MeHgCys) que é um substrato para o Transportador 1 de Aminoácidos Neutros Grandes (LAT1), o qual ativamente transporta o mercúrio do sangue através da barreira hematoencefálica, contribuindo para os altos níveis de mercúrio encontrados no cérebro após a exposição (KERPER *et al.*, 1992; revisado por FARINA *et al.*, 2011).

Dessa forma, o Sistema Nervoso Central (SNC), o principal alvo da intoxicação por MeHg, sofre os danos mais importantes observados em humanos. O MeHg afeta, principalmente, áreas específicas do cérebro, como cerebelo, lobos temporais e córtex visual (BAIRD; CANN, 2004; CRESPO-LÓPEZ *et al.*, 2005; ANTUNES DOS SANTOS *et al.*, 2016).

No SNC o mercúrio induz estresse oxidativo, tanto por aumentar a produção de radicais livres quanto por depletar os níveis de enzimas antioxidantes; altera a homeostase do cálcio, induz apoptose, causa desagregação dos microtúbulos, provoca neuroinflamação, induz a hipofosforilação da proteína tau e favorece o acúmulo de proteína beta-amilóide (HUANG *et al.*, 2008; FARINA *et al.*, 2011; RODRIGUEZ *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2014). Adicionalmente, altera a sinalização gabaérgica e glutamatérgica, pela interação com o receptor GABA-A potenciando a neurotransmissão gabaérgica; e pela inibição da receptação do glutamato levando a toxicidade glutamatérgica (FONFRÍA *et al.*, 2001, 2005).

A exposição ao metilmercúrio no cérebro adulto causa danos no córtex visual e perda neuronal na camada granulosa no cerebelo. Entretanto, no SNC em desenvolvimento, extremamente sensível à neurotoxicidade mercurial, ocorre desorganização difusa e generalizada da citoarquitetura do córtex cerebral. Os sintomas da exposição pré-natal incluem retardo mental, diminuição na função intelectual (QI), ataxia, cegueira e espasticidade (CECCATELLI *et al.*, 2010; ANTUNES DOS SANTOS *et al.*, 2016).

Ainda, já foi demonstrado que mulheres grávidas expostas ao metilmercúrio estão sob risco aumentado de aborto e do nascimento de bebês com deformidades ou doenças severas do sistema nervoso, mesmo quando a mãe não apresenta nenhum sintoma de intoxicação (LLOP *et al.*, 2012).

Em adultos com intoxicação aguda, os primeiros sintomas geralmente aparecem alguns dias após a exposição e são evidenciados pelos tremores das mãos sem controle pelo

indivíduo e queda dos cabelos e dos dentes (AZEVEDO, 2003). Uma contaminação severa pode causar cegueira, coma e morte (CARDOSO *et al.*, 2001).

Por sua vez, a intoxicação crônica por metilmercúrio se caracteriza principalmente por ataxia (perda da coordenação dos movimentos voluntários), disartria (problemas na articulação de palavras), parestesia (perda da sensibilidade nas extremidades das mãos e dos pés e em torno da boca), constrição do campo visual, perda de audição e, como já vimos, alterações no desenvolvimento nervoso em crianças (TCHOUNWON *et al.*, 2003). Devido a todas essas consequências deletérias da intoxicação crônica por metilmercúrio, é de extrema importância realizar um monitoramento adequado das populações expostas.

A avaliação da exposição mercurial é realizada por meio de indicadores biológicos, como é o caso da análise da concentração de mercúrio no cabelo e no sangue, embora cada um ofereça diferentes tipos de informações sobre essa exposição (MAGOS; CLARKSON, 2008).

Através da análise do sangue, pode ser obtida uma estimativa de exposição em curto prazo, mais recente; ao passo que o cabelo reflete a exposição média ao longo do período de crescimento do segmento de cabelo analisado (LI *et al.*, 2010). O cabelo humano acumula metilmercúrio (CERNICHIARI *et al.*, 2007) e aproximadamente 7% do metilmercúrio no corpo são excretados por esta via (MAGOS; CLARKSON, 2008). Assim, esta rota é um excelente monitor biológico largamente utilizado para quantificar a exposição humana ao metilmercúrio (MAGOS; CLARKSON, 2008). De fato, vários estudos já demonstraram que níveis de mercúrio no cabelo se correlacionam estreitamente com os níveis desse metal no sangue (AKAGI *et al.*, 1995; MERGLER *et al.*, 2007). Além disso, em um estudo com mães expostas ao mercúrio através da alimentação (via pescado), foi demonstrando que o conteúdo de mercúrio no cabelo das mães é altamente correlacionado com o conteúdo de mercúrio em seis regiões do cérebro de seus filhos (após necropsia) (CERNICHIARI *et al.*, 1995).

Dessa forma, o nível de mercúrio no cabelo é considerado o principal indicador de exposição em populações cronicamente expostas ao metilmercúrio e é utilizado por definição por diretrizes internacionais (WHO, 1990; USEPA, 1997; ATSDR, 1999). O fato de o conteúdo de mercúrio no cabelo refletir a exposição média ao longo do período de crescimento do segmento de cabelo (a taxa de crescimento é de cerca de 1 cm/mês) faz com

que este marcador se torne essencial no biomonitoramento, especialmente durante a gravidez (NRC, 2000; CLARKSON; MAGOS, 2006; MAGOS; CLARKSON, 2008; DIÉZ, 2009).

Geralmente, o conteúdo de mercúrio no cabelo é cerca de 250 a 300 vezes mais concentrado do que no sangue total (NRC, 2000; MAGOS; CLARKSON, 2008), levando a uma taxa de 250:1 e taxa correspondente para o nível de mercúrio no plasma de cerca de 2.500:1. A taxa proposta de concentração de mercúrio no cérebro para o sangue total situa-se entre 5:1 e 10:1 (CERNICHIARI *et al.*, 2007); no entanto esta taxa foi medida em apenas alguns indivíduos voluntários dosados com metilmercúrio radioativo.

1.1.2 Mercúrio e Amazônia

O mercúrio é uma importante fonte de poluição ambiental em diversas partes do mundo e especialmente na Amazônia, onde este fato está intimamente relacionado ao seu intenso uso pela atividade garimpeira (CÂMARA *et al.*, 1997; CRESPO-LÓPEZ *et al.*, 2005; SÁ *et al.*, 2006; PINHEIRO *et al.*, 2007; HACON *et al.*, 2008; BERZAS-NEVADO *et al.*, 2010; DÓREA; MARQUES, 2016). Ainda, um conteúdo expressivo de mercúrio no solo, inclusive em locais onde não existe histórico extrativista, estaria demonstrando que o solo amazônico é naturalmente rico neste metal (ROULET *et al.*, 1998; revisado por WASSERMAN *et al.*, 2001; BÉLIVEAU *et al.*, 2009; revisado por BERZAS-NEVADO *et al.*, 2010).

A Amazônia e, sobretudo a região do rio Tapajós (Figura 2), vive em um cenário de exposição mercurial desde a década de setenta, quando houve a corrida pelo ouro (SANTOS *et al.* 2003; DÓREA; MARQUES, 2016). Desde então, várias técnicas de extração de ouro têm sido desenvolvidas utilizando amalgamação com mercúrio (em virtude da capacidade deste metal de se ligar a outros metais, principalmente aqueles de interesse econômico) (AZEVEDO, 2003; SANTOS *et al.* 2003; BAIRD; CANN, 2004).

Adicionalmente, a Amazônia vem sendo foco de ampla discussão por conta das construções das grandes barragens que geram enormes impactos locais (FEARNSIDE *et al.*, 2015; FEARNSIDE, 2016). A construção da hidrelétrica de Tucuruí é, até hoje, uma fonte de controvérsia, pois foram inundados 2.430 km² de área após o bloqueio do rio Tocantins em 1974, gerando inúmeros impactos ambientais e sociais, como deslocamento da população

local, aumento na incidência de doenças como malária e aumento da intoxicação por mercúrio, por exemplo (FEARNSIDE *et al.*, 2015).

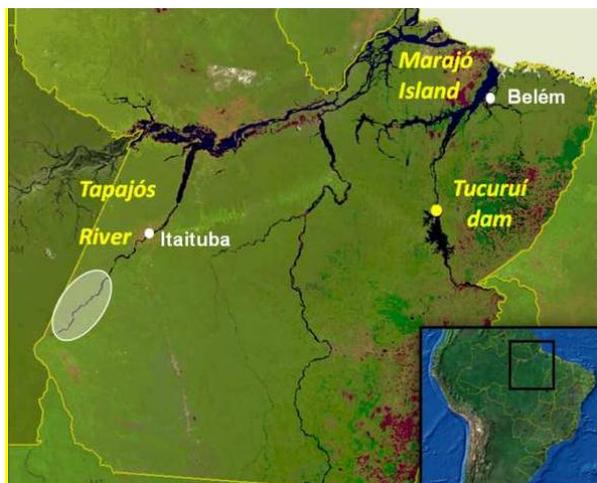


Figura 2: Mapa do Estado do Pará com a localização das áreas estudadas no presente estudo (Tapajós e Tucuruí), bem como a localização aproximada da área de garimpo na Bacia do Rio Tapajós (grande círculo cinza). Fonte: Imagem cedida por Maria Elena Crespo López.

Desta forma, as atividades mineradoras, a lixiviação dos solos após o desmatamento, a natureza química da água e os grandes impactos ambientais como, por exemplo, a construção de hidrelétricas, seriam considerados os principais fatores modificadores do conteúdo de mercúrio no ecossistema aquático amazônico resultando na exacerbada contaminação deste ecossistema (CARDOSO *et al.*, 2001; BERZAS-NEVADO *et al.*, 2010).

Por conseguinte, estudos vêm sendo realizados nestas regiões, para analisar a exposição humana ao mercúrio (HACON *et al.*, 2008; PASSOS; MERGLER, 2008; BERZAS-NEVADO *et al.*, 2010), com exceção de Tucuruí que apresenta apenas um trabalho, até o presente momento (LEINO; LODENIUS, 1995).

Na região do rio Tapajós, a exposição ao mercúrio vem sendo estudada pela análise de amostras de cabelo das populações de diferentes comunidades ribeirinhas (PINHEIRO *et al.*, 2003; PINHEIRO *et al.*, 2006; PINHEIRO *et al.*, 2007; PINHEIRO *et al.*, 2008; BERZAS-NEVADO *et al.*, 2010; DÓREA; MARQUES, 2016). Estes estudos encontraram níveis acima do limite de 10 $\mu\text{g/g}$ estabelecido pela Organização Mundial da saúde para os níveis de mercúrio em amostras de cabelo de populações com alta ingestão de pescado (WHO, 1990). Nas comunidades situadas ao longo do rio Tapajós, como a exemplo de Barreiras e São Luiz do Tapajós, os habitantes apresentaram níveis médios de 15 $\mu\text{g/g}$, aproximadamente (PINHEIRO *et al.*, 2006). Posteriormente, o mesmo grupo mostrou que esta contaminação existe inclusive nos grupos mais suscetíveis, como as crianças, com uma média de $13,39 \pm$

9,08 $\mu\text{g/g}$ de mercúrio no cabelo encontrado na comunidade de São Luiz do Tapajós (PINHEIRO *et al.*, 2007).

Considerando as pesquisas realizadas nas comunidades da região do Tapajós onde já foram encontrados valores de 0,1 $\mu\text{g/g}$ até mais de 150 $\mu\text{g/g}$ em conteúdo de mercúrio no cabelo ao longo dos últimos anos (revisado por BERZAS-NEVADO *et al.*, 2010), parece existir uma tendência a diminuição dos níveis de mercúrio encontrados nas amostras de cabelo (Figura 3). No entanto, é preciso ressaltar que a grande parte destas populações permanece exposta apresentando ainda níveis médios de mercúrio acima de 10 $\mu\text{g/g}$ (limite preconizado pela OMS) (BERZAS-NEVADO *et al.*, 2010).

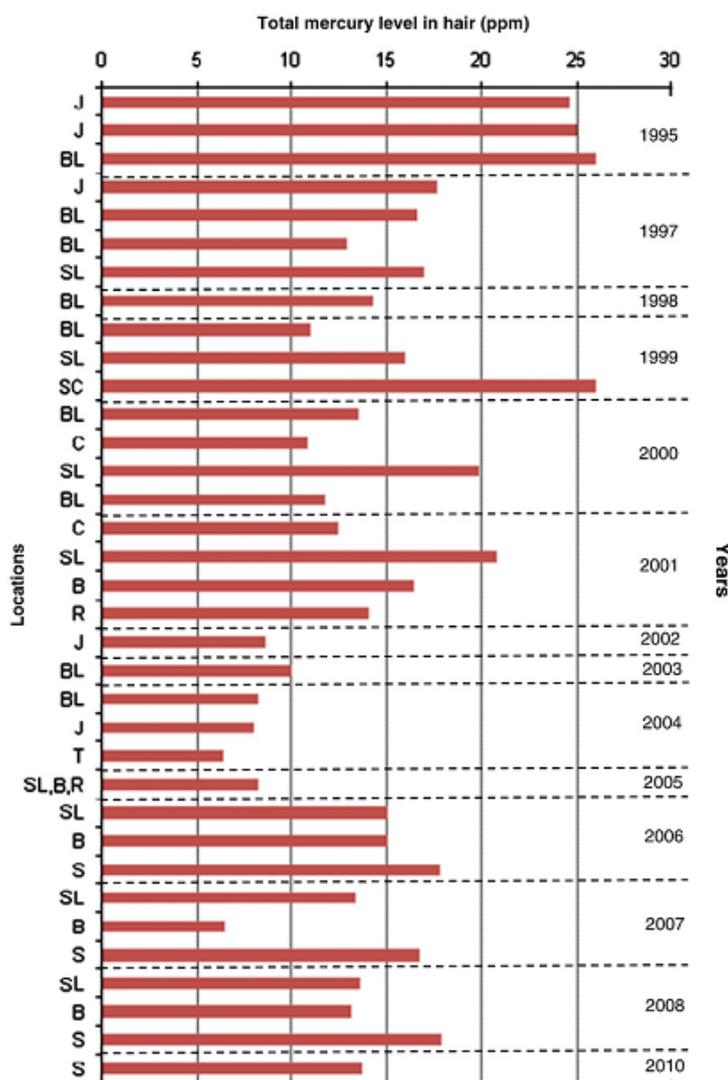


Figura 3: Níveis de mercúrio total detectados durante o período de 1995 a 2010 em amostras de cabelo de populações ribeirinhas da Bacia do Rio Tapajós: Jacareacanga (J), Brasília Legal (BL), São Luiz do Tapajós (SL), Sai-Cinza (SC), Cameté (C), Barreiras (B), Rainha (R), Tabatinga (T) e outras localidades (S). Fonte: Cedido gentilmente pelos autores de Berzas-Nevado *et al.* (2010).

Uma vez que a dieta das maiorias das populações indígenas e ribeirinhas, como no Tapajós, é constituída de peixe, esta via torna-se o principal meio de exposição destas populações ao mercúrio, especialmente, ao metilmercúrio (PINHEIRO *et al.*, 2008; BERZAS-NEVADO *et al.*, 2010; DÓREA; MARQUES, 2016). O risco de intoxicação mercurial através da ingestão de peixes contaminados é considerado alto quando levamos em conta fatores como a quantidade ingerida e a frequência dessa ingestão, pois são determinantes para o acúmulo de mercúrio no organismo humano (MORGANO, *et al.*, 2005). Os hábitos alimentares das populações ribeirinhas do Tapajós incluem aproximadamente sete refeições por semana com cerca de 141g de peixe por refeição (PASSOS *et al.*, 2008). A taxa de ingestão de mercúrio nessas comunidades varia em um intervalo de zero a 11,8 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$, com média de $0,92 \pm 0,89 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$, sendo que o limite estabelecido pela OMS para o consumo máximo de mercúrio é de $0,23 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ (WHO, 1990; PASSOS *et al.*, 2008). Dependendo do nível de contaminação do peixe, uma pessoa teria que comer, no máximo, uma refeição de peixe por semana para permanecer dentro do limite de ingestão recomendado.

Recentemente nosso grupo realizou a especiação mercurial em peixes destinados ao consumo humano obtidos em Itaituba (região do Tapajós) e em Belém (área sem histórico de exposição ao mercúrio) (Figura 4). Nenhuma das espécies de peixes não-piscívoras (*Mylossoma sp.*, o Pacú, *Leporinus sp.*, o Aracu, *Satanoperca sp.*, a Caratinga e *Colossoma macropomum*, o Jaraqui) apresentou concentrações de metilmercúrio consideradas tóxicas (RODRÍGUEZ MARTÍN-DOIMEADIOS *et al.*, 2014). Em contraste, aproximadamente 17% dos peixes piscívoros de Itaituba (*Brachyplatystoma filamentosum*, o Filhote, *Brachyplatystoma flavicans*, a Dourada, e *Pellona sp.*, a Sarda) apresentaram níveis de mercúrio acima do limite de $0,5 \mu\text{g}/\text{g}$, preconizado pela OMS, sendo que o aumento do conteúdo em MeHg foi geralmente acompanhado pelo aumento do nível de mercúrio inorgânico (RODRÍGUEZ MARTÍN-DOIMEADIOS *et al.*, 2014). Neste trabalho, demonstramos que os níveis de MeHg nas espécies piscívoras do Tapajós são maiores do que os níveis encontrados nos peixes da área não exposta (com exceção do Tucunaré, *Cichla sp.*).

Um dado curioso deste trabalho foi que os exemplares de Tucunaré (*Cichla sp.*), adquiridos no Mercado do Ver-O-Peso em Belém (mas que foram pescados no Lago de Tucuruí), apresentaram níveis de metilmercúrio acima do limite ($1,75 \pm 1,27 \mu\text{g}/\text{g}$), comparáveis àqueles apresentados pelos peixes da mesma espécie da região do rio Tapajós

(RODRÍGUEZ MARTÍN-DOIMEADIOS *et al.*, 2014) (Figura 4). Cabe destacar que o Tucunaré é um peixe predatório que compõe mais da metade da captura comercial em Tucuruí (FEARNSIDE *et al.*, 2015). Este fato voltou nossa atenção para a região de Tucuruí, e encontramos um trabalho publicado anteriormente já demonstrando que os Tucunarés pescados no lago da Hidrelétrica de Tucuruí, no ano de 2000, apresentavam altos níveis de mercúrio (KEHRIG *et al.*, 2008).

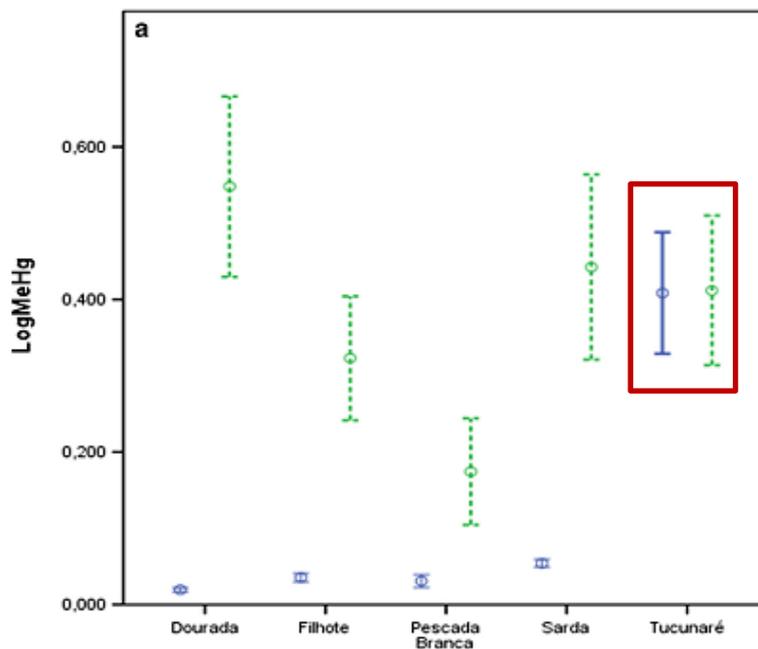


Figura 4: Concentrações de metilmercúrio (média ± desvio padrão) nas espécies de peixes piscívoros compradas em Itaituba (verde) e Belém (azul). O Tucunaré comprado em Belém foi originário do Lago de Tucuruí. Fonte: RODRÍGUEZ MARTÍN-DOIMEADIOS *et al.*, 2014.

Segundo Leino e Lodenius (1995), haveria duas possíveis causas responsáveis pelo aumento dos níveis de mercúrio na biota aquática e no ambiente na Reserva de Tucuruí: áreas de garimpo, com a carga trazida pelo rio Tocantins (Serra Pelada, área de grande atividade mineradora) (LEINO; LODENIUS, 1995) e a própria inundação dos solos (material orgânico em decomposição) (LEINO; LODENIUS, 1995; MALM *et al.*, 2004; KEHRIG *et al.*, 2008).

Até o presente, apenas um estudo realizado há mais de 20 anos, avaliou a contaminação mercurial nas populações residentes na reserva de Tucuruí (LEINO; LODENIUS, 1995). Naquele momento, as amostras de cabelo de pescadores e suas famílias revelaram níveis de mercúrio entre 0,9 e 240 $\mu\text{g/g}$ (com uma média de 65 $\mu\text{g/g}$, acima do limite preconizado pela OMS de 10 $\mu\text{g/g}$), suficientes para causar intoxicação fetal com alterações no desenvolvimento neurológico e danos à saúde destas populações (LEINO; LODENIUS, 1995).

Apesar dos resultados alarmantes desse último trabalho, até agora, nunca foi realizado nenhum outro monitoramento nas populações daquela região.

1.1.3 Metilmercúrio e Apolipoproteína E

É importante ressaltar que a toxicidade do metilmercúrio, varia de acordo com a via de entrada, quantidade de exposição e suscetibilidade individual (HONG *et al.*, 2012). Assim, de forma adicional aos estudos sobre exposição mercurial medindo os níveis de mercúrio, os esforços nos últimos anos foram focados na procura por biomarcadores de intoxicação (isto é, do dano provocado), e de suscetibilidade. Esta última característica é especialmente importante para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e para a identificação dos indivíduos de alto risco que precisam de um acompanhamento adequado. Especialmente na última década tem sido destacado o importante papel da apolipoproteína E (ApoE para a proteína; *APOE* para o gene) como um fator de suscetibilidade genética frente à intoxicação mercurial (GODFREY *et al.*, 2003; MUTTER *et al.*, 2004; WOJCIK *et al.*, 2006; NG *et al.*, 2013; 2015; WOODS *et al.*, 2014).

A ApoE é uma glicoproteína contendo 299 aminoácidos e 34 KDa de peso molecular (SEET *et al.*, 2004; REBECK *et al.*, 2006). Como proteína constituinte das lipoproteínas do plasma e do cérebro, ela medeia a captação celular do colesterol, triglicerídeos, fosfolídeos e ésteres de colesterol, por interagir com os receptores de LDL, receptor de LDL relacionado à proteína 1 (LRP1) e receptor de VLDL. Os níveis plasmáticos de ApoE de ~40–70 mg/ml, são principalmente originários do fígado (75%). Nos humanos, o cérebro é o segundo sítio de maior síntese de ApoE, sendo produzida principalmente por astrócitos (o nível de ApoE no líquido cefalorraquidiano (LCR) é em torno de 3–5 mg/ml), os neurônios sintetizam ApoE sob situações de estresse (MAHLEY *et al.*, 2009).

O cérebro é o sítio mais rico em colesterol de todo o corpo, contendo aproximadamente 25% de todo o colesterol corpóreo e a ApoE é a principal apolipoproteína encontrada neste tecido (DIETSCHY; TURLEY, 2001). O colesterol é essencial para o desenvolvimento normal do cérebro. É componente fundamental para a produção da mielina e da membrana celular dos neurônios e células gliais, sendo utilizado constantemente nos processos de reparo para manter a integridade destas estruturas. O colesterol é necessário para a sinapse e formação dos dendritos, e para a orientação axonal (revisado por ORTH;

BELLOSTA, 2012). Aproximadamente todo o colesterol presente no SNC é sintetizado *in situ*, através da síntese *de novo*. Virtualmente o colesterol da periferia não atravessa a barreira hematoencefálica (BHE) (HIRSCH-REINSHAGEN *et al.*, 2009; revisado por ORTH; BELLOSTA, 2012). Portanto, é extremamente necessária a manutenção da síntese e da homeostase do colesterol no SNC (HIRSCH-REINSHAGEN *et al.*, 2009; ONG; WONG, 2013).

Dentro do SNC, os lipídios são transportados em lipoproteínas que se assemelham às partículas HDL que circulam no LCR, sendo a ApoE a principal constituinte deste HDL (HIRSCH-REINSHAGEN *et al.*, 2009; RIEDEL *et al.*, 2016). A ApoE secretada pelas células gliais une-se à moléculas de colesterol e de fosfolipídios, formando assim uma partícula de HDL (VENCE; HAYASHI, 2010). Por sua vez, esta partícula de HDL pode ligar-se aos receptores nas membranas de neurônios. Assim, acredita-se que estas partículas façam a entrega de colesterol para os neurônios para ser usado nos processos de crescimento celular, reparo e sinaptogênese (VENCE; HAYASHI, 2010).

A ApoE é codificada por um gene polimórfico (Figura 5) que está localizado no braço longo do cromossomo 19, na posição 13.2, possuindo 3.7 kilobases com 4 éxons e 3 íntrons (RICHARD *et al.*, 1994; SEET *et al.*, 2004). Apresenta-se em três principais isoformas (ApoE2, ApoE3 e ApoE4), codificadas pelos alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$, respectivamente (HARRIS *et al.*, 2006).

Estas três isoformas diferem entre si no conteúdo de dois aminoácidos nos resíduos 112 e 158 da proteína (GODFREY *et al.*, 2003; SEET *et al.*, 2004). Nos humanos, existem seis possíveis combinações de genótipo ($\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 4/\epsilon 4$). A ApoE3 é a isoforma mais abundante na maioria das populações humanas (SEET *et al.*, 2004) e possui uma arginina e uma cisteína nas posições 112 e 158, respectivamente. A ApoE2 possui somente cisteína (Cys) nessas posições e a ApoE4 possui somente arginina (Arg) (Figura 5).

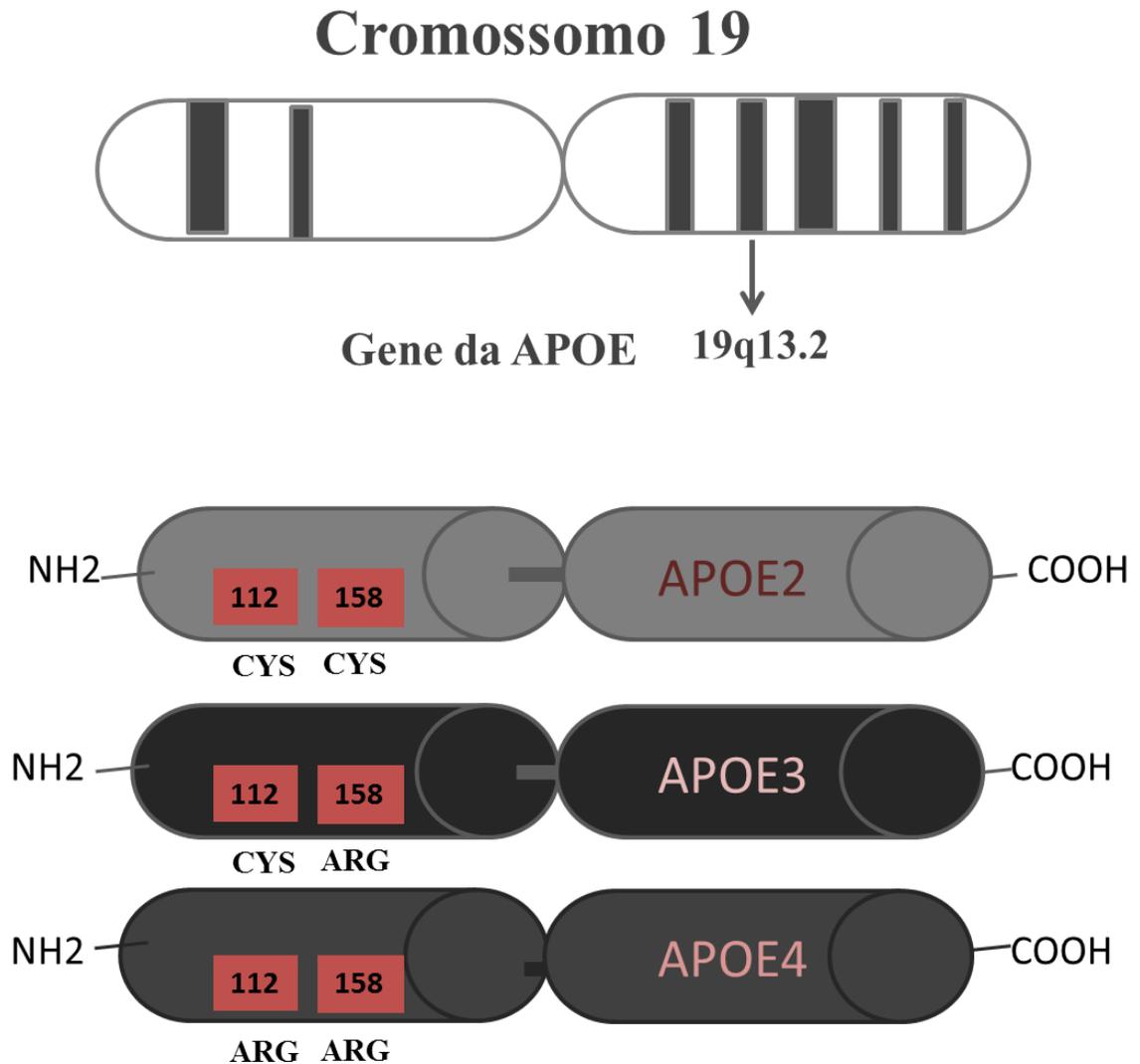


Figura 5: Localização do gene da apolipoproteína E e as três isoformas da proteína com indicação do conteúdo em cisteína (Cys) ou arginina (Arg) nas posições 112 e 158. Fonte: Imagem elaborada pela autora.

Na população mundial, o alelo mais comum é o $\epsilon 3$ (79%), seguido pelo $\epsilon 4$ (13,5%), sendo alelo $\epsilon 2$ (7,3%) o mais raro (Singh *et al.*, 2006) (Figura 6). Na América do Sul, o alelo mais comum continua sendo o $\epsilon 3$ (76,7%), porém há um aumento da frequência do $\epsilon 4$ que passa de 13,5%, para 18,7%; e uma redução no alelo $\epsilon 2$ que passa de 7,3% para 4,6% (Singh *et al.*, 2006) (Figura 7).

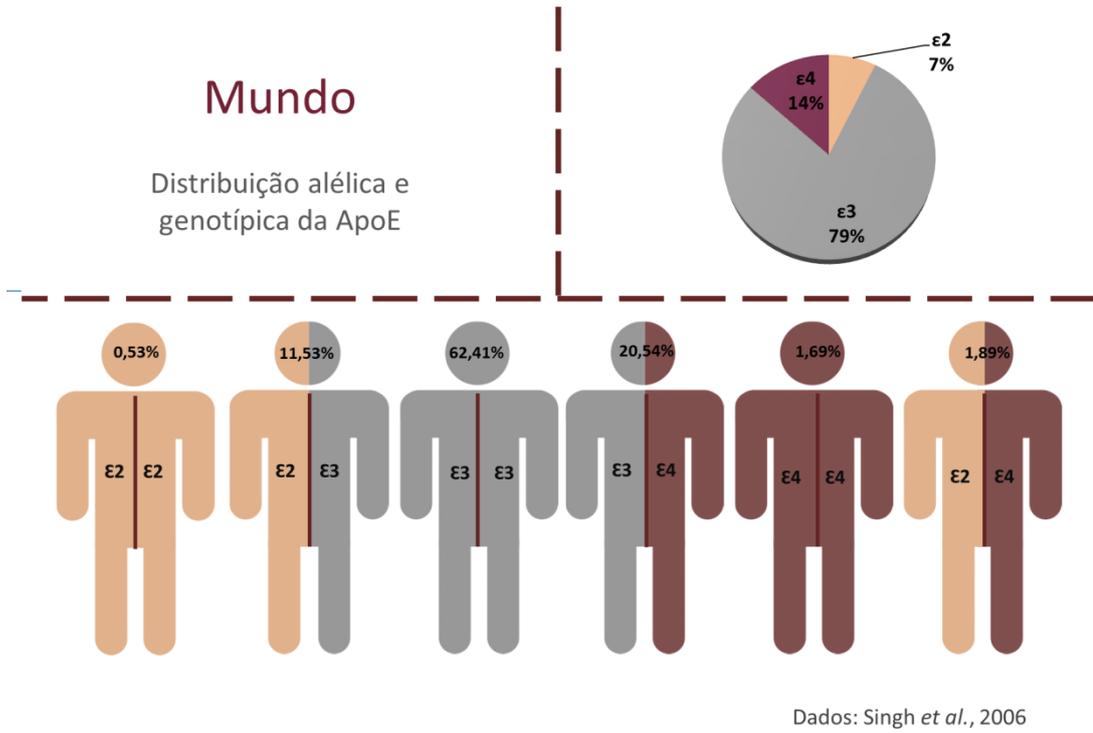


Figura 6: Distribuição dos genótipos e alelos da apolipoproteína E na população mundial. Fonte: Imagem elaborada pela autora.

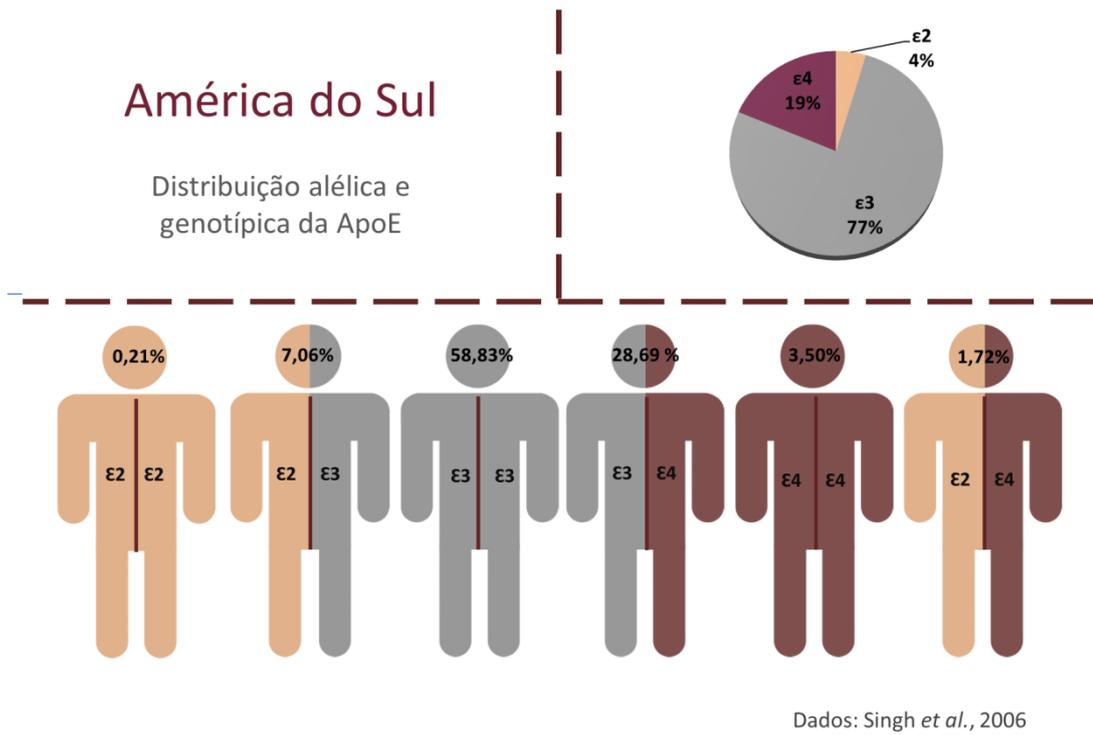


Figura 7: Distribuição dos genótipos e alelos da apolipoproteína E na América do Sul. Fonte: Imagem elaborada pela autora.

O polimorfismo da ApoE influencia tanto na estrutura quanto na função da proteína, alterando, por exemplo, a afinidade dela por receptores (SCHWANKE *et al.*, 2002; ZHONG; WEISGRABER, 2009). A presença das cisteínas nas ApoE3 e ApoE2 resulta na formação de pontes de dissulfeto com outras moléculas da ApoE formando dímeros, o que não acontece na ApoE4 devido à falta de grupos dissulfeto nas argininas dessas posições (ZHONG; WEISGRABER, 2009). Esta pequena diferença na composição de aminoácidos influencia de forma definitiva na conformação espacial que adquire a molécula da ApoE (Figura 8): na ApoE4, a Arg na posição 61 interage com o glutamato na posição 255 fazendo que os domínios N-terminal e C-terminal se aproximem, em virtude da reorientação provocada na molécula (ZHONG; WEISGRABER, 2009). Isso não acontece com os domínios da ApoE2 e da ApoE3, onde a posição 112 é ocupada por uma Cys que se liga à Arg na posição 61 evitando a interação com o glutamato da posição 255 (ZHONG; WEISGRABER, 2009).

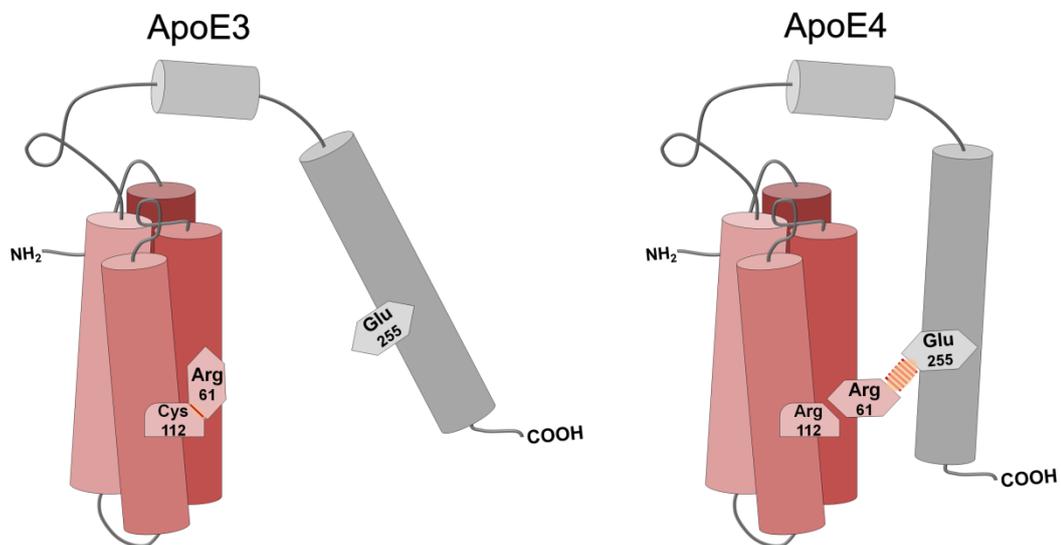


Figura 8: Influência dos domínios de interação na estrutura da apoE. Fonte: Imagem cedida por Ricardo Paraense Sousa de Oliveira.

Assim, essas modificações podem ser as responsáveis pela relação das isoformas da ApoE com certas patologias. Por exemplo, a substituição da cisteína na posição 158 na ApoE2 resulta em aumento dos níveis de triglicerídeos e colesterol causado pelo *clearance* tardio de lipoproteínas hepáticas e intestinais (b-VLDL), levando a hiperlipoproteinemia do tipo III (MAHLEY *et al.*, 2009). Ainda essa reorientação da molécula ApoE4 poderia explicar porque esta isoforma desempenha um papel chave na neuropatologia de muitas desordens, por afetar dramaticamente o domínio de interação e a estabilidade desta proteína (levando a formação do glóbulo fundido, que são reativos intermediários, que possuem muitos efeitos,

dentre eles, aumento da suscetibilidade a proteólise, quebra da membrana e translocação através da membrana, por exemplo) (MAHLEY *et al.*, 2006).

A presença da *APOE4* é o principal fator de risco genético para a doença de Alzheimer (DA) com 60-80% dos portadores da doença tendo pelo menos um alelo $\epsilon 4$, enquanto que a *APOE2* é relacionada com uma probabilidade reduzida e um retardo no início da DA (revisado em REBECK *et al.*, 2006; XU *et al.*, 2014). Entretanto, o mecanismo molecular através do qual a ApoE4 resulta no principal fator de risco para o desenvolvimento de DA ainda não é bem conhecido (REBECK *et al.*, 2006). Existem diversas hipóteses acerca da relação entre a presença da ApoE4 e a neurodegeneração encontrada na DA, dentre elas a ApoE4 favoreceria: a deposição e a produção da proteína β -amilóide, principal componente das placas senis; a inibição do crescimento dos neuritos; quebras no citoesqueleto neuronal; maior hiperfosforilação da proteína tau, levando a formação de emaranhados neurofibrilares e declínio cognitivo (MAHLEY; HUANG, 2006; Yu *et al.*, 2014).

A ApoE parece contribuir definitivamente no reparo e/ou proteção dos neurônios, por meio de mecanismos ainda não conhecidos (HAYASHI *et al.*, 2007), pois a deficiência da ApoE é relacionada ao aumento da neurodegeneração durante o envelhecimento e após danos produzidos tanto no SNC quanto no sistema nervoso periférico (SNP), há aumento dramático da síntese de ApoE (MAHLEY *et al.*, 2006; HAYASHI *et al.*, 2007). Em certas condições, os neurônios humanos podem sintetizar ApoE em quantidades significantes, possivelmente como uma parte de um programa compensatório para conter a neurodegeneração (ROSES *et al.*, 1998; XU *et al.*, 1999; Boschert *et al.*, 1999).

A presença da ApoE4 também aumenta a extensão do dano produzido no corpo humano pela intoxicação com metais pesados, especialmente no caso de metais que podem afetar o sistema nervoso central, como o mercúrio (PENDERGRASS; HALEY, 1995; GODFREY *et al.*, 2003, WOJCIK *et al.*, 2006; NG *et al.*, 2013; 2015; WOODS *et al.*, 2014).

Pendergrass e Haley (1995) propuseram uma explicação bioquímica baseada nas diferenças de aminoácidos das três isoformas da ApoE e a afinidade do mercúrio por grupamentos sulfidríla (-SH), determinando a relevância das isoformas na eliminação mercurial. Assim, indivíduos ApoE2 (com duas cisteínas, portanto dois grupamentos -SH) e em menor extensão ApoE3 (uma cisteína, portanto, um grupamento -SH), estariam aptas a

ligar e remover o mercúrio do cérebro e LCR (PENDERGRASS; HALEY, 1995). Em contraste, indivíduos com ApoE4 intoxicados com mercúrio apresentariam uma capacidade naturalmente diminuída para ligar ou “quelar” o metal, quando comparados àqueles apresentando as isoformas ApoE2 e ApoE3 (PENDERGRASS; HALEY, 1995; GODFREY *et al.*, 2003, WOJCIK *et al.*, 2006). Este fenômeno favoreceria a presença do metal na forma livre, exercendo assim seu efeito tóxico.

Uma maior frequência do alelo $\epsilon 4$ (34%) foi encontrada em grupos com indivíduos apresentando sintomas clássicos da intoxicação mercurial (provenientes possivelmente da grande quantidade de amálgama dentárias em seus dentes) em comparação com o grupo que não apresentava os sintomas (26%) (GODFREY *et al.*, 2003). Também foi encontrada uma forte correlação entre indivíduos ApoE4 e os sintomas característicos da toxicidade mercurial crônica, doença de Alzheimer, transtorno bipolar e depressão, em um estudo com populações da Nova Zelândia expostas ao mercúrio via restaurações com amálgama presentes em seus dentes (WOJCIK *et al.*, 2006).

Assim, qualquer exposição ao mercúrio poderia colocar em risco potencialmente maior aos efeitos neuropsiquiátricos indivíduos ApoE4, enquanto que para os indivíduos ApoE2 este risco não seria tão grande (WOJCIK *et al.*, 2006). A correlação entre a inabilidade de eliminação do mercúrio por indivíduos ApoE4 ($\epsilon 3/\epsilon 4$ e $\epsilon 4/\epsilon 4$) e um aumento na incidência e sintomatologia da toxicidade mercurial crônica daria suporte para a teoria da afinidade pelos grupamentos sulfidrilas (WOJCIK *et al.*, 2006).

A alta afinidade do mercúrio pelo cérebro humano e sua habilidade de atravessar membranas lipídicas (incluindo a barreira placentária) requer especial atenção para os efeitos deste metal no neurodesenvolvimento de fetos e crianças. Um interessante estudo de coorte com 168 crianças tailandesas, que foram acompanhadas desde o nascimento até dois anos de idade, demonstrou que a exposição pré-natal ao mercúrio foi associada com efeitos adversos significativos na cognição, comportamento social e neurodesenvolvimento entre os indivíduos que continham pelo menos uma cópia do alelo $\epsilon 4$ (NG *et al.*, 2013). Ainda, a continuação deste mesmo estudo, demonstrou que altos níveis de mercúrio no cordão umbilical, são relacionados com os maiores *scores* (pior performance) no teste aplicado para avaliar distúrbios comportamentais, como reatividade emocional e ansiedade/depressão, nas crianças ApoE4 (NG *et al.*, 2015)

Outro estudo coorte com 300 crianças de Lisboa, Portugal, com idade entre 8 e 12 anos expostas ao mercúrio através de amálgama dentária, demonstrou que o mercúrio pode afetar especialmente funções de aprendizado e memória, atenção e coordenação motora em crianças ApoE4 (WOODS *et al.*, 2014).

Apesar dos trabalhos já existentes demonstrando que a identificação dos polimorfismos da ApoE funciona como um marcador de suscetibilidade à neurotoxicidade mercurial, até o presente momento, nunca foi aplicado um teste de suscetibilidade individual nas populações amazônicas para este gene. Assim, torna-se necessário saber qual é a distribuição dos genótipos da apolipoproteína E presentes nas populações amazônicas e se eles indicam uma correlação entre a presença da ApoE4 e um maior dano nas populações amazônicas que apresentam exposição mercurial.

1.1.4 Mercúrio e marcadores de intoxicação: S100B e Enolase Específica dos Neurônios (NSE)

É de extrema importância para um biomonitoramento adequado de populações humanas realizar a análise de três fatores: da exposição, que analisa o conteúdo do tóxico no corpo; da suscetibilidade individual, que estuda a predisposição que cada indivíduo tem a sofrer um maior ou menor dano com a mesma quantidade de exposição; e da intoxicação, que quantifica a extensão do dano já provocado.

Dentre os estudos com mercúrio e populações humanas na Amazônia, existe um grande número de estudos sobre exposição, publicados tanto por pesquisadores brasileiros quanto estrangeiros (revisado por BERZAS-NEVADO *et al.*, 2010). Entretanto, os estudos sobre a intoxicação (isto é, o dano produzido por uma exposição) ou suscetibilidade (isto é, predisposição genética a sofrer esse dano) são bem menos numerosos nas populações amazônicas.

O número escasso de trabalhos sobre intoxicação mercurial nestas populações pode residir na dificuldade de uma detecção acurada de dano neurológico/neurodegenerativo nessas populações através dos métodos tradicionais neurocomportamentais propostos, devido à presença de vários fatores de confusão, como o isolamento geográfico, as características

socioeconômicas e as doenças endêmicas da região. Estes possíveis fatores de confusão dos testes neurológicos ficam evidentes quando olhamos para o resultado de um trabalho que demonstrou, após a avaliação neurológica das manifestações subjetivas, que em uma comunidade ribeirinha amazônica não exposta ao mercúrio, a frequência de relatos de sintomas comuns na intoxicação por mercúrio (como cefaleia, fadiga, tontura, náuseas/vômitos, adormecimento nas mãos, parestesias, alteração de memória, insônia, tristeza, ansiedade, medo e agressividade) foi maior do que nas áreas expostas, sugerindo outras causas que não o mercúrio (KHOURY *et al.*, 2013).

Assim, a procura por marcadores bioquímicos tem sido realizada e recentemente, um interessante estudo (YILMAZ *et al.*, 2014) demonstrou que marcadores como as proteínas S100B e a enolase específica de neurônio (NSE) podem ser medidos no soro das populações intoxicadas com mercúrio e revelar efeitos deletérios neurodegenerativos antes mesmo do aparecimento de sintomatologia.

As proteínas S100B e enolase específica dos neurônios (NSE) têm sido extensamente utilizadas como biomarcadores de dano no sistema nervoso, estando seus níveis elevados em inúmeras desordens crônicas e agudas no sistema nervoso, como por exemplo, traumatismo crânio encefálico (RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2016), hemorragia intracraniana (ALATAS *et al.*, 2015) e Doença de Alzheimer (CHAVES *et al.*, 2010) (Figura 9).

A proteína S100B é uma proteína ligante de cálcio produzida fisiologicamente e liberada principalmente por astrócitos no SNC, com efeitos neurotróficos e neuroprotetores em concentrações fisiológicas da ordem de nanomolar. Contudo, concentrações mais altas (micromolar) são neurotóxicas levando a morte astrocítica (VAN ELDIK; WAINWRIGHT, 2003). Em situações de dano, a S100B é liberada ou vaza através das células do SNC e entra na circulação periférica, no entanto, o mecanismo através do qual ocorre este aumento da concentração de S100B na periferia ainda não foi elucidado. Como as proteínas não cruzam tão facilmente a BHE acredita-se que este aumento periférico na concentração de S100B pode estar baseado em transportes ativos ou passivos, na alteração da permeabilidade da barreira, ou uma combinação destes dois fatores (SCHULTE *et al.*, 2014).

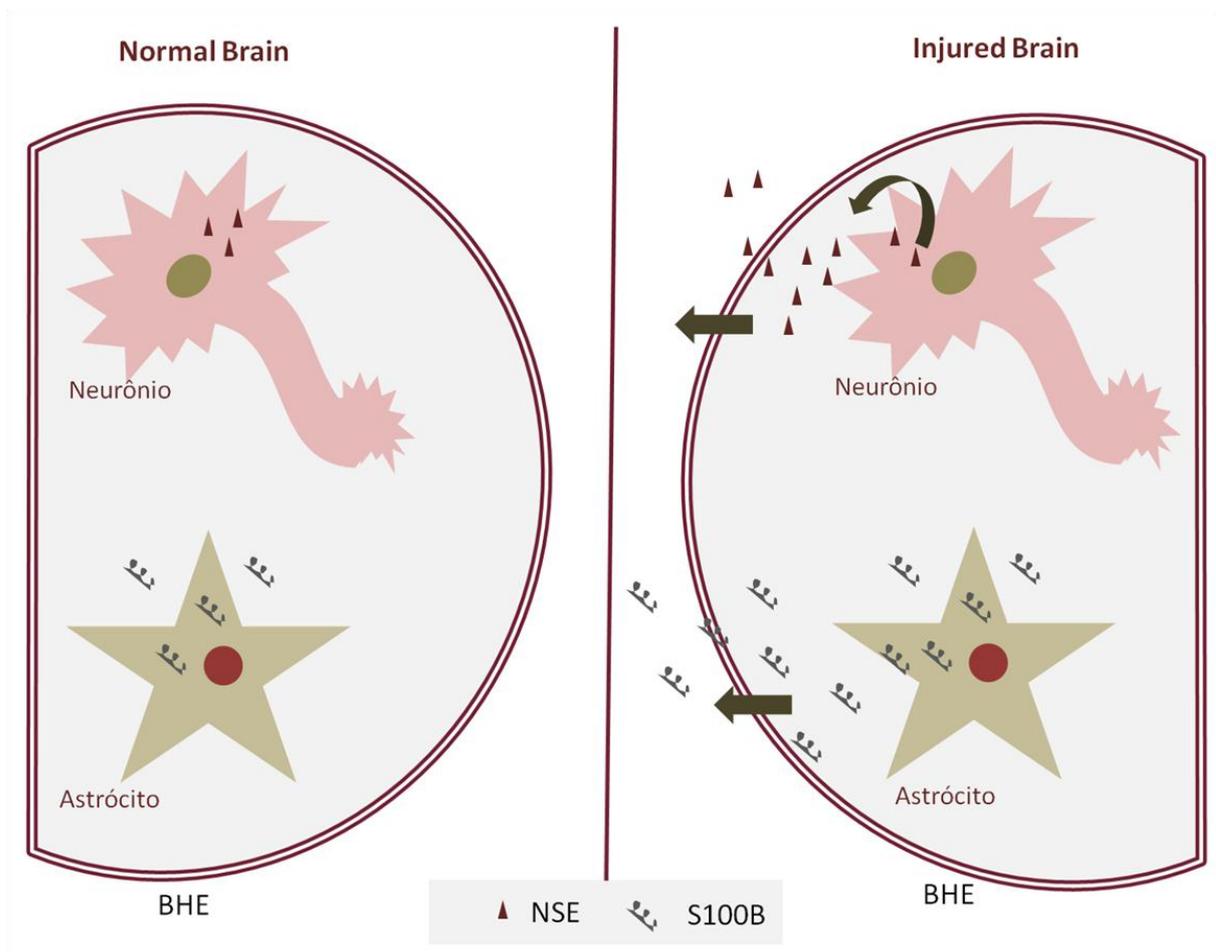


Figura 9: Expressão das proteínas S100B e enolase específica do neurônio (NSE), por neurônio e astrócito, respectivamente, no cérebro normal e no cérebro após injúria. BHE: Barreira hemato-encefálica. Fonte: Imagem elaborada pela autora.

A NSE é uma enzima glicolítica citoplasmática, que constitui entre 0,4 % e 2,2 % do conteúdo total de proteínas no cérebro. Em alguns neurônios chega a 3-4% do conteúdo de proteínas solúveis. Esta quantidade de enzima parece ser muito além do que o suficiente para atividade catalítica, mas até o presente, não se sabe se existem outras funções por ela realizadas (ISGRO *et al.*, 2015). Uma vez que a NSE é uma proteína citoplasmática e não é secretada, ela é considerada um marcador altamente específico neuronal, pois o aumento dos seus níveis no LCR ou sangue indica danos estruturais às células neuronais, provendo uma ferramenta de diagnóstico útil sobre desordens devido a metabolismo alterado ou morte neuronal (STREITBURGER *et al.*, 2012; ISGRO *et al.*, 2015).

Assim, estudos *in vitro* com linhagens de células de glioma e neuroblastoma (HUANG *et al.*, 1993) e *in vivo* com ratos Wistar (FARINA *et al.*, 2005) e com humanos (YILMAZ *et al.*, 2014) demonstraram que estes biomarcadores de dano neuronal e glial são úteis para

identificar a neurotoxicidade mercurial. Huang e colaboradores (1993) encontraram aumento na secreção de NSE e S100B em cultivo de células C6 e N18TG-2 tratadas com mercúrio (HUANG *et al.*, 1993). Farina e colaboradores (2005) encontraram um aumento de três vezes na concentração de S100B no LCR de ratos tratados com MeHg (concentração média no sangue de 1 µg/ml) em relação aos controles (FARINA *et al.*, 2005). Mais recentemente, Yilmaz e colaboradores (2014) demonstraram em um grupo de crianças com exposição aguda a mercúrio, aumentos significativos nos níveis plasmáticos de NSE e S100B em comparação com o grupo não exposto (YILMAZ *et al.*, 2014).

As proteínas S100B e NSE podem ser quantificadas através de inúmeros métodos, como por exemplo, ensaio imunoradiométrico, ensaios imunoluminométricos, espectroscopia de massa, Western Blotting e PCR em tempo real, entre outros (YARDAN *et al.*, 2011; ISGRO *et al.*, 2015). Estes métodos diferem com relação à especificidade, sensibilidade, aplicação da amostra e custos (YARDAN *et al.*, 2011).

Com relação à especificidade e sensibilidade, a técnica de PCR em tempo real vem ganhando cada vez mais espaço sendo considerada extremamente sensível e confiável, detectando diferenças com poucas cópias de DNA (LIVAK; SCHIMITTGEN, 2001).

No que concerne a amostras, considerando as situações adversas encontradas durante as expedições em coleta de campo, a conservação adequada de proteínas após a coleta torna-se por muitas vezes impossível, uma vez que geralmente o sangue precisa ser centrifugado em no máximo uma hora após a coleta, porque a hemólise afeta significativamente a análise (ISGRO *et al.*, 2015), o que seria um fator que poderia inviabilizar a análise correta do nível de proteínas no soro. Após o desenvolvimento de reagentes estabilizantes de RNA, como o RNAlater®, que estabiliza o RNA presente nos tecidos coletados por até uma semana a temperatura ambiente, determinar o nível do RNAm mensageiro das proteínas, parece ser uma excelente escolha quando a conservação da proteína não é possível.

Uma vez que a detecção do RNAm da S100B, intra- ou extracelular e os níveis da proteína, têm sido utilizados como parâmetro para acessar o dano/reação astrocítica em muitas situações de dano ao SNC (GONÇALVES *et al.*, 2008) e um aumento na expressão do RNAm da NSE já foi demonstrado após a exposição a cádmio e arsênio (SOH *et al.*, 2012) e devido às condições em que deve ser realizada a coleta de amostras nestas populações

(fazendo com que marcadores proteicos não sejam confiáveis), acreditamos que a análise do RNAm no soro destes indivíduos pode ser uma alternativa de marcador para estas populações.

Até o presente momento, nenhum destes marcadores de dano foi aplicado nas comunidades ribeirinhas do Tapajós e de Tucuruí. Estas proteínas podem ser excelentes parâmetros de intoxicação, uma vez que muitos dos testes neurológicos aplicados nessas populações apresentam muitos fatores de confusão.

2 OBJETIVO GERAL

Estudar a suscetibilidade genética, exposição e intoxicação mercuriais nas populações ribeirinhas de Itaituba (região do Tapajós) e Tucuruí (reserva de Tucuruí).

2.1 Objetivos Específicos

- a) Estudar a suscetibilidade genética através da análise da distribuição genotípica e alélica da apolipoproteína E em comunidades ribeirinhas da Amazônia;
- b) Determinar a exposição atual das populações incluídas no presente estudo realizando a especiação mercurial nas amostras de cabelo dos indivíduos;
- c) Identificar a possível existência de indivíduos de risco baseando-se na genotipagem da ApoE e nos níveis de mercúrio;
- d) Estudar a intoxicação mercurial através da análise da expressão de proteína S100B e da enolase específica de neurônio, quantificadas no soro, com o intuito de determinar se podem servir como parâmetro de intoxicação em indivíduos expostos das comunidades ribeirinhas da Amazônia.

3 METODOLOGIA

3.1 Populações de estudo:

3.1.1 Comunidades ribeirinhas do Rio Tapajós:

No presente estudo, foram estudadas seis comunidades ribeirinhas situadas às margens do Rio Tapajós (Figura 10, Quadro 1).

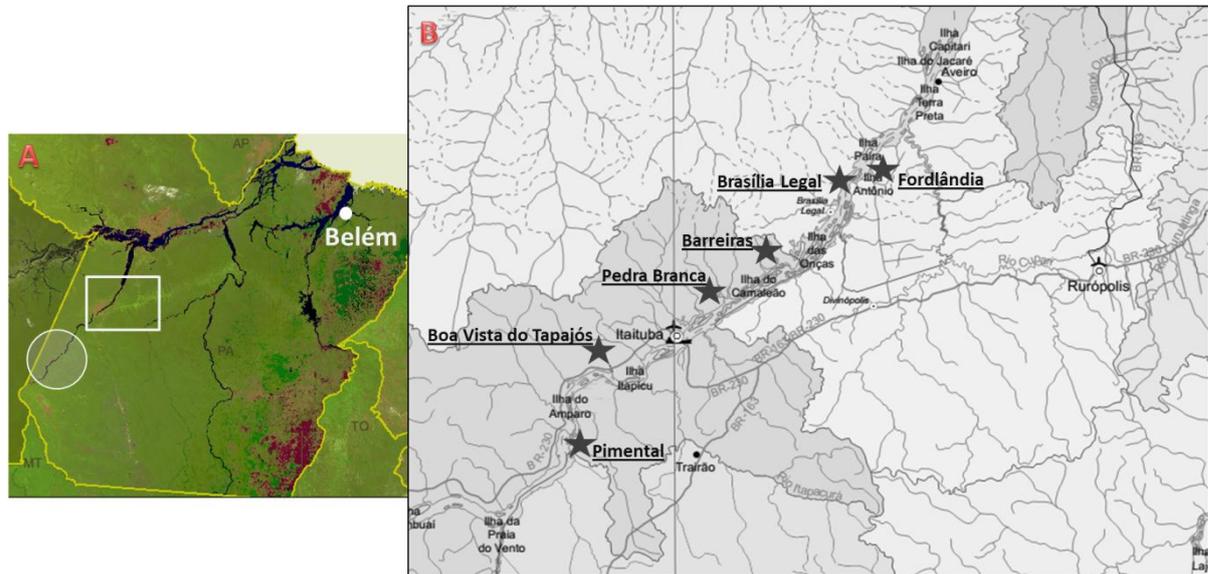


Figura 10: Mapa do Pará (A), com destaque para a região do Tapajós (B), demonstrando a localização das comunidades ribeirinhas incluídas no estudo, situadas ao longo do rio Tapajós. A área demarcada pelo círculo é a área de garimpo na região do Tapajós. Dados: IBGE, 2016. Fonte: Imagem elaborada pela autora.

Quadro 1: Localização das comunidades ribeirinhas do Tapajós incluídas no estudo.

Comunidade	Localização (latitude e longitude)
Barreiras	-4°05'29.6 e -55°41'19.3
Boa Vista do Tapajós	-4°21'13.8 e -56°10'35.7
Pimental	-4°34'10.2 e -56°15'43.4
Fordlândia	-3°49'45.0 e -55°29'48.5
Brasília Legal	-3°56'48.6 e -55°34'55.6
Pedra Branca	-4°07'26.6 e -55°47'34.8

As comunidades do Tapajós são formadas por várias casas, umas próximas das outras, sem saneamento básico, água encanada e coleta de lixo. Todas as comunidades apresentam posto de saúde, mas apenas duas delas contavam com a presença de um médico (Brasília Legal e Fordlândia).

Estas populações estão situadas na margem do rio Tapajós, que foi cenário para a atividade garimpeira na extração do ouro, desde os anos 70, sendo, portanto, expostas à contaminação mercurial (BERZAS-NEVADO *et al.*, 2010).

3.1.2 Comunidades ribeirinhas de Tucuruí:

Foram incluídos neste estudo residentes nas ilhas do Lago de Tucuruí (onde funciona a Usina Hidrelétrica Tucuruí) da região chamada Caraipé (3°47'41"S e 49°48'3"O) (Figura 11). Os ribeirinhos residentes no lago de Tucuruí são distribuídos aleatoriamente entre as várias ilhas situadas no local, geralmente com uma ou duas famílias por ilha. Não há energia elétrica, saneamento básico, água encanada e coleta de lixo. O acesso aos serviços de saúde é precário, uma vez que não há posto de saúde próximo a eles, sendo necessário o deslocamento até a cidade (1-2h em barco).

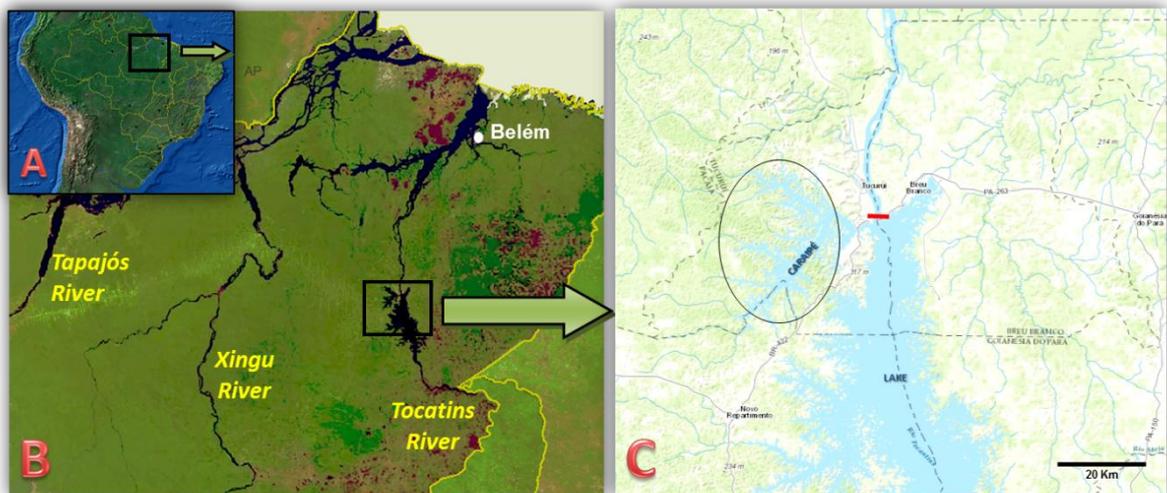


Figura 11. Mapas de Brasil (A), Estado de Pará (B) e região de Tucuruí (C). No mapa C, são mostradas as localizações aproximadas da Usina Hidroelétrica (linha vermelha) e os dois compartimentos comunicados da reserva (Caraipé e o lago). Os participantes do trabalho foram de Caraipé (círculo cinza). Fonte: Imagem cedida por Maria Elena Crespo López.

3.2 Critérios de inclusão e exclusão:

Foram incluídos no estudo indivíduos adultos (≥ 18 e < 65 anos de idade), de ambos os sexos, ribeirinhos moradores no município há mais de dois anos, que consumiam semanalmente peixe em cinco refeições ou mais. Os critérios de exclusão incluíram fumantes de mais de quatro cigarros ao dia, portadores de doenças agudas e crônicas graves ou que em

tratamento à base de medicamentos nos últimos dois meses, usuários fármacos-dependentes, indivíduos que bebiam quantidades significativas de álcool (mais de 200 ml) ao dia, ou aqueles que sofreram exposição ocupacional ao mercúrio.

3.3 Aspectos éticos

Todos os participantes da pesquisa foram informados sobre o objetivo do estudo e foi solicitado seu consentimento por escrito para participar da pesquisa através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Este projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, Brasil; CAAE nº 43927115.4.0000.0018

3.4 Coleta de dados e amostras

Foram realizadas quatro expedições, duas para cada região, no período de 2014 e 2015.

3.4.1 Dados antropométricos

O peso e a altura de cada indivíduo foram registrados utilizando estadiômetro e balança digital, posteriormente foi realizado o cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC) utilizando a fórmula: $IMC = \frac{kg}{m^2}$.

3.4.2 Amostras de cabelo

De cada indivíduo participante do estudo foi realizada a coleta de amostras de cabelo, utilizando uma tesoura de aço inox, limpa com etanol (Merck, Elmsford, Estados Unidos) antes de cada coleta de amostra. Cerca de 300 mg de cabelo foram retirados, quando possível, da área occipital próximo ao escalpo. As amostras de cabelo foram acondicionadas em envelopes de papel devidamente identificados (Figura 12).



Figura 12: Coleta de amostra de cabelo no posto de Saúde de Boa Vista do Tapajós (A) e no barracão comunitário no lago de Tucuruí (B). Fonte: Imagem do arquivo pessoal da autora.

3.4.3 Amostras de sangue

De cada indivíduo foram extraídos cerca de 4 ml de sangue venoso com material estéril e de uso único aberto pela primeira vez diante do participante (Figura 13). As amostras foram armazenadas em tubos vacutainer contendo o anticoagulante EDTA e/ou o estabilizante de RNA RNAlater® (Thermo Fisher Scientific) e armazenadas a 4°C, para posterior análise no laboratório.

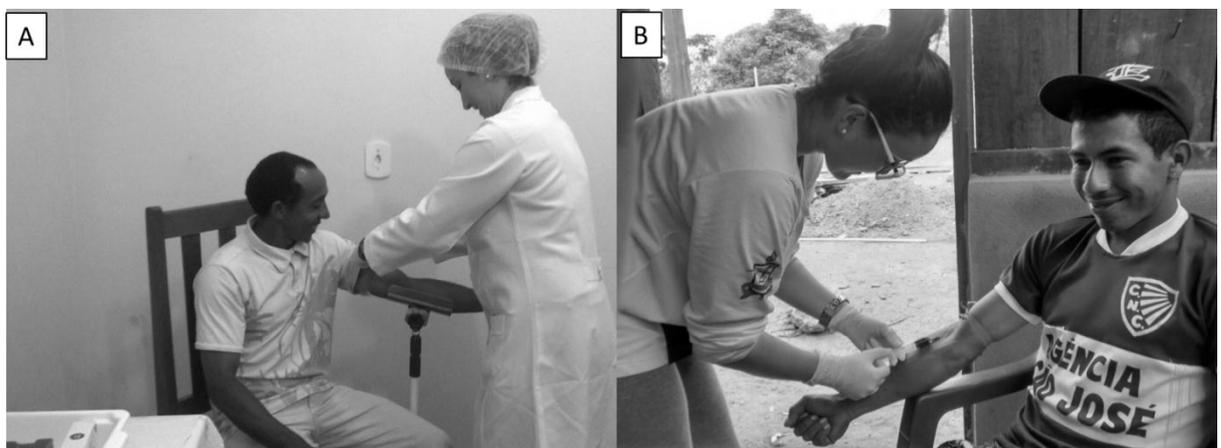


Figura 13: Representação das diferentes condições enfrentadas em campo para a realização da coleta de amostras de sangue em um posto de saúde (A) e em barracão comunitário (B). Fonte: Imagem do arquivo pessoal da autora.

3.5 Genotipagem da Apolipoproteína E

3.5.1 Extração de DNA:

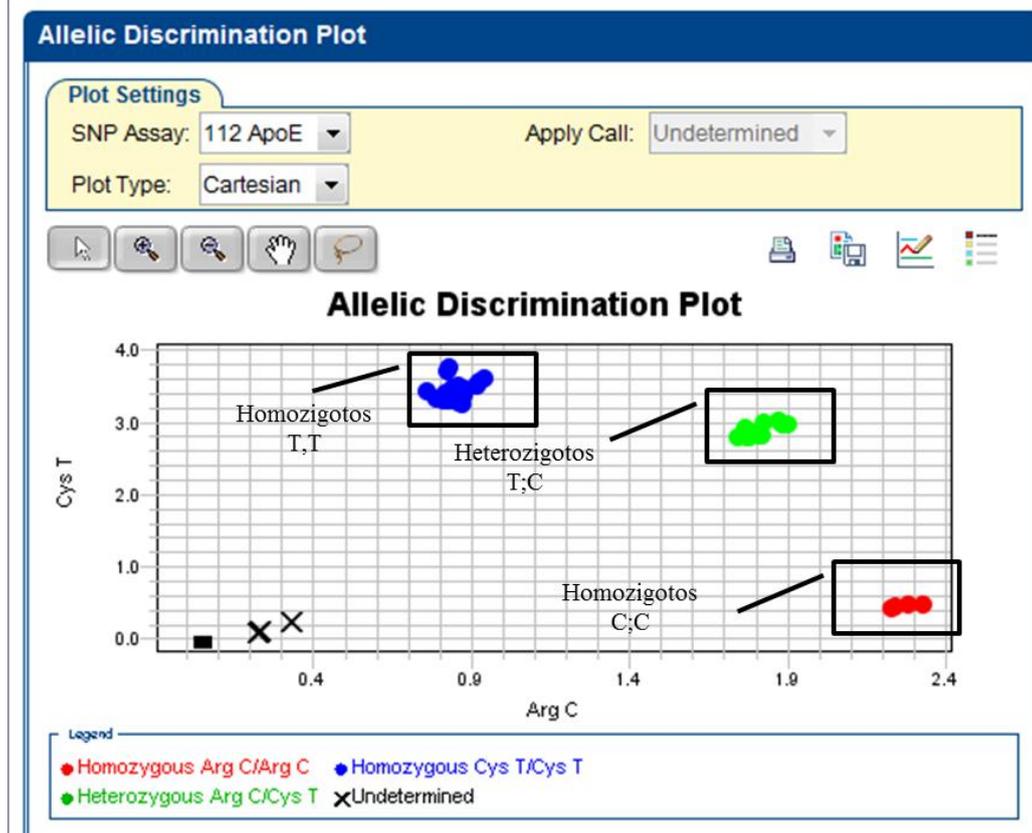
O DNA genômico foi extraído a partir de 2 ml de sangue total com o PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade e quantidade do DNA foi verificada por espectrofotometria com a leitura da absorbância a 230, 260 e 280 nm, utilizando o equipamento Picodrop Microliter UV/Vis Spectrophotometer® (Thermo Fisher Scientific).

3.5.2 Genotipagem por PCR em tempo real:

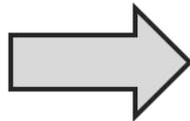
A sequência do gene da apolipoproteína E (*APOE*) foi amplificada mediante PCR em tempo real, no equipamento StepOne Plus Real Time PCR (96-well) da Applied Biosystems, pelo método TaqMan Genotyping Assay, com os SNPs rs429358 (posição 112) e rs7412 (posição 158) (ALHARBI *et al.*; 2014).

O TaqMan SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA) é uma técnica altamente específica, relativamente simples e rápida que permite analisar dois alelos variantes de um SNP em um segmento de DNA. Cada alelo é marcado com um fluoróforo diferente; no caso deste ensaio, o alelo C é marcado pelo fluoróforo VIC e o T é marcado pelo fluoróforo FAM. Cada reação consiste de 1x TaqMan Universal PCR Master Mix, 1 x TaqMan SNP Genotyping Assay, 50 ng de DNA e água em quantidade suficiente para completar 10 µL de volume final. Para cada paciente foram realizadas duas reações, uma para identificar o alelo presente na posição 112 (rs429358) e uma para a posição 158 (rs7412), em duplicata. De todas as reações foram realizados controles negativos. As condições da reação foram 95°C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 45 segundos.

A identificação dos genótipos foi baseada na fluorescência de cada fluoróforo detectada pelo equipamento (Figura 14).



112 rs429358	158 rs7412	Alelo
T	T	$\epsilon 2$
T	C	$\epsilon 3$
C	C	$\epsilon 4$



	112	158
$\epsilon 2/\epsilon 2$	T [FAM]	T [FAM]
$\epsilon 2/\epsilon 3$	T [FAM]	C;T [VIC;FAM]
$\epsilon 2/\epsilon 4$	C;T [VIC;FAM]	C;T [VIC;FAM]
$-\epsilon 3/\epsilon 3$	T [FAM]	C [VIC]
$-\epsilon 3/\epsilon 4$	C;T [VIC;FAM]	C [VIC]
$\epsilon 4/\epsilon 4$	C [VIC]	C [VIC]

Figura 14: Identificação do genótipo de cada indivíduo após o Q-PCR pelo método do TaqMan SNP Genotyping Assay. Fonte: Imagem elaborada pela autora.

3.6 Quantificação de mercúrio nas amostras de cabelo

As determinações de metilmercúrio (MeHg) e mercúrio inorgânico (IHg) foram feitas em colaboração com o Departamento de Química Analítica y Tecnología de los Alimentos da Facultad de Ciencias Ambientales da Universidad de Castilla-La Mancha (UCLM, Espanha), por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV AAS – FIMS 100 –

Flow Injection Mercury System, Perkin Elmer) (RODRIGUEZ MARTÍN-DOIMEADIOS *et al.*, 2014).

As amostras de cabelo foram inicialmente cortadas em pedaços pequenos (1-2 cm), as ferramentas metálicas (tesouras, pinças, etc.) utilizadas foram lavadas com etanol antes e depois de cada utilização. Uma quantidade de 200 mg foi pesada em função da disponibilidade de amostras.

As espécies de mercúrio foram simultaneamente extraídas das amostras com tetrametilamôniohidróxido (TMAH) em micro-ondas em um frasco fechado e foram determinadas por derivatização com tetraetilborato de sódio e injetadas em um sistema GC-pyro-AFSsystem. A concentração de mercúrio total (Total Hg) foi calculada como a soma de MeHg e IHg.

Os limites de detecção (LOD) foram 0,0028 µg/g para MeHg e 0,002 µg/g para IHg. O controle de qualidade analítico e a validação da metodologia, quanto à precisão e à exatidão foram feitos por meio da análise de material de referência com valor certificado: cabelo humano com concentrações conhecidas de mercúrio ERM-DB001 (Sigma-Aldrich, Brasil) e os valores dos padrões foram 4.54 ± 0.32 e 0.17 ± 0.04 µg/g, para MeHg e IHg, respectivamente, estando de acordo com as concentrações certificadas com 95% de nível de confiança (Teste t de Student)

3.7 Quantificação relativa da expressão de S100B e NSE por PCR em tempo real

3.7.1 Extração de RNA

Amostras de sangue total conservadas na solução estabilizadora RNAlater foram utilizadas para extrair o RNA total com o Kit RiboPure Blood Kit (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade do RNA extraído das amostras foi imediatamente verificada por espectrofotometria com a leitura da absorbância a 230, 260 e 280 nm, utilizando o equipamento Picodrop Microliter UV/Vis Spectrophotometer® (Thermo Fisher Scientific). Foram consideradas amostras com razão $A_{260/280}$ entre 1.7- 2.1 e $A_{230/260}$ 1.8- 2.0.

3.7.2 Transcrição para o cDNA

Após a extração e quantificação, as amostras foram imediatamente transcritas para o DNA complementar utilizando o Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. A reação de transcrição reversa consistiu de 10 × RT Buffer, 25 × dNTP Mix (100 mM), 10 × RT Random Primers, MultiScribe™ Reverse Transcriptase e água Nuclease-free na quantidade suficiente para completar 10 µL de volume final. A cada 10 µL deste mix foram adicionados 10 µL de amostra completando um volume final de 20 µL por reação. As condições da reação foram: 25°C por 10 min, 37 °C por 120 min e 85°C por 5 min.

3.7.3 PCR em tempo real dos genes S100B e NSE

As reações foram realizadas em placas de 96 poços no equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems), utilizando o sistema TaqMan® Gene Expression Assay (TaqMan® MGB probes, FAM™ dye-labeled) (Applied Biosystems). Estas sondas MGB (*minor groove binder*) contêm em sua extremidade 5' o fluoróforo FAM e um supressor (*quencher*) ligado à extremidade 3', que absorve a energia do fluoróforo.

Durante a PCR, a sonda hibridiza de forma altamente específica à sua sequência complementar. Em seguida a elongação da cadeia de interesse pela enzima DNA polimerase chega à região das sondas, liberando o *quencher* e resultando em emissão da fluorescência pelo fluoróforo, proporcional à quantidade de DNA-alvo existente na amostra. Foi utilizado o gene GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) como gene de referência para comparação relativa. As sondas e primers utilizados para os genes foram: GAPDH (Hs 99999905_m1, controle endógeno), S100B (Hs 00389217_m1) e NSE γ (Hs 00157360_m1). As reações foram realizadas em triplicatas em um volume final de 10 µL e consistiram de 5 µL do TaqMan® Universal PCR Master Mix; 0,5 µL do TaqMan® Gene Expression Assay; 3,5 µL de água Milli-Q autoclavada e 1µL de DNA. As condições da reação foram 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 min e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

O cálculo da quantificação relativa das amostras foi feito pelo método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ descrito por Livak e Schmittgen (2001) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O GAPDH e o calibrador (grupo com menores níveis de mercúrio) foram usados com normalizadores.

3.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism 6.0. Utilizamos o teste de Kolmogorov-Smirnov para testar a distribuição dos dados e o teste de Bartlett para testar a homocedasticidade dos grupos. Para comparação de dois grupos foi usado o teste Mann-Whitney ou o teste t de Student, de acordo a se os dados foram não-paramétricos ou paramétricos, respectivamente. Para comparação de 3 ou mais grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis A Correlação de Spearman foi utilizada para testar a associação entre as variáveis estudadas. A frequência alélica foi determinada por contagem direta dos diferentes alelos sendo calculada as suas proporções. Foi aplicado o teste do Qui-quadrado para verificar se as frequências alélicas observadas estavam de acordo com as esperadas, de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. O teste exato de Fisher foi utilizado para testar as proporções entre as variáveis. As análises com valor de $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

4 RESULTADOS

4.1 Dados antropométricos

Participou deste estudo um total de 459 indivíduos, após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados 388 indivíduos que compõem a população estudada (Tabela 1), onde foram encontradas diferenças significativas entre a idade, peso e altura de ambos os sexos.

Tabela 1: Características antropométricas da população total incluída no estudo.

	Total	Sexo		Diferença entre os sexos
		Masculino	Feminino	
N (%)	388 (100)	131 (33,8)	257 (66,2)	*
Idade (anos)	44 (32-52)	48 (36 – 54)	42 (30-50)	***
Peso (Kg)	65,0 (56,9-75,1)	71,3 (62,5 – 79,9)	62,0 (53,7-71,5)	****
Altura (cm)	156 (151-164)	166 (161 – 171)	153 (149-157)	****
IMC	25,8 (23,4-30,0)	25,7 (23,5- 29,0)	26,1 (23,2- 30,4)	p> 0,05

Dados apresentados como mediana e intervalos interquartis. IMC = Índice de Massa Corpórea. Teste Exato de Fisher, *p<0,05; Teste de Mann-Whitney, *** p< 0,001 e **** p< 0,0001.

Na região do Tapajós, o número de participantes atingiu a marca de 224, com uma elevada proporção de mulheres (Tabela 2).

Tabela 2. Características antropométricas da população do Tapajós incluída no estudo.

	Total	Sexo		Diferença entre os sexos
		Masculino	Feminino	
N (%)	224 (100)	65 (29,0)	159 (71,0)	** ^a
Idade (anos)	39 (29-49)	45 (30 – 53)	37 (29-48)	*
Peso (Kg)	64,4 (56,2-74,9)	68,0 (59,8 – 77,2)	62,8 (55,0-73,2)	**
Altura (cm)	156 (151-163)	165 (161 – 171)	154 (150-158)	****
IMC	25,9 (23,2-30,0)	25,4 (22,8- 27,6)	26,7 (23,4- 30,4)	**

Dados apresentados como mediana e intervalos interquartis. IMC = Índice de Massa Corpórea. ^a Teste Exato de Fisher **p<0,01; Teste de Mann-Whitney, * p< 0,05, ** p< 0,01 e **** p< 0,0001,.

Já na região de Tucuruí, o número de participantes foi de 64 com uma participação mais equilibrada de homens e mulheres (Tabela 3).

Tabela 3. Características antropométricas da população de Tucuruí incluída no estudo.

	Total	Sexo		Diferença entre os sexos
		Masculino	Feminino	
N (%)	164 (100)	66 (40,2)	98 (59,8)	$p > 0,05^a$
Idade (anos)	49 (40-54)	49 (41 – 55)	47 (37-54)	$p > 0,05^b$
Peso (Kg)	65,7 (57,2-77,3)	74,2 (64,8 – 85,8)	61,2 (52,2-69,1)	****
Altura (cm)	156 (149-165)	166 (160 – 171)	152 (148-156)	****
IMC	25,8 (23,5-30,6)	26,2 (24,1- 30,7)	25,7 (22,7- 30,6)	$p > 0,05^b$

Dados apresentados como mediana e intervalos interquartis. IMC = Índice de Massa Corpórea. ^aTeste Exato de Fisher; ^bTeste de Mann-Whitney, **** $p < 0,0001$.

4.2 Distribuição genotípica da Apolipoproteína E em comunidades da Amazônia.

No presente trabalho foram genotipados 388 indivíduos (224 ribeirinhos da região do Tapajós e 164 ribeirinhos de Tucuruí) (Tabela 4). A distribuição dos genótipos está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$). Dentre os seis genótipos da apoE, apenas o homocigoto ϵ_2/ϵ_2 não foi detectado em nenhum participante.

Considerando cada região separadamente, a distribuição genotípica foi bastante semelhante tanto no Tapajós quanto em Tucuruí. Os genótipos mais frequentes foram o ϵ_3/ϵ_3 e o ϵ_3/ϵ_4 . Dentre os alelos, o ϵ_3 foi o mais frequente em ambas as regiões, seguido pelo ϵ_4 . A frequência do alelo ϵ_2 foi a mais baixa, sendo encontrado unicamente em indivíduos heterocigotos (Tabela 4).

Tabela 4: Distribuição genotípica e alélica da *APOE* na população do estudo.

Genótipos	Total		Tapajós		Tucuruí	
	<i>n</i>	(%)	<i>N</i>	(%)	<i>N</i>	(%)
ε2/ ε2	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)
ε2/ ε3	25	(6,4)	14	(6,5)	11	(6,7)
ε2/ ε4	6	(1,6)	5	(2,23)	1	(0,61)
ε3/ ε3	244	(62,9)	140	(62,5)	104	(63,4)
ε3/ ε4	97	(25,0)	59	(26,34)	38	(23,2)
ε4/ ε4	16	(4,1)	6	(2,68)	10	(6,1)
Total	388	(100,0)	224	(100,0)	164	(100,0)
Frequência alélica	<i>f</i>	<i>f</i> (%)	<i>F</i>	<i>f</i> (%)	<i>F</i>	<i>f</i> (%)
ε2	0,040	4,0	0,042	4,2	0,037	3,7
ε3	0,786	78,6	0,788	78,8	0,784	78,4
ε4	0,174	17,4	0,170	17,0	0,180	18,0

4.3 Exposição mercurial em comunidades da Amazônia

As análises de mercúrio se encontram atualmente em andamento na Universidad de Castilla-La Mancha (Toledo, Espanha) e até agora foram analisadas amostras de 109 indivíduos, 74 participantes do Tapajós (24 de Boa Vista do Tapajós, 28 de Barreiras e 22 de Pimental) e 35 participantes de Tucuruí.

Não foram encontradas correlações significativas entre os níveis de mercúrio total e a idade ($r = 0,03976$ e $p > 0,05$; $r = 0,1984$ e $p > 0,05$, Tapajós e Tucuruí, respectivamente), bem como entre os níveis de mercúrio total e o sexo ($r = -0,2719$ e $p > 0,05$, no Tapajós e $r = 0,1936$ e $p > 0,05$, em Tucuruí).

As medianas e intervalos interquartis do conteúdo em mercúrio total e metilmercúrio no cabelo dos participantes do nosso estudo foram de $4,2 \mu\text{g/g}$ (1,9- 10,2) e $3,8 \mu\text{g/g}$ (1,6-8,9), respectivamente. Ainda, 24,8% dos participantes apresentaram níveis de mercúrio total acima de $10 \mu\text{g/g}$, limite preconizado pela OMS. Ainda, 12,8% dos participantes mostraram um conteúdo total em mercúrio maior ou igual a $20 \mu\text{g/g}$ (Figura 15).

Proporção de indivíduos apresentando níveis de mercúrio total acima do limite (n=109)

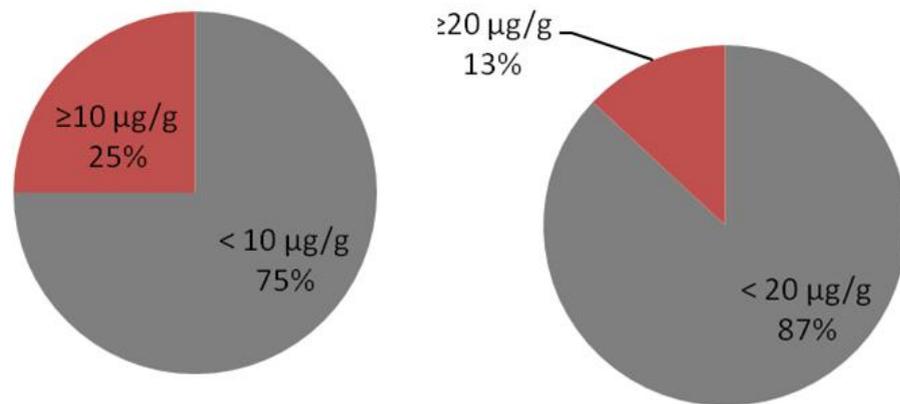


Figura 15: Proporção de indivíduos na população total do estudo (n=109) com níveis de mercúrio total no cabelo iguais ou acima do limite de $10 \mu\text{g/g}$ e de $20 \mu\text{g/g}$.

Os valores de mediana e intervalos interquartis do conteúdo em mercúrio total e metilmercúrio dos indivíduos agrupados por região de origem são apresentados na figura 16. Pode ser observado que os dados são semelhantes dentro de cada região indicando que a maior parte do mercúrio se encontra na forma de metilmercúrio (constituindo entre 85-90% em média, aproximadamente) (Figura 16).

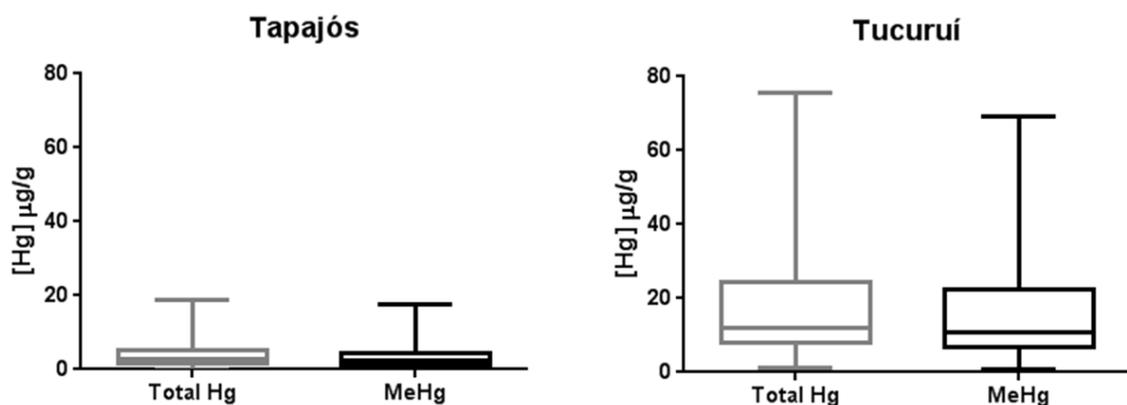


Figura 16: Níveis de mercúrio total (Total Hg) e metilmercúrio (MeHg) nas amostras de cabelo de ribeirinhos nas regiões do Tapajós (n= 74) e Tucuruí (n= 35). Dados apresentados em $\mu\text{g/g}$ como mediana e interquartis.

Dentre as três comunidades do Tapajós, Barreiras apresentou os níveis de metilmercúrio e mercúrio total mais altos que os níveis de Boa Vista do Tapajós ($P < 0,05$). Não houve

diferença significativa entre os níveis de Barreiras *versus* Pimental, bem como Pimental *versus* Boa Vista do Tapajós (Figura 17).

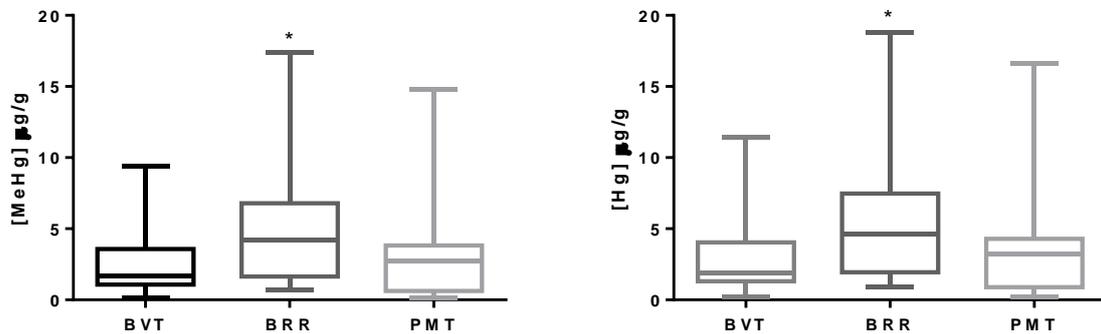


Figura 17: Níveis de metilmercúrio e mercúrio total determinados nas amostras de cabelo de ribeirinhos das comunidades de Boa Vista do Tapajós (BVT, n=24), Barreiras (BRR, n= 28) e Pimental (PMT, n= 22). Dados apresentados em µg/g como mediana e intervalos interquartis. Teste de Kruskal-Wallis, * p<0,05 vs BVT.

Comparando os níveis de mercúrio total entre as duas regiões estudadas, observamos que os níveis de Tucuruí são muito maiores que os níveis encontrados no Tapajós, 12,02 µg/g, (7,81 -24,28) e 2,97 µg/g (1,51- 5,13), respectivamente (p<0,0001) (Figura 18, a). Além disso, a porcentagem de metilmercúrio dentro do conteúdo total de mercúrio foi significativamente mais elevada (p= 0,0001) na região de Tucuruí em comparação com o Tapajós (Figura 18,b).

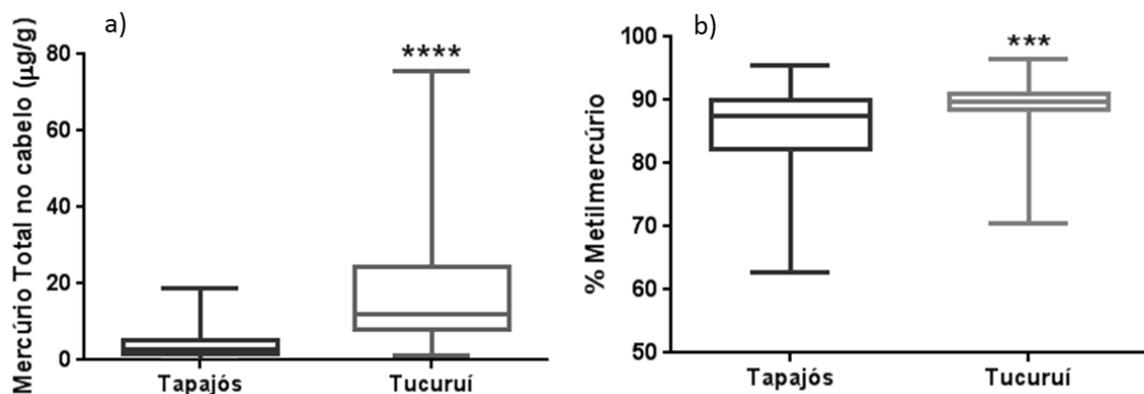


Figura 18: Níveis de mercúrio total em µg/g encontrados na populações do Tapajós (n=74) e Tucuruí (n=35) (a) e porcentagem de metilmercúrio em relação ao mercúrio total em ambas as regiões (b). Dados apresentados como mediana e intervalos interquartis (Mann-Whitney, ****p< 0,0001 e *** p=0,0001).

Esses dados alarmantes ficam ainda mais evidentes quando as populações foram divididas em dois grupos: um grupo que incluiu indivíduos com níveis de mercúrio total no cabelo abaixo do limite de $10 \mu\text{g/g}$, e outro grupo onde foram incluídos aqueles participantes com níveis maiores ou iguais a $10 \mu\text{g/g}$. Dessa forma, encontramos que, na região do Tapajós, 9% da população está exposta a níveis de mercúrio total iguais ou maiores que $10 \mu\text{g/g}$, enquanto que em Tucuruí encontramos 57% dos indivíduos com níveis acima do limite (Figura 19).

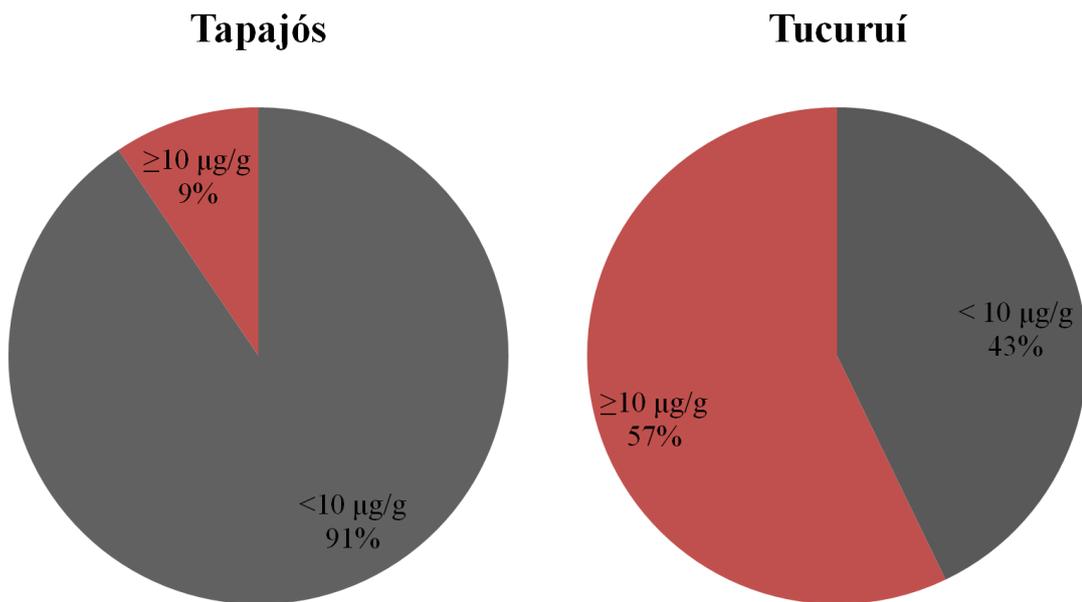


Figura 19: Porcentagem de indivíduos do Tapajós e Tucuruí com níveis de mercúrio total no cabelo abaixo de $10 \mu\text{g/g}$ e maior ou igual a essa quantidade.

Uma análise mais de perto dos dados de Tucuruí indicou que esse 57% de indivíduos com mercúrio estava composto por 27% de indivíduos com mercúrio menor de $20 \mu\text{g/g}$ e 30% com mercúrio maior ou igual a $20 \mu\text{g/g}$. Esse último grupo de indivíduos (30% do total de participantes) apresentaram níveis médios de $43.53 \mu\text{g/g} \pm 17.90$ de mercúrio total no cabelo (Figura 20).

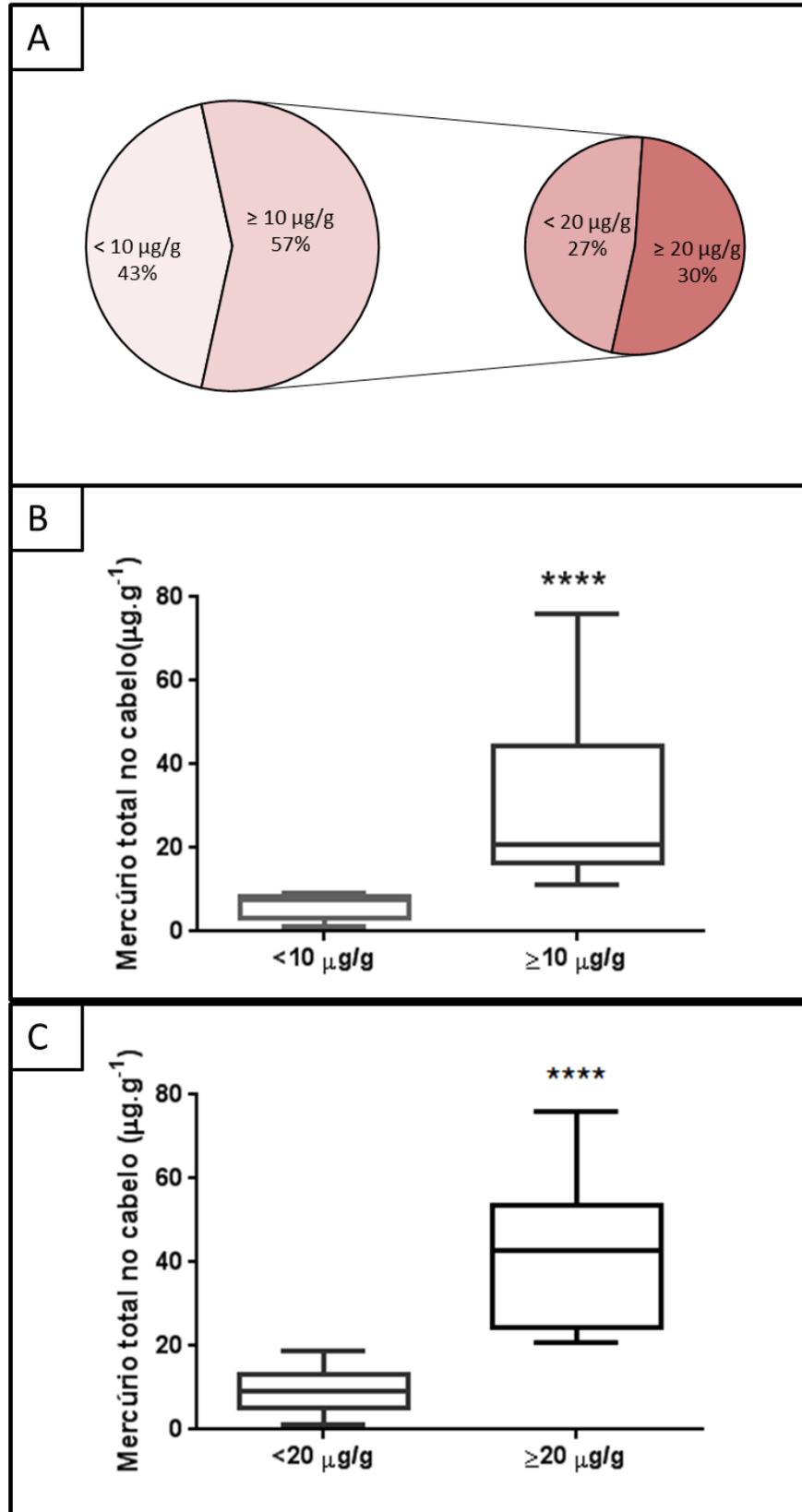


Figura 20: Distribuição dos participantes de acordo com níveis de mercúrio total no cabelo (A) e mediana e intervalos interquartis dos participantes com níveis acima e abaixo de 10 µg/g (B) e 20 µg/g (C). Teste de Mann-Whitney, *** $p < 0.001$.

4.4 Identificação de indivíduos de risco

Para realizar a identificação de indivíduos de risco, foram cruzados os dados de nível de mercúrio e genotipagem da *APOE*. Dos 109 participantes que tiveram analisados os níveis de mercúrio no cabelo e o genótipo da ApoE, dois indivíduos com o genótipo $\epsilon 2/\epsilon 4$ (e menos de 10 $\mu\text{g/g}$ de mercúrio no cabelo) foram desconsiderados por apresentarem os dois alelos responsáveis, respectivamente, por uma maior proteção e suscetibilidade genética frente aos danos da intoxicação mercurial. Após a exclusão desses dois indivíduos o número total de participantes foi de 107 (Tabela 5) e os resultados podem ser observados na tabela 5.

Tabela 5: Distribuição dos fenótipos da ApoE de acordo com o conteúdo de mercúrio nas amostras de cabelo.

Total Hg	n		Total	Tapajós	Tucuruí
	80	Portadores de $\epsilon 2$	8	6	2
< 10 ppm	(65 indivíduos do Tapajós + 15 indivíduos de Tucuruí)	$\epsilon 3/\epsilon 3$	49	41	8
		Portadores de $\epsilon 4$	23	18	5
	27	Portadores de $\epsilon 2$	1	1	0
≥ 10 ppm	(7 indivíduos do Tapajós + 20 indivíduos de Tucuruí)	$\epsilon 3/\epsilon 3$	18	5	13
		Portadores de $\epsilon 4$	8	1	7

Foram identificados oito indivíduos em risco máximo: portadores da ApoE4 com níveis de mercúrio acima do limite preconizado pela OMS (Tabelas 5 (em laranja) e 6).

Um dado interessante do presente trabalho é que a maior exposição dentre todos os participantes foi identificada em indivíduos portadores do alelo $\epsilon 4$. Embora na região de Tapajós não tenham sido detectados níveis de mercúrio acima de 20 $\mu\text{g/g}$, todos os indivíduos da região de Tucuruí com conteúdo em mercúrio maior de 50 $\mu\text{g/g}$ (e até 76 $\mu\text{g/g}$) foram portadores do alelo $\epsilon 4$.

Tabela 6: Indivíduos ApoE4 com níveis de metilmercúrio e mercúrio total acima do limite de 10 µg/g nas amostras de cabelo.

	Sexo	Região	Idade	Genótipo	MeHg (µg/g)	Total Hg (µg/g)
Indivíduo 1	M	Tucuruí	58	E4/E3	47,72	51,73
Indivíduo 2	M	Tucuruí	58	E4/E3	51,04	53,39
Indivíduo 3	M	Tucuruí	50	E4/E3	60,40	67,38
Indivíduo 4	M	Tucuruí	40	E4/E4	69,15	75,80
Indivíduo 5	F	Tucuruí	65	E4/E3	10,92	12,02
Indivíduo 6	F	Tapajós (Barreiras)	47	E4/E3	10,85	12,62
Indivíduo 7	F	Tucuruí	28	E4/E3	15,64	17,90
Indivíduo 8	M	Tucuruí	25	E4/E3	17,89	18,55

A tabela 7 mostra os níveis de mercúrio para os diferentes genótipos da *APOE*. Observamos que a mediana dos níveis de mercúrio total e metilmercúrio nos indivíduos *APOE4* em comparação com indivíduos *APOE2* foi ligeiramente maior, apesar de não serem significativamente diferentes ($p > 0,05$).

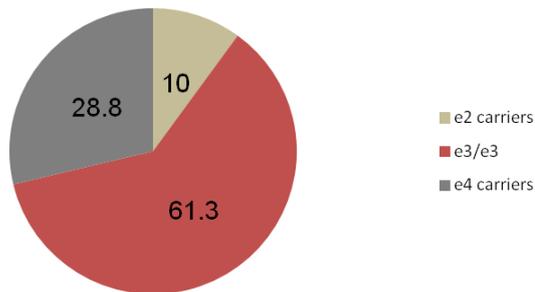
Tabela 7: Níveis de mercúrio total e metilmercúrio para cada genótipo.

	Mercúrio total (µg/g)	p	Metilmercúrio (µg/g)	p
Portadores de ε2	2,99 (1,86-9,04)	0.5178	2,46 (1,64- 7,99)	0.5293
e3/e3	4,19 (1,71-11,40)		3,69 (1,44- 9,95)	
Portadores de ε4	5,11 (3,26- 12,02)		4,57 (2,92- 10,85)	

Dados apresentados como mediana e intervalos interquartis. Diferença entre os portadores, teste de Kruskal-Wallis.

As frequências relativas das distribuições alélicas dentro do grupo com menos de 10 µg/g e do grupo com ≥ 10 µg/g são apresentadas na figura 21. Pode-se observar que a única frequência diferente entre os dois grupos foi aquela dos portadores do alelo ε2, com uma maior prevalência entre os indivíduos com menos de 10 µg/g.

Distribuição alélica da APOE em indivíduos com menos de 10 µg/g



Distribuição alélica da APOE em indivíduos com ≥ 10 µg/g

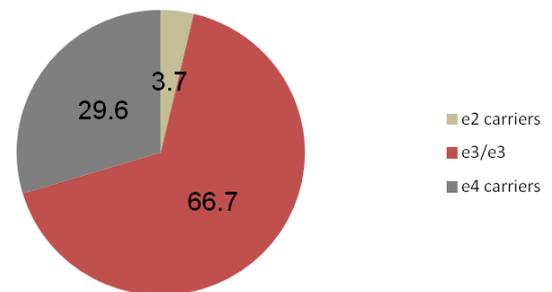
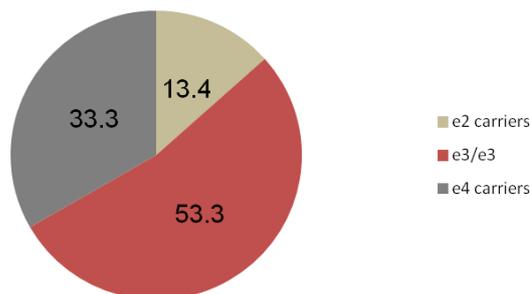


Figura 21: Distribuição alélica da APOE em indivíduos com níveis de mercúrio no cabelo abaixo de 10 µg/g e igual ou maior que essa quantidade.

Essa prevalência diferente do alelo ε2 foi ainda mais evidente entre os indivíduos da região de Tucuruí (região onde foram registrados os níveis maiores de exposição). Nessa região, nenhum indivíduo com níveis iguais ou acima de 10 µg/g apresentou este alelo (Figura 22).

Distribuição alélica da APOE em indivíduos da região de Tucuruí com menos de 10 µg/g



Distribuição alélica da APOE em indivíduos da região de Tucuruí com ≥ 10 µg/g

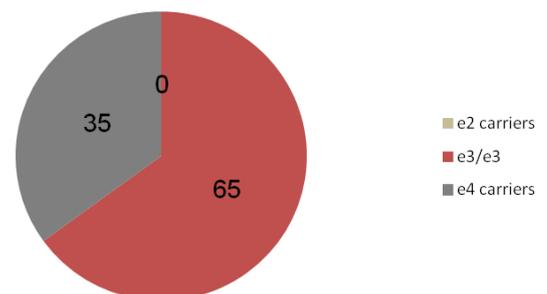


Figura 22: Distribuição alélica da APOE em indivíduos da população de Tucuruí com níveis de mercúrio no cabelo abaixo de 10 µg/g e igual ou maior que essa quantidade.

4.5 Expressão de S100B e NSE

Considerando que os participantes de Tucuruí apresentaram os maiores níveis de exposição, com mercúrio nas amostras de cabelo de 1,1 a 75,8 µg/g, e que os indivíduos expostos dessa região não apresentaram o possível fator protetor do alelo ε2 da ApoE, foram

selecionados indivíduos daquela região para testar a hipótese de que as medições da expressão do RNAm das proteínas S100B e NSE poderia funcionar como marcadores de intoxicação nas populações amazônicas. Para isso, foram aplicados critérios de exclusão adicionais selecionando unicamente aqueles indivíduos que não fumavam, não faziam uso abusivo de bebidas alcóolicas, não apresentavam doenças crônicas e não haviam feito uso de medicações nos últimos meses. Assim, estes indivíduos (n=6) foram divididos em dois grupos: 1) Grupo com níveis de mercúrio abaixo de 7 $\mu\text{g/g}$ (n=3) e 2) Grupo com níveis de mercúrio acima de 18 $\mu\text{g/g}$ (n=3) (Figura 23). Não houve diferença na idade e IMC entre os dois grupos (Teste de Mann-Whitney, $p > 0,05$).

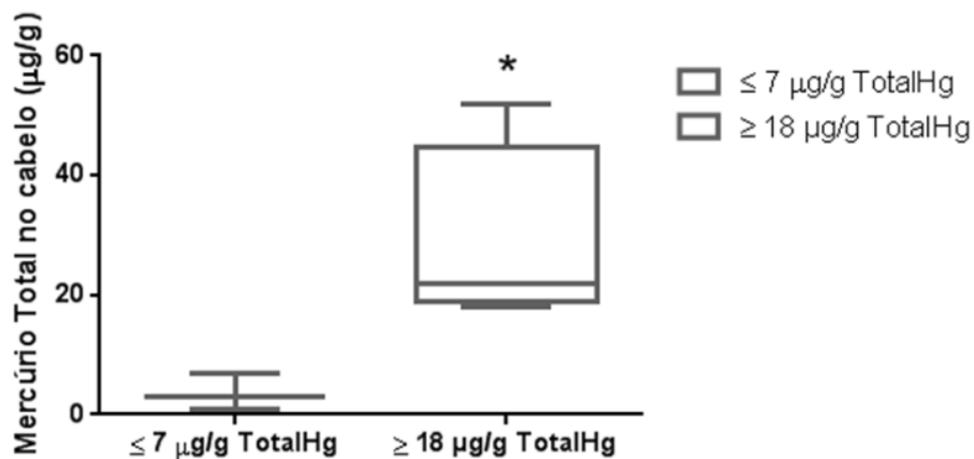


Figura 23: Níveis de mercúrio total no cabelo nos grupos com níveis de mercúrio abaixo de 7 $\mu\text{g/g}$ e acima de 18 $\mu\text{g/g}$ (Teste de Mann-Whitney, * $p < 0,05$).

Dessa forma, o nível do RNA mensageiro dos marcadores S100B e NSE foi determinado no sangue destes indivíduos. Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na detecção do RNAm da S100B entre os grupos, existindo cerca de três vezes maior quantidade de RNAm no grupo com maior nível de mercúrio no cabelo do que no grupo com baixos níveis. Ainda, apesar de não termos encontrado diferença estatística na NSE, observamos um aumento na quantidade de RNAm de 0,6 vezes em relação ao grupo com menor teor de mercúrio (Figura 24).

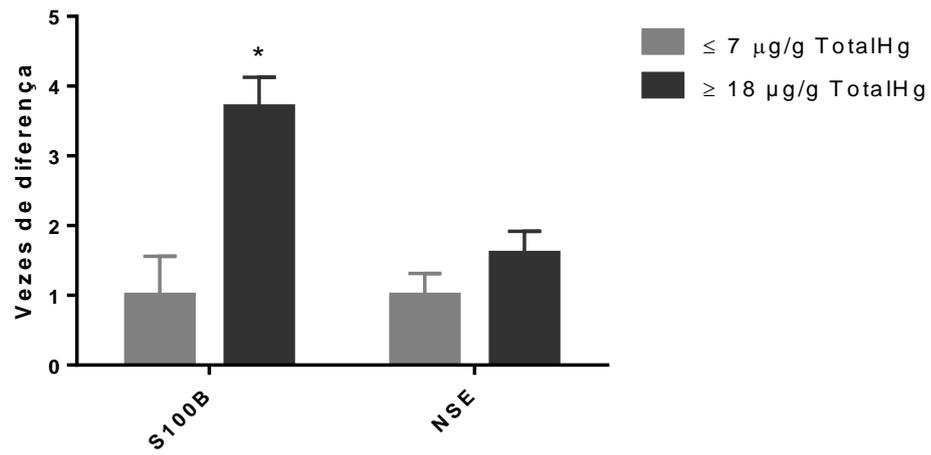


Figura 24: Quantificação relativa do RNAm das proteínas S100B e NSE no sangue de indivíduos da região de Tucuruí expostos a baixos e altos níveis de mercúrio. Dados apresentados como vezes de diferença em relação ao grupo com baixo teor de mercúrio. Teste de Mann-Whitney, * $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

A exposição humana ao mercúrio na Amazônia vem sendo estudada desde muitos anos e é bem caracterizada em algumas áreas, como na região do Rio Tapajós, por exemplo (BERZAS-NEVADO *et al.*, 2010). Contudo, em algumas áreas, como a região do Lago Tucuruí, até o presente momento há apenas um trabalho que demonstra exposição mercurial nos ribeirinhos locais (LEINO; LODENIUS, 1995). Ainda, dentre os trabalhos publicados sobre estas duas regiões, Tapajós e Tucuruí, a grande maioria é sobre a exposição ao mercúrio, alguns poucos caracterizam o dano produzido pela exposição e até o presente, ainda menos estudos analisaram suscetibilidade genética frente à intoxicação mercurial.

Assim, esta é a primeira vez que é realizado um estudo epidemiológico incluindo a análise de exposição, suscetibilidade genética e intoxicação mercurial nas populações ribeirinhas da Amazônia.

Este trabalho incluiu 388 indivíduos no total. Apesar da dificuldade de obter dados exatos atualizados sobre o número de habitantes de cada comunidade incluída no estudo, após comunicação pessoal com os representantes das comunidades, o tamanho amostral incluído no presente estudo representa de 10 a 30% da população local. Além disso, o tamanho da população incluída neste trabalho está de acordo com os tamanhos amostrais usados em outros trabalhos publicados com populações das mesmas regiões (LEINO; LODENIUS, 1995; PINHEIRO *et al.*, 2007, 2008; PASSOS *et al.*, 2008; PASSOS; MERGLER, 2008; CRESPO-LOPÉZ *et al.*, 2010; FAIAL *et al.*, 2015).

É importante ressaltar que após a chegada da equipe nas comunidades, era realizado um convite para uma reunião informativa do intuito do projeto através da divulgação nas rádios locais e da comunicação de porta em porta, convidando toda a comunidade a participar (Figura 25). Assim, todos os indivíduos adultos que demonstraram interesse em participar do projeto foram atendidos (livre demanda), o que é uma forma de garantir uma maior participação das comunidades e a veracidade das informações reveladas por cada indivíduo, sobre a presença dos possíveis fatores de exclusão. *A posteriori* foram aplicados os critérios de inclusão/exclusão sobre os resultados e a população final incluída no presente estudo foi constituída de indivíduos adultos sadios voluntários, com idade entre 18 e 65 anos.



Figura 25: Fotos demonstrativas do processo realizado para convidar os indivíduos a participarem do projeto. (A) Equipe na sede de uma rádio local realizando o convite e (B) reunião informativa sobre o projeto com a comunidade. Fonte: Imagem do arquivo pessoal da autora.

Em relação à composição da nossa amostra, é possível que as diferenças encontradas na proporção de homens e mulheres participantes da região do Tapajós (aproximadamente de duas mulheres por cada homem), possam estar relacionadas ao fator cultural brasileiro de os homens serem menos cuidadosos com a saúde (GOMES *et al.*, 2007), fazendo com que a maior procura para participar do estudo seja das mulheres. Por outro lado, a ausência dessa diferença na proporção de homens e mulheres na população de Tucuruí (aproximadamente

uma mulher por cada homem), poderia ser pelo fato de que as coletas foram realizadas em pontos distantes das ilhas onde morava cada família, fazendo com que toda a família (pai, mãe e filhos) se deslocasse até o local da coleta. Assim, uma vez que os homens já estavam ali, as mulheres os encorajavam a participar.

Considerando essa diferente proporção de homens e mulheres participantes de cada região, todas as variáveis que pudessem interferir nos resultados, como sexo, idade e IMC, foram testadas para todos os parâmetros analisados no presente estudo.

As populações ribeirinhas da Amazônia vêm sendo estudadas por causa da exposição mercurial desde 1995, aproximadamente (BERZAS-NEVADO *et al.*, 2010). Devido a seu estilo de vida peculiar, associado a seus hábitos alimentares, que tem como elemento central o pescado, estas populações representam um modelo único no mundo para avaliar os efeitos da exposição ao metilmercúrio. Nestas populações já foram descritos níveis de mercúrio muito acima do limite preconizado pela OMS, inclusive com alguns indivíduos apresentando sintomas característicos da intoxicação mercurial com níveis de 20 µg/g (abaixo do nível de 50 µg/g, preconizado como limite para o estabelecimento da Síndrome de Minamata) (HARADA *et al.*, 2001, PASSOS; MERGLER, 2008).

Os danos neurológicos causados pela intoxicação mercurial são irreversíveis (HUANG *et al.*, 2008) e do ponto de vista social, podem ter consequências drásticas não só para o indivíduo intoxicado, como também para seus familiares. Além disso, a relação entre mercúrio e doenças neurodegenerativas tem sido cada vez mais discutida (FARINA *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2014). As doenças neurodegenerativas tem se traduzido em um grande motivo de preocupação das políticas de saúde públicas, contabilizando um grande número de hospitalizações e pessoas com incapacidade, gerando enormes custos para o governo (FARINA *et al.*, 2011; MIDORIKAWA *et al.*, 2016).

Dessa forma, em um ambiente onde a exposição diária ao mercúrio é realidade, além do biomonitoramento das populações expostas, identificar fatores que possam ajudar a prevenir futuras situações de intoxicação mercurial é imperativo. Assim, este é o primeiro trabalho realizado com populações ribeirinhas da Amazônia expostas ao mercúrio, utilizando a apolipoproteína E como marcador de suscetibilidade genética frente à intoxicação mercurial.

5.1 Suscetibilidade genética na Amazônia: distribuição alélica e genotípica do gene da Apolipoproteína E

A distribuição dos genótipos na população estudada está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os dois genótipos mais comuns foram o ϵ_3/ϵ_3 e o ϵ_3/ϵ_4 e, interessantemente, o genótipo ϵ_2/ϵ_2 não foi detectado em nenhum dos 388 participantes (Tabela 4). A distribuição alélica da *APOE* nas populações amazônicas foi de 0,043:0,784:0,173 para $\epsilon_2:\epsilon_3:\epsilon_4$, respectivamente. Esse padrão de distribuição foi semelhante ao padrão já descrito para populações da América do Sul (0,046:0,767:0,187 para $\epsilon_2:\epsilon_3:\epsilon_4$, respectivamente) (SINGH *et al.*, 2006). No entanto, comparando com a distribuição alélica da *APOE* na Europa (0,077:0,790:0,127 para $\epsilon_2:\epsilon_3:\epsilon_4$, respectivamente) observamos em nossas populações o aumento da frequência do alelo ϵ_4 e a diminuição da frequência do alelo ϵ_2 .

A *APOE* evoluiu a partir do ancestral hominídeo comum de humanos e grandes símios, uma vez que enquanto existem estas três principais isoformas da *APOE* nos seres humanos (ϵ_2 , ϵ_3 e ϵ_4), todos os grandes macacos são portadores apenas do alelo ϵ_4 (RIEDEL *et al.*, 2016). Porém o motivo das diferenças na distribuição dos genótipos da *APOE* entre as diferentes populações do mundo, não é bem conhecido (MAHLEY *et al.*, 2009).

Há evidências que sugerem que o alelo ϵ_4 ancestral seja uma vantagem evolutiva contra doenças infecciosas, pois na África, por exemplo, a sua frequência é muito alta (ϵ_4 : 0,209) possivelmente oferecendo proteção contra alguma doença endêmica específica (doenças infecciosas e parasitárias) (SINGH *et al.*, 2006; MAHLEY *et al.*, 2009).

Ainda, acredita-se que o alelo ϵ_4 permaneça elevado em regiões onde ainda exista uma economia de forrageamento ou onde a alimentação é (ou foi até recentemente) escassa ou qualitativamente pobre (com pouca variedade de alimentos) e sob estas condições ambientais, ser portador do alelo ϵ_4 seria uma vantagem adaptativa, pois este alelo poderia ajudar no reequilíbrio dos níveis de colesterol (que por causa da dura condição alimentar local, seria demasiado baixo) (CORBO; SCACCHI, 1999).

Adicionalmente, foi sugerido que a *APOE4* tem um papel protetor no desenvolvimento cognitivo e peso-altura de crianças com episódios recorrentes de diarreia na primeira infância

(o ciclo entre diarreia, má nutrição e parasitoses intestinais é bem conhecido) (ORÍÁ *et al.*, 2007; 2010).

Tanto a exposição a doenças infecciosas quanto à dieta qualitativamente pobre, são realidades das populações incluídas no presente estudo, cabendo ainda destacar, que a Região Norte do Brasil é a segunda com a mais alta taxa de doenças diarreicas em crianças menores de cinco anos (FONSECA *et al.*, 2016). Esse fato poderia explicar, pelo menos em parte, a alta frequência do alelo $\epsilon 4$ encontrada.

Independentemente da origem dessa alta frequência, este é um dado preocupante, pois este alelo é um fator de risco para muitas doenças, como Doença de Alzheimer, declínio cognitivo, sintomas depressivos, hipertensão, acidente vascular encefálico, doenças coronarianas, doenças cardiovasculares e diabetes (MIDORIKAWA *et al.*, 2016).

Ainda, no presente trabalho encontramos uma redução significativa na frequência do $\epsilon 2$ em comparação com a distribuição da ApoE no mundo (7,3%) (SINGH *et al.*, 2006). Acredita-se que a baixa frequência do alelo $\epsilon 2$ em algumas populações como América do Sul e Siberianos, seja um reflexo da história de colonização destas regiões, pois este alelo possivelmente não estaria presente nos povos que colonizaram as regiões das Américas e Árticas, cerca de 10.000- 35.000 anos atrás (SINGH *et al.*, 2006).

No Tapajós a frequência deste alelo foi 4,2% e em Tucuruí foi 3,7% (Tabela 4). Uma vez que a presença de ApoE2 é relacionada com proteção frente a intoxicação mercurial, a reduzida prevalência do alelo protetor nessas populações (em comparação com outras populações do mundo), faz que seja ainda mais alarmante a existência de casos de exposição e ratifica ainda mais a necessidade de monitoramento e acompanhamento destes indivíduos.

5.2 Exposição mercurial na Amazônia: Níveis de mercúrio nas Regiões do Tapajós e Tucuruí

O monitoramento da exposição mercurial pode ser realizado através da determinação dos níveis de mercúrio no cabelo humano, que é considerada uma excelente ferramenta para acessar a exposição (MAGOS; CLARKSON, 2008). Além da quantidade de mercúrio total, é importante conhecer a proporção de mercúrio que se encontra na forma orgânica

(metilmercúrio), pois é uma das espécies mais tóxicas. Dessa forma, o presente estudo realizou a determinação de metilmercúrio e mercúrio total em amostras de cabelo de 109 indivíduos das populações ribeirinhas do Tapajós (n=74) e Tucuruí (n=35).

Destaca-se que os participantes destas análises foram altamente selecionados com rigorosos critérios de exclusão/inclusão (que nem sempre estão presentes em estudos de exposição humana), garantindo que os níveis de mercúrio não foram significativamente influenciados por alterações hepáticas e/ou renais. Ainda, não houve correlação do sexo ou idade com os níveis de mercúrio (testes de Mann-Whitney e Spearman, $p > 0,05$), revelando o padrão homogêneo de exposição em nossa amostra.

Os valores das medianas de mercúrio total e metilmercúrio estiveram abaixo do limite de 10 $\mu\text{g/g}$ de mercúrio no cabelo preconizado pela OMS (Figura 16). Contudo, aproximadamente 25% dos participantes apresentaram níveis acima do limite e 13% apresentaram níveis maiores ou iguais a 20 $\mu\text{g/g}$ (Figura 15). Demonstrando que apesar da diminuição nos níveis, há ainda uma alta proporção de indivíduos expostos a altas concentrações de mercúrio.

Cada vez mais trabalhos tem explorado o impacto dos baixos níveis de mercúrio, com efeitos adversos no crescimento fetal, funções neurológicas e, sistemas cardiovascular e imunológico (KARAGAS *et al.*, 2012). Sabendo que o sistema nervoso em desenvolvimento é especialmente tóxico ao mercúrio, é de especial importância a detecção precoce da exposição em mulheres em idade fértil. No nosso estudo, mais da metade das mulheres em que o conteúdo em mercúrio foi determinado estava em idade fértil (até 40 anos de idade). De forma alarmante, 16,2% das mulheres analisadas apresentou níveis de mercúrio acima do limite preconizado. Já foi demonstrado que níveis de mercúrio no cabelo materno maiores ou iguais a 10 $\mu\text{g/g}$ são relacionados com alterações clinicamente óbvias, tais como início da locomoção retardado (MAHAFFEY, 2005; ANTUNES DOS SANTOS *et al.*, 2016). Os efeitos adversos da exposição pré-natal ao mercúrio podem ser identificados na criança mesmo quando a exposição materna é de cerca de 5 $\mu\text{g/g}$, levando a alterações sutis no desenvolvimento (MAHAFFEY, 2005). Neste trabalho, 32,4% das mulheres testadas e em idade fértil apresentaram níveis maiores ou iguais a 5 $\mu\text{g/g}$ (Figura 26). Esses dados são especialmente preocupantes, uma vez que a exposição pré-natal ao mercúrio, mesmo quando as mães apresentam sintomas mínimos, resulta em anormalidades fetais extremas, como

microcefalia, cegueira, retardo mental e anormalidades físicas (HARADA, 1995; KARAGAS *et al.*, 2012; ANTUNES DOS SANTOS *et al.*, 2016).

Proporção de mulheres em idade fértil com níveis acima de 10 e 5 $\mu\text{g/g}$

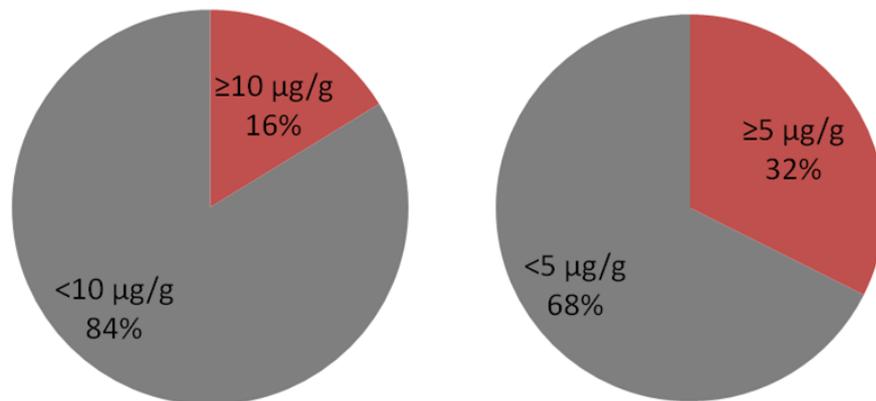


Figura 26: Proporção de mulheres em idade fértil na população total do estudo (n=37) com níveis de mercúrio total no cabelo igual ou acima de 10 $\mu\text{g/g}$ e de 5 $\mu\text{g/g}$.

Analisando os níveis de mercúrio total em cada região por separado, um aspecto positivo dos nossos dados é que esta é a primeira vez que são registrados níveis de mercúrio no Tapajós tão baixos. Se compararmos os dados do presente estudo com os dados de estudos publicados anteriormente, podemos realizar um monitoramento temporal aproximado ao longo destes 20 anos (Figura 27). Para isso, foi usado o valor da média e erro padrão da média dos nossos resultados ($4,21 \mu\text{g/g} \pm 0,46$), uma vez que a grande maioria dos trabalhos anteriormente publicados apresentam seus dados desta forma. A figura 27 mostra que houve uma redução nos níveis de mercúrio total no cabelo nos últimos 20 anos, estando a média atual abaixo do limite (Figura 27).

É possível que os baixos níveis de mercúrio encontrados em nosso trabalho sejam relacionados à diminuição das atividades antropogênicas em garimpos, bem como, aos trabalhos de conscientização que os diversos grupos que trabalham com estas populações ribeirinhas vêm realizando ao longo dos anos, como já foi sugerido na literatura (BERZAS-NEVADO *et al.*, 2010).

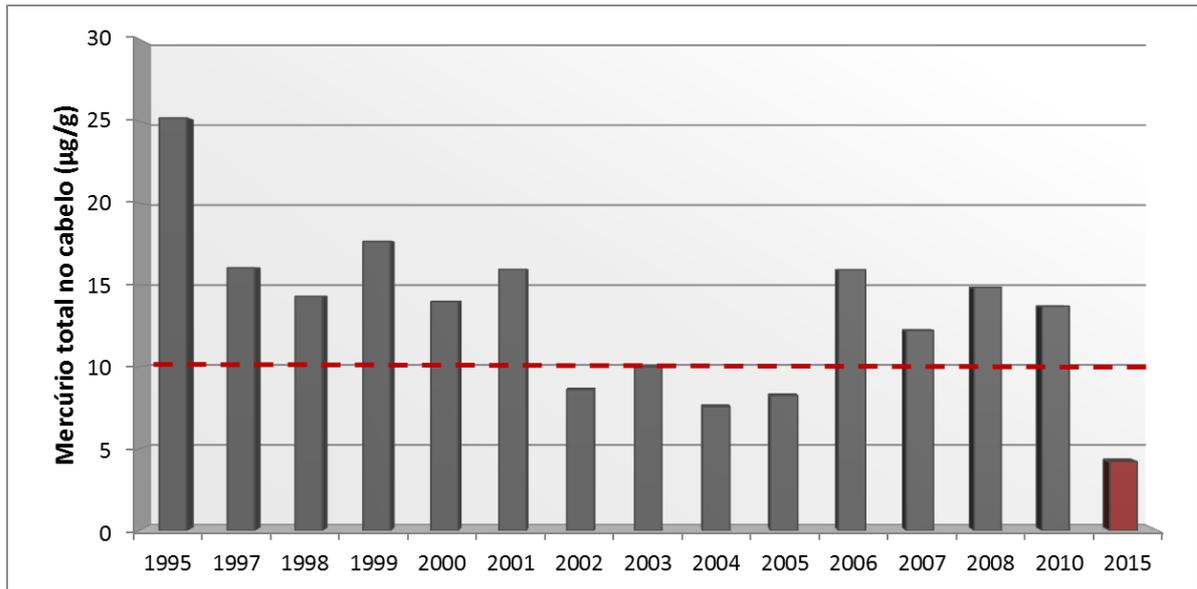


Figura 27: Médias de mercúrio total no cabelo de populações ribeirinhas da Bacia do Rio Tapajós, detectadas durante o período de 1995 a 2015. Dados coletados da literatura em cinza (AKAGI *et al.*, 1995; MALM *et al.*, 1995; KEHRIG *et al.*, 1997; LEBEL *et al.*, 1997; MALM *et al.*, 1997; LEBET *et al.*, 1998; GRADJEAN *et al.*, 1999; AMORIM *et al.*, 2000; DOLBEC *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2000; DOLBEC *et al.*, 2001; HARADA *et al.*, 2001; CROMPTON *et al.*, 2002; BOISCHIO *et al.*, 2002; PASSOS *et al.*, 2003; BAHIA *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2004; PINHEIRO *et al.*, 2005; PINHEIRO *et al.*, 2006; FILLION *et al.*, 2006; LEMIRE *et al.*, 2006; PINHEIRO *et al.*, 2007; PASSOS *et al.*, 2007a; PASSOS *et al.*, 2007b; PINHEIRO *et al.*, 2008; PASSOS *et al.*, 2008; GROTTTO *et al.*, 2010) e do presente trabalho em vermelho. A linha vermelha horizontal indica o limite de 10 µg/g de mercúrio no cabelo, preconizado pela OMS.

Entretanto, um trabalho recém-publicado realizado na comunidade ribeirinha de Barreiras demonstrou níveis médios de mercúrio total de 13,99 µg/g (2,07- 27,02 µg/g) (média e valores mín e máx) (FAIAL *et al.*, 2015), acima tanto do limite quanto dos níveis encontrados em nosso trabalho para essa mesma comunidade (5,73 µg/g e 0,89- 18,79 µg/g, média e valores mín e máx). Infelizmente não é possível efetuar comparações entre ambos os trabalhos uma vez que o período da coleta não foi descrito no referido trabalho. Cabe destacar que nossos dados corroboram os dados de outros estudos realizados na comunidade de Barreiras que indicam que aparentemente os níveis de mercúrio vêm diminuindo, em comparação com os anos anteriores: em 1994 foi 20,5 µg/g (n=26) (PINHEIRO *et al.*, 2000); em 1995 foi 17,7 µg/g (n=52) (PINHEIRO *et al.*, 2000); entre 1994-1998 foi 16,4 µg/g (n=132) (HARADA *et al.*, 2001) e em 2003 foi 12,12 µg/g (n=87) (PINHEIRO *et al.*, 2008) (Figura 28).

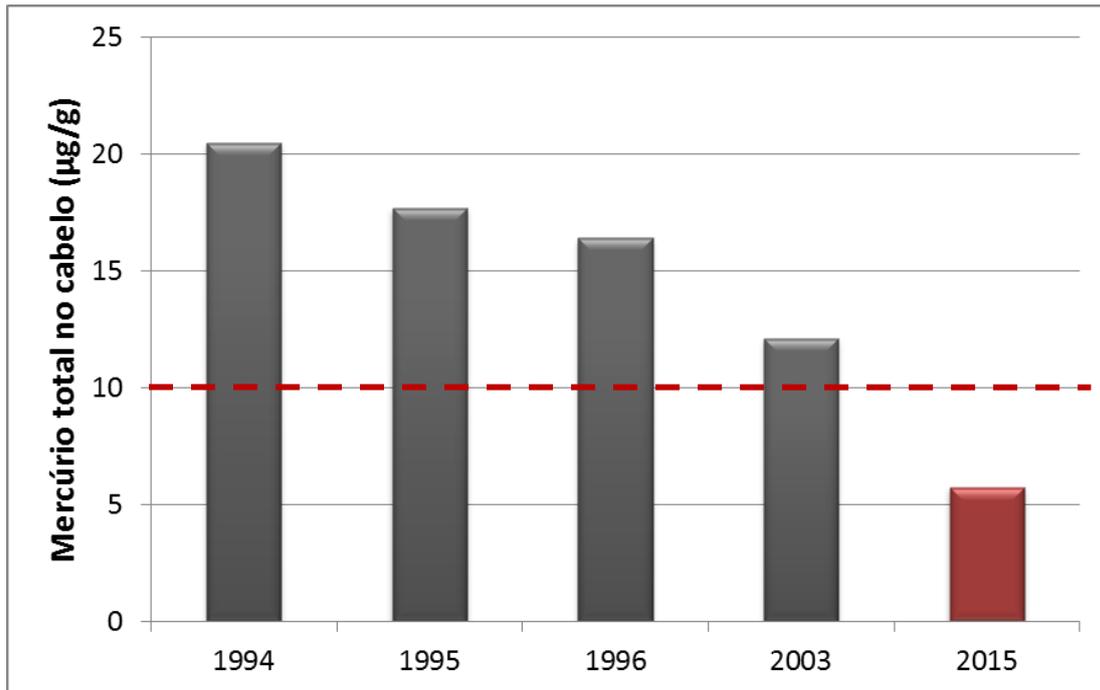


Figura 28: Nível de mercúrio total determinado em amostras de cabelo de ribeirinhos da comunidade de Barreiras de 1994 a 2015: 1994 (PINHEIRO *et al.*, 2000); 1995 (PINHEIRO *et al.*, 2000); 1996 (HARADA *et al.*, 2001); 2003 (PINHEIRO *et al.*, 2008) e 2015 (nossos dados). A linha vermelha horizontal indica o limite de 10 µg/g de mercúrio no cabelo, preconizado pela OMS.

Além da comunidade de Barreiras, este trabalho incluiu outras comunidades dentre as quais existem três que foram estudadas pela primeira vez: Boa Vista do Tapajós, Pimental e Pedra Branca. Embora os níveis de metilmercúrio e mercúrio total das amostras da comunidade de Pedra Branca ainda estejam em fase de determinação, conseguimos analisar as comunidades de Boa Vista do Tapajós e Pimental.

Os níveis mais baixos encontrados neste estudo foram provenientes da comunidade de Boa Vista do Tapajós (1,91 µg/g, $p < 0,05$ vs Barreiras), próximo do limite de 2 µg/g aceitável para populações adultas com consumo esporádico de pescado preconizado pela OMS (WHO, 1990). Tendo em vista que, assim como Barreiras e Pimental, esta comunidade está localizada às margens do rio Tapajós, vários fatores podem estar relacionados a esta diferença, como por exemplo, o tipo e a oferta do peixe disponível na comunidade que pode ser diferente do que é encontrado nas outras comunidades. Em entrevista informal com os participantes, eles nos informaram que tem sido cada vez mais difícil conseguir peixes na área próxima à comunidade e que geralmente os peixes mais consumidos são os peixes pequenos, como o Piau (que além do tamanho reduzido, são herbívoros e, portanto, apresentariam menores níveis de mercúrio). Uma vez que os peixes de hábitos carnívoros apresentam maiores níveis de mercúrio que os peixes herbívoros (RODRIGUES MARTINS-DOIMEADIOS *et al.* 2014),

no intuito de tentar diminuir os níveis de mercúrio encontrados nas populações, os ribeirinhos são orientados a dar preferência para os peixes de hábitos herbívoros.

Contudo, apesar dos níveis médios de mercúrio estarem abaixo do limite, 4,17% da população de Boa Vista do Tapajós, 14,29% de Barreiras e 5% de Pimental estão expostos a níveis maiores ou iguais a 10 $\mu\text{g/g}$ de mercúrio total.

Diferente de outras regiões da Amazônia (como a bacia do rio Tapajós), a área de Tucuruí apresenta uma reduzida influência de garimpos que utilizam mercúrio. Ainda assim, alguns poucos trabalhos no passado indicaram uma possível contaminação por mercúrio do meio ambiente (AULA *et al.*, 1995; PORVARI, 1995; KEHRIG *et al.*, 2008; 2009). Infelizmente, até agora um único trabalho epidemiológico daquela região realizado 20 anos atrás foi publicado até o momento (LEINO; LODENIUS, 1995). Esse trabalho revelou que 45 moradores do reservatório principal do Lago de Tucuruí apresentaram níveis de mercúrio de até 51 $\mu\text{g/g}$ no cabelo, bem acima do limite de segurança estabelecida pela OMS.

Apesar Leino e Lodenius (1995) terem incluído variados pontos de coleta no Lago de Tucuruí e suas imediações, nós decidimos nos focar na região de Caraipé, uma das duas regiões em que é dividido Tucuruí desde o ponto de vista limnológico (Figura 11). A escolha da região de Caraipé baseou-se no tempo de retenção da água no reservatório (cerca de 130 dias) mais elevado quando comparado com a do lago (30 dias) (BONETTO, 1994), o que poderia contribuir para o acúmulo de mercúrio.

Em contraste com os dados acima apresentados da região do Tapajós, nosso grupo demonstrou níveis alarmantes de mercúrio em Tucuruí (média de 20,15 $\mu\text{g/g}$), sobretudo porque 57% dos indivíduos desta área estão expostos a níveis acima do limite de 10 $\mu\text{g/g}$, 30% estão expostos a mais de 20 $\mu\text{g/g}$ e 11% a níveis acima de 50 $\mu\text{g/g}$. Esses dois últimos valores de mercúrio, 50 $\mu\text{g/g}$ e 20 $\mu\text{g/g}$, correspondem respectivamente ao limite estabelecido a partir de intoxicações agudas para diagnóstico de Doença de Minamata (WHO, 1990) e ao limite proposto para detectar os sintomas de neurotoxicidade e casos suspeitos de Doença de Minamata em populações da Amazônia (HARADA *et al.*, 2001).

Comparando nossos dados com os dados apresentados por Leino e Lodenius (1995) para a região do Caraipé, não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa

nos níveis de mercúrio total ($p > 0,05$; figura 29), demonstrando que aquela região continua exposta à níveis semelhantes àqueles de 20 anos atrás, necessitando com urgência de monitoramento, acesso constante aos serviços de saúde com acompanhamento clínico e laboratorial, e políticas de conscientização sobre a exposição e intoxicação mercurial.

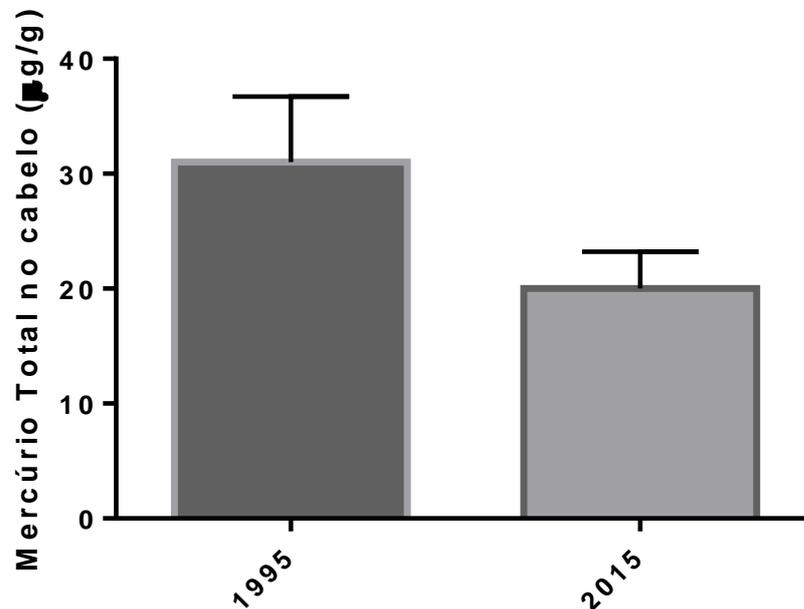


Figura 29: Níveis de mercúrio total em $\mu\text{g/g}$ encontrados na região de Tucuruí em 1995 (publicado por Leino e Lodenius, 1995; $n=11$) e em 2015 (presente trabalho; $n=35$). Dados apresentados como média e erro padrão da média. (Teste t-student, $p > 0,05$)

Interessantemente, comparando os níveis de mercúrio total entre as duas regiões estudadas, observamos que os altos níveis de mercúrio encontrados na região de Tucuruí são muito mais elevados do que aqueles encontrados no Tapajós (região altamente influenciada por áreas de garimpos) ($p < 0,0001$) e comparáveis aos níveis encontrados no Tapajós de cerca de 20 anos atrás (BERZAS-NEVADO *et al.*, 2010) (figura 30). Isso fica mais evidente quando observamos que apenas 9% da população do Tapajós apresentam níveis de mercúrio acima de $10 \mu\text{g/g}$ contra 57% da população Tucuruí.

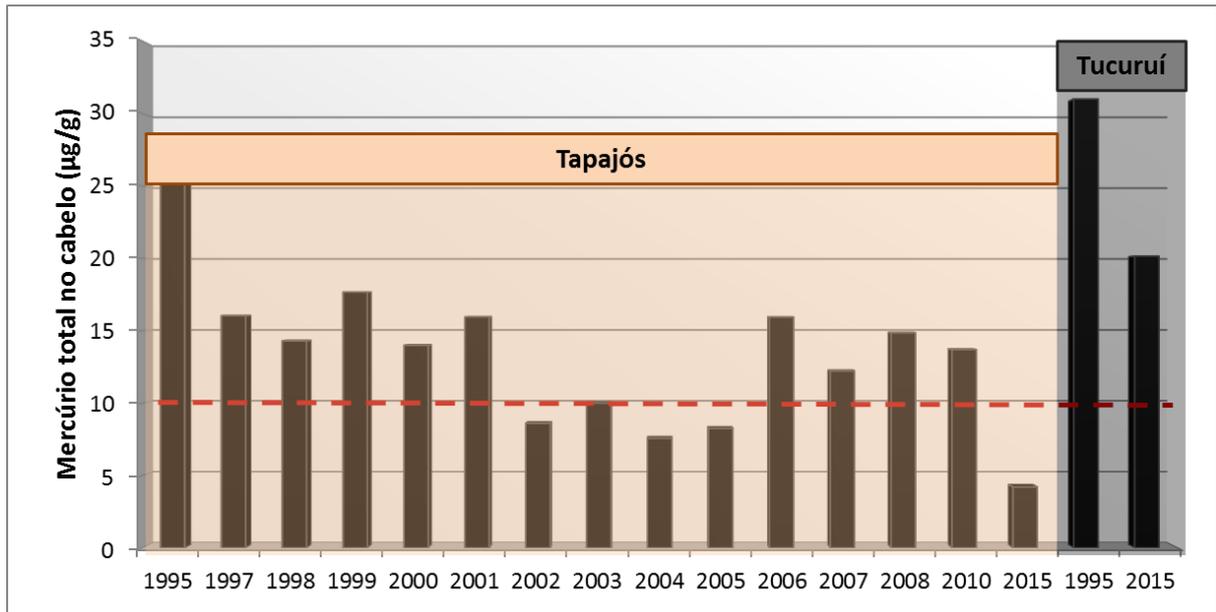


Figura 30: Médias de mercúrio total no cabelo de populações ribeirinhas da Bacia do Rio Tapajós e Tucuuruí, detectadas durante o período de 1995 a 2015. Dados coletados da literatura (Tapajós: AKAGI *et al.*, 1995; MALM *et al.*, 1995; KEHRIG *et al.*, 1997; LEBEL *et al.*, 1997; MALM *et al.*, 1997; LEBET *et al.*, 1998; GRADJEAN *et al.*, 1999; AMORIM *et al.*, 2000; DOLBEC *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2000; DOLBEC *et al.*, 2001; HARADA *et al.*, 2001; CROMPTON *et al.*, 2002; BOISCHIO *et al.*, 2002; PASSOS *et al.*, 2003; BAHIA *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2004; PINHEIRO *et al.*, 2005; PINHEIRO *et al.*, 2006; FILLION *et al.*, 2006; LEMIRE *et al.*, 2006; PINHEIRO *et al.*, 2007; PASSOS *et al.*, 2007a; PASSOS *et al.*, 2007b; PINHEIRO *et al.*, 2008; PASSOS *et al.*, 2008; GROTTTO *et al.*, 2010 e; Tucuuruí: LEINO; LODENIUS, 1995) e do presente trabalho em 2015. A linha vermelha horizontal indica o limite de 10 µg/g de mercúrio no cabelo, preconizado pela OMS.

Curiosamente, elevados níveis de mercúrio em rios amazônicos com influência reduzida de garimpos já foram demonstrados anteriormente (WASSERMAN *et al.*, 2003). Os solos amazônicos podem apresentar um teor elevado de mercúrio com mais de 97% do mercúrio acumulado na superfície do solo sendo pré-antropogênico (ROULET *et al.*, 1998). Embora esta origem geológica de níveis naturalmente elevados de mercúrio no solo amazônico seja controversa, é reconhecido que o ambiente amazônico tem o potencial de liberar e acumular quantidades significativas deste metal em resposta a ações antropogênicas, como a presença de barragens e da mineração de ouro (WASSERMAN *et al.*, 2003; BERZAS-NEVADO *et al.*, 2010).

Infelizmente, existem poucos trabalhos que determinam a possível exposição humana de populações amazônicas vizinhas a projetos arquitetônicos de grande escala com o potencial para acumular drasticamente mercúrio no ambiente. Além disso, as áreas a jusante das barragens demonstraram por vezes níveis ainda mais elevados de MeHg do que os detectados a montante (KASPER *et al.*, 2014), provavelmente porque as condições anóxicas podem favorecer a proliferação bacteriana (principal responsável pela biotransformação do mercúrio

inorgânico a mercúrio orgânico). Assim, nossos dados suportam a necessidade de analisar com urgência a exposição das populações que vivem em regiões a jusante da barragem de Tucuruí.

Embora estudos adicionais sejam necessários para confirmar a possível amplificação da presença de mercúrio pelas barragens na Amazônia (a exemplo da usina hidrelétrica de Tucuruí), nossos dados já suportam a importância de realizar estudos de impacto adequados e do acompanhamento contínuo, especialmente no caso das barragens que estão sendo previstas ou construídas em áreas altamente influenciadas por garimpos: como por exemplo, as barragens de Jatobá e de São Luiz do Tapajós, que estão previstas na bacia do rio Tapajós, a jusante das áreas de garimpo.

5.3 Identificação de indivíduos de risco de acordo à suscetibilidade e à exposição

A distribuição dos genótipos da *APOE* nos 109 indivíduos em que foram determinados os níveis de mercúrio está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p=0.889$) e apresenta distribuição semelhante àquela da população total incluída no estudo, demonstrando que apesar de ser uma amostra mais reduzida, ela ainda mantém as características encontradas para o total dos indivíduos.

Não encontramos diferenças significativas entre os níveis de mercúrio total e metilmercúrio e os fenótipos da ApoE (apesar das medianas, tanto de mercúrio total quanto de metilmercúrio terem sido maiores nos portadores do alelo $\epsilon 4$) (Tabela 7). De forma semelhante, Ng e colaboradores (2013 e 2015) também não encontraram diferenças significativas entre os níveis de mercúrio e os diferentes genótipos. Contudo, esses autores relatam um padrão de distribuição semelhante ao que nós encontramos (com indivíduos portadores da ApoE2 apresentando menores níveis de mercúrio, portadores da ApoE3 com níveis intermediários e portadores da ApoE4 com os níveis mais elevados) no grupo que apresentava níveis de mercúrio no cordão umbilical duas vezes maior que o limite estabelecido (NG *et al.*, 2013; 2015). Interessantemente, nestes mesmos trabalhos, este padrão de distribuição desaparece no grupo com níveis de mercúrio abaixo do limite. Isso nos leva a pensar que como a distribuição dos níveis de mercúrio na nossa amostra é muito variada, este fato poderia mascarar as diferenças nos níveis de mercúrio entre os genótipos. Infelizmente, a

análise desta distribuição apenas entre os indivíduos com níveis de mercúrio acima do limite não pôde ser realizada no presente trabalho, pois neste grupo só há um indivíduo com o genótipo *APOE2*.

Embora não tenha havido diferença significativa entre os níveis de mercúrio no cabelo e os genótipos da ApoE, as frequências relativas da distribuição dos portadores de $\epsilon 2$ ($\epsilon 2/\epsilon 3$) e dos portadores de $\epsilon 4$ ($\epsilon 3/\epsilon 4$ e $\epsilon 4/\epsilon 4$) nos grupos com níveis de mercúrio acima e abaixo do limite, mostrou uma variação significativa na frequência do $\epsilon 2$ entre os dois grupos (Figuras 21 e 22), sendo a frequência do alelo $\epsilon 2$ maior no grupo com níveis de mercúrio abaixo do limite. Esta é a primeira vez que um trabalho apresenta este resultado. Até o presente, os estudos realizados encontraram diferenças significativas apenas na frequência da *APOE4* (GODFREY *et al.*, 2003; WOJCIK *et al.*, 2006) ou não encontraram variação (NG *et al.*, 2013, 2015).

O aparente acúmulo de mercúrio e metilmercúrio nos indivíduos ApoE4, bem como o aumento da frequência de indivíduos ApoE2 no grupo exposto a níveis de mercúrio abaixo do limite, apontam para a mesma direção das hipóteses levantadas por Wojcik e colaboradores (2006), e por Pendergrass e Haley (1995). A primeira das hipóteses afirma que os indivíduos apresentariam uma inabilidade genética para eliminar o mercúrio com eficiência (WOJCIK *et al.*, 2006). Na segunda hipótese, é defendido que os indivíduos ApoE2, devido a presença de dois grupamentos sulfidrilas, estariam aptos a ligar e remover o mercúrio do cérebro e do LCR, ajudando assim na sua eliminação (PENDERGRASS; HALEY, 1995).

Embora o mecanismo exato pelo qual a ApoE4 poderia exercer sua influência não seja totalmente conhecido, já foi demonstrada a relação entre a presença desta isoforma e uma suscetibilidade individual aumentada a processos neurodegenerativos como os que acontecem na intoxicação mercurial (MAHLEY; HUANG, 2012).

As alterações neuropatológicas encontradas naturalmente em indivíduos ApoE4, como o retardo de crescimento dos neuritos, desarranjos do citoesqueleto, disfunção mitocondrial (incluindo alteração do potencial membrana e diminuição dos níveis e atividades de enzimas respiratórias mitocondriais), apoptose neuronal, disfunção da proteína tau, deposição da proteína beta-amilóide e a neuroinflamação (Figura 31) (MAHLEY; HUANG, 2012; RODRIGUEZ *et al.*, 2014), também são observadas em casos de intoxicação mercurial

(desequilíbrio oxidativo, mitocondrial, indução da apoptose, desarranjo dos microtúbulos, neuroinflamação, indução da hiperfosforilação da proteína tau, acúmulo da proteína beta-amilóide (Figura 31) (ERCAL *et al.*, 2001; MARTY; ATCHISON, 1998; STOIBER *et al.*, 2004; JOHANSSON *et al.*, 2007; FUJIMURA *et al.*, 2009; KEMPURAJ *et al.*, 2010; FARINA *et al.*, 2011; FRETHAM *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2014).

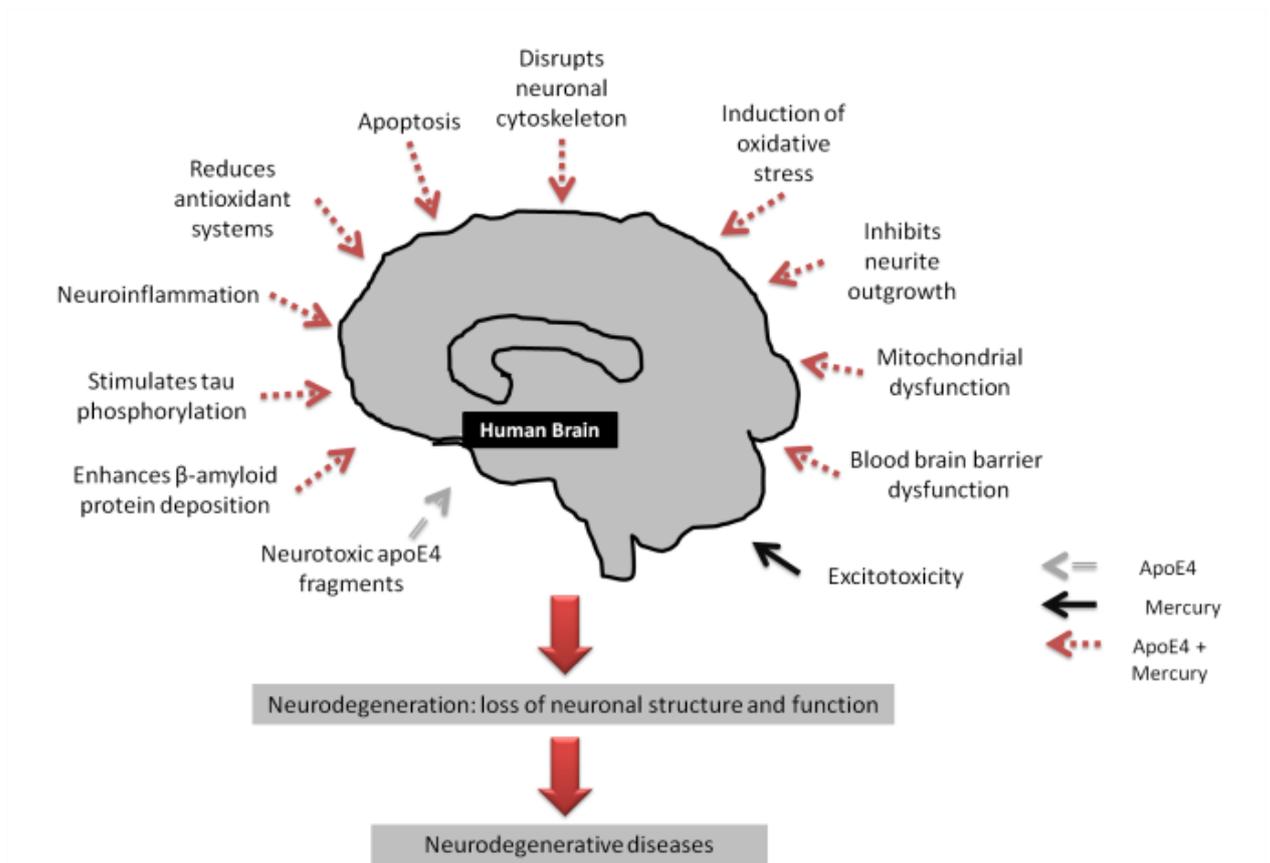


Figura 31: Alterações causadas pelo mercúrio e/ou a presença da ApoE4. Setas vermelhas pontilhadas indicam os mecanismos compartilhados pelos dois fatores; setas cinzas e pretas mostram os mecanismos exclusivos da ApoE4 ou mercúrio, respectivamente. Fonte: Imagem elaborada pela autora.

Considerando os numerosos efeitos provocados em indivíduos ApoE4 intoxicados pelo mercúrio, apenas a existência de um único mecanismo molecular (como o proposto pela teoria da quelação por grupos sulfidríla de ApoE) poderia não ser suficiente para explicar completamente a correlação entre os dois fatores. Curiosamente, os indivíduos que transportam a ApoE4 demonstram muitas alterações neuropatológicas com mecanismos moleculares semelhantes aos de neurotoxicidade induzida por mercúrio. Assim, existe a possibilidade de que a presença da ApoE4 seja responsável por uma facilitação da lesão

induzida por mercúrio no cérebro desses indivíduos. Com base nas evidências atuais, a hipótese de um possível efeito sinérgico entre as duas condições (portadores de ApoE4 e intoxicação por mercúrio) pode ser sugerida, de forma adicional àquelas que sugerem efeitos causados por uma eliminação ineficiente de mercúrio nos indivíduos $\epsilon 4$ (Figura 31).

Uma vez que a presença da ApoE4 aumenta a extensão do dano produzido no corpo humano pela intoxicação mercurial (PENDERGRASS; HALEY, 1995; GODFREY *et al.*, 2003, WOJCIK *et al.*, 2006, NG *et al.*, 2013; 2015; WOODS *et al.*, 2014), os indivíduos portadores dos genótipos $\epsilon 3/\epsilon 4$ e $\epsilon 4/\epsilon 4$ são considerados indivíduos de risco. No presente trabalho identificamos que 29% dos indivíduos da população do estudo são ApoE4 (Figura 32) e oito deles estão expostos a níveis de mercúrio acima do limite (12,02-75,80 $\mu\text{g/g}$), sendo considerados indivíduos de risco máximo (Tabela 6). Através desta análise, estes indivíduos poderão ser monitorados mais de perto e, os indivíduos que ainda não apresentarem os sintomas da intoxicação mercurial, serão orientados sobre como preveni-la. Ainda, estudos futuros podem ser conduzidos com estes indivíduos na tentativa de elucidar os mecanismos através dos quais a ApoE4 exerce esse efeito.

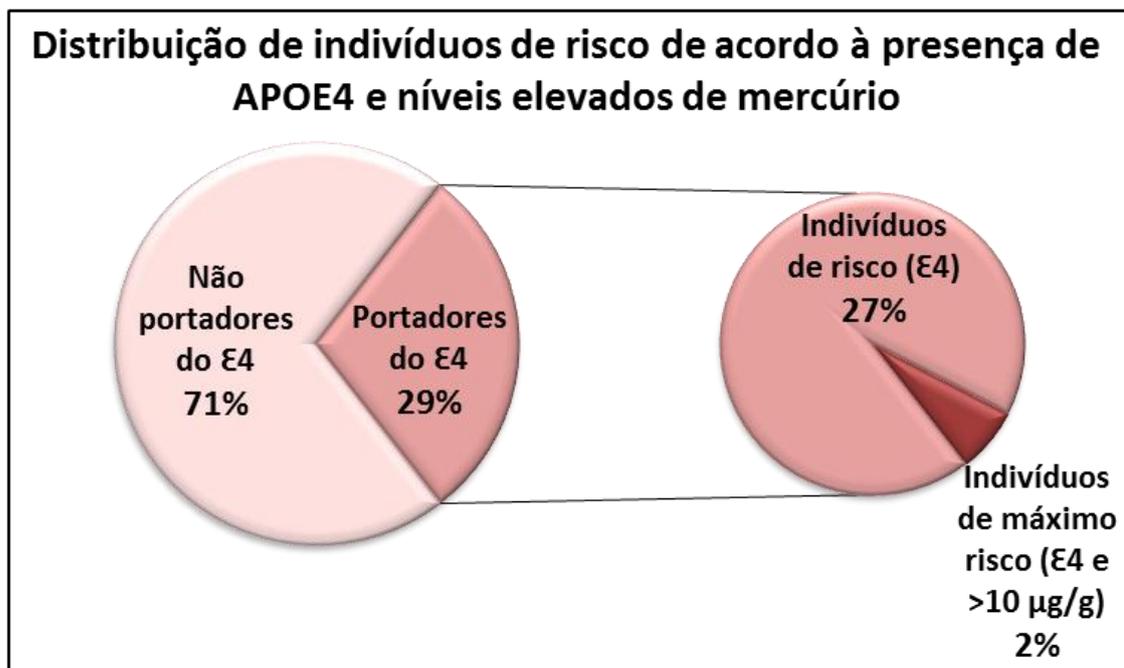


Figura 32: Distribuição de indivíduos APOE4 na população de estudo destacando os indivíduos de risco e risco máximo.

5.4 Marcadores Moleculares de intoxicação mercurial nas comunidades ribeirinhas da Amazônia

Além de monitorar a exposição e rastrear suscetibilidade genética em populações expostas ao mercúrio, é importante quantificar o dano produzido pela intoxicação mercurial. Infelizmente, na realidade das populações ribeirinhas da Amazônia é muito difícil o acesso a consultas médicas, que possam levar a identificação dos sintomas e, por conseguinte, dos danos produzidos pelo mercúrio. Este pode ser um dos motivos pelos quais, apesar do longo histórico comprovado de exposição mercurial nas comunidades ribeirinhas da Amazônia, nunca foi relatado um único caso diagnosticado de Doença de Minamata.

Dessa forma, encontrar um marcador periférico, de dano ao sistema nervoso central, seria de grande valia no acompanhamento dos indivíduos expostos, principalmente, os indivíduos de alto risco. Neste intuito, recentemente, Yilmaz e colaboradores (2014) demonstraram que os biomarcadores periféricos, NSE e S100B, apresentavam níveis elevados no soro de indivíduos com intoxicação aguda por mercúrio (YILMAZ *et al.*, 2014).

Até o presente momento, os trabalhos publicados relacionando a S100B e a NSE com os danos causados pelo mercúrio, foram realizados detectando os níveis das proteínas no soro ou no LCR (FARINA *et al.*, 2005; YILMAZ *et al.*, 2014). Até o máximo de nosso conhecimento, esta é a primeira vez que um trabalho é realizado detectando os níveis de RNAm destas proteínas no soro de indivíduos expostos ao mercúrio.

Mas, por que medir a quantidade de RNAm no soro e não as proteínas? Primeiro, a escolha desta metodologia foi baseada, sobretudo, em dois fatores: 1) a técnica do PCR em tempo real é extremamente sensível e confiável, detectando diferenças com poucas cópias de DNA, aumentando a possibilidade de detecção precoce de dano e; 2) é possível manter a estabilidade do RNA da amostra através do uso de reagentes estabilizadores, como o RNAlater, garantindo a qualidade e confiabilidade das análises. Levando em consideração as situações adversas enfrentadas em campo e baseados na nossa experiência com estas comunidades isoladas, a conservação adequada de proteínas após a coleta torna-se por muitas vezes impossível e não há eletricidade e nem freezers para o congelamento imediato e conservação das amostras (Figura 33). Ainda, existindo um intervalo de tempo significativo entre a coleta e a realização das análises, devido à distância.



Figura 33: Casa de um líder comunitário onde foram realizadas coletas de amostras. Notar o isopor onde as amostras eram armazenadas. Fonte: Imagem do arquivo pessoal da autora.

Devido às condições em que deve ser realizada a coleta de amostras nestas populações, marcadores proteicos não são confiáveis. Entretanto, devido à possibilidade de estabilização imediata e conservação (até em temperatura ambiente) do RNAm, estudamos ele como uma alternativa de marcador para estas populações.

Assim, este trabalho determinou pela primeira vez a quantidade do RNAm de S100B e NSE no soro de um subgrupo de indivíduos da população de Tucuruí expostos a diferentes níveis de mercúrio no intuito de comprovar se serviriam como marcadores de intoxicação. Não houve diferença na idade e o IMC, o que elimina possíveis interferências desses fatores nas análises destes marcadores ($p > 0,05$).

Interessantemente, encontramos diferença significativa na detecção do RNAm da proteína S100B entre o grupo com até $7 \mu\text{g/g}$ de mercúrio total e o grupo com mais de $18 \mu\text{g/g}$. O fato de haver diferença nos níveis de S100B entre os grupos, corrobora os dados da literatura (HUANG *et al.*, 1993; FARINA *et al.*, 2005; YILMAZ *et al.*, 2014) e, mais, nos permite sugerir que este marcador poderá ser utilizado para detectar danos nestas populações.

Por outro lado, apesar de não haver diferença significativa entre os grupos para a NSE (houve um aumento de 0,6 vezes em relação aos níveis do grupo com baixos níveis de mercúrio), se torna necessária uma análise mais acurada com um maior número de indivíduos para poder afirmar categoricamente a ausência de diferenças ou de utilidade como marcador de dano nestas populações. Ainda, é possível que esta ausência de diferença seja atribuída ao fato de que neste trabalho foi determinado o RNAm da isoforma γ -NSE expressada especificamente pela grande maioria dos neurônios ($\gamma\gamma$ -NSE), enquanto que geralmente os testes comerciais utilizados para a determinação da proteína no soro detectam as isoformas α -NSE (que é ubíqua) e a γ -NSE, detectando não só a isoforma expressa pelos neurônios, como a isoforma expressa por células neuroendócrinas ($\alpha\gamma$ -NSE), a exemplo do Kit comercial utilizado por Yilmaz e colaboradores (2014) (YILMAZ *et al.*, 2014).

Estudos futuros são necessários para estabelecer como parâmetros clínicos de diagnóstico a detecção do RNAm de S100B e NSE. Para isso este trabalho já deu o primeiro passo e os dados aqui apresentados, demonstram que há aumento na detecção do RNAm da S100B entre os grupos com níveis mais altos e mais baixos de exposição (o que poderia caracterizar maior dano).

Uma vez que há muitos fatores de confusão que podem interferir no correto diagnóstico dos sintomas da intoxicação mercurial nestas populações ribeirinhas, como doenças endêmicas e/ou o nível de instrução de cada indivíduo (interferindo diretamente nos testes comportamentais aplicados), há uma necessidade imperativa no desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico que possam prevenir e detectar possíveis danos. Nesse cenário, o presente trabalho apoia o uso de um conjunto de marcadores que analisem a suscetibilidade genética (através da genotipagem da apolipoproteína E), a exposição (através do nível de mercúrio no cabelo) e a intoxicação (através da quantidade relativa de RNAm de S100B).

6. CONCLUSÕES

- I. Pela primeira vez foi realizada a genotipagem da apolipoproteína E de populações ribeirinhas da Amazônia, demonstrando a distribuição genotípica e alélica da APOE.
- II. A análise dos níveis de mercúrio nas amostras de cabelo dos indivíduos do Tapajós mostrou que os níveis vêm diminuindo com o passar dos anos. No entanto, em Tucuruí, os indivíduos residentes da região do Lago, estão expostos a níveis elevados de mercúrio, similares aos níveis já descritos há 20 anos.
- III. Foram identificados 8 indivíduos de máximo risco (genótipo APOE4 e níveis de mercúrio acima do limite da OMS) com até 75,80 µg/g de mercúrio total no cabelo.
- IV. Encontrou-se aumento significativo do RNAm da S100B no soro de indivíduos expostos a altos níveis de mercúrio total no cabelo, apoiando seu uso como marcador.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). Toxicological profile for Mercury. **Public Health Service**, Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Health Sciences, 1999.
- AKAGI, H.; MALM, O.; KINJO, Y.; HARADA, M.; BRANCHES, F.J.P.; PFEIFFER, W.C. Methylmercury pollution in the Amazon, Brazil. **Science Total Environment**. 175: 85-95. 1995.
- ALATAS, Ö.D.; GÜRGER, M.; ATEŞÇELİK, M.; YILDIZ, M.; DEMIR, C.F.; KALAYCI, M.; ILHAN, N.; ACAR, E.; EKINGEN, E. Neuron-Specific Enolase, S100 Calcium-Binding Protein B, and Heat Shock Protein 70 Levels in Patients With Intracranial Hemorrhage. **Medicine (Baltimore)**. 94(45):e2007. 2015.
- ALHARBI, K.K.; KHAN, I.A.; SYED, R. Association of apolipoprotein E polymorphism with type 2 diabetes mellitus in a Saudi population. **DNA Cell Biol**. 33(9):637-41. 2014.
- AMORIM, M. I.; MERGLER, D.; BAHIA, M.O.; DUBEAU, H.; MIRANDA, D.; LEBEL, J.; BURBANO, R. R.; LUCOTTE, M. Cytogenetic damage related to low levels of methylmercury contamination in the Brazilian Amazon. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 72, n. 4, p. 497–507. 2000.
- ANTUNES DOS SANTOS, A.; APPEL HORT, M.; CULBRETH, M.; LÓPEZ-GRANERO, C.; FARINA, M.; ROCHA, J.B.; ASCHNER, M. Methylmercury and brain development: A review of recent literature. **J Trace Elem Med Biol**. S0946-672X(16)30022-0. [Epub ahead of print]. 2016.
- AULA, I.; BRAUNSCHWEILER, H.; MALIN, I. The watershed flux of mercury examined with indicators in the Tucuruí reservoir in Pará, Brazil. **Science of the Total Environment**. 175(2): 97-107. 1995.
- AZEVEDO, F. A. **Toxicologia do Mercúrio**. São Paulo: RiMa, 2003.
- BAHIA, M. O.; CORVELO, T. C.; MERGLER, D.; BURBANO, R. R.; LIMA, P.D. L.; CARDOSO, P. C. S.; LUCOTTE, M.; AMORIM, M. I. Environmental biomonitoring using cytogenetic endpoints in a population exposed to mercury in the Brazilian Amazon. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v. 44, n. 4, p. 346-349. 2004.
- BAIRD, Colin; CANN, Kann. **Environmental Chemistry**. New York: Freeman, 2004.
- BERZAS-NEVADO, J.J.; RODRÍGUEZ MARTÍN-DOIMEADIOS, R.C.; GUZMÁN BERNARDO, F.J.; JIMÉNEZ MORENO, M.; HERCULANO, A.M.; DO

- NASCIMENTO, J.L.; CRESPO-LÓPEZ M.E. Mercury in the Tapajós River basin, Brazilian Amazon: a review. **Environmental International**. 36(6):593-608. 2010.
- BÉLIVEAU, A.; LUCOTTE, M.; DAVIDSON, R.; LOPES, L.O.; PAQUET, S. Early Hg mobility in cultivated tropical soils one year after slash-and-burn of the primary forest, in the Brazilian Amazon. **Science of Total Environment**. 15;407(15):4480-9. 2009.
- BONETTO, A.A. Austral Rivers on South America. In: MARGALEF, R. (ed.) *Limnology Now: A Paradigm of Planetary Problems*. New York: Elsevier Science, p. 425-472. 1994.
- BOSCHERT, U.; MERLO-PICH, E.; HIGGINS, G.; ROSES, A.D.; CATSICAS, S. Apolipoprotein E expression by neurons surviving excitotoxic stress. **Neurobiology of Disease**. 6(6):508-14. 1999.
- CÂMARA, V. M.; FILHOTE, M. I.; LIMA, M. I.; ALHEIRA, F. V.; MARTINS, M. S.; DANTAS T. O.; LUIZ, R. R. Strategies for preventing adolescent mercury exposure in Brazilian gold mining areas. **Toxicology and Industrial Health**. 13, 2-3, 285-297. 1997.
- CARDOSO, P.C.S.; LIMA, P.D.L.; BAHIA, M.O.; AMORIM, M.I.M.; BURBANO, R. R.; FARIAS, R.A.F. Efeitos Biológicos do Mercúrio e seus Derivados em Seres Humanos - uma revisão bibliográfica. **Revista Paraense de Medicina**. 15: 51-58. 2001.
- CECCATELLI, S.; DARÉ, E.; MOORS, M. Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. **Chem Biol Interact**. 188(2):301-8. 2010
- CERNICHIARI, E.; MYERS, G.J.; BALLATORI, N.; ZAREBA, G.; VYAS, J.; CLARKSON, T. The biological monitoring of prenatal exposure to methylmercury. **Neurotoxicology**. 28(5):1015-22. 2007.
- CERNICHIARI, E.; BREWER, R.; MYERS, G.J.; MARSH, D.O.; LAPHAM, L.W.; COX, C.; SHAMLAYE, C.F.; BERLIN, M.; DAVIDSON, P.; CLARKSON, T.W. Monitoring methylmercury during pregnancy: maternal hair predicts fetal brain exposure. **Neurotoxicology**. 16, 705–710. 1995.
- CHAVES, M.L.; CAMOZZATO, A.L.; FERREIRA, E.D.; PIAZENSKI, I.; KOCHHANN, R.; DALL'IGNA, O.; MAZZINI, G.S.; SOUZA, D.O.; PORTELA, L.V. Serum levels of S100B and NSE proteins in Alzheimer's disease patients. **J Neuroinflammation**. 27;7:6. 2010.
- CLARKSON, T.W.; MAGOS, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. **Critical Reviews in Toxicology**. 36, 609–662. 2006.

- CORBO, R.M.; SCACCHI, R. Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE*4 a 'thrifty' allele? **Ann Hum Genet.** 63(Pt 4):301-10. 1999.
- CRESPO-LÓPEZ, M.E.; MACÊDO, G.L.; ARRIFANO, G.P.; PINHEIRO, M.D.A.C.; DO NASCIMENTO, J.L.; HERCULANO, A.M. Genotoxicity of mercury: contributing for the analysis of Amazonian populations. **Environment International.** 37(1):136-41. 2010.
- CRESPO-LÓPEZ, M. E.; MACÊDO, G. L.; PEREIRA, S. I. D.; ARRIFANO, G. P. F.; PIKANÇO-DINIZ, D. L. W.; DO NASCIMENTO, J. L. M.; HERCULANO, A. M. Mercury and human genotoxicity: Critical considerations and possible molecular mechanisms. **Pharmacological Research.** 60: 212-220. 2009.
- CRESPO-LÓPEZ, M.E.; HERCULANO, A. M.; CORVELO, T. C.; NASCIMENTO, J. L. M do. Mercurio y neurotoxicidad. **Revista de Neurologia.** v. 40, n. 7, p. 441–447. 2005.
- CROMPTON, P.; VENTURA, A.M.; DE SOUZA, J.M.; SANTOS, E.; STRICKLAND, G.T.; SILBERGELD, E. Assessment of mercury exposure and malaria in a Brazilian Amazon riverine community. **Environmental Research.** 90A:69–75. 2002.
- DIETSCHY, J.M.; TURLEY, S.D. Cholesterol metabolism in the brain. **Current Opinion in Lipidology.** 12(2):105-12. 2001.
- DÍEZ, S. Human health effects of methylmercury exposure. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.** 198:111–132. 2009.
- DOLBEC, J.; MERGLER, D.; PASSOS, C.J.S.; MORAIS, S.S.; LEBEL, J. Methyl mercury exposure affects motor performance of a riverine population of the Tapajós River, Brazilian Amazon. **Int Arch Occup Environ Health.** 73:195–203. 2001.
- DOLBEC, J.; MERGLER, D.; PASSOS, C.J.S.; MORAIS, S.S.; LEBEL, J. Methyl mercury exposure affects motor performance of a riverine population of the Tapajós River, Brazilian Amazon. **International Archives of Occupational and Environmental Health.** 73:195–203. 2000.
- DÓREA, J.G.; MARQUES, R.C. Mercury levels and human health in the Amazon Basin. **Ann Hum Biol.** 43(4):349-59. 2016.
- ERCAL, N.; GURER-ORHAN, H.; AYKIN-BURNS, N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. **Current Topics in Medicinal Chemistry.** vol. 1, no. 6, pp. 529-539. 2001.
- FAIAL, K.; DEUS, R.; DEUS, S. NEVES, R.; JESUS, I.; SANTOS, E.; ALVES, C.N.; BRASIL, D. Mercury levels assessment in hair of riverside inhabitants of the Tapajós

- River, Pará State, Amazon, Brazil: fish consumption as a possible route of exposure. **J Trace Elem Med Biol.** 30:66-76. 2015.
- FARINA, M.; ROCHA, J.B.; ASCHNER, M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. **Life Sci.**, 10;89(15-16):555-63. 2011
- FARINA, M.; CERESER, V.; PORTELA, L.V.; MENDEZ, A.; PORCIÚNCULA, L.O.; FORNAGUERA, J.; GONÇALVES, C.A.; WOFCHUK, S.T.; ROCHA, J.B.; SOUZA, D.O. Methylmercury increases S100B content in rat cerebrospinal fluid. **Environ Toxicol Pharmacol.** 19(2):249-53. 2005
- FEARNSIDE, P.M. Tropical dams: To build or not to build? **Science.** 29;351(6272):456-7. 2016.
- FEARNSIDE, P.M. Impactos Sociais da Barragem de Tucuruí. pp. 37 -52. In: **Hidrelétricas na Amazônia: Impactos Ambientais e Sociais na Tomada de Decisões sobre Grandes Obras.** Vol. 1. Editora do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas. 296 pp. 2015.
- FILLION, M.; MERGLER, D.; PASSOS, C.J.S.; LARRIBE, F.; LEMIRE, M.; GUIMARÃES, J.R.D. A preliminary study of mercury exposure and blood pressure in the Brazilian Amazon. **Environmental Health.** 5:29. 2006.
- FONFRÍA, E.; VILARÓ, M.T.; BABOT, Z.; RODRÍGUEZ-FARRÉ, E.; SUÑOL, C. Mercury compounds disrupt neuronal glutamate transport in cultured mouse cerebellar granule cells. **J Neurosci Res.** 79(4):545-53. 2005.
- FONFRÍA, E.; RODRÍGUEZ-FARRÉ, E.; SUÑOL, C. Mercury interaction with the GABA(A) receptor modulates the benzodiazepine binding site in primary cultures of mouse cerebellar granule cells. **Neuropharmacology.** 41(7):819-33. 2001.
- FONSECA, P.A.; HACON, S.D.E.S.; REIS, V.L.; COSTA, D.; BROWN, I.F. Using satellite data to study the relationship between rainfall and diarrheal diseases in a Southwestern Amazon basin. **Cien Saude Colet.** 21(3):731-42. 2016.
- FRETHAM, S.J.B.; CAITO, S.; MARTINEZ-FINLEYA, E.J.; ASCHNER M. Mechanisms and modifiers of methylmercury-induced neurotoxicity. **Toxicology Research.** vol. 1,. 32-38. 2012.
- FUJIMURA, M.; USUKI, F.; SAWADA, M.; TAKASHIMA, A. Methylmercury induces neuropathological changes with tau hyperphosphorylation mainly through the activation of the c-jun-N-terminal kinase pathway in the cerebral cortex, but not in the hippocampus of the mouse brain. **Neurotoxicology.** 30(6):1000-7. 2009.

- GODFREY, M.E.; WOJCIK, D.P.; KRONE, C.A. Apolipoprotein E genotyping as a potential biomarker for mercury neurotoxicity. **Journal of Alzheimers Disease**. 5: 189-95. 2003.
- GOMES, R.; NASCIMENTO, E.F.; ARAÚJO, F.C. Why do men use health services less than women? Explanations by men with low versus higher education. **Cad Saude Publica**. 23(3):565-74. 2007.
- GUZZI, G.; LA PORTA, C.A. Molecular mechanisms triggered by mercury. **Toxicology**. 3;244(1):1-12. 2008.
- GRANDJEAN, P.; WHITE, R.F.; NIELSEN, A.; CLEARY, D.; SANTOS, E.C.O. Methyl mercury neurotoxicity in Amazonian children downstream from gold mining. **Environmental Health Perspectives**. 107:587–91. 1999.
- GROTTO, D.; VALENTINI, J.; FILLION, M.; PASSOS, C.J.; GARCIA, S.C.; MERGLER, D.; *ET AL*. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. **Science of Total Environment**. 408:806–11. 2010.
- HACON, S.; BARROCAS, P.R.; VASCONCELLOS, A.C.; BARCELLOS, C.; WASSERMAN, J.C.; CAMPOS, R.C.; RIBEIRO, C.; AZEVEDO-CARLONI, F.B. An overview of mercury contamination research in the Amazon basin with an emphasis on Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**. 24(7):1479-92. 2008.
- HARADA, M.; NAKANISHI, J.; YASODA, E.; PINHEIRO, M.C.N.; OIKAWA, T.; GUIMARÃES, G.A.; *ET AL*. Mercury pollution in the Tapajós River Basin, Amazon: mercury level of head hair and health effects. **Environment International**. 27:285–90. 2001.
- HARADA M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. **Crit Rev Toxicol**. 25(1):1-24. 1995.
- HARRIS, J.D.; EVANS, V. & OWEN, J.S. ApoE gene therapy to treat hyperlipidemia and atherosclerosis. **Current Opinion In Molecular Therapeutics**. 8: 275-287. 2006.
- HAYASHI, H.; CAMPENOT, R.B.; VANCE, D.E. & VANCE, J.E. Apolipoprotein E-containing lipoproteins protect neurons from apoptosis via a signaling pathway involving low-density lipoprotein receptor-related protein-1. **Journal of Neuroscience**. 27: 1933-1941. 2007.
- HIRSCH-REINSHAGEN, V.; BURGESS, B.L.; WELLINGTON, C.L. Why lipids are important for Alzheimer disease? **Molecular and Cellular Biochemistry**. 326(1-2):121-9. 2009.

- HONG, Y.S.; KIM, Y.M.; LEE, K.E. Methylmercury exposure and health effects. **Journal Of Preventive Medicine And Public Health**. 45(6):353-63. 2012.
- HUANG, C.F.; HSU, C.J.; LIU, S.H.; LIN-SHIAU, S.Y. Neurotoxicological mechanism of methylmercury induced by low-dose and long-term exposure in mice: oxidative stress and down-regulated Na⁺/K⁽⁺⁾-ATPase involved. **Toxicol Lett**. 176(3):188-97. 2008.
- HUANG, J.; TANII, H.; KATO, K.; HASHIMOTO, K. Neuron and glial cell marker proteins as indicators of heavy metal-induced neurotoxicity in neuroblastoma and glioma cell lines. **Arch Toxicol**. 67 : 491 – 496. 1993.
- ISGRÒ, M.A.; BOTTONI, P.; SCATENA, R. Neuron-Specific Enolase as a Biomarker: Biochemical and Clinical Aspects. **Adv Exp Med Biol**. 867:125-43. 2015.
- JOHANSSON, C.; CASTOLDI, A.F.; ONISHCHENKO, N.; MANZO, L.; VAHTER, M.; CECCATELLI, S. Neurobehavioural and molecular changes induced by methylmercury exposure during development. **Neurotox Res**. 11(3-4):241-60. 2007.
- KARAGAS, M.R.; CHOI, A.L.; OKEN, E.; HORVAT, M.; SCHOENY, R.; KAMAI, E.; COWELL, W.; GRANDJEAN, P.; KORRICK, S. Evidence on the human health effects of low-level methylmercury exposure. **Environ Health Perspect**. 120(6):799-806. 2012.
- KASPER, D.; FORSBERG, B.R.; AMARAL, J.H.; LEITÃO, R.P.; PY-DANIEL, S.S.; BASTOS, W.R.; MALM O. Reservoir stratification affects methylmercury levels in river water, plankton, and fish downstream from Balbina hydroelectric dam, Amazonas, Brazil. **Environ Sci Technol**. 48(2):1032-40. 2014.
- KEHRIG, H.A.; PALERMO, E.F.A; SEIXAS, T.G.; SANTOS, H.S.B.; MALM O.; AKAGI H. Methyl and Total mercury found in two man-made Amazonian reservoirs. **Journal of Brazilian Chemistry Society**. 20(6): 1142-1152. 2009.
- KEHRIG, H.A.; HOWARD, B.M.; MALM, O. Methylmercury in a predatory fish (*Cichla* spp.) inhabiting the Brazilian Amazon. **Environmental Pollution**. 154(1): 68-76. 2008.
- KEHRIG, H.A.; MALM, O.; AKAGI, H. Methylmercury in hair samples from different riverine groups, Amazon, Brasil. **Water Air Soil Pollution**. 97:17–29. 1997.
- KEMPURAJ, D.; ASADI, S.; ZHANG, B.; MANOLA, A.; HOGAN, J.; PETERSON, E.; THEOHARIDES, T.C. Mercury induces inflammatory mediator release from human mast cells. **J Neuroinflammation**. 7:20. 2010.
- KERPER, L.E.; BALLATORI, N.; CLARKSON, T.W. Methylmercury transport across the blood-brain barrier by an amino acid carrier. **Am J Physiol**. 262(5 Pt 2):R761-5. 1992.

- KIM, D.K.; PARK, J.D.; CHOI, B.S. Mercury-induced amyloid-beta (A β) accumulation in the brain is mediated by disruption of A β transport. **J Toxicol Sci.** 39(4):625-35. 2014.
- KHOURY, E.D.; SOUZA, G.D.A.S.; SILVEIRA, L.C.; COSTA, C.A.; ARAÚJO, A.A.; PINHEIRO, M.D.AC. Neurological manifestations in riverine populations from areas exposed to mercury in the Brazilian Amazon. **Cad Saude Publica.** 29(11):2307-18. 2013.
- LEBEL, J.; MERGLER, D.; BRANCHES, F.; LUCOTTE, M.; AMORIM, M.; LARRIBE, F.; DOLBEC, J. Neurotoxic effects of low-level methylmercury contamination in the Amazonian Basin. **Environmental Research.** v. 79, n. 1, p. 20-32. 1998.
- LEBEL, J.; ROULET, M.; MERGLER, D.; LUCOTTE, M.; LARRIBE, F. Fish diet and mercury exposure in a riparian Amazonian population. **Water Air Soil Pollut.** 97:31–44.1997.
- LEINO, T.; LODENIUS, M. Human hair mercury levels in Tucuruí area, state of Pará, Brazil. **Science of Total Environment.** 175:119-125. 1995.
- LEMIRE, M.; MERGLER, D.; FILLION, M.; PASSOS, C.J.; GUIMARÃES, J.R.; DAVIDSON, R.; LUCOTTE, M. Elevated blood selenium levels in the Brazilian Amazon. **Sci Total Environ.** 366(1):101-11. 2006.
- LI, P.; FENG, X.; QIU, G. Methylmercury exposure and health effects from rice and fish consumption: a review. **International Journal of Environmental Research and Public Health.** 7(6):2666-91. 2010.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods.** 25(4):402-8. 2001.
- LLOP, S.; IBARLUCEA, J.; SUNYER, J.; BALLESTER, F. Current dietary exposure to mercury during pregnancy and childhood, and public health recommendations. **Gaceta Sanitaria/S.E.S.P.A.S.** Espanha. 2012.
- MAGOS, L.; CLARKSON, T.W. The assessment of the contribution of hair to methyl mercury excretion. **Toxicology Letters.**182:48–9. 2008.
- MAGOS, L.; CLARKSON, T.W. Overview of the clinical toxicity of mercury. **Ann Clin Biochem.** Pt 4:257-68. 2006.
- MAHAFFEY, K. R. Mercury Exposure: Medical and Public Health Issues. **Trans Am Clin Climatol Assoc.** 116: 127–154. 2005.
- MAHLEY, R.W.; HUANG, Y. Apolipoprotein e sets the stage: response to injury triggers neuropathology. **Neuron.** 76(5):871-85. 2012.

- MAHLEY, R.W.; HUANG, Y. Apolipoprotein (apo) E4 and Alzheimer's disease: unique conformational and biophysical properties of apoE4 can modulate neuropathology. **Acta Neurol Scand Suppl.** 185:8-14. 2006.
- MAHLEY, R.W.; WEISGRABER, K.H.; HUANG Y. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. **J Lipid Res.** 50 Suppl: S183-8. 2009.
- MAHLEY, R.W.; WEISGRABER, K.H.; HUANG, Y. Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 103: 5644-5651. 2006.
- MALM, O., *et al.* Transport and cycling of mercury in Tucuruí reservoir, Amazon, Brazil: 20 years after fulfillment. **RMZ Materials and Geoenvironment**, v.51, p.1195-8, 2004.
- MALM, O.; GUIMARAES, J.R.D.; CASTRO, M.G.; BASTOS, W.R.; VIANA, J.P.; BRANCHES, F.J.P. Follow-up of mercury levels in fish, human hair and urine in the Maderia and Tapajós basins, Amazon, Brazil. **Water Air Soil Poll.** 97:45–51. 1997.
- MALM O.; BRANCHES F.J.; AKAGI H.; CASTRO M.B.; PFEIFFER W.C.; HARADA M.; BASTOS W.R.; KATO H. Mercury and methylmercury in fish and human hair from the Tapajós river basin, Brazil. **Science of Total Environment.** 11;175(2):141-50. 1995.
- MARTY, M.S.; ATCHISON, W.D. Elevations of intracellular Ca²⁺ as a probable contributor to decreased viability in cerebellar granule cells following acute exposure to methylmercury. **Toxicol Appl Pharmacol.** 150(1):98-105.1998.
- MERGLER, D.; ANDERSON, H.A.; CHAN, L.H.; MAHAFFEY, K.R.; MURRAY, M.; SAKAMOTO, M.; STERN, A.H. Methylmercury exposure and health effects in humans: a worldwide concern. Panel on Health Risks and Toxicological Effects of Methylmercury. **Ambio.** 36(1):3-11. 2007.
- MIDORIKAWA, K.; SOUKALOUN, D.; AKKHAVONG, K.; SOUTHIVONG, B.; RATTANAVONG, O.; SENGKHYGNVONG, V.; PYALUANGLATH, A.; SAYASITHSENA, S.; NAKAMURA, S.; MIDORIKAWA, Y.; MURATA, M. APOE Genotype in the Ethnic Majority and Minority Groups of Laos and the Implications for Non-Communicable Diseases. **PLoS One.** 11(5):e0155072. 2016.
- MORGANO, M.A.; GOMES, P.C.; MANTOVANI, D.M. B.; PERRONE, A. A. M; SANTOS, T.F. Níveis de mercúrio total em peixes de água doce de pisciculturas paulistas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** 25(2): 250-253. 2005.

- MORI, N.; YAMAMOTO, M.; TSUKADA, E.; YOKOOJI, T.; MATSUMURA, N.; SASAKI, M.; MURAKAMI, T. Comparison of in vivo with in vitro pharmacokinetics of mercury between methylmercury chloride and methylmercury cysteine using rats and Caco2 cells. **Arch Environ Contam Toxicol.** 63(4):628-36. 2012.
- MUTTER, J.; NAUMANN, J.; SADAGHIANI, C.; SCHNEIDER, R.; WALACH, H. Alzheimer disease: mercury as pathogenetic factor and apolipoprotein E as a moderator. **Neuro Endocrinology Letters.** 25: 331-339. 2004.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Toxicological Effects of Methylmercury.** Washington: National Academy of Sciences. 2001.
- NG, S.; LIN, C.C.; JENG, S.F.; HWANG, Y.H.; HSIEH, W.S.; CHEN, P.C. Mercury, APOE, and child behavior. **Chemosphere.** 120:123-30. 2015.
- NG, S.; LIN, C.C.; HWANG, Y.H.; HSIEH, W.S.; LIAO, H.F.; CHEN, P.C. Mercury, APOE, and children's neurodevelopment. **Neurotoxicology.** 2013
- ONG, Q.; WONG, B. The neuronal functions of human apolipoprotein E, **OA Biochemistry.** vol. 01, no. 1, pp. 1-5, 2013
- ORIÁ, R.B.; PATRICK, P.D.; ORIÁ, M.O.; LORNTZ, B.; THOMPSON, M.R.; AZEVEDO, O.G.; LOBO, R.N.; PINKERTON, R.F.; GUERRANT, R.L.; LIMA, A.A. ApoE polymorphisms and diarrheal outcomes in Brazilian shanty town children. **Braz J Med Biol Res.** 43(3):249-56. 2010.
- ORIÁ, R.B.; PATRICK, P.D.; BLACKMAN, J.A.; LIMA, A.A.; GUERRANT, R.L. Role of apolipoprotein E4 in protecting children against early childhood diarrhea outcomes and implications for later development. **Med Hypotheses.** 68(5):1099-107. 2007.
- ORTH, M.; BELLOSTA, S. Cholesterol: its regulation and role in central nervous system disorders. **Cholesterol.** 2012:292598. 2012.
- PASSOS, C. J. S.; MERGLER, D. Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review. **Caderno de Saúde Pública,** Rio de Janeiro. 24: 503-520. 2008.
- PASSOS, C.J.S.; MERGLER, D.; LEMIRE, M.; FILLION, M.; GUIMARÃES, J.R.D. Fish consumption and bioindicators of inorganic mercury exposure. **Science of Total Environment.** 373:68–76. 2007a.
- PASSOS, C.J.S.; MERGLER, D.; FILLION, M.; LEMIRE, M.; MERTENS, F.; GUIMARÃES, J.R.D.; *ET AL.* Epidemiologic confirmation that fruit consumption influences mercury exposure in the Brazilian Amazon. **Environmental Research.** 105:183–93. 2007b.

- PASSOS, C. J.; MERGLER, D.;LEBEL, J.; GASPAR, E.; MORAIS, S.; LUCOTTE, M.; LARRIBE, F.; DAVIDSON, R.; GROSBOIS de, S. Eating tropical fruit reduces mercury exposure from fish consumption in the Brazilian Amazon. **Environmental Research**. v. 93, n. 2, p. 123-130. 2003.
- PENDERGRASS, J.C.; HALEY, B.E. Mercury-EDTA complex specifically blocks brain β -tubulin-GTP interactions: Similarity to observations in Alzheimer's disease. **Status Quo and Perspective of Amalgam and Other Dental Materials**, International Symposium Proceedings, L.T. Friberg and G.N. Schrauzer, eds, Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 98-105. 1995.
- PINHEIRO, M. C.; MACCHI, B. M.; VIEIRA, J. L.; OIKAWA, T.; AMORAS, W. W.; GUIMARÃES, G. A.; COSTA, C. A.; CRESPO-LÓPEZ, M. E.; HERCULANO, A. M.; SILVEIRA, L. C. L.; NASCIMENTO, J. L. M do. Mercury exposure and antioxidant defenses in women: A comparative study in the Amazon. **Environmental Research**. v.107, n. 1, p. 53-59. 2008.
- PINHEIRO, M. C.; CRESPO-LÓPEZ, M. E.; VIEIRA, J. L.; OIKAWA, T.; GUIMARÃES, G. A.; COSTA, C. A.; AMORAS, W. W.; RIBEIRO, D. R.; HERCULANO, A. M.; NASCIMENTO, J. L. M. do; SILVEIRA, L. C. L. Mercury pollution and childhood in Amazon riverside villages. **Environment International**. v. 33, n.1, p. 56-61. 2007.
- PINHEIRO, M. C.; OIKAWA, T.; VIEIRA, J. L.; GOMES, M. S.; GUIMARÃES, G. A.; CRESPO-LÓPEZ, M. E.; MULLER, R. C.; AMORAS, W. W.; RIBEIRO, D. R.; RODRIGUES, A. R.; CORTÊS, M. I.; SILVEIRA, L. C. L. Comparative study of human exposure to mercury in riverside communities in the Amazon region. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 39, n. 3, p. 411-414. 2006.
- PINHEIRO, M. C.; HARADA, M.; YASODA, E.; NAKANISHI, J.; OIKAWA, T.; VIEIRA, J. L.; COSTA, S. M.; GUIMARÃES, G. A.; BACELAR, M. D. R.; ALMEIDA, S. S.; SILVEIRA, L. C. L. Toxicological and epidemiological data on human exposure to mercury in the Tapajós River Basin: 1994-1998. **Environmental Sciences**. v. 10, n. 3, p. 99-105. 2003.
- PINHEIRO, M.C.; GUIMARÃES, G.A.; NAKANISHI, J.; OIKAWA, T.; VIEIRA, J.L.; QUARESMA, M.; CARDOSO, B.; AMORAS W. [Total mercury in hair samples of inhabitants of Tapajós River, Pará State, Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop**. 33(2):181-4. 2000.

- PORVARI, P. Mercury levels of fish in Tucuruí hydroelectric reservoir and in River Mojú in Amazonia, in the state of Pará, Brazil. **Science of the Total Environment**. 175(2): 109-117. 1995.
- REBECK, G.W.; LADU, M.J.; ESTUS, S.; BU, G. & WEEBER, E.J. The generation and function of soluble apoE receptors in the CNS. **Molecular Neurodegeneration**. 1: 15. 2006.
- RICHARD, P.; THOMAS, G.; DE ZULUETA, M.P.; DE GENNES, J.L.; THOMAS, M.; CASSAIGNE, A.; BÉRÉZIAT, G.; IRON, A. Common and rare genotypes of human apolipoprotein E determined by specific restriction profiles of polymerase chain reaction-amplified DNA. **Clinical Chemistry**. 40: 24-29. 1994.
- RIEDEL, B.C.; THOMPSON, P.M.; BRINTON, R.D. Age, APOE and sex: Triad of risk of Alzheimer's disease. **J Steroid Biochem Mol Biol**. 160:134-47.2016.
- RODRIGUEZ, G.A.; TAI, L.M.; LADU, M.J.; REBECK, G.W. Human APOE4 increases microglia reactivity at A β plaques in a mouse model of A β deposition. **J Neuroinflammation**. 11:111. 2014.
- RODRÍGUEZ MARTÍN-DOIMEADIOS, R.C.; BERZAS- NEVADO, J.J.; GUZMÁN BERNARDO, F.J.; JIMÉNEZ MORENO, M.; ARRIFANO, G.P.F; HERCULANO, A.M.; DO NASCIMENTO, J.L.; CRESPO-LÓPEZ, M.E. Comparative study of mercury speciation in commercial fishes of the Brazilian Amazon. **Environ Sci Pollut Res Int**. 7466-79. 2014.
- RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, A.; EGEA-GUERRERO, J.J.; GORDILLO-ESCOBAR, E.; ENAMORADO-ENAMORADO, J.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, C.; RUIZ DE AZÚA-LÓPEZ, Z.; VILCHES-ARENAS, Á.; GUERRERO, J.M.; MURILLO-CABEZAS, F. S100B and Neuron-Specific Enolase as mortality predictors in patients with severe traumatic brain injury. **Neurol Res**. 38(2):130-7. 2016.
- ROSES, A.D.; GILBERT, J.; XU, P.T.; SULLIVAN, P.; POPKO, B.; BURKHART, D.S.; CHRISTIAN-ROTHROCK, T.; SAUNDERS, A.M.; MAEDA, N.; SCHMECHEL, D.E. Cis-acting human ApoE tissue expression element is associated with human pattern of intraneuronal ApoE in transgenic mice. **Neurobiology of Aging**. 19: S53-8. 1998.
- ROULET, M.; LUCOTTE, M.; SAINT-AUBIN, A.; TRAN, S.; RHÉAULT, I.; FARELLA, N.; DE JESUS DA SILVA, E.; DEZENCOURT, J.; SOUSA PASSOS, C.J.; SANTOS SOARES, G.; GUIMARÃES, J.R.; MERGLER, D.; AMORIM, M. The geochemistry of mercury in central Amazonian soils developed on the Alter-do-Chão formation of

- the lower Tapajós River Valley, Pará state, Brazil. **Science of Total Environment**. 3;223(1):1-24. 1998.
- SÁ, A. L. de; HERCULANO, A. M.; PINHEIRO, M. C.; SILVEIRA, L. C. L.; NASCIMENTO, J. L. M do. Human exposure to mercury in the west region of Pará State. **Revista Paraense de Medicina**. v. 20, n. 1, p. 19–25. 2006.
- SANTOS, L. S. dos; MULLER, R. C.; SARKIS, J.E.; ALVES, C.N.; BRABO, E.S.; SANTOS, E. O.; BENTES, M. H. Evaluation of total mercury concentrations in fish consumed in the municipality of Itaituba, Tapajos River Basin, Para, Brazil. **The Science of the Total Environment**. v. 261, n. 1-3, p. 1-8. 2000.
- SANTOS, E.C.O.; JESUS, I.M.; BRABO, E. S.; FAIAL, K.R. F.; SÁ FILHO, G.C.; LIMA, M.O.; MIRANDA, A.M.M.; MASCARENHAS, A.F.S.; SÁ, L.L.C.; SILVA, A.P.; CÂMARA, V M. Exposição ao mercúrio e ao arsênio em Estados da Amazônia: síntese dos estudos do Instituto Evandro Chagas. **Revista Brasileira de Epidemiologia** 6: 171-185. 2003.
- SCHULTE, S.; PODLOG, L.W.; HAMSON-UTLEY, J.J.; STRATHMANN, F.G.; STRÜDER, H.K. A systematic review of the biomarker S100B: implications for sport-related concussion management. **J Athl Train**. 49(6):830-50. 2014.
- SEET, W.T.; MARY ANNE, T.J.; YEN, T.S. Apolipoprotein E genotyping in the Malay, Chinese and Indian ethnic groups in Malaysia-a study on the distribution of the different apoE alleles and genotypes. **Clinica Chimica Acta**. 340: 201- 205. 2004.
- SCHWANKE, C.H.A.; CRUZ, I.B.M. ; LEAL, N.F. ; SCHEIBE, R. M. ; MORIGUCHI, Y.; MORIGUCHI, E.H. Análise da associação entre o polimorfismo do gene da apolipoproteína E e fatores de risco cardiovascular em idosos longevos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 78: 561-570. 2002.
- SILVA, I.A.; NYLAND, J.F.; GORMAN, A.; PERISSE, A.; VENTURA, A.M.; SANTOS, E.C.O.; *et al*. Mercury exposure, malaria, and serum antinuclear/antinucleolar antibodies in Amazon populations in Brazil: a cross-sectional study. **Environ Health: A Global Access Science Source**. 3:11. 2004.
- SINGH, P.P.; SINGH, M.; MASTANA, S.S. APOE distribution in world populations with new data from India and the UK. **Ann Hum Biol**. 33(3):279-308. 2006.
- STOIBER, T.; BONACKER, D.; BÖHM, K.J.; BOLT, H.M.; THEIR, R.; DEGEN, G.H.; UNGER, E. Disturbed microtubule function and induction of micronuclei by chelate complexes of mercury(II). **Mutat Res**. 563(2):97-106. 2004.

- STREITBÜRGER, D.P.; ARELIN, K.; KRATZSCH, J.; THIERY, J.; STEINER, J.; VILLRINGER, A.; MUELLER, K.; SCHROETER, M.L. Validating serum S100B and neuron-specific enolase as biomarkers for the human brain - a combined serum, gene expression and MRI study. **PLoS One**. 7(8):e43284. 2012.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Mercury study report to congress. **Health effects of mercury and mercury compounds**, Washington: U. S. Environmental Protection Agency. 1997.
- VAN ELDIK, L.J.; WAINWRIGHT, M.S. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. **Restor Neurol Neurosci**. 21(3–4):97–108. 2003 .
- VANCE, J.E.; HAYASHI, H. Formation and function of apolipoprotein E-containing lipoproteins in the nervous system. **Biochim Biophys Acta**. 1801(8):806-18. 2010.
- VÁZQUEZ, M.; VÉLEZ, D.; DEVESA, V. In vitro evaluation of inorganic mercury and methylmercury effects on the intestinal epithelium permeability. **Food Chem Toxicol**. 74:349-59. 2014.
- XU, H.; FINKELSTEIN, D.I.; ADLARD, P.A. Interactions of metals and Apolipoprotein E in Alzheimer's disease. **Front Aging Neurosci**. 12;6:121. 2014.
- XU, P.T.; GILBERT, J.R.; QIU, H.L.; ERVIN, J.; ROTHROCK-CHRISTIAN, T.R.; HULETTE, C.; SCHMECHEL, D.E. Specific regional transcription of apolipoprotein E in human brain neurons. **American Journal of Pathology**. 154: 601-11. 1999.
- WASSERMAN, J.C., HACON, S., WASSERMAN, M.A. Biogeochemistry of mercury in the Amazonian environment. **Ambio** 32(5): 336-42. 2003.
- WASSERMAN, J. C; HACON, S. S. WASSERMAN, M. A. **O ciclo do mercúrio no ambiente amazônico**. Mundo e vida vol. 2. 2001.
- WOODS, J.S.; HEYER, N.J.; RUSSO, J.E.; MARTIN, M.D; FARIN, F.M. Genetic polymorphisms affecting susceptibility to mercury neurotoxicity in children: summary findings from the Casa Pia Children's Amalgam clinical trial. **Neurotoxicology**. 44:288-302. 2014.
- WOJCIK, D.P.; GODFREY, M.E.; CHRISTIE, D. & HALEY, B.E. Mercury toxicity presenting as chronic fatigue, memory impairment and depression: diagnosis, treatment, susceptibility, and outcomes in a New Zealand general practice setting (1994-2006). **Neuro Endocrinology Letters**. 27: 415-423. 2006.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Environmental health criteria: methylmercury. **International program on Chemical Safety**, Geneva: WHO, p. 101-140, 1990.
- YU, J.T.; TAN, L.; HARDY, J. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease: an update. **Annu Rev Neurosci.** 37:79-100. 2014.
- YILMAZ, F.M.; YILMAZ, H.; TUTKUN, E.; UYSAL, S.; CARMAN, K.B.; DILBER, C.; ERCAN, M. Serum biochemical markers of central nerve system damage in children with acute elemental mercury intoxication. **Clin Toxicol (Phila).** 52(1):32-8. 2014.
- ZHONG, N.; WEISGRABER, K.H. Understanding the association of apolipoprotein E4 with Alzheimer's disease: Clues from its structure. **The Journal of Biological Chemistry**, 6;284(10):6027-31. 2009.

ANEXO A- ARTIGO PUBLICADO RELACIONADO À TESE

1) Artigo da Dissertação do Mestrado publicado na revista *Environmental Science and Pollution Research* (fator de impacto 2,760)

Environ Sci Pollut Res
DOI 10.1007/s11356-014-2680-7

RESEARCH ARTICLE

Comparative study of mercury speciation in commercial fishes of the Brazilian Amazon

R. C. Rodríguez Martín-Doimeadios & J. J. Berzas Nevado & F. J. Guzmán Bernardo & M. Jiménez Moreno & G. P. F. Arrifano & A. M. Herculano & J. L. M. do Nascimento & M. E. Crespo-López

Received: 18 November 2013 / Accepted: 19 February 2014
Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Mercury is responsible for serious episodes of environmental pollution throughout the world, especially in the Amazon. This toxicity has led regulatory agencies to focus on fish as the target organism for protecting the health of humans and other sensitive organisms. Unfortunately, in the Amazon area, different sampling strategies and the wide variety of sampling areas and fish species make it extremely difficult to determine relationships across geographic regions or over time to ascertain historical trends. Thus, the aim of this work was to achieve three main objectives: a comparative study of mercury contamination in fish of Itaituba (Tapajós, located downstream of the largest gold-mining region in Amazon) and Belém (an area non-exposed to mercury pollution of anthropogenic origin), perform an analysis of inorganic mercury (IHg) versus monomethylmercury (MeHg) contents, and, finally, compare mercury contamination in Tapajós over time. Five piscivorous species were obtained in Itaituba and Belém. Also, four non-piscivorous species were collected in Itaituba. For the first time, mercury speciation showed that (1) current MeHg levels in piscivorous species in Tapajós are higher than those of the non-exposed area, (2) piscivorous species from Itaituba (dourada, filhote, and sarda) contained mercury levels above the World Health Organization safety limit (~17 %) and/or above the US Environmental Protection Agency tissue residue criterion (40 %), (3) increased MeHg is usually accompanied by increased IHg, and (4) the mean total mercury concentrations for piscivorous species in Itaituba were within the same range and, associated uncertainties as those previously reported, although a remarkable decreasing trend over time was observed for mean total Hg concentrations in non-piscivorous species from Itaituba. The present study supports the importance of continuous monitoring of both populations in the Amazon Rivers. Our results will better assist the development of preventive strategies and governmental actions to confront the problem of mercury contamination in the Amazon.

Keywords Mercury · Methylmercury · Tapajós · Amazon · Fish · Inorganic mercury · Belém

Responsible editor: Stuart Simpson

Dedication Professor J.J. Berzas Nevado sadly passed away. This paper is dedicated to the memory of this outstanding scientific and dear friend, with all our respect and acknowledgements.

R. C. Rodríguez Martín-Doimeadios · F. J. Guzmán Bernardo · M. Jiménez Moreno

Department of Analytical Chemistry and Food Technology, Faculty of Environmental Sciences and Biochemistry, University of Castilla-La Mancha, 45071 Toledo, Spain

J. J. Berzas Nevado

Department of Analytical Chemistry and Food Technology, Faculty of Chemistry, University of Castilla-La Mancha, 13071 Ciudad Real, Spain

G. P. F. Arrifano · M. E. Crespo-López (*)

Laboratório de Farmacologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Av. Augusto Correa, 01. Campus do Guamá, 66075110 Belém, Brazil
e-mail: maria.elena.crespo.lopez@gmail.com

A. M. Herculano

Laboratório de Neuroendocrinologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil

J. L. M. do Nascimento

Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil

ANEXO B- ARTIGOS SUBMETIDOS RELACIONADOS À TESE

1) Artigo submetido na revista *Chemosphere* (fator de impacto: 3,698)

LARGE-SCALE ARCHITECTURAL PROJECTS IN AMAZON AND HUMAN EXPOSURE TO MERCURY: THE CASE-STUDY OF TUCURUÍ DAM

Gabriela P.F. Arrifano¹, Rosa C. Rodríguez Martín-Doimeadios², María Jiménez Moreno², Vanesa Ramírez-Mateos², Núbia F. S. da Silva¹, José Rogério Souza-Monteiro¹, Marcus A. de Oliveira³, Ricardo S. O. Paraense¹, Barbarella M. Macchi⁴, José Luiz M. do Nascimento⁴, Maria Elena Crespo López^{1,*}

¹Laboratório de Farmacologia Molecular, ³Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção no Hospital Universitário João de Barros Barreto and

⁴Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil. maria.elena.crespo.lopez@gmail.com

²Department of Analytical Chemistry and Food Technology, Faculty of Environmental Sciences and Biochemistry, University of Castilla-La Mancha, 45.071-Toledo, Spain

***Correspondence and proofs must be sent to:**

Maria Elena Crespo Lopez

Laboratorio de Farmacologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal do Pará

Av. Augusto Correa, 01. Campus do Guamá. 66075-110 Belém – PA. Brazil.

Phone: + 559132018212, Fax: + 559132011601

E-mail: maria.elena.crespo.lopez@gmail.com

Abstract

Tucuruí dam is one of the largest dams ever built in the Amazon. The area showed reduced influence of gold mining areas as a source of mercury contamination. Still, we recently indicated that one of the most consumed fishes (*Cichla* sp.) is possibly contaminated with methylmercury. So, this work evaluated the mercury content in human population living at Tucuruí dam. Strict exclusion/inclusion criteria were applied for the selection of participants avoiding those with altered hepatic and/or renal functions. Methylmercury (MeHg) and total mercury contents were analyzed in hair samples. Median level of mercury in hair was above the safe limit recommended by World Health Organization, with values up to 75 µg/g (about 90% as MeHg). Major percentages of participants (57% and 30%) showed high levels of mercury (≥ 10 µg/g and ≥ 20 µg/g, respectively), with median value of 42.90 µg/g. Interestingly, these levels are relatively higher than those currently showed in human populations highly influenced by gold mining areas. Although additional studies are necessary to confirm the possible magnification of the presence of mercury by the dams in Amazon, our data already support the importance of adequate impact studies and continuous monitoring. More than 400 hydropower dams are operational or under construction in the Amazon and additional 334 dams are presently planned/proposed. The continuous monitoring of the populations will better assist in the development of prevention strategies and government actions to face the problem of the impact caused by the dams.

Keywords: Amazon, mercury, dam, Tucuruí, human, exposure

Abbreviations: Methylmercury (MeHg), World Health Organization (WHO), Body Mass Index (BMI)



Fwd: Thank you for your submission to Chemosphere

De: **Maria Elena Crespo López**
Para: rosacarmen.rodriguez@uclm.es ,María.Jimenez@uclm.es ,gabrielaarriano@uol.com.br ,nuenfer11@gmail.com ,rogerio.souza.monteiro@gmail.com ,marcusoliveira@globo.com
Cópia:
Cópia oculta:
Assunto: Fwd: Thank you for your submission to Chemosphere
Data: 04/08/2016 23:02
CHEM-S-16-03457.pdf **859.42**
KB

Profa. Dra. Maria Elena Crespo López
Coordenadora do Laboratório de Farmacologia Molecular
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Pará (UFPA)
Av. Augusto Correa, 01. Campus do Guamá.
66075-110 Belém - PA
Phone: +55 91 3201 8212
Fax: +55 91 3201 7930

----- Forwarded message -----

From: **Chemosphere** <chem-go@elsevier.com>
Date: 2016-08-04 22:58 GMT-03:00
Subject: Thank you for your submission to Chemosphere
To: maria.elena.crespo.lopez@gmail.com, ecrespo@ufpa.br

Dear Prof. Crespo-López,

Thank you for sending your manuscript LARGE-SCALE ARCHITECTURAL PROJECTS IN AMAZON AND HUMAN EXPOSURE TO MERCURY: THE CASE-STUDY OF TUCURUÍ DAM for consideration to Chemosphere. Please accept this message as confirmation of your submission.

2) Artigo submetido na revista *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (fator de impacto: 4,492)

Neurodegeneration and Mercury Intoxication: a Role for Apolipoprotein E?

Gabriela de Paula Fonseca Arrifano¹, Marcus Augusto de Oliveira², José Rogerio Souza-Monteiro¹, Ricardo S. Oliveira Paraense¹, Ândrea Kely Ribeiro-dos-Santos³, José Ricardo dos Santos Vieira⁴, Artur Luiz da Costa Silva⁵, Manoel da Silva Filho⁶, Barbarella de Matos Macchi⁷, José Luiz Martins do Nascimento⁷, Rommel Mario Rodriguez Burbano⁸, Maria Elena Crespo-López^{1,*}

¹Laboratório de Farmacologia Molecular, ²Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, ³Laboratório de Genética Humana e Médica, ⁴Laboratório de Análises Clínicas, ⁵Laboratório de Genômica e Bioinformática, ⁶Laboratório de Biofísica Celular, ⁷Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular and ⁸Laboratório de Citogenética Humana; Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Brazil

*Corresponding author:

Maria Elena Crespo López

Laboratório de Farmacologia Molecular

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará (UFPA)

Rua Augusto Corrêa 01, Campus do Guamá.

66075-110 Belém-PA, Brasil

Phone: +55 91 32018212

Fax: +55 91 32017930

E-mail: maria.elena.crespo.lopez@gmail.com

Abstract

Mercury intoxication is a serious problem of public health and a worldwide concern. Presently, Minamata Convention on Mercury has been already signed by 128 countries and endorsed by WHO with the recommendation of promoting the management of epidemiological information. CNS is the main target organ for mercury. Intoxication symptoms include altered motor coordination, visual and tactile dysfunction and paralysis, caused by neurodegeneration with a key role for oxidative damage. Recently, some works demonstrated a correlation between mercury intoxication and the isoforms of apolipoprotein E (ApoE). ApoE has a protective role against oxidative stress and its gene is one of the only two genes consistently associated to longevity. In this review, epidemiological data are revised and hypotheses about the possible molecular mechanisms underlying the association between ApoE and mercury intoxication are aroused. Based on the evidences and the several neuropathological changes that the presence of ApoE4 and the mercury neurotoxicity have in common, we propose a convergent action of both factors. The presence of ApoE4 seems to set the stage to potentiate the damage caused by mercury. The better knowledge of this interaction using epidemiological and pre-clinical studies becomes essential to improve prevention strategies and the adequate manage of intoxicated patients.

Keywords: apolipoprotein e; ApoE; mercury; neurodegenerative disease; apoE4; methylmercury

14/08/2016

5813570: Acknowledging Receipt - gabrielaarrifano@uol.com.br

**5813570: Acknowledging Receipt**

De: Oxidative Medicine and Cellular Longevity
Para: maria.elena.crespo.lopez@gmail.com
Cópia: ahmed.haroun@hindawi.com ,gabrielaarrifano@uol.com.br ,marcusoliveira@globo.com ,rogerio.souza.monteiro@gmail.com ,pos_ricardo@hotmail.com ,akelyufpa@gmail.com ,jrvie
Cópia oculta:
Assunto: 5813570: Acknowledging Receipt
Data: 05/08/2016 14:13

Dear Dr. Crespo López,

The Review Article titled "Neurodegeneration and Mercury Intoxication: a Role for Apolipoprotein E?" by Gabriela Arrifano, Marcus Oliveira, José Rogério Monteiro, Ricardo Paraense, Ândrea Kely Ribeiro dos Santos, José Ricardo Vieira, Artur Silva, Manoel Da Silva Filho, Barbarella Macchi, José Luiz Martins do Nascimento, Rommel Mário Rodríguez Burbano and Maria Elena Crespo López has been received and assigned the number 5813570.

The special issue for which the paper is being processed is
"Neuroprotection in Neurodegenerative Disease: From Basic Science to Clinical Applications"

All authors will receive a copy of all the correspondences regarding this manuscript.

Thank you for submitting your work to Oxidative Medicine and Cellular Longevity.

Best regards,

Ahmed Haroun
Editorial Office
Hindawi Publishing Corporation
<http://www.hindawi.com>

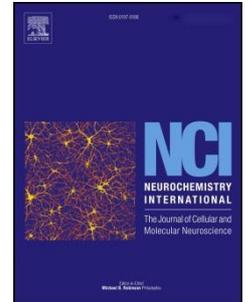
ANEXO C- ARTIGOS PUBLICADOS NÃO RELACIONADOS À TESE

1) Artigo publicado na revista *Neurochemistry International* (fator de impacto: 3,385)

Accepted Manuscript

Anticonvulsant properties of *Euterpe oleracea* in mice

José Rogerio Souza-Monteiro, Moisés Hamoy, Danielle Santana-Coelho, Gabriela P.F. Arrifano, Ricardo S.O. Paraense, Allan Costa-Malaquias, Jackson R. Mendonça, Rafael F. da Silva, Wallena S.C. Monteiro, Hervé Rogez, Diogo L. de Oliveira, José Luiz M. do Nascimento, Maria Elena Crespo-López



PII: S0197-0186(15)30001-2

DOI: [10.1016/j.neuint.2015.06.014](https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.06.014)

Reference: NCI 3722

To appear in: *Neurochemistry International*

Received Date: 14 April 2015

Revised Date: 9 June 2015

Accepted Date: 27 June 2015

2) Artigo publicado na revista *Neurochemistry International* (fator de impacto: 3,385)

Accepted Manuscript

Antidepressant drugs in convulsive seizures: Pre-clinical evaluation of duloxetine in mice

Danielle Santana-Coelho, José Rogerio Souza-Monteiro, Ricardo S.O. Paraense, Guilherme L. Busanello, Gabriela P.F. Arrifano, Jackson R. Mendonça, Mauro E.P. Silveira-Junior, Luiz Fernando F. Royes, Maria Elena Crespo-López

PII: S0197-0186(16)30146-2

DOI: [10.1016/j.neuint.2016.06.001](https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.06.001)

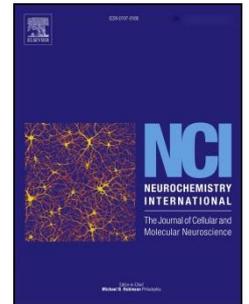
Reference: NCI 3879

To appear in: *Neurochemistry International*

Received Date: 2 December 2015

Revised Date: 27 May 2016

Accepted Date: 7 June 2016



RESEARCH ARTICLE

Is Low Non-Lethal Concentration of Methylmercury Really Safe? A Report on Genotoxicity with Delayed Cell Proliferation

María Elena Crespo-Lopez^{1*}, Allan Costa-Malaquias¹, Edivaldo H. C. Oliveira², Moysés S. Miranda³, Gabriela P. F. Arrifano¹, José R. Souza-Monteiro¹, Fernanda Espirito-Santo Sagica⁴, Enéas A. Fontes-Junior⁴, Cristiane S. F. Maia⁴, Barbarella M. Macchi³, José Luiz M. do Nascimento⁵

1 Laboratório de Farmacologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, 66075-110 Belém (Pará), Brasil, **2** Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética, Departamento de Meio Ambiente, Instituto Evandro Chagas, 67030-000 Ananindeua (Pará), Brasil, **3** Laboratório de Fertilização In Vitro, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, 66075-110 Belém (Pará), Brasil, **4** Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, 66075-110 Belém (Pará), Brasil, **5** Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, 66075-110 Belém (Pará), Brasil

* maria.elena.crespo.lopez@gmail.com


 OPEN ACCESS

Citation: Crespo-Lopez ME, Costa-Malaquias A, Oliveira EHC, Miranda MS, Arrifano GPF, Souza-Monteiro JR, et al. (2016) Is Low Non-Lethal Concentration of Methylmercury Really Safe? A Report on Genotoxicity with Delayed Cell Proliferation. *PLoS ONE* 11(9): e0162822. doi:10.1371/journal.pone.0162822

Editor: Yi Hu, Chinese Academy of Sciences, CHINA

Received: March 10, 2016

Accepted: August 11, 2016

Published: September 13, 2016

Copyright: © 2016 Crespo-Lopez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia em Pesquisa (CNPq, Brazil; grants 467143/2014-5 and 447568/2014-0) and Instituto Evandro Chagas (IEC, Brazil). J.L.M. do Nascimento, E.H.C. Oliveira and M.E. Crespo-López thank CNPq for their CNPq fellowships. Also, A. Costa-Malaquias, J.R. Souza-Monteiro and G.P.F. Arrifano thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA, Brazil) and Coordenação de Aperfeiçoamento de

Abstract

Human exposure to relatively low levels of methylmercury is worrying, especially in terms of its genotoxicity. It is currently unknown as to whether exposure to low levels of mercury (below established limits) is safe. Genotoxicity was already shown in lymphocytes, but studies with cells of the CNS (as the main target organ) are scarce. Moreover, disturbances in the cell cycle and cellular proliferation have previously been observed in neuronal cells, but no data are presently available for glial cells. Interestingly, cells of glial origin accumulate higher concentrations of methylmercury than those of neuronal origin. Thus, the aim of this work was to analyze the possible genotoxicity and alterations in the cell cycle and cell proliferation of a glioma cell line (C6) exposed to a low, non-lethal and non-apoptotic methylmercury concentration. Biochemical (mitochondrial activity) and morphological (integrity of the membrane) assessments confirmed the absence of cell death after exposure to 3 μ M methylmercury for 24 hours. Even without promoting cell death, this treatment significantly increased genotoxicity markers (DNA fragmentation, micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds). Changes in the cell cycle profile (increased mitotic index and cell populations in the S and G₂/M phases) were observed, suggesting arrest of the cycle. This delay in the cycle was followed, 24 hours after methylmercury withdrawal, by a decrease number of viable cells, reduced cellular confluence and increased doubling time of the culture. Our work demonstrates that exposure to a low sublethal concentration of MeHg considered relatively safe according to current limits promotes genotoxicity and disturbances in the proliferation of cells of glial origin with sustained consequences after methylmercury withdrawal. This fact becomes especially important, since this cellular type accumulates more methylmercury than neurons and displays a vital role protecting the CNS, especially in chronic intoxication with this heavy metal.

ANEXO D – ARTIGO SUBMETIDO NÃO RELACIONADO A TESE

1) Artigo submetido na revista *Phytomedicine* (fator de impacto: 2,937)

CLARIFIED AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA*) JUICE AS ANTICONVULSANT AGENT: *IN VITRO* MECHANISTIC STUDY ON GABERGIC TARGETS

Gabriela P.F. Arrifano^{a,b}, Mathieu P. Lichtenstein^a, José Rogério Souza-Monteiro^b, Marcelo Farina^c, Hervé Rogez^d, Cristina Suñol^{a,*}, Maria Elena Crespo-López^{b,*}

^a Departament of Neurochemistry and Neuropharmacology, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), IDIBAPS, CIBERESP, Barcelona, Spain

^b Laboratório de Farmacologia Molecular (Instituto de Ciências Biológicas) and ^d College of Food Engineering and Centre for the Valorization of Bioactive Compounds from Amazonia, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, Brazil

^c Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, Brazil.

*** These authors have equal contributions**

Corresponding authors:*Maria Elena Crespo López**

Laboratório de Farmacologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará (UFPA). Rua Augusto Corrêa 01, Campus do Guamá. 66075-110 Belém-PA, Brasil. Phone: +559132018212; Fax: +559132017930

E-mail: maria.elena.crespo.lopez@gmail.com

Cristina Suñol

Departament of Neurochemistry and Neuropharmacology, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), IDIBAPS, CIBERESP. Rosselló 161, 08036 Barcelona, Spain. Phone: +34933638318; Fax: +34933638301.

E-mail: csenqi@iibb.csic.es

Abstract

Background: Seizures affect more than 50 million people and about 30% is refractory to the present pharmacological arsenal. Recently the anticonvulsant properties of clarified açai (*Euterpe oleracea*, EO) juice were shown with results similar to diazepam in an *in vivo* model with pentylentetrazol, a blocker of the GABA_A receptor. **Purpose:** This work carried out a mechanistic study with the main gabaergic targets for anticonvulsant drugs, analyzing the effect on the benzodiazepine and picrotoxinin binding sites of the GABA receptor, and the GABA uptake in cultured neurons and astrocytes. **Study Design:** Primary cultures of cortical neurons and astrocytes were treated with EO (0-25%) for up to 90 min. **Methods:** [³H]flunitrazepam and [³H]TBOB bindings, [³H]GABA uptake, cell viability and morphology were assayed. **Results:** Non-lethal concentrations of EO increased the agonist binding and decreased the antagonist binding in cortical neurons. Low concentrations significantly inhibited the GABA uptake, especially in astrocytes, suggesting a possible accumulation of endogenous GABA in the synaptic cleft. **Conclusions:** Our results demonstrated, for the first time, that EO can improve the gabaergic neurotransmission through interaction with GABA_A receptor and modulation of the GABA uptake. Knowing these molecular mechanisms will help in the treatment of this disease, especially considering that nearly 80% of all epileptic patients live in developing countries and with approximately 75% of them with inadequate treatment. Because geographical isolation and low purchasing power are main reasons making it difficult the access to treatment, the study of this fruit juice (easily available for these populations) may create an important impact.

Keywords: seizure; GABA; anticonvulsant; binding; Amazon; acai.

Abbreviations: EO, clarified açai (*Euterpe oleracea*) juice; GABA, gamma-amino butyric acid; PTZ, pentylentetrazol; TBOB, t-butylbicycloorthobenzoate; GAT, GABA transporter.

----- Forwarded message -----

From: **Ingrid Maier** <im_phytomedicine@t-online.de>
 Date: 2016-07-20 18:04 GMT-03:00
 Subject: Submission Confirmation
 To: maria.elena.crespo.lopez@gmail.com, ecrespo@ufpa.br

Dear Prof. Maria Elena Crespo-López,

We have received your article "CLARIFIED AÇAÍ (EUTERPE OLERACEA) JUICE AS ANTICONVULSANT AGENT: IN VITRO MECHANISTIC STUDY ON GABERGIC TARGETS" for consideration for publication in Phytomedicine as Short Communication

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.