



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

FÁBIO BRANCHES XAVIER

**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA, HORMONAL E DE PARÂMETROS DE
CRESCIMENTO NA EXPOSIÇÃO PÓS-NATAL AO METILMERCÚRIO EM
RATOS WISTAR**

BELÉM-PA

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL

FÁBIO BRANCHES XAVIER

**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA, HORMONAL E DE PARÂMETROS DE
CRESCIMENTO NA EXPOSIÇÃO PÓS-NATAL AO METILMERCÚRIO EM
RATOS WISTAR**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará para obtenção do grau de Doutor.

Orientadora: Dra. Maria da Conceição Nascimento Pinheiro

BELÉM-PA

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

X3a Xavier, Fábio Branches
Avaliação bioquímica, hormonal e de parâmetros de crescimento na exposição pós-natal ao metilmercúrio em ratos wistar. – Belém- PA: UFPA, 2016. 58 fls.

Orientadora: Dra. Maria da Conceição Nascimento Pinheiro

Tese (Doutorado em Doenças Tropicais) Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará. UFPA, 2016.

1. Hormônio do crescimento. 2. Metilmercúrio. 3. Crescimento e desenvolvimento. I. Pinheiro, Maria da Conceição Nascimento. II. UFPA. Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará. III. Título.

CDD 21 ed. 612.405

FÁBIO BRANCHES XAVIER

**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA, HORMONAL E DE PARÂMETROS DE
CRESCIMENTO NA EXPOSIÇÃO PÓS-NATAL AO METILMERCÚRIO EM
RATOS WISTAR**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará para obtenção do grau de Doutor.

Orientadora: Dra. Maria da Conceição Nascimento Pinheiro

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Maria da Conceição Nascimento Pinheiro
Orientadora NMT/UFPA

Prof^º. Dr. Moisés Hamoy
Membro ICB/UFPA

Prof^º. Dr. José Luis Fernandes Vieira
Membro ICS/UFPA

Prof^ª. Dr. Anderson Raiol Rodrigues
Membro NMT/UFPA

Prof^º. Dr. Givago da Silva Souza
Membro NMT/UFPA

DATA DA DEFESA: ___/___/___

RESULTADO:

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Dra. Maria da Conceição Nascimento Pinheiro, pelo apoio incondicional à todas as minhas atividades no Núcleo de Medicina Tropical. Sempre orientando e conduzindo os estudos com competência e ética.

Ao Prof. Dr. Moisés Hamoy por todo apoio com os procedimentos experimentais do estudo. O referido abriu as portas do Laboratório de Toxicologia de Produtos Naturais e auxiliou em todas as etapas do experimento.

Ao Prof. Dr. José Luis Fernandes Vieira pelo grande auxílio nas etapas iniciais e conclusivas do estudo, auxiliando sempre nas questões de toxicologia, estatística e organização dos resultados.

À amiga Dra. Elza Baia Brito pelo apoio e por ter oportunizado minha entrada no Núcleo de Medicina Tropical ainda quando na graduação.

Ao meu mestre Dr. Raimundo Camurça de Menezes pelos ensinamentos.

Ao Dr. Luís Carlos de Lima Silveira, meu orientado no mestrado, grande pesquisador, presto minhas homenagens a sua memória.

Ao Dr. Anderson Raiol Rodrigues pelo apoio no NMT/UFPA.

Aos meus pais Ilson da Silva Xavier e Sônia Maria Branches Xavier, por tudo que fizeram pela minha educação e ainda fazem para me ver avançando.

À Minha esposa Suelem Cristina Luchetti pela luta no dia-a-dia.

Às minhas filhas Ana Luiza, Beatriz e Izabelle pela alegria que me fazem sentir.

A meus amigos Marcello Figueiredo e Mauro Magno pelas discussões científicas.

Ao meu Amigo Dr. Rogério dos Anjos Miranda pelos anos em que estivemos fazendo pesquisa no NMT/UFPA.

Enfim à todos que direta ou indiretamente colaboraram para realização desta Tese.

AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA, HORMONAL E DE PARÂMETROS DE CRESCIMENTO NA EXPOSIÇÃO PÓS-NATAL AO METILMERCÚRIO EM RATOS WISTAR

RESUMO

Os efeitos do metilmercúrio sobre o hormônio de crescimento e a relação com a função hepática, peso e crescimento foram avaliados em modelo experimental de exposição aguda e subcrônica ao mercúrio em 40 ratos wistar, machos, os quais foram distribuídos em quatro grupos: controle, agudo, subcrônico2 (SB2) e subcrônico3(SB3). Medidas de mercúrio total(HgT), hormônio do crescimento (GH), glicose, atividades das enzimas ALT e AST além do peso e comprimento dos animais foram aferidos em todos os grupos. Os resultados demonstraram que a dose de 25mg/Kg administrada foi letal para todos os animais desse grupo. As concentrações de mercúrio medidas no pelo dos animais dos grupos SB2 e SB3 foram significativamente maiores que os do grupo controle. Os níveis de GH foram elevados no grupo agudo e reduzidos nos grupos subcrônicos. A redução da glicemia dos animais dos grupos subcrônicos foi altamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,01$). As provas de função hepática mostraram-se alteradas, principalmente a AST. Esses resultados sugerem que, metilmercúrio no modelo do rato e nas doses administradas é hepatotóxico, é capaz de comprometer o controle da glicemia e de promover alterações significativas nos níveis de GH, os quais podem interferir principalmente no crescimento dos animais. Novos estudos são necessários para melhor compreensão das alterações encontradas.

Palavras chave: Hormônio do Crescimento, Metilmercúrio, Crescimento e Desenvolvimento.

BIOCHEMICAL, HORMONAL AND GROWTH PARAMETERS EVALUATION IN THE POST-CHRISTMAS EXPOSURE TO METHYLMERURUS EXPOSURE IN WISTAR RATS

ABSTRACT

Abstract

The effects of methylmercury on growth hormone and its relation to liver function, weight and growth were evaluated in an experimental model of acute and subchronic exposure with mercury. Forty wistar rats were divided into four groups: control, acute, subchronic2 (SB2) and subchronic3 (SB3). Measurements of total mercury (HgT), growth hormone (GH), glucose, ALT and AST enzyme activities, body weight and length of animals were measured in all groups. The results demonstrated that the dose of 25mg/kg was lethal for all animals in this group. The concentrations of mercury measured in the hair's from the SB2 and SB3 groups were significantly higher than in the control group. GH levels were elevated in the acute group and reduced in the subchronic groups. The reduction of glycemia in the subchronic groups was highly significant in relation to the control group ($p < 0.01$). The ALT and AST enzyme activities were altered. These results suggest that methylmercury high doses administered is hepatotoxic, able of to compromise glycemic control and to promote significant alterations in GH levels, which may interfere in the growth of the animals. However, other studies are required to understand the alterations found.

Keywords: Growth Hormone, Methylmercury, Growth and Development.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartatoaminotransferase
cm	Centímetros
dp	Desvio-padrão
EROS	Espécies reativas de oxigênio
g	Gramas
GSH	Glutathiona
GH	Hormônio do crescimento
Hg	Mercúrio
HGRH	Hormônio liberador do hormônio do crescimento
HgT	Mercúrio total
IGF-1	Fator de crescimento insulina-símile
kg	Quilograma
Md	Mediana
MeHg	Metilmercúrio
SB2	Grupo subcrônico número 2
SB3	Grupo subcrônico número 3
X	Média Aritmética
Σ	Soma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	09
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
	2.1. O MERCÚRIO.....	12
	2.2. MERCÚRIO E MEIO AMBIENTE.....	13
	2.3. TOXICIDADE DO MERCÚRIO.....	16
	2.4. COMPLEXO METILMERCÚRIO, GLUTATIONA E L-CISTEÍNA.....	19
	2.5. LESÕES CELULARES CAUSADAS PELO METILMERCÚRIO.....	20
	2.6. HORMÔNIO DO CRESCIMENTO E SOMATOMEDINA.....	21
3	OBJETIVOS.....	25
	3.1. OBJETIVO GERAL.....	25
	3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
	4.1. ANIMAIS EMPREGADOS – POPULAÇÃO DE ESTUDO E CONDICIONAMENTO.....	26
	4.2. EXPOSIÇÃO DOS ANIMAIS AO METILMERCÚRIO.....	27
	4.3. AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DOS ANIMAIS.....	27
	4.3.1. AVALIAÇÃO PONDERAL.....	27
	4.3.2. AVALIAÇÃO DO COMPRIMENTO.....	28
	4.4. PROCEDIMENTOS ANESTÉSICOS, CIRÚRGICOS E LAPAROTOMIA.....	28
	4.5. PREPARO DE SOLUÇÕES.....	28
	4.5.1. SOLUÇÃO DE CLORETO DE METILMERCÚRIO.....	28

4.6. COLHEITA DE AMOSTRAS DE PELO E QUANTIFICAÇÃO DE HGT.....	29
4.7. ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	30
4.7.1. DOSAGEM DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO (GH).....	30
4.7.2. PROVAS DE FUNÇÃO HEPÁTICA.....	30
4.7.2.1. QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA ASPARTATOAMINOTRANSFERASE (AST).....	30
4.7.2.2. QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT).....	31
4.7.2.3. DOSAGEM DA GLICEMIA.....	31
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5 RESULTADOS.....	33
6 DISCUSSÃO.....	37
CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
ANEXOS.....	54

1.INTRODUÇÃO

O Mercúrio é um contaminante ambiental oriundo de eventos naturais e de atividades antropogênicas. Ele existe no ambiente em três diferentes formas químicas: vapor de mercúrio elementar, sais de mercúrio inorgânico e compostos orgânicos. O metabolismo e os efeitos tóxicos em humanos e animais parecem similares e são dependentes de sua forma química. Os compostos orgânicos de mercúrio têm sido amplamente estudados em humanos com relação à toxicidade sobre o neurodesenvolvimento infantil, em particular, na exposição pré-natal. As evidências epidemiológicas e em estudos envolvendo modelos experimentais indicam que o SNC em desenvolvimento é o alvo preferido para os efeitos deletérios do metilmercúrio (DEBES *et al*, 2006; CLARKSON, 2006; DAVIDSON, 2011).

Em humanos, vários estudos mostraram os efeitos da neurotoxicidade na exposição pré-natal a baixos níveis de exposição. Em longo prazo, a exposição ao metilmercúrio pode causar prejuízo no desenvolvimento de crianças expostas através da dieta. Em modelos animais, ratos têm sido escolhidos por reproduzirem em laboratório os efeitos da exposição aos diferentes compostos de mercúrio tanto na fase pré como pós-natal. No período pós-natal os roedores apresentam um rápido desenvolvimento, distinto em fases que evoluem do nascimento ao final do período de desmame. Além disso, roedores jovens apresentam período pós-natal inicial onde há marcado desenvolvimento e crescimento dos órgãos e do corpo. Esse estágio tem sido chamado “fase do rápido desenvolvimento cerebral”, e o cérebro é destacado por ser o órgão fundamental no desenvolvimento de um organismo, além de reproduzir lesões que são observadas em humanos expostos ao mercúrio. Os três períodos principais correspondem todos a idade de aleitamento materno, começando ao nascer e continuando até entorno de 3 semanas

(primeiro estágio: de 0 a 6 dias, o segundo estágio vai de 8 a 12 dias e 3º estágio entre o 17 ao 23 dia da vida pós-natal). Durante o estágio do crescimento cerebral há uma notável síntese de RNA, DNA, proteína e mielina e consequente aumento no volume e peso dos órgãos (BRAGADIN *et al*, 2002; CASTOLDI *et al*, 2008; MELO *et al*, 2012; BITTENCOURT *et al*, 2013; SOUZA *et al*, 2014).

Quanto ao gênero, alguns estudos têm mostrado que ratos machos são mais susceptíveis a intoxicação ao cloreto de mercúrio (HgCl₂) do que ratos fêmeas (MALAGUTTI *et al*, 2009; EKSTRAND *et al*, 2010). Por essas características este modelo tem sido utilizado para esclarecer várias questões observadas em humanos.

Na exposição pós-natal, os estudos realizados em roedores buscaram demonstrar os efeitos sobre a atividade neurocomportamental. Dreier *et al*, (2009) utilizaram animais submetidos a uma exposição subcrônica ao metilmercúrio para analisar os efeitos sobre o sistema dopaminérgico e verificaram que o transporte de dopamina estava alterado. Em outro estudo, Sokolowski *et al*, (2011) verificaram que, ratos com sete dias submetidos a baixos níveis de exposição ao MeHg são capazes de desenvolver neurotoxicidade que é dependente de aumento das caspases, enzimas relacionadas a apoptose.

Ratos “wistar” jovens mostraram alterações nas enzimas hepáticas quando submetidos à exposição subcrônica, sugerindo que essa espécie pode ser considerada modelo para estudos de toxicidade hepática causada pelo mercúrio (GARLET *et al*, 2009). Animais adultos machos submetidos à intoxicação por mercúrio mostraram aumento da peroxidação lipídica e nas atividades das enzimas hepáticas no plasma, a alaninaaminotransferase (ALT) e aspartatoaminotransferase (AST), ambas marcadores de lesão hepática (AGARWAL *et al*, 2010; PAL and GHOSH, 2012).

Peso e estatura são parâmetros antropométricos muito utilizados para avaliar estado nutricional de crianças (MONTEIRO, *et al* 2016). Na exposição ao mercúrio são escassos os estudos tanto em humanos como em modelos de animais experimentais, em particular na exposição pós-natal. Em humanos, recentes estudos demonstraram que metilmercúrio oriundo da dieta não afetou o peso, porém mostraram indícios de alteração estatural (XAVIER *et al*, 2011; LIMA *et al*, 2015). Em modelo animal, Sakamoto *et al*, (1993) também havia avaliado o peso de ratos submetidos ao metilmercúrio e demonstrou que o ganho de peso do corpo desses animais variou em diferentes fases do desenvolvimento.

Há evidências que exposição a químicos ambientais considerados disruptores endócrinos podem estar associados ao diabetes e à obesidade (LEE *et al*, 2006; VASILIOUS *et al*, 2006). É vasta a literatura sobre a relação da glicemia com o peso, em humanos. Porém, é muito escassa em modelo animal exposto ao mercúrio. Por outro lado, não se conhece o comportamento do comprimento dos animais e sua relação com o hormônio de crescimento. Este é o primeiro estudo que avaliou os efeitos do metilmercúrio sobre o comprimento dos animais e sobre os níveis do hormônio de crescimento.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. O Mercúrio

Pertencente à classe dos metais, o mercúrio é líquido a temperatura ambiente, não tem cheiro e apresenta uma cor prateada. O uso do mercúrio pelo homem é relatado em documentos históricos antes da era Cristã. Pós era cristã, sabe-se que gregos, chineses e romanos herdaram o conhecimento do uso do mercúrio dos egípcios. O uso do metal alcançou todo o continente europeu e foi estudado cientificamente pela primeira vez por alquimistas gregos e romanos. Posteriormente os romanos utilizaram o termo “hydrargirium” e determinaram sua simbologia como Hg. O metal foi caracterizado quimicamente como um “metal pesado” de cor prateada que ocorre em estado físico natural líquido a temperatura ambiente. Atualmente sabe-se que é um metal com alta densidade (13,6 g/mL) e bastante volátil, liquefazendo-se a temperatura em torno de 38,9°C. Com ampla distribuição no ambiente, o metal, não apresenta nenhuma função biológica benéfica às diversas reações bioquímicas e fisiológicas que ocorrem no organismo humano (BISINOTI & JARDIM, 2004).

Quimicamente o mercúrio pode figurar no ambiente sob a forma de compostos inorgânicos e orgânicos. As formas inorgânicas podem se apresentar como mercúrio elementar (Hg^0) e bivalente (Hg^{++}). O metilmercúrio (MeHg) é a forma orgânica que acarreta neurotoxicidade (MALAGUTTI, *et al* 2009). Devido as diversas espécies químicas, este metal é bastante utilizado nas indústrias e nos processos artesanais de extrativismo mineral, o que provocou vários acidentes, muitas vezes letais à saúde humana. O mercúrio metálico é utilizado na fabricação de termômetros, amálgmas dentários, termostatos, barômetros, baterias, entre outros (ROOS, 2009; LOHREN, 2015).

Os vapores de mercúrio são estáveis e podem residir no ambiente por até um ano. O mercúrio metálico pode ser captado pela vegetação e ser introduzido ao solo, ou oxidado lentamente na atmosfera, gerando íons de mercúrio que serão trazidos ao solo, lagos e rios através das chuvas. Outras formas como cloreto mercurioso e o citratomercúrico foram utilizados na composição de cremes anti-sépticos, diuréticos e na fabricação de chapéus, (MALAQUIAS, 2015).

2.2. Mercúrio e meio ambiente

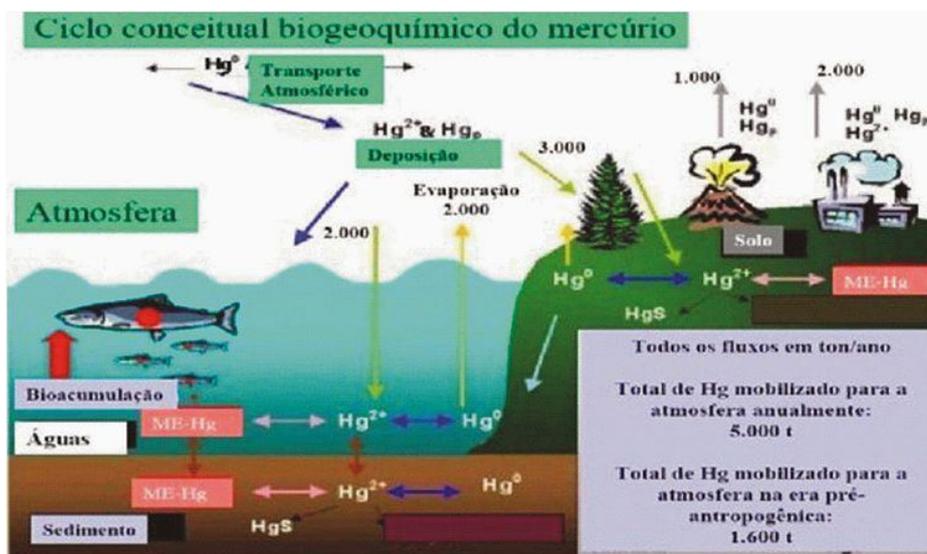
O mercúrio é considerado um poluente ambiental de alto risco, sendo regulado pela US EPA (United States Environmental Protection Agency). A preocupação a respeito da poluição do mercúrio surge dos efeitos à saúde decorrentes da exposição por mercúrio metilado (que é extremamente tóxico) encontrado na água e alimentos aquáticos (US EPA, 1997).

O mercúrio inorgânico pode ser convertido em metilmercúrio e dimetilmercúrio pela ação de microrganismos (bactérias metanogênicas), particularmente nos sedimentos de grandes rios e mares. A biotransformação do mercúrio inorgânico em metilmercúrio representa um sério risco ambiental visto que ele se acumula na cadeia alimentar aquática por um fenômeno chamado bioamplificação, isto é, a concentração do metal aumenta à medida que ele avança nos níveis tróficos. Portanto, por ter a capacidade de permanecer por longos períodos nos tecidos do organismo, este elemento poderá ser encontrado nos peixes predadores da extremidade da cadeia em concentrações elevadas, culminando, finalmente, no regime alimentar dos humanos (SOUZA *et al*, 2014).

A maioria dos rejeitos de mercúrio liberados ao ambiente são provenientes de fontes antropogênicas, sendo resíduos industriais ou de garimpos de ouro. Estima-se que

no Brasil já foram lançadas cerca de 200 toneladas/ano de mercúrio no ambiente (LACERDA, 1997; XAVIER, 2011).

A disponibilidade do mercúrio nos diferentes compartimentos ambientais está diretamente ligada às formas químicas do metal, isto é, metálicas, orgânica e inorgânica. O mercúrio metálico (Hg^0) ocorre sob a forma líquida no ambiente, e por alterações de temperatura e pressão volatilizam. Este vapor (gás monoatômico) é extremamente tóxico e permanecer na atmosfera por tempo variável. Na atmosfera o Hg^0 pode sofrer oxidação, a partir da reação com o ozônio (O_3) e pela ação da luz solar, acarretando a perda de um e dois elétrons, sendo convertido aos estados mercurioso (Hg^{+1}) e mercuríco (Hg^{+2}), respectivamente. O tempo de permanência do mercúrio metálico na atmosfera é estimado entre seis dias a dois anos, dependendo das condições climáticas locais. Devido a variação de tempo de permanência do metal na atmosfera, a probabilidade da contaminação ambiental se estender a áreas longínquas é elevada (CÂMARA *et al*, 2001; UNEP, 2013).



Fonte: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA)

Figura 1. Ciclo biogeoquímico do mercúrio.

Existem relatos de diversos acidentes causados pelo uso indiscriminado do mercúrio e seus compostos em todo o mundo acarretando grandes impactos sobre diversos grupos populacionais as comunidade, o que levou a pesquisar para melhor caracterização dos efeitos tóxicos deste metal sobre a saúde humana. Dentre esses acidentes ocorridos pelo mundo, destacam-se o de Minamata, no Japão que resultou em dezenas de mortes e centenas de sequelados neurológicos, conforme Harada, (1998). A causa de intoxicação foi a ingestão de peixes contaminados por metilmercúrio produzido por uma fábrica de aldeído acético, cujo rejeito foi lançado diretamente na Baía de Minamata contaminando o pescado utilizado pela dieta dos pescadores e familiares da região. Após anos de estudo e observações dos sinais e sintomas, a doença foi denominada de doença de Minamata, a qual foi considerada o primeiro grande relato de contaminação ambiental e exposição humana por mercúrio orgânico envolvendo diretamente a cadeia alimentar (HARADA, 1998; MAGNO, 2009).

Na década de 70, do século passado, um acidente de grande proporção atingiu o Iraque devido ao consumo de pães fabricados com trigo tratado com praguicidas contendo mercúrio. Outro acidente similar, porém, com menor gravidade ocorreu no Canadá, causado por uma fábrica de soda caustica que utilizava o mercúrio como catalizador (XAVIER, 2003; AMORAS, 2011).

2.3. Toxicidade do mercúrio

O mercúrio e seus compostos são quimicamente ativos e dependendo da concentração no tecido animal, pode desnaturar proteínas, inativar enzimas e modificar membranas celulares com prejuízo de suas funções, podendo causar morte celular e destruição tecidual. Os danos em nível celular são graves e estão associados ao estresse oxidativo, peroxidação lipídica e disfunção mitocondrial, além de perturbar a transmissão

sináptica, a formação de microtúbulos e o transporte de aminoácidos (MALAQUIAS, 2015).

Quase todas as propriedades biológicas do mercúrio podem ser explicadas por sua grande afinidade pelos radicais sulfidríla – SH - de proteínas, enzimas e substâncias de menor peso molecular como a coenzima A e o aminoácido Cisteína (Cys). A ligação com os radicais SH se faz facilmente por ligação covalente simples. Estudos sobre a toxicocinética do metilmercúrio revelaram que esta forma orgânica possui maior solubilidade quando comparada a forma inorgânica. Sendo assim, o metilmercúrio tem plena passagem pelas membranas celulares e absorção em torno de 90% a 95% pelo trato gastrointestinal (US EPA, 1997; BISINOTI & JARDIM, 2004).

O metilmercúrio ingerido e absorvido pelo trato gastrointestinal sofre intenso efeito de primeira passagem, sendo excretado pela bile, e novamente reabsorvido. Pequena fração é excretada pelas fezes como um complexo glutatona-metilmercúrio. Parte do mercúrio presente na bile pode sofrer recirculação entero-hepática prolongando desta forma a meia vida no organismo (NORSERTH & CLARKSON, 1970; DUTCZAK *et al.*, 1991; CORTÊS, 2008).

Quanto a excreção, somente 10% do MeHg tem excreção renal, o restante retorna a circulação entero-hepática ou sofre a desmetilação em nível intestinal e sistema imunológico, sendo que a maior parte desse MeHg é eliminado na forma inorgânica. No fígado, as células hepáticas convertem o MeHg a forma inorgânica, outro local que também ocorre essa conversão são nas células astrogliais do cérebro. O mercúrio inorgânico tem sido a principal forma encontrada em tecido de humanos que foram a óbito após exposição prolongada ao MeHg (PATRICK, 2002).

A intoxicação por mercúrio inorgânico é caracterizada por agressão ao sistema gastrointestinal, túbulos renais e sistema respiratório (após a exposição por inalação), enquanto a intoxicação crônica por mercúrio inorgânico pode ser neurotóxica. Compostos de mercúrio inorgânico causam coagulação da mucosa do trato alimentar, propiciando o desenvolvimento rápido de gastroenterite. Os animais que sobrevivem aos distúrbios do trato alimentar e absorvem mercúrio podem apresentar sintomas de lesão nos capilares periféricos, os existentes nos pontos por onde o mercúrio é excretado, podendo resultar em nefrose, colite e estomatite (BONACKER *et al*, 2004; CORTÊS, 2008; GARLET *et al*, 2009).

A toxicidade crônica ocorre quando são ingeridas pequenas quantidades de mercúrio inorgânicas por longos períodos. A síndrome consiste em depressão, anorexia, emaciação, andar rígido, podendo progredir para paresia, alopecia, prurido, petéquias, diarreia persistente, fraqueza, coordenação, convulsões e morte. A toxicidade aguda por mercúrio pode ser decorrente da ingestão acidental de compostos contendo esse metal, principalmente o cloreto de mercúrio que é venenoso ou fungicidas mercuriais orgânicos (BERNHOF, 2012).

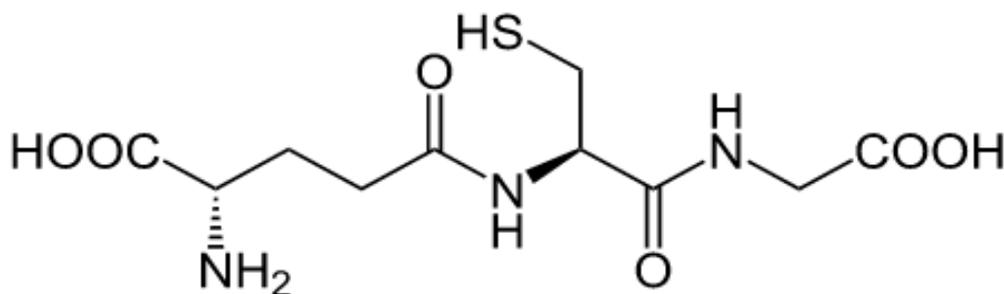
O envenenamento também ocorre como absorção em excesso de uma solução antissépticabiclorada ou pela absorção de iodeto mercúrio, em decorrência da inalação de vapores provenientes do mercúrio metálico. Nesses casos, os sinais clínicos que surgem em questão de horas são dor de cólica intensa, vômito, ediarreia. A principal lesão é de gastroenterite grave e talvez hemorrágica. A mucosa gástrica sofre necrose de coagulação, uma alteração comparável a que ocorre nos tecidos submetidos a fixadores mercuriais no laboratório de patologia. O sistema nervoso central (SNC) é bastante suscetível às diferentes formas de mercúrio, particularmente ao mercúrio metálico e metilmercúrio. Os

sintomas marcantes da intoxicação pelo mercúrio metálico são tremores, alterações visuais e auditivas, insônia, cefaléia, alterações de personalidade e perda de memória, irritabilidade e nervosismo (CASARETT, 2001).

Na intoxicação crônica pelo metilmercúrio há evidências que o tecido nervoso pode apresentar sinais de neuropatias e síndromes semelhantes à esclerose lateral amiotrófica, podendo ocorrer também, distúrbios sensoriais, ataxia cerebelar e disartria. Em ordem de susceptibilidade, as crianças apresentam maior risco de agressão ao SNC quando comparadas aos adultos (LEBEL, *et al* 1998). A compreensão se torna clara quando se observa que o metilmercúrio pode atravessar a barreira placentária e causar danos ao feto. No período pós-natal, as crianças podem ser expostas através do leite materno. Tavares *et al*, (2005), afirmam que o metilmercúrio nas crianças pode acarretar perda de coordenação motora, déficits de desenvolvimento, alteração na fala e movimentos finos e ainda um impacto deletério sobre o quociente de inteligência.

2.4. Complexo Metilmercúrio, Glutathiona e L-Cisteína.

A glutathiona (GSH) é um potente antioxidante que atua na biotransformação e eliminação de uma série de xenobióticos e na defesa de células contra o estresse oxidativo. É o mais abundante tiol de baixa massa molecular. Na verdade, trata-se de um tripeptídeo encontrado em altas concentrações no meio intracelular, apresentando-se constituída pelo ácido glutâmico, a cisteína (Cys) e a glicina (HUBER & ALMEIDA, 2008).

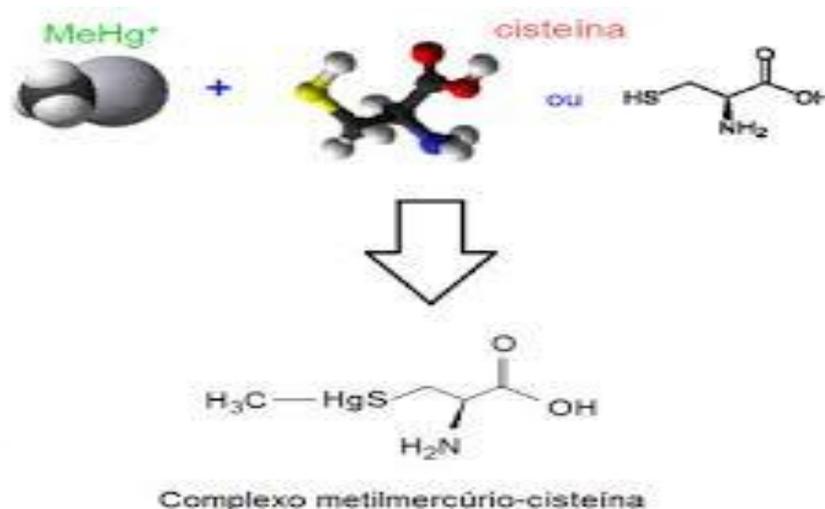


Fonte: Universidade de Brasília – Unb - <https://radicaislivres97.wordpress.com/2013/07/>

Figura 2. Estrutura molecular da Glutathiona (GSH).

A biossíntese da GSH ocorre no meio intracelular (exceto em células epiteliais) pela ação consecutiva de duas enzimas. A GSH promove a detoxificação dos xenobióticos em três fases: I, II e III. Apesar de distintas, todas estão interligadas. As fases I e II promovem a transformação dos xenobióticos em espécies solúveis em água, o que consequentemente reduz a toxicidade. A fase III é responsável pelo transporte dos metabólitos para o exterior da célula e consequente excreção (PATRICK, 2002; HUBER & ALMEIDA, 2008).

Na corrente sanguínea o metilmercúrio vai estar atrelado as albuminas as hemácias e a glutathiona e/ou a cisteína. Quimicamente sabe-se que o MeHg se liga ao grupamento tiol da cisteína, formando um complexo (MeHg-Cys) que facilita o transporte de mercúrio para os tecidos, além de ser um dos principais fatores que levam a redução dos níveis de GSH. A consequência é um aumento do número de EROS e possíveis inícios de lesões celulares.



Fonte: PUC-RJ - http://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/21195/21195_2.PDF

Figura 3. Formação do complexo metilmercúrio-cisteína

2.5. Lesões celulares causadas pelo metilmercúrio

Lesões celulares podem desencadear alterações e/ou perturbações sobre o pleno equilíbrio de um sistema que em condições normais desempenham funções muito específicas. As lesões celulares surgem quando são excedidos os limites da capacidade de adaptação ao dano ou não é mais possível uma resposta adaptativa, a partir daí, seguem-se uma sequência de eventos que irão caracterizar a lesão celular. Essas lesões podem assumir caráter reversível, mas dependendo da agressão e de sua intensidade inicial e prolongamento, a lesão pode se tornar irreversível e levar a morte celular. Inúmeras podem ser as causas de lesões celulares, entretanto, as mais frequentes são causadas por hipóxia quando há perturbação da respiração oxidativa aeróbica, agressão por agentes físicos, agentes infecciosos, reações imunológicas, distúrbios genéticos, desequilíbrios nutricionais e por fim ação de agentes químicos e drogas, os xenobióticos (ROBBINS, 2004; KING, 2007).

Xenobióticos como o mercúrio podem agredir quatro sistemas intracelulares vitais as células, comprometendo a integridade das membranas celulares, respiração aeróbica envolvendo a fosforilação oxidativa e produção de ATP, a síntese de proteínas e a preservação da integridade do material genético contido no núcleo celular. Estudos comprovam que o metilmercúrio interage diretamente com o DNA e RNA, causando redução da síntese de proteínas e desarranjo na estrutura dos microtúbulos, além de produzir estresse oxidativo nas células (AMORIM *et al*, 2000; BONACKER & STOIBER, 2004; PEREIRA *et al*, 2012).

A indução da lesão causada pelo metilmercúrio está intimamente ligada a afinidade com os grupamentos sulfidrilas das proteínas. A partir de então o metal consegue desestabilizar sistemas bioquímicos complexos como a alteração da permeabilidade da membrana celular interferindo diretamente na homeostase do cálcio

por exemplo. De acordo com Roos (2009), o mercúrio pode causar um influxo de cálcio gerando a citotoxicidade pelo cálcio, o que pode levar a uma disfunção mitocondrial, pois o influxo vai fazer com que a mitocôndria aumente a captação de cálcio causando despolarização e inchaço mitocondrial. Ainda segundo o autor, esses fatores podem contribuir para o aumento do número de EROS e finalizar em apoptose/morte celular.

2.6. Hormônio do crescimento e Somatomedina

O hormônio do crescimento (GH) é sintetizado e secretado pela adenoipófise, atuando principalmente no metabolismo e crescimento humano. Este hormônio também é conhecido como hormônio somatotrópico ou somatotropina. É uma pequena molécula protéica constituída de 191 aminoácidos em cadeia única, e sintetizado e secretado por somatotrofos (células secretoras de hormônio) presentes na hipófise (SILVERTHORN, 2003).

Esse hormônio é importante na atuação sobre o crescimento e está na dependência da produção de somatomedinas, também conhecidas como fatores do crescimento. Seus efeitos vão além da estimulação do crescimento no organismo. Este hormônio exerce diversos efeitos metabólicos como: aumento da síntese de proteínas na maioria das células, aumento dos ácidos graxos livres como fonte alternativa de energia e redução da utilização da glicose. Em síntese, o GH potencializa quase todos os aspectos da captação de aminoácidos e da síntese de proteínas com intuito de evitar a degradação protéica (GUYTON & HALL, 2002).

O controle do GH é multifatorial, envolvendo vários órgãos e mediadores neuroquímicos. Especificamente, a secreção de GH é mediada por dois hormônios hipotalâmicos: o hormônio liberador do hormônio de crescimento (HGRH) e a

somatostatina que é o hormônio de inibição do GH. De acordo com Frackelton&Christensen (1998), a produção de GH está sob controle primário do sistema nervoso central (SNC) em resposta a múltiplos fatores, como estresse, sono, ritmo circadiano, exercício físico, hipoglicemia, aminoácidos como a arginina, drogas e outros hormônios, que incluem a testosterona, estrogênio e tiroxina.

Estes fatores promovem a produção do (HGRH) no hipotálamo, o qual é responsável pela produção e liberação de GH pela hipófise, que é usado para estimular o metabolismo celular em tecidos-alvo do corpo. O hormônio do crescimento também estimula a produção de outro peptídeo hormonal, o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), também denominado somatomedina, que estimula o metabolismo celular e o crescimento em tecidos alvo do corpo, assim como o GH. Contudo, atua como regulador negativo, controlando a produção de GH e GHRH. (BIANCO &RABELO, 1999; SILVERTHORN, 2003; DE PAULA & CZEPIELEWSKI, 2008; SANTOS, 2015).

De acordo com Aron *et al*, (2000), o GH promove o crescimento linear, mediado pelo IGF-1, que aumenta a síntese protéica, promovendo a captação de aminoácidos e acelerando diretamente a transcrição e translação do RNAm.

Basicamente os efeitos orgânicos associados ao GH são causados através de uma substância chamada IGF-1 ("*Insulin-Like Growth Factor-1* ou *Fator de Crescimento Insulina Símile-1*"). O fígado e outros tecidos são estimulados pelo Hormônio de Crescimento a secretar o IGF-1 que é a substância responsável pelo aumento da massa muscular, diminuição do percentual de gordura, crescimento dos nervos e ossos, aumento do colágeno com redução das rugas da pele, aumento da energia e das funções mentais, neurológicas e sexuais. Uma vez a hipófise recebendo o sinal estimulante positivo, ela então secreta GH que em troca estimula o fígado para produzir IGF-1. Esta é a substância

que está comumente medida como um marcador de substituto para produção de GH. Uma vez que os níveis de IGF-1 são bastante altos, uma mensagem de realimentação é mandada de volta à hipófise e o hipotálamo para modular secreção de GH adicional (JUNNILA *et al*, 2013).

A deficiência do GH causa nanismo (baixa estatura) em crianças. No adulto, a falta de GH ocasiona diminuição da absorção de cálcio, diminuição do fósforo plasmático, aumento da uréia e aminoácidos plasmáticos, diminuição da densidade muscular e óssea, redução do rendimento cardíaco, aumento do tecido adiposo, aumento do colesterol ruim, redução na produção de colágeno, queda do rendimento físico e prejuízo da função cognitiva. Esta deficiência pode estar relacionada à falta do próprio GH, falta de GHRH, deficiência na secreção de IGF-I ou problemas com os receptores (GUYTON, 2002; ALMEIDA, 2016).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as alterações bioquímicas, hormonais e os parâmetros de crescimento na exposição pós-natal de ratos wistar submetidos a diferentes níveis e tempo de exposição ao mercúrio.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Demonstrar a exposição pós-natal ao metilmercúrio em modelo experimental do rato wistar;
- 2- Verificar as alterações bioquímicas (glicemia e de função hepática) associadas à exposição pós-natal nas fases aguda e subcrônica da intoxicação pelo metilmercúrio;
- 3- Identificar o potencial xenobiótico do metilmercúrio sobre o hormônio de crescimento (GH);
- 4- Analisar a evolução ponderal dos animais em função do tempo e da dose de exposição subcrônica;
- 5- Analisar a evolução do crescimento linear (comprimento) dos animais em função do tempo e a dose de exposição subcrônica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais empregados - População de estudo e condicionamento

Para execução do projeto foram utilizados 40 espécimes de ratos machos da linhagem “wistar”, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Pará.

Os animais foram selecionados rigorosamente, e os pesos dos componentes de cada grupo não excederam 20%, a partir do 21º dia de nascimento.

Os procedimentos experimentais, assim como o condicionamento dos animais em condições adequadas de alojamento e manejo foram realizados no Biotério do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais da Universidade Federal do Pará (UFPA) sob parecer técnico do Dr. Moisés Hamoy. Levou-se em consideraçãoos seguintes fatores ambientais: temperatura, umidade relativa, luminosidade, exaustão eficiente e manutenção da integridade de barreiras sanitárias, garantindo desta forma, que animais pudessem responder de forma adequada e homogênea aos experimentos.

Os animais receberam 10 g/dia de dieta balanceada (Nuvilab CR-1) composta por milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e aminoácidos. A água foi disponibilizada *ad libitum*.

A solução de MeHg foi administrada via gavagem. Para o melhor controle das doses administradas os animais foram pesados diariamente e qualquer alteração implicou no ajuste da dose.

4.2. Exposição dos animais ao MeHg

O tratamento com MeHg foi realizado por via intragástrica com auxílio de gavagem e com doses de 2, 3 e 25 mg/kg/dia de MeHg. Para o grupo controle foi utilizado água destilada. Os animais foram divididos em 4 (quatro) grupos compostos por 10 animais cada. Aqueles tratados foram diferenciados pelo tempo de exposição ao MeHg em Agudos (AG) (submetidos a exposição aguda – 24h), subcrônico SB2 (sete dias de tratamento) e subcrônico SB3 (14 dias de tratamento). Os animais submetidos a exposição aguda (grupo AG) receberam 25mg/kg e foram sacrificados com 24h. Os animais submetidos a exposição subcrônica, pertenciam aos grupos SB2 e SB3. O grupo SB2 recebeu tratamento por 7 dias com uma dosagem de 2mg/kg/dia e o grupo SB3 foi tratado por 14 dias com uma dosagem de 3mg/kg/dia. O procedimento de exposição ocorreu sempre às 9:00h da manhã de cada dia e no ato da administração as dosagens foram ajustadas de acordo com o peso.

Ao término dos dias da exposição, os animais foram transportados para uma área anexa ao Laboratório Experimental, onde foram preparados para a coleta do material biológico e laparotomia.

4.3. Avaliação do desenvolvimento dos animais

4.3.1. Avaliação ponderal

A avaliação ponderal dos animais foi realizada a partir da tomada de medidas de peso (em gramas) com auxílio de uma balança de marca filizola com precisão de 0,1g. A aferição do peso foi realizada sempre antes da administração das dosagens de exposição.

4.3.2. Avaliação do comprimento

O comprimento dos animais foi aferido com uso de uma fita inelástica inextensível, em centímetros, tomando o comprimento naso-caudal. Os animais foram medidos inicialmente e com sete e quatorze dias de acordo com as etapas do experimento.

4.4. Procedimentos anestésicos, cirúrgicos e laparotomia.

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados em condições assépticas, no Laboratório Experimental do biotério do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais do Instituto de Ciências Biológicas da UFPA. Os animais foram anestesiados com uma mistura de três partes de solução de cloridrato de cetamina (Ketalar, König) para uma parte de solução de cloridrato de xilazina (Kenzol, König), na dose de 0,4 ml/Kg de peso corporal, por via intramuscular, obedecendo critérios éticos para com animais de experimentação.

Para este e demais estudos foram retirados o cérebro, o fígado e os rins dos animais e acondicionados em solução de formalina a 10%.

4.5. Preparo de soluções

4.5.1. Solução de cloreto de metilmercúrio

Os fracionamentos das soluções que foram administradas nos grupos expostos foram realizados a partir da diluição da substância cloreto de metilmercúrio e para cálculo foi utilizado como fator determinante para as doses agudas e subcrônicas a DL_{50} (Dose Letal Mediana).

4.6. Colheita de amostras de pelo e quantificação de HgT.

Amostras de aproximadamente 1 a 2g de pelo retirados da região dorsal próximo a cabeça foram acondicionadas em envelope de papel devidamente identificadas e encaminhadas para análise de mercúrio no Laboratório de Toxicologia Humana e Ambiental do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA. No laboratório, as amostras foram submetidas ao processo de lavagem em água destilada e acetona, colocadas para secar em capela de exaustão e, em seguida picotadas. Esses microfragmentos foram pesados a uma quantia aproximada de 10 µg/g e submetidos à análise de Hg-T através de espectrofotometria de absorção atômica com amalgamação em lâmina de ouro, utilizando um medidor de mercúrio automático denominado comercialmente como Mercury Analyzer (MA), modelo SP-3D da Nippon Corporation-Japão.

Os cálculos foram realizados através do programa específico do equipamento que se destina a receber e processar dados de medição dos aparelhos MERCURY MA-1 e MERCURY MD-1 (aqui referidos como “MD-1”) enviados através da interface RS-232C. O demonstrador digital do MD-1 mostra a quantidade de mercúrio contida em peso (ng) e concentração de mercúrio em ppm (parte por milhão).

Nas análises de Hg, a determinação da precisão foi obtida através de quantificação em duplicata. A acurácia estabelecida através do padrão de referência internacional denominado IAEA 085. A reprodutibilidade demonstrada através da linearidade $r=1$, por meio de uma curva de calibração, constituída de cinco pontos (0,10,20,50,100). Os resultados foram expressos em µg/g (ppm).

4.7. Análise bioquímica

4.7.1. Dosagem do hormônio do crescimento (GH)

Para dosagem do GH foi utilizado o teste imunoenzimático – Elisa para dosagem quantitativa de hormônio do crescimento humano em soro. Para alcance dos resultados foram seguidos os seguintes procedimentos:

- Pipetagem de 50µL de cada Padrão e amostras; adição de 100µL de conjugado em todas as cavidades; cobertura da microplaca e agitação delicada e incubação por 60 minutos, em temperatura ambiente;
- Lavagem por cinco vezes com 300µL de Solução de lavagem diluída; pipetagem de 100µL da Solução cromógeno-substrato em todas as cavidades, incluindo o branco; incubação por 15 minutos em temperatura ambiente, longe da luz intensa; adição de 100µL da solução bloqueadora; leitura da densidade óptica a 450nm.

4.7.2. Provas de Função Hepática

4.7.2.1. Quantificação da atividade da Aspartato Aminotransferase - AST

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

O método fundamenta-se no fato da AST catalisar a transferência do grupo amina do aspartato para o cetoglutarato com formação de glutamato e oxalacetato, o qual é reduzido a malato por ação da malatodesidrogenase (MDH), enquanto que, a coenzima NADH é oxidada a NAD⁺. A atividade da AST na amostra é calculada com base na

redução do NADH que se transforma em NAD⁺. O Valor de normalidade da AST no soro ou plasma é até 42 U/L.

4.7.2.2. Quantificação da atividade da Alanina Aminotransferase - ALT

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

O método fundamenta-se no fato da ALT catalisar a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato com formação de glutamato e piruvato, o qual é reduzido a lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD⁺. A atividade da ALT na amostra é calculada com base na redução do NADH que se transforma em NAD⁺. O valor de normalidade da ALT no soro é de até 41 U/L.

4.7.2.3. Dosagem da Glicemia

Para dosagem de glicose sanguínea os animais foram deixados em jejum por 12 horas, sendo a amostra da coleta por punção cardíaca com os animais anestesiados com quetamina e xilazina. O material foi armazenado em tubos contendo anticoagulante EDTA a 10%. Posteriormente os tubos foram centrifugados durante 10 minutos a 3500 rpm para separação do soro. Os parâmetros bioquímicos foram dosados através de analisador automatizado ABBOTT, modelo, ARCHITECT C 8000.

4.8. Análise estatística

Os dados retirados do protocolo de colheita de dados foram digitados no programa Bioestat 5.0. As medidas de tendência central e medidas de variabilidade e dispersão foram utilizadas para verificação da normalidade das distribuições, juntamente com a variância.

A normalidade dos diversos parâmetros em estudo foi determinada pelo kolmogorov-Smirnov. Para comparação das amostras independentes e distribuição não normal foi utilizado o teste U de Mann-Whitney. Nos casos em que foram testadas mais amostras utilizou-se o teste de Kruskal-wallis. Para comparar as variáveis com distribuição normal entre os grupos expostos e controle foi empregado o teste ANOVA um critério. O nível de significância adotado no estudo foi de 5%.

4.9. Aspectos Éticos

Este projeto foi submetido à análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação (CEPAE) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará coordenado pelo Prof. Dr. Wallace Gomes Leal, e foi aprovado através do parecer 261-14 (Anexo 2).

5. RESULTADOS

Os resultados demonstraram que a diferença nas concentrações de mercúrio total no pelo dos animais foi significativa quando comparados o grupo controle com os grupos subcrônicos. A diferença também foi significativa quando comparados os grupos subcrônicos 2 e 3. Na análise do hormônio do crescimento ficou evidente o aumento significativo quando comparados os níveis médios do grupo controle com o grupo de exposição aguda. Os níveis médios de hormônio do crescimento dos grupos subcrônicos 2 e 3 foram de 0,02 e 0,00 ng/mL, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração de mercúrio total e hormônio de crescimento em ratos “wistar” submetidos a diferentes níveis de exposição do MeHg.

Parâmetros	GRUPOS			
	Controle	Agudo	SB2 [#]	SB3 ^{##}
	X±dp Md (min – max)			
HgT* (µg/g)	0,67±0,09 0,67 (0,56 – 0,78)	-	1,46±0,65 1,50 (0,76 – 2,40)	1,78±1,77 1,15 (0,70 – 6,30)
GH** (ng/mL)	0,21±0,14 0,19 (0,03 – 0,39)	3,37±5,34 1,03 (0,82 – 15,4)	0,02±0,05 0,00 (0,00 – 0,15)	0,00

*Mercúrio total - Kruskal-Wallis $p < 0,05$ Controle/SB2 / $p > 0,05$ SB2/SB3
Controle/SB3

**Hormônio do crescimento - Kruskal-Wallis $p > 0,05$ Controle/Agudo

Grupo subcrônico exposto por 7 dias com 2mg/kg/dia de solução HgCl₂

Grupo subcrônico exposto por 14 dias com 3mg/kg/dia de solução de HgCl₂

X média

Md mediana

dp desvio-padrão

Ao avaliar os níveis glicêmicos médios, observou-se redução altamente significativa quando comparados o grupo controle com o grupo de animais expostos por 7 dias (SB2) ($p<0,01$) e controle com animais expostos por 14 dias (SB3) ($p<0,01$).

Quando comparadas as médias da enzima AST entre o grupo agudo e cada um dos subcrônicos observou-se uma redução estatisticamente significativa ($p<0,05$). O mesmo ocorreu quando foram comparados os grupos SB2 e SB3 ($p<0,05$). A comparação das médias da ALT do grupo agudo com os grupos subcrônicos mostrou diferença altamente significativa ($p<0,01$). Na comparação da ALT entre os grupos subcrônicos ficou evidente redução nos valores de SB2 para SB3 ($p<0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Valores bioquímicos em ratos “wistar” expostos a diferentes concentrações de metilmercúrio.

Marcadores Bioquímicos	GRUPOS			
	Controle	Agudo	SB2	SB3
	X±dp Md (min – max)	X±dp Md (min – max)	X±dp Md (min – max)	X±dp Md (min – max)
Glicemia* (mg/dL)	73,1±6,1 73 (65 – 84)	- -	60±9,5 61,5 (38-71)	62,0±6,2 61 (53 – 75)
AST** (U/dL)	-	198±53,6 201 (137 – 290)	127,5±25,5 127 (101 – 176)	121,1±16,6 111 (110 – 149)
ALT*** (U/dL)	-	31,2±7,6 33 (18 – 39)	59,0±12,6 57 (44 – 81)	50,4±6,07 51,0± (44 – 59)

*Glicemia Anova $p<0,01$ Controle/SB2 $p>0,05$ SB2/SB3
Controle/SB3

**Kruskal-wallis $p<0,05$ Agudo/SB2 $p>0,05$ SB2/SB3
Agudo/SB3

***Anova $p<0,01$ Agudo/SB2 $p>0,05$ SB2/SB3
Agudo/SB3

X média
Md mediana
dp desvio-padrão

Ao comparar a média de peso do grupo controle com o grupo SB2, pôde-se observar um aumento de peso significativo ($p < 0,03$). Na comparação do grupo controle com o grupo SB3, também ficou evidente o aumento significativo de peso ($p < 0,03$). Em relação ao tempo de exposição, o ganho ponderal do grupo controle no sétimo dia foi de 13g e ao décimo quarto dia alcançou 15,5g. O grupo SB2 ganhou em 7 dias 19,5g e o grupo SB3 ganhou 27,5g em 14 dias (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação do peso de ratos wistars submetidos a diferentes níveis de exposição.

Grupos	Peso/Tempo de Exposição			Σ (g)
	Peso (g) Inicial X±dp Md (min – max) Ganho de peso	Peso (g) 7º dia* X±dp Md (min – max) Ganho de peso	Peso (g) 14º dia** X±dp Md (min – max) Ganho de peso	
Controle	29,7±1,97 30,5 (26 – 31) -	43,3±2,1 43,5 (40 – 46) 13	41,7±1,0 41 (41 – 43) 2,5	15,5
SB2	31,9±2,2 31 (28 – 35) -	51,2±5,8 50,5 (43 – 60) 19,5	- - -	19,5
SB3	37,0±1,6 37 (35 – 40) -	-	64,0±9,1 64,5 (51 – 78) 27,5	27,5

*Mann-Whitney $p < 0,03$ Controle – SB2

**Mann-Whitney $p < 0,03$ Controle SB3

X média

Md mediana

dp desvio-padrão

Ao comparar a média de crescimento do grupo controle com o grupo SB2, ficou evidente um crescimento significativo de 6,5 cm ($p < 0,05$). Na comparação do grupo controle com SB3 foi significativo o aumento de 4,9cm ($p < 0,05$).

Quando avaliado o comprimento dos animais, observou-se no grupo controle, um ganho de 4cm ao sétimo dia e mais 1 cm ao décimo quarto dia, totalizando 5 cm de

ganho durante o experimento. No grupo SB2 observou-se um ganho de crescimento de 6,5 cm ao sétimo dia e no grupo SB3 o crescimento ao décimo quarto dia foi de apenas 4,9 cm (Tabela 4).

Tabela 4. Comparação do comprimento dos ratos dos grupos subcrônicos com o controle.

Grupos	Comprimento/Tempo de Exposição			Σ (cm)
	Comprimento (cm) Inicial X±dp Md (min – max) Ganho de comprimento (cm)	Comprimento (cm) 7º dia* X±dp Md (min – max) Ganho de comprimento (cm)	Comprimento (cm) 14º dia* X±dp Md (min – max) Ganho de comprimento (cm)	
Controle	17,3±0,8 17 (16 – 19) -	20,6±0,7 21 (19,5 – 21,4) 4	21,9±0,5 22 (21,5 – 23) 1	5
SB2	17,6±2,1 17 (16 – 23) -	23,7±1,01 23,5 (22 – 25) 6,5	- - -	6,5
SB3	18,8±1,13 19 (17 – 21) -	- - -	23,7±0,94 23,9 (22 – 25) 4,9	4,9

*Kruscal-Wallis $p < 0,05$ Controle – SB2

**Kruscal-Wallis $p < 0,05$ Controle – SB3

X média

Md mediana

dp desvio-padrão

Σ Soma

6. DISCUSSÃO

Este estudo avaliou os efeitos deletérios do MeHg em ratos machos sobre parâmetros de lesão hepática (alanina aminotransferase-ALT e aspartatoaminotransferase-AST) e sobre parâmetros de crescimento (peso e comprimento). Analisou-se ainda a glicemia como fator relacionado ao peso e hormônio do crescimento (GH) relacionado ao crescimento.

Os resultados deste estudo mostraram que uma dose de mercúrio de 25mg/kg de peso foi letal para todos os animais agudamente expostos. A resposta na maioria dos parâmetros avaliados variou entre os grupos intoxicados com 2mg e 3mg de mercúrio por kg de peso. A função hepática mostrou AST alterada, sendo mais grave nos agudos, reduzindo a gravidade no grupo SB2 e SB3. A glicose apresentou-se reduzida na exposição prolongada em relação ao grupo controle.

A exposição subcrônica ao metilmercúrio foi confirmada através da análise do HgT em amostras de pelo dos animais. Verificou-se diferença significativa entre os grupos experimentais em relação ao grupo controle, porém, entre os grupos com exposição prolongada por 7 e 14 dias não houve diferença significativa ($p > 0,05$) sugerindo que as dosagens e o tempo de exposição para os animais não influenciaram na excreção do metilmercúrio, no cabelo. Para demonstrar os efeitos crônicos do MeHg em ratos estudados por Eto *et al* (2010) estudaram a localização do mercúrio no tecido cerebral, e mostraram que na exposição animal com 5ppm o mercúrio foi detectado um ano a um ano e meio de exposição ao metilmercúrio, confirmando o efeito cumulativo desse composto. No corrente estudo, os animais expostos a 25ppm tiveram êxito letal. Essa dose foi cinco vezes acima que a administrada. Os expostos subcronicamente

com doses menores que 5ppm resistiram ao 7º e 14º dia respectivamente, entretanto, apresentaram alterações enzimáticas sugestivas de lesão hepática.

Na análise dos testes de função hepática entre os animais submetidos a diferentes concentrações de MeHg ficou evidente que a enzima mais afetada foi a AST, cuja alteração foi tanto maior quanto maior foi a dose administrada e menor o tempo de exposição, caracterizando os casos agudos - 25mg/kg, neste estudo. Apesar dos valores estarem elevados nos animais expostos subcronicamente, não houve diferença estatística significativa entre os níveis de AST dos grupos SB2 e SB3 ($p > 0,05$). Já a ALT mostrou-se dentro dos valores normais para o modelo em estudo, conforme Dantas *et al*, (2006) que estabeleceram os parâmetros bioquímicos de função hepática no modelo de ratos. Neste estudo, essa enzima não mostrou alteração nos grupos subcronicamente expostos com 2mg/kg e 3mg/kg de metilmercúrio.

De forma geral, em ratos, a ALT pode ser considerada uma enzima indicadora de dano hepático. Está aumentada nas hepatites virais, tóxicas e autoimune. Geralmente, nessas condições a AST acompanha o seu aumento, porém mais lentamente. Melo *et al*, (2008) em estudo experimental envolvendo ratos wistar para avaliação de função hepática em animais expostos a farinha de mandioca demonstraram efeitos sobre a atividade da ALT e não da AST.

De acordo com Silva (2010), na presença de lesão hepática, ambas as enzimas tendem a elevar seus níveis, sendo a ALT mais específica de lesão hepatocelular. A elevação da AST sem elevação da ALT pode ser resultante de lesão no sistema canalicular/ductos intra-hepáticos, sugerindo uma resposta à exposição prolongada ao metilmercúrio (SILVA, 2010).

No modelo de macaco *Cebusapella*, a dose de mercúrio 1,5mg/kg de peso, durante 120 dias não alterou as enzimas hepáticas em relação ao grupo controle (SILVA, 2011). Pode-se admitir que a lesão hepática causada pelo metilmercúrio depende da dose e do tempo de exposição. Apesar de não haver alterações nas enzimas hepáticas sugerindo ausência de necrose hepatocelular, a autora encontrou lesões degenerativas no fígado de macacos *Cebus apela*.

As concentrações de glicemia de jejum apresentadas pelos animais subcronicamente expostos, reduziram ao longo do período do experimento em relação aos controles, sugerindo possível efeito do mercúrio sobre a ação da insulina, resposta que foi melhorando com o tempo da exposição subcrônica. Supostamente ocorreu alguma lesão no pâncreas desses animais para justificar a hipoglicemia leve apresentada. Outra hipótese seria a possibilidade de o mercúrio aumentar a sensibilidade dos receptores de insulina para maior captação de glicose pela célula. Os valores de glicemia apresentados pelos animais controles estavam dentro dos valores de referência estabelecidos para este modelo (50 a 135mg/dL) de acordo com Cubas *et al*, (2007).

Os resultados do presente estudo sugerem que o mercúrio influenciou no peso dos ratos. Embora, os grupos tivessem apresentado diferenças no peso inicial ao experimento com os grupo controle apresentando as menores medidas, pelo ganho de peso corporal verificou-se que o grupo controle aumentou em 7 dias 13 gramas e, em 14 dias aumentou 16,5g, enquanto, o grupo SB2, no mesmo período aumentou 19,5g. O grupo SB3 ganhou no período 27,5g. Em ambos os grupos expostos o ganho de peso foi maior que o do grupo controle. A relação entre ganho de peso e metilmercúrio tem sido pouco avaliado tanto em humanos como em modelo experimental. Em humanos, Karmauset *al* (2009) estudando a exposição materna ao DDE durante a gravidez verificaram aumento de peso

e IMC em mulheres adultas exposta no pré-natal com aumento na frequência de pessoas com aumento da gordura corporal.

Os animais expostos subcronicamenteganharam peso à medida que prolongou o tempo de exposição. O ganho de peso pode ser explicado por possíveis efeitos do mercúrio na exposição prolongada a baixas concentrações sobre os receptores de insulina. O mercúrio influenciando na resistência insulínica contribuiria para o acúmulo de gordura a partir da transformação do excesso de glicose em triglicérides e conseqüentemente distribuição da gordura nos tecidos periféricos e no próprio fígado resultando no aumento do peso. Essa premissa pode ser admitida, considerando que neste estudo observou-se uma queda da insulina até o 7º dia e elevação lenta até ao 14º dia, apesar de, não haver diferença significativa entre os dois grupos SB2 e SB3.

Defeitos no metabolismo lipídico são responsáveis por grande parte da patogenicidade da doença hepática gordurosa não alcoólica que pode ocorrer ou por um desequilíbrio entre a ingestão e a queima de energia ou por resistência periférica à insulina, resultando no acúmulo intracelular de lipídios (LEMOS, 2010).

Algumas evidências em humanos apontam para o efeito xenobiótico de substâncias químicas orgânicas(DDT, DDE, metilmercúrio, arsênio, cádmio) estejam associados com o aumento do peso corporal e o índice de massa corporal (IMC)(SONNEMSCHEIN &SOTO, 1998;MESEGNER, PUCHE, CABERO, 2002; KARMAUS *et al*, 2009). Muitos dos poluentes ambientais se associam a obesidade provavelmente pelo efeito estrogênico, cujos mecanismos incluem: bloqueio de androgênio, uma fraca mimetização estrogênica em mulheres ou indução da aromatase (SONNEMSCHEIN and SOTO, 1998).

O comprimento dos animais, apesar da progressão, deixa uma diferença a ser pesquisada, pois os animais expostos por menor período de tempo (7 dias) tiveram ganho de comprimento maior em relação aos expostos por maior período (14 dias). Não há registro na literatura de estudos que tenham analisado o crescimento pondero-estatural de animais experimentais expostos ao mercúrio, tratando-se este de um ensaio pioneiro na investigação dos efeitos da exposição ao metilmercúrio sobre o crescimento e desenvolvimento de animais.

É possível que a duração da exposição para o modelo usado seja curta para evidenciar alterações no crescimento, considerando que em humanos as alterações (atraso) no crescimento estatural é um processo prolongado que pode iniciar desde a fase pré-natal, e, neste estudo a exposição foi pós-natal.

Algumas evidências indicam que a distribuição da dose no tempo pode ter papel determinante nos efeitos da exposição. Uma dose isolada e um pico de exposição como observado no acidente do Iraque pode liberar uma dose aguda para o cérebro que teoricamente deve ser alto suficiente para produzir lesão no SNC. Doses crônicas tais como aquelas resultantes do consumo frequente de pescado devem também acumular suficiente quantidade no tempo para causar lesão (DAVIDSON *et al*, 2011).

Os níveis de GH foram elevados nos animais com intoxicação aguda e baixos no grupo SB2 (submetido à exposição por 7 dias com 2mg/Kg de mercúrio) em relação ao controle. Destaca-se que o grupo SB2 apresentou um ganho de peso importante, o que pode ser explicado pela ação de IGF-1 influenciando na resistência insulínica.

Tanto o GHRH quanto a somatostatina são influenciados por vários fatores, dentre eles, a nutrição, atividade física, estresse psicológico, sono adequado. A secreção de GH

está diminuída em crianças e adultos obesos e a resposta aos testes provocativos também é prejudicada. Uma explicação para a menor secreção de GH nos animais submetidos a exposição subcrônica seria o “feedback” negativo exercido pela insulina e provavelmente pela leptina sobre a secreção de GH. Especula-se que a leptina sérica poderia diminuir a resposta dos somatotrófos ao GHRH.

O crescimento estatural/comprimento e o peso são medidas utilizadas para avaliar o desenvolvimento. Há indícios que o mercúrio afeta o desenvolvimento estatural de crianças expostas em longo prazo ao mercúrio oriundo da dieta. Outros estudos envolvendo crianças ribeirinhas também com exposição prolongada através do consumo de pescado não observaram tal efeito (MARQUES *et al*, 2007; SOUZA, 2014).

Os níveis de mercúrio total aumentaram progressivamente com o tempo e aumento da dose. Esses valores de exposição se associaram com um pico de GH no grupo agudo e uma redução acentuada nos grupos subcrônicos. Uma explicação para essa drástica redução pode ter acontecido porque o GH é um hormônio peptídico e o metilmercúrio tem grande afinidade por radicais sulfidríla dos aminoácidos que compõem determinadas moléculas como os hormônios, inativando a função e por vezes a secreção e síntese dessas substâncias.

O comprimento dos animais do grupo controle foi menor em relação aos grupos SB2 e SB3 ($p < 0,05$). Nos grupos SB2 e SB3, as doses administradas na dieta parecem não ter exercido impacto sobre o crescimento animal, sugerindo que a dose e o tempo de exposição não foram suficientes para perturbarem o crescimento dos animais, entretanto chama atenção o ganho de crescimento maior do grupo controle em relação ao grupo SB3 ao décimo quarto dia. No estudo de Xavier (2011), algo semelhante aconteceu com crianças expostas ao metilmercúrio na Amazônia, um grupo de crianças menores de 10

anos com altos níveis de mercúrio total apresentavam desnutrição crônica (déficit de estatura/idade).

Estudos em animais revelaram ainda, que em baixa exposição ao mercúrio pode não ocorrer retardo de desenvolvimento imediato, entretanto pode ocorrer reflexos tardios (RICE, 1996). Em humanos a neurotoxicidade aparece geralmente anos após a exposição ter iniciada. Linet *al* (2011) estudando a exposição na vida pré-natal ao cádmio verificaram que esse metal afetou a circunferência do crânio ao nascer e o crescimento estatural das crianças nos três primeiros anos de vida.

7. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir que metilmercúrio nas doses administradas no modelo experimental do rato resultou em grave lesão com êxito letal na dose de 25mg/Kg e promoveu alterações significativas na função hepática, no controle da glicemia e nas concentrações de GH nas doses 2mg/Kg e 3mg/Kg sugerindo a possibilidade dessas alterações influenciarem nos parâmetros de peso e comprimento dos animais.

Como o crescimento linear dos seres vivos é multifatorial, incluindo o fator nutricional, novos estudos adotando períodos mais prolongados de exposição ao metilmercúrio podem demonstrar melhor relação do mercúrio com o comprimento dos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, R; GOEL, SK; CHANDRA, R; BEHARI, JR. Role of vitamin E in /preventing acute Mercury toxicity in rat. *Environ. Toxicol. Pharmacol*, v. 29, p. 70-78, 2010.

AMORAS, W.W. **Interferentes bio-sócio-ambientais na exposição ao mercúrio em crianças ribeirinhas de diferentes regiões da Amazônia.** Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, 2011.

AMORIM, M. I. M; MERGLER, D.; BAHIA, M. O.; DUBEAL, H.; MIRANDA, D.; LEBEL, J. BURBANO, R. R.; LUCOTTE, M. Citogenetic damage related to low levels of methylmercury contamination in the Brazilian Amazon. **Anais da Academia Brasileira de Ciências.**v. 72, n. 4, Rio de Janeiro, dez. 2000.

ALMEIDA, A.C.; MENDES, L.C.; SAD, I.R.; RAMOS, E.G.; FONSECA, V.M.; PEIXOTO, M.V.M. Use of monitoring tool for growth and development in brasilian children – sistematic review. **Rev. Paul. Pediatr**, 34(1):122-131, 2016.

ARON, D.C.; FINDLING, J.W.; TYRRELL, J.B. **Hipotálamo e hipófise. In: Endocrinologia Básica e Clínica.** Editora Guanabara Koogan, 5ª ed. Rio de Janeiro, 2000.

BERNHOF, R.A. Mercury toxicity and tratament: a review of the literature. **Journal of Environmental and Public Health**, v(2012), 2012.

BIANCO, A.C. & RABELO, R. **Introdução à Fisiologia Endócrina. In: Fisiologia** [Margarida de Mello Aires]. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1999.

BISINOTI, M.C. & JARDIM, W.F. O comportamento do metilmercúrio no meio ambiente. **Quim. Nova.** v. 27, n. 4, p. 593-600, 2004.

BITTENCOURT, P.E.R.; FAIDA, H. ABDALLA, L.; DE BONA, K.S.; MORETTO, M.B.; Exposição aguda ao Metilmercúrio em ratos em desenvolvimento: mini-revisão. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 137-148, jul – dez, 2013.

BRAGADIN, M.; MARTON, D.; MANENTE, S.; GRASSO, M.; TONINELLO, A. Methylmercury induces the opening of the permeability transition pore in rat liver mitochondria. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 89, n. 1/2, p. 159-62, 2002.

BONACKER, D. & STOIBER, T. Genotoxic of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function. **Arch. Toxicol**, 78(10) 575-583, 2004.

CÂMARA, V. M.; SILVA, A.P.; GALVÃO, L.A. Contaminação ambiental por mercúrio na região amazônica: subsídios para um programa de vigilância de populações expostas. **Organização Panamericana de Saúde–OPAS/ Organização Mundial daSaúde - OMS**, 2001.

CASARETT, L. **Toxicology, the basic science of poisons**. Curtis D. Klassen, 6^a Ed.; Mc.Graw Hill, p. 834–837, 2001.

CASTOLDI A. F.; Johansson C, Onishchenko N, Coccini T, Roda E, Vahter M, Ceccatelli S, Manzo L. Human developmental neurotoxicity of methylmercury: impact of variables and risk modifiers. **RegulToxicolPharmacol.** v.51 (2), p. 201–214, 2008.

CLARKSON, T.W.; MAGOS L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. **CritRevToxicol.** v. 36(8), p. 609–662, 2006.

CORTÊS, **Avaliação psicofísica do sistema visual em habitantes de duas comunidades ribeirinhas da Amazônia expostas ao mercúrio: comparação com normas estatísticas.** (Tese de Doutorado em Neurociências e Biologia Celular) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará. Belém-PA, 2008.

CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; DIAS, J. L. C. **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária.** 1. ed. São Paulo: Roca, 2007.

DANTAS, J. A.; AMBIEL, C. R.; CUMAN, R. K. N.; BARONI, S.; BERSANI-AMADO, C. A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum. Health Science**, Maringá, v. 28, n. 2, p. 165-170, jul./dez. 2006.

DAVIDSON, P. W.; MYERS, G. J. AND WEISS, B. Mercury Exposure and Child Development Outcomes. **Pediatrics**, v. 113, n. 4, p. 1023- 1029, 2011.

DEBES, F.; BUDTZ-JORGENSEN, E.; WEIHE, P.; WHITE, R.F.; GRANDJEAN, P. Impact of prenatal methylmercury exposure on neurobehavioral function at age 14 years. **Neurotoxicol Teratol.** v. 28 (5), p. 536–547, 2006.

DE PAULA, L. P.; CZEPIELEWSKI, M. A. Avaliação dos métodos diagnósticos para deficiência de GH (DGH) na infância: IGFs, IGFbPs, testes de liberação, ritmo de GH e exames de imagem. **Arq. Bras EndocrinolMetab**, 52/5, 2008.

DREIEM, A.; SHAN, M.; OKONIEWSKI, R. J.; MORRISSEY, S. S.; SEEGAL, R. F. Methylmercury inhibits dopaminergic function in rat pup synaptosomes in an age-dependent manner. **Neurotoxicology and Teratology**, Elmsford, v. 31, n. 5, p. 312-317, 2009.

DUTCZAK, W. J.; CLARKSON, T. W.; BALLATORI, N. Biliary-hepatic recycling of a xenobiotic gallbladder absorption of methylmercury. **American Journal of Physiology**, v. 260, p. G873-G880, 1991.

EKSTRAND, J.; NIELSEN J. B.; HAVARINASAB, S.; ZALUPS, R. K.; SÖDERKVIST, P.; HULTMAN, P. Mercury toxicokinetics – dependency on strain and gender. **Toxicol. Appl. Pharmacol**, 243, p. 283 – 291, 2010.

ETO, K.; MARUMOTO, M.; TAKEDA, M. The pathology of methylmercury poisoning (Minamata disease). **Neuropathology**.v. 30, p. 471-479, 2010.

FRACKELTON, J. P. & CHRISTENSEN, R. L. Mercury poisoning and its potential impact on hormone regulation and aging: preliminary clinical observations using a new therapeutic approach. **Journal of Advancement in Medicine**. v. 11, n. 1, Spring, 1998.

GARLET, F.C.; MORAES-SILVA, L.; BUENO, T. M. Efeitos do cobre sobre alterações bioquímicas induzidas pelo mercúrio em ratos jovens. **Salão de Iniciação Científica. Livro de Resumos. UFRGS**. v. 21, p. 19-23, Porto Alegre, out. 2009.

GUIMARÃES, G. A.; ARAÚJO, C. C.; AMORAS, W. W.; RIBEIRO, D. R.; HERCULANO, A. M.; NASCIMENTO, J. L. M.; SILVEIRA, L. C. L. Mercury pollution and childhood in Amazon Riverside villages. **Environment international**, v. 33, p. 56-61, 2007.

GUYTON, A.C. & HALL, J.E. **Os hormônios hipofisários e seu controle pelo hipotálamo**. In: Tratado de Fisiologia Médica. 10^a ed, 2002.

HARADA (a), M. A doença de Minamata e a poluição mercurial no planeta. In: **International Symposium for evaluation of the mercurial contamination in the amazon**. JICA/NMT-UFPA, nov-dez, 1998.

HUBER, P.C. & ALMEIDA, W. P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**. v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

JUNNILA, R. K.; LIST, E. O.; BERRYMAN, D. E.; MURREY, J. W.; KOPICHIK, J. J. The GH/IGF-1 axis in ageing and longevity. **Nature Reviews Endocrinology**. v. 9, p. 366-376, jun. 2013.

KARMAUS, W; OSUCH, JR; ENELI, I; MUDD, L. M; ZHANG, J; MIKUCKI, D; HAAN, P; DAVIS, S. Maternal levels of dichlorodiphenyl-dichloroethylene (DDE) may increase weight and body mass index in adult female offspring. **Occup Environ Med**. v. 66, p. 143–149, 2009.

KING, T. C. **Patologia – Lesão celular, resposta celular a lesão e morte celular**. In: Patologia. Ed. Elsevier, p. 1-20, Rio de Janeiro, 2007.

LACERDA, L. D. Contaminação por mercúrio no Brasil: fontes industriais Vs Garimpo de Ouro. **Química nova**. v. (20) 2, 1997.

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**. p. 20-32, 1998.

LEE D. H.; Lee I K, Song K, *et al*. A strong dose-response relation between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes: results from the National Health and Examination Survey 1999–2002. **Diabetes Care**. v. 29, p. 1638–1644, 2006.

LEMOS, A. H. **Processos naturais de desintoxicação para prevenção e tratamento das doenças**. 1ª ed. p. 348, Rio de Janeiro, 2010.

LIMA, A. C. M.; OLIVEIRA, C. S. B.; XAVIER, C. T. S.; PINHEIRO, M. C. N.; SOUZA, D. M.; MAGALHÃES, C. M. C.; PINTO, RF. Exposição ao mercúrio em escolares de áreas ribeirinhas na Amazônia brasileira. **Pesquisa em Saúde**, n. 14, p. 14-21, 2015.

LIN, C. M.; DOYLE, P; WANG, D; HWANG, Y. H; CHEN, P-C. Does prenatal cadmium exposure affect fetal and child growth? **Occup Environ Med**, v. 68, p .641-646, 2011.

LOHREN, H.; PIEPER, I; BLAGOJEVIC, L.; BRONHORST, J.; GALLA, H.J.; SHWERDTLE, T. **Neurotoxicity of organic and inorganic Mercury species**.2015.

MAGNO, I. M. N. **Avaliação dos marcadores de injúria miocárdica induzida pela exposição ao metilmercúrio em modelos experimentais de primatas do novo mundo (CEBUS APELLA)**. (Tese de Doutorado em Doenças Tropicais) Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará. Belém-PA, 2009.

MALAGUTTI, K. S.; SILVA, A. P.; BRAGA, H. C.; MITOZO, P. A.; SANTOS, A. R. S.; DAFRE, A. L.; BEM, A. F.; FARINA, M. 17β-estradiol decreases methylmercury induced neurotoxicity in mademice. **Environ. Toxicol. Pharmacol**, n. 27, p. 293-297, 2009.

MALAQUIAS, A.C. **Exposição à concentração subletal de metilmercúrio: genotoxicidade e alterações na proliferação celular**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Belém, 2015.

MARQUES, R.C.; D'OREA, J.G.; BASTOS, W.R.; REBELO, M.F.; FONSECA, M.F.; MALM, O. Maternal mercury exposure and neuro-motor development in breastfed infants from Porto Velho (Amazon Brazil). **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v10, n1, p.51-60, 2007.

MELO, M. G. D.; DÓRIA, M. R.; SERAFINI, A. A. S.; ARAÚJO, A. H. S. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 8, 4, 2012.

MELO, D. S.; CORRÊA, A. D.; MARCOS, F. C. A.; SOUSA, R. V.; ABREU, C. M. P.; SANTOS, C. D. Efeitos da farinha de folhas de mandioca sobre a atividade das enzimas AST, ALT, FA e lipídios hepáticos de ratos *Wistar*. **Ciênc. Technol. Aliment.** v. 28, Dez., Campinas. 2008.

MESEGUER A, PUCHE C, CABERO A. Sex steroid biosynthesis in white adipose tissue. **HormMetab Res**, v. 34, p. 731–736, 2002.

MONTEIRO, F. P. M; ARAÚJO, T. L.; CAVALCANTE, T. F.; LEANDRO, T. A.; SAMPAIO FILHO, C. P. S. Crescimento infantil: análise do conceito. **Texto context Enferm**, (25) 2, 2016.

NORSETH, T.; CLARKSON, T. W. Studies on the biotransformation of Hg²⁰³-labeled methylmercury chloride. **Archives of Environmental Health**, v. 21, p. 717-727, 1970.

PAL AND GHOST. Studies on comparative efficacy of α -linolenic acid and α -eleostearic acid on prevention of organic mercury – induced oxidative stress in kidney and liver of rat. **Food Chem. Toxicol**, v. 50, p. 1066-1072, 2012.

PATRICK, L. N. D. Mercury toxicity and antioxidants: part I: role of glutathione and aliphatic acid in the treatment of mercury toxicity. **Alternative Medicine Review Sandpoint**, v. 7, n. 6, p. 456-471, 2002.

PEREIRA, C.; SOUZA, A. O.; PAZIN, M.; DORTA, D.J. Mitocôndria como alvo para avaliação de toxicidade de xenobiótico. **Revista Brasileira de Toxicologia**, 25, n. 1-2, p. 1-14, 2012.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. K. Injury and cell death. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins and Cotran. **Pathologic Basis of Disease**, 7th ed Philadelphia: Elsevier Saunders, p.1504, 2004.

ROOS, D. H. **O complexo metilmercúrio-cisteína altera o acúmulo de mercúrio em diferentes tecidos de camundongos.** Dissertação apresentada a UFSM. Rio Grande do Sul, 2009. http://cascavel.ufsm.br/tede//tde_busca/arquivo.php?codArquivo=2556

SAKAMOTO, M.; NAKANO, A.; KAJIWARA, Y.; NARUSE, I.; FUJISAKI T. Effects of Methyl Mercury in Postnatal. Developing Rats. **Environmental Research**, v. 61, p. 43-50, April 1993.

SANTOS, A. J. A. O. **Food intake and energy needs estimated in isolated deficiency and genetic growth hormone.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2015.

SILVA, M. C. F. **Alterações hepáticas por exposição a baixas concentrações de metilmercúrio em macacos prego Cebusapella**(Linnaeus, 1758). Tese (Doutorado, Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular). Belém - PA, 2011.

SILVA, L. M. **Efeitos do mercúrio sobre a atividade das enzimas alanina aminotransferase, lactato desidrogenase e glicose 6-fosfatase de ratos jovens.**Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria - RS, 2010.

SILVERTHORN, D. Controle endócrino do crescimento. In: **Fisiologia Humana, uma abordagem integrada.** [Tradução da 2 ed original de Ivana Beatrice Mânca da Cruz] – ed. Manole, Barueri-SP, 2003.

SOKOLOWSKI, K.; MOREL, A. F.; ZHOU, X.; BLOOM, E. D. Methylmercury (MeHg) elicits mitochondrial-dependent apoptosis in developing hippocampus and acts at low exposures. **NeuroToxicology**, Little Rock, v. 32, p. 535–544, 2011.

SOUZA, J. M.; NOVAES, J. S.; RODRIGUES NETO, G.; SOUZA, M. S.; REIS, I. G.; CARVALHAL, M. I. Assessment of the motor development of children poisoned with mercury. **Gazz Med Ital – Arch Sci Med**, v. 173, p. 1-2, 2014.

SONNEMSCHEIN, C.; SOTO, A. M. An updated review of environmental estrogen and Androgen mimics and antagonists. **J Steroid BiochemMol Biol.**, v. 65, p. 143–50, 1998.

TAVARES, L. M. B.; CÂMARA, V. M.; MALM, O.; SANTOS, E. C. O. Performance on neurological development tests by riverine children with moderate mercury exposure in Amazonia, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 21(4), p.1160-1167, jul-ago, Rio de Janeiro, 2005.

UNEP. **Global mercuryassessment 2013: sources, emissions, releases andenvironmenttransport.** Geneva, Swirtzeland, 2013.

US EPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY.
Mercury Study Report to Congress. Volume V: **Health Effects of Mercury and Mercury Compounds.**EPA-4562/R-97-007. Washington, DC, USA: U.S. EPA, 1997.

VASILIOUS O.; CAMERON L.; GARDINER J.; *et al.* Polybrominated biphenyls, polychlorinated biphenyls, body weight, and incidence of adult-onset diabetes mellitus. **Epidemiology**, n.17, p.352–359, 2006.

XAVIER, F. B. **Parasitoses intestinais e desnutrição em crianças expostas ao mercúrio na Amazônia.** Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais). Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará. Belém-PA, 2003.

XAVIER, F. B.; PINHEIRO, M. C. N.; CARNEIRO, L. M.; SILVEIRA, L. C. L. Parasitoses intestinais, desnutrição e exposição mercurial em crianças na Amazônia brasileira. **Revista Uningá**, v. 28, p. 109-126, 2011.

ANEXO 1 – FICHA CLÍNICA E LABORATORIAL



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

Ficha Clínica e laboratorial

IDENTIFICAÇÃO:

Animal:

Procedência:.....

Raça:

Sexo.....

Data de entrada no biotério/...../.....

DADOS TOXICOLÓGICOS

Peso corporal no início da exposição

Peso corporal no final da exposição

Dose inicial de MetilHg data : ____ / ____ / ____

Dose final de MetilHg data : ____ / ____ / ____

Tempo de exposição

QUADRO CLÍNICO

Desconforto respiratório ()

Sinais de caquexia ()

Alterações comportamentais e/ou psicogênicas ()

Alterações da marcha ()

Icterícia conjuntival ()

Edema ()

Outros () _____

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

- AST Normal () Alterado ()
- ALT Normal () Alterado ()
- GAMA GT Normal () Alterado ()
- BILIRRUBINA Normal () Alterado ()
- SOMATOTROFINA Normal () Alterado ()
- SOMATOMEDINA Normal () Alterado ()
- MERCÚRIO TOTAL Normal () Alterado ()

DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO

Lâmina n°: _____

Material: _____

Macroscopia: _____

Microscopia: _____



PARECER 261-14

Projeto: Avaliação do Crescimento e desenvolvimento de Ratos Wistar intoxicado com metilmercúrio.

Coordenador: Profa. Dra. Maria da Conceição Nascimento Pinheiro

Área Temática: Toxicologia

Vigência: 03/2014 a 12/2016

No no CEPAE-UFPA: 261-14

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 3988/2011 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação (N=40, ratos Wistar) nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido.

As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 05 de março de 2014

Wallace Gomes Leal
Prof. Dr. Wallace Gomes Leal
Presidente do CEPAE-UFPA