



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

GISELE LIMA MACEDO

**GENOTOXICIDADE MERCURIAL:** contribuição para análise de  
populações amazônicas

BELÉM  
2008

**GISELE LIMA MACEDO**

**GENOTOXICIDADE MERCURIAL:** contribuição para análise de  
populações amazônicas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Patologias das Doenças Tropicais.

Orientador (a): Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Elena Crespo López.

**BELÉM**  
2008

**GISELE LIMA MACEDO**

**GENOTOXICIDADE MERCURIAL:** contribuição para análise de  
populações amazônicas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Patologia das Doenças Tropicais.

Orientador (a): Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Elena Crespo López.

Data da Aprovação: 05 de junho de 2008

Banca:

---

Prof. Dra. Maria Elena Crespo López  
Laboratório de Farmacologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas

---

Prof. Dra. Maria da Conceição Pinheiro  
Núcleo de Medicina Tropical

---

Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento  
Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas

---

Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano  
Laboratório de Neuroendocrinologia, Instituto de Ciências Biológicas

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais: Grodédio Cavalcante Macedo e Inês Lima Macedo, por todo o apoio que me deram em todo meu trajeto não só profissional, mas de vida.

## **AGRADECIMENTOS**

À DEUS, que nos momentos mais difíceis, serviu-me como esteio e inspiração para continuar galgando sem medo de enfrentar todos os desafios de minha vida.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Elena Crespo López, pela orientação, que sempre com respeito e sabedoria me ensinou a apreciar a pesquisa e, em especial neste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento e sua equipe do Laboratório de Neuroquímica pelo apoio durante a realização deste trabalho.

À Dra Maria da Conceição Pinheiro, pela oportunidade que me forneceu em participar da Expedição Científica realizada à região estudada para a obtenção de dados desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Rommel Burbano e sua equipe do Laboratório de Citogenética Humana pela ajuda durante a elaboração deste trabalho.

Ao Núcleo de Medicina Tropical (NMT) que contribuiu para a realização deste trabalho.

À Equipe da Biblioteca do NMT, pelo auxílio na normalização deste trabalho.

Aos meus amigos de curso pelo companheirismo.

E não poderia esquecer dos grandes amigos que fiz no Laboratório de Farmacologia Molecular e no Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular pela amizade e companheirismo de todos.

## RESUMO

O mercúrio é uma importante fonte de poluição ambiental em diversas partes do mundo e especialmente na Amazônia. Atualmente, existem evidências de que a exposição crônica a concentrações relativamente baixas de mercúrio poderia estar iniciando processos genotóxicos (dano ao DNA) em humanos. Porém, foram realizados até agora poucos estudos epidemiológicos com populações amazônicas expostas que não incluíram uma comparação com uma população controle. O objetivo do presente estudo foi identificar a técnica mais adequada para analisar genotoxicidade mercurial em populações amazônicas e estabelecer os valores normais de genotoxicidade em uma população ribeirinha amazônica. Para a realização dos testes *in vitro* foram aplicadas e comparadas duas técnicas tradicionais de detecção de genotoxicidade (micronúcleos e aberrações cromossômicas). Culturas primárias de linfócitos sanguíneos de voluntários de Belém foram expostas a concentrações relativamente baixas de metilmercúrio (1-500 $\mu$ g/l ou 0,004-2  $\mu$ M). O índice mitótico (proporção de células em metáfase) originado com a técnica de detecção de aberrações cromossômicas revelou-se como o parâmetro mais sensível à genotoxicidade mercurial. Após a identificação da técnica e o parâmetro mais sensível à genotoxicidade mercurial, essa técnica foi aplicada para estudar uma população ribeirinha amazônica que funcionasse como controle para os estudos de genotoxicidade mercurial que estão sendo feitos. Foi selecionada a população de Panacauera, e a média do índice mitótico encontrado nos indivíduos dessa população foi de  $0.077 \pm 0.045$ . Os valores de índice mitótico detectados apresentaram uma variabilidade que não esteve relacionada com a idade ou o sexo. Quando esses valores foram comparados com os valores de Brasília Legal (comunidade exposta ao metilmercúrio) registrados na literatura, foi verificado que para alguns grupos o índice mitótico de Brasília Legal foi inferior ao de Panacauera, o que indicaria uma inibição da progressão do ciclo celular e/ou uma perda da capacidade proliferativa causada pela intoxicação mercurial. Estes resultados apóiam a idéia de que o índice mitótico poderia servir como parâmetro essencial para o diagnóstico precoce do dano causado pela exposição mercurial e contribuem para o escasso conhecimento epidemiológico sobre as conseqüências que está tendo a exposição crônica de mercúrio nas populações da Amazônia.

**Palavra-chave:** Mercúrio, Micronúcleos, Aberrações Cromossômicas

## ABSTRACT

Mercury is an important environmental pollutant for the world and, specially, for the Amazon. Presently, there are some evidences about chronic exposure to relatively low concentrations of mercury initiating genotoxic processes (DNA damage) in humans. However, to date, few epidemiological studies were carried out with Amazonian populations exposed to mercury, but no study included a population as a control to compare. The aim of this study was to identify the technique more adequate for analyzing mercury genotoxicity in Amazonian populations and to establish control values of genotoxicity in an Amazonian riverside population. To carry out *in vitro* tests, two traditional methods to detect genotoxicity (micronuclei and chromosomal aberrations) were applied and compared. Primary cultures of blood lymphocytes of volunteers from Belém, were exposed to relatively low concentrations of methylmercury (1-500µg/l or 0,004-2 µM). Mitotic index (proportion of cells in metaphase) originated with the method of detection of chromosomal aberrations was the parameter more sensitive to mercury genotoxicity. After identification of the method and the parameter more sensitive to mercury genotoxicity, this method was applied to study an Amazonian riverside population as a control for studies about mercury genotoxicity. Panacauera was selected as control population and mitotic index for this population was  $0.077 \pm 0.045$ . Detected values of mitotic index showed variability, not related to age or sex. When these values were compared to the values of Brasilia Legal (community exposed to methylmercury) registered in literature, mitotic index of Brasilia Legal for some groups was below mitotic index of Panacauera, pointing to an inhibition of the cell-cycle progression and/or loss of proliferative capacity due to mercury intoxication. These results support the idea that mitotic index may serve as an essential parameter for the early diagnosis of the damage provoked by mercury exposure, and they contribute to the epidemiological knowledge about the consequences of the chronic exposure with mercury in Amazonian populations.

**Key word:** Mercury, Micronuclei, Chromosome aberrations

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa do Brasil mostrando os estados federais com as capitais indicadas por estrelinhas pretas (esquerda). À direita encontra-se ampliado o mapa do Estado do Pará com a localização das comunidades de Panacauera, na bacia do rio Tocantins, e Brasília Legal e São Luis do Tapajós, na bacia do rio Tapajós, todas indicadas com pequenos círculos brancos. Também é indicada com um círculo grande cinza, a localização aproximada da principal área de garimpo.....15
- Figura 2.** Esquema para a diferenciação de quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas nas aberrações estruturais .....17
- Figura 3.** Cariótipo humano com uma alteração numérica, a seta indica uma trissomia do cromossomo 21 .....18
- Figura 4.** Esquema de formação de micronúcleos .....18
- Figura 5.** Média dos índices de binucleação ( $\pm$ desvio médio) encontrados através da técnica de detecção de micronúcleos realizada em culturas de linfócitos humanos tratados *in vitro* com cinco diferentes concentrações de metilmercúrio (n=8).....30
- Figura 6.** Micronúcleos (setas) detectados nas culturas de linfócitos sangüíneos expostas *in vitro* à luz ultravioleta durante 30 minutos.....30
- Figura 7.** Número de metáfases encontradas nas culturas de linfócitos, expostas *in vitro* ao metilmercúrio, dos cinco doadores usando a técnica de detecção de aberrações cromossômicas.....33
- Figura 8.** Média dos Índices Mitóticos ( $\pm$  desvio médio) de culturas de linfócitos tratadas com diferentes concentrações de metilmercúrio. \*p<0.05 vs Controle; \*\* p<0.05 vs 10 $\mu$ g/l e 100  $\mu$ g/l; \*\*\* p<0.01 vs Controle .....33
- Figura 9.** Exemplo de aberração cromossômica encontrada nas culturas de linfócitos sangüíneos expostas *in vitro* à luz ultravioleta durante 30 minutos. A seta indica um cromossomo trirradial .....34
- Figura 10.** Distribuição da população controle (Panacauera) de acordo com intervalos de idade.....35
- Figura 11.** Índices mitóticos (média  $\pm$  desvio médio) dos indivíduos de Panacauera (verde) e Brasília Legal (branco) agrupados por sexo (acima) ou intervalo de idade (abaixo). Os dados de Brasília Legal procedem de AMORIM et al. (2000). \*p<0.05 vs Mulheres; \*\*p vs 18  $\geq$  a <25 .....36



**LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1.** Principais estudos epidemiológicos sobre mercúrio e câncer.....  
.....20
- Tabela 2.** Índice de binucleação (IB), frequência de células micronucleadas (FCM), índice de micronucleação (IMn), índice mitótico (IM) e índice de pontes nucleoplasmáticas (IPN) de culturas de linfócitos expostos a metilmercúrio (0-500 µg/l) usando a técnica de detecção de micronúcleos .....29
- Tabela 3.** Índices de binucleação de culturas de linfócitos sanguíneos expostas *in vitro* à luz ultravioleta .....31
- Tabela 4.** Número de metáfases (NM) e índice mitótico (IM) de culturas de linfócitos expostas *in vitro* ao metilmercúrio (0-500 µg/l) usando a técnica de detecção de aberrações cromossômicas .....32
- Tabela 5.** Índices mitóticos de linfócitos sanguíneos expostos *in vitro* à luz ultravioleta.....34
- Tabela 6.** Dados da população controle (Panacauera) de acordo com a idade, sexo e o índice mitótico observado .....35
- Tabela 7.** Concentrações mínimas, encontradas na literatura, de diferentes compostos de mercúrio que provocaram alterações genotóxicas significativas em culturas de linfócitos humanos expostos *in vitro* .....41

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

NRC - National Research Council

USEPA- United States Environmental Protection Agency

Hg<sup>0</sup>- mercúrio metálico

Hg<sub>2</sub><sup>+2</sup> - íon mercuroso

Hg<sup>+2</sup>- íon mercúrico

CH<sub>3</sub>Hg - metilmercúrio

((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Hg)- dimetilmercúrio

ppb -parte por bilhão

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

µg/g -micrograma por grama

OMS- Organização Mundial da Saúde

WHO- World Health Organization

DNA- ácido desoxirribonucleico

MN- micronúcleo

AC- aberração cromossômica

TCI- troca de cromátides irmãs

PCR- polymerase chain reaction - reação em cadeia pela polimerase

SCGE- o ensaio de eletroforese de célula única

µg/l- micrograma por litro

ClCH<sub>3</sub>Hg- cloreto de metilmercúrio

KCl- cloreto de potássio

µl- microlitro

µg/ml- micrograma por mililitro

rpm- rotação por minuto

°C- grau Celsius

ml- mililitros

IB- índice de binucleação

FCM- frequência de células micronucleadas

IMn- índice de micronucleação

IM- índice mitótico

IPN- índice de ponte nucleoplasmática

ANOVA- Análise de variância

ERO- espécies reativas de oxigênio

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- peróxido de hidrogênio

DM- Doença de Minamata

GTP- nucleosídeo trifosfato

UV- Ultravioleta

mg/m<sup>3</sup>- miligrama por metros cúbico

cm- centímetro

ppm- parte por milhão

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1 MERCÚRIO E CONTAMINAÇÃO DO AMBIENTE AMAZÔNICO .....	13
1.2 GENOTOXICIDADE .....	16
1.3 MERCÚRIO E GENOTOXICIDADE HUMANA .....	19
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>24</b>
3.1 ASPECTOS ÉTICOS .....	24
3.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO .....	24
<b>3.2.1 Doadores Voluntários .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.2 População Ribeirinha Amazônica Controle .....</b>	<b>24</b>
3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	24
3.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	25
3.5 COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE .....	25
3.6 CULTURA PRIMÁRIA DE LINFÓCITOS HUMANOS.....	25
3.7 EXPOSIÇÃO AO CLORETO DE METILMERCÚRIO E À LUZ ULTRAVIOLETA .....	25
3.8 TÉCNICA DE DETECÇÃO DE MICRONÚCLEOS .....	26
3.9 TÉCNICA DE DETECÇÃO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS .....	27
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	27
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
4.1 EFEITOS GENOTÓXICOS DA EXPOSIÇÃO <i>IN VITRO</i> DE LINFÓCITOS HUMANOS A METILMERCÚRIO USANDO A TÉCNICA DE DETECÇÃO DE MICRONÚCLEOS .....	28
4.2 EFEITOS GENOTÓXICOS DA EXPOSIÇÃO <i>IN VITRO</i> DE LINFÓCITOS HUMANOS A METILMERCÚRIO USANDO A TÉCNICA DE DETECÇÃO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS .....	31
4.3 SELEÇÃO DA POPULAÇÃO CONTROLE E APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS .....	34
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>

<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>47</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>48</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 MERCÚRIO E CONTAMINAÇÃO DO AMBIENTE AMAZÔNICO

O mercúrio é um dos elementos químicos de mais antiga utilização pelo homem. Sua versatilidade como metal credencia sua utilização na indústria, na odontologia, na agricultura e em atividades de mineração primária de ouro (SANFELIU et al., 2003). 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; GODCHFELD, 2003; SANFELIU et al., 2003; CRESPO-LÓPEZ et al., 2005]. Assim, o mercúrio é considerado um poluente de alto risco, sendo regulado por vários órgãos ambientais, como por exemplo, a USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY) (LIN et al., 1999).

Em seu estado elementar, o mercúrio apresenta-se como um líquido branco-prateado, sendo também conhecido como mercúrio metálico ( $\text{Hg}^0$ ). Além disso, o mercúrio pode se apresentar em duas formas oxidadas [íon mercurioso ( $\text{Hg}_2^{+2}$ ) e íon mercúrico ( $\text{Hg}^{+2}$ )] e sob diferentes espécies orgânicas (alquilmercuriais, alcoximercuriais e fenilmercuriais). Existem também os compostos derivados do mercúrio inorgânico como: cloreto mercurioso ( $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ), cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ), nitrato de mercúrio [ $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ ], o fulminato de mercúrio [ $\text{Hg}(\text{CNO})_2$ ] e sulfeto de mercúrio ( $\text{HgS}$ ), entre outros. Os alquilmercuriais de cadeia curta, como metilmercúrio ( $\text{CH}_3\text{Hg}$ ) e dimetilmercúrio ( $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ ) representam os compostos mercuriais de maior interesse toxicológico. Essas formas orgânicas têm maior solubilidade em lipídios quando comparadas às formas inorgânicas, o que facilita sua difusão pela matriz lipídica da membrana para o interior da célula aumentando o seu potencial tóxico (USEPA, 1997; NRC, 2001; AZEVEDO, 2003; BAIRD AND CANN, 2004).

O mercúrio é uma importante fonte de poluição ambiental em diversas partes do mundo e especialmente na Amazônia. Este fato está intimamente relacionado ao seu intenso uso pela atividade garimpeira em virtude da capacidade do mercúrio de se ligar a outros metais, principalmente aqueles de interesse econômico, como o ouro (CÂMARA et al., 1997; CRESPO-LÓPEZ et al., 2005; SÁ et al., 2006; PINHEIRO et al., 2007). Esta ligação forma amálgamas que facilita a separação de ambos os metais dos sedimentos de rios e solos (AZEVEDO, 2003; BAIRD AND CANN, 2004).

A liberação do mercúrio para o ambiente se dá quando a amálgama formada é aquecida para recuperar o ouro. Por ação da força da gravidade o mercúrio precipita no leito misturando-se ao sedimento.

Este mercúrio sofre, então, o processo de biotransformação, onde bactérias metanogênicas transformam mercúrio inorgânico em metilmercúrio (BAHIA et al., 1999; BOENING et al., 2000; BAIRD AND CANN, 2004).

Após o processo de biotransformação, ocorre também outro processo denominado de biomagnificação, que supõe a tendência do metal a se acumular nos seres vivos à medida que se avança nos níveis tróficos da cadeia alimentar.

Assim, 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 (GODCHFELD, 2003; CRESPO-LÓPEZ et al., 2005; SÁ et al., 2006; PINHEIRO et al., 2006; PINHEIRO et al., 2007).

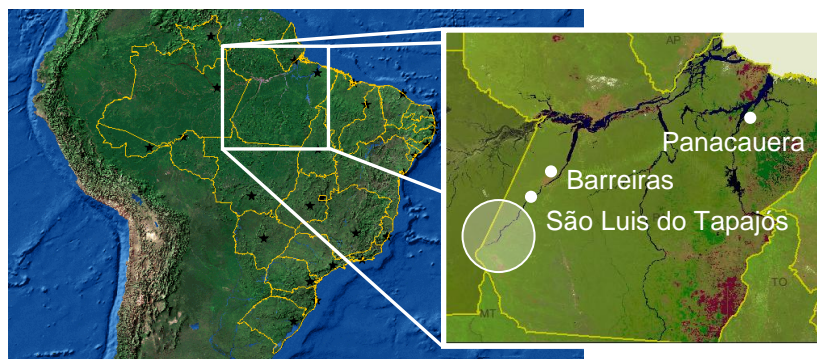
Vários estudos sobre contaminação mercurial na Amazônia demonstraram concentrações variáveis de metilmercúrio em diferentes espécies de peixes sendo mais elevados nas espécies predadoras (MALM, 1998; SANTOS et al., 2000).

Na bacia do rio Tapajós no Estado do Pará (Figura 1), os níveis mais elevados de concentração de mercúrio (acima de 500 ppb) foram encontrados em peixes carnívoros como da família *Sciaenidae* (*Plagisocion squamosissimus*, conhecido como pescada branca), *Pseudoplatystoma sp.* (surubim), da família *Pimelodidae* (*Brachyplatystoma filamentosum*, conhecido como filhote; *B. fravicans*, conhecido como dourada) e da família *Cichlidae* (*Cichla sp.*, conhecido como tucunaré) entre outros (MALM, 1998; SANTOS et al., 2000). Essas famílias de peixes constituem a principal fonte protéica dos ribeirinhos, que geralmente consomem peixe em cinco ou mais refeições por semana (LEBEL et al., 1998; PINHEIRO et al., 2003; PINHEIRO et al., 2008).

A exposição humana com mercúrio, na região do rio Tapajós no Estado do Pará, 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).

Os estudos realizados em algumas dessas comunidades (por exemplo, Brasília Legal, Barreiras e São Luis do Tapajós) situadas próximo à grande reserva mineral de ouro do Tapajós, têm demonstrado que no passado níveis de exposição relativamente elevados de mercúrio em amostras de cabelo (acima de 10µg/g) (revisado por SÁ et al., 2006). Assim, esta

Região vem sofrendo uma exposição crônica a níveis moderadamente elevados de mercúrio desde os anos 70.



**Figura 1.** Mapa do Brasil mostrando os estados federais com as capitais indicadas por estrelinhas pretas (esquerda). À direita encontra-se ampliado o mapa do Estado do Pará com a localização das comunidades de Panacauera, na bacia do rio Tocantins, Brasília Legal e Barreiras, na bacia do Rio Tapajós, indicadas com pequeno círculo branco. Também é indicada com um círculo grande cinza, a localização aproximada da principal área de garimpos nessa região. Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, Brasil).

A exposição ao mercúrio (em especial os episódios de intoxicação aguda, como os acidentes de Minamata e no Iraque) tem despertado a preocupação dos órgãos internacionais, como a Organização Mundial de Saúde - OMS, pela gravidade a respeito de seus efeitos sobre as populações atingidas [WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 1990; LIN et al., 1999].

O sistema nervoso central é o alvo principal da intoxicação aguda por metilmercúrio, pois é o órgão que sofre os danos mais importantes observados em humanos (SANFELIU et al., 2003; BAIRD AND CANN, 2004; CRESPO-LÓPEZ et al., 2005; CRESPO-LÓPEZ et al., 2007). Esse tipo de intoxicação 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 alterações no desenvolvimento nervoso em crianças (TCHOUNWON et al., 2003; CRESPO-LÓPEZ et al., 2005; SÁ et al., 2006; CRESPO-LÓPEZ et al., 2007). Outro quadro típico da intoxicação crônica (ocasionada pelo vapor de mercúrio) é o eretismo mercurial caracterizado por transtornos de comportamento e de personalidade, os quais podem evoluir para um quadro de disforia depressiva (BERLIN, 1986; TCHOUNWON et al., 2003).

Entretanto, os efeitos de longo prazo causados pela exposição crônica ao mercúrio ainda não são tão bem conhecidos, tornando este fato preocupante, especialmente em



populações humanas expostas, como na Região de Tapajós. Nos últimos anos, foram publicados vários estudos que apóiam a idéia que a exposição crônica às concentrações moderadamente altas de mercúrio poderia estar iniciando processos genotóxicos em humanos (AMORIM et al., 2000; WESTPHAL et al., 2003; CRESPO-LÓPEZ et al., 2005). A possível ação genotóxica dos compostos mercuriais ocasionaria alterações no material genético, resultando eventualmente no desenvolvimento de processos carcinogênicos, teratogênicos e/ou mutagênicos nas populações humanas expostas.

## 1.2 GENOTOXICIDADE

A genotoxicidade ou a genética toxicológica estuda os efeitos de agentes genotóxicos que desencadeiam processos que alteram a base genética da vida. Essa alteração pode acontecer na estrutura físico-química do DNA (processo este classificado de mutagênese) ou no determinismo genético ao nível celular ou orgânico (processos identificados respectivamente como carcinogênese e teratogênese) (SILVA et al., 2003).

No decorrer da vida, o DNA sofre alterações denominadas de mutações, que podem ser causadas por erros durante a duplicação do DNA na divisão celular. O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies (RIBEIRO et al., 2003).

Muitas das mutações não implicam mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou do organismo, e, portanto, passam despercebidas. Outras mutações podem determinar a morte celular. Assim, apenas um pequeno número de mutações que ocorrem em genes específicos pode determinar vantagens e/ou um crescimento desordenado das células (RIBEIRO et al., 2003).

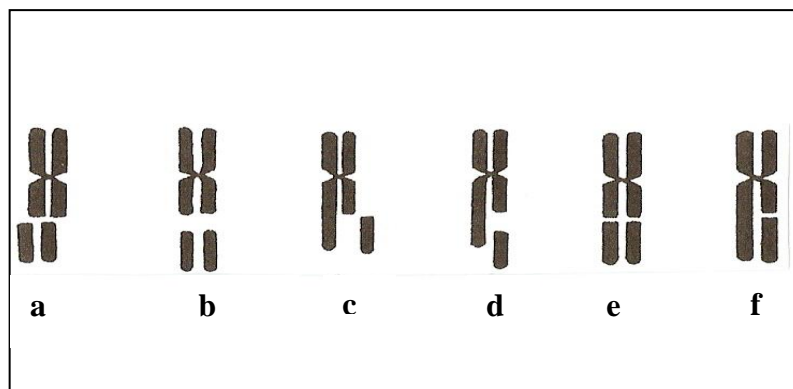
Os chamados agentes genotóxicos alteram a seqüência das bases no DNA, e podem acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias. A mutação é uma consequência do erro no DNA e este pode ser o estágio inicial no processo pelo qual a maioria dos carcinógenos químicos inicia a formação do tumor (BISHOP, 1991). Após passar por várias divisões, uma célula pode acumular mutações que, se em número elevado, determinam à perda do controle da sua divisão, levando, assim, ao aparecimento do câncer (RIBEIRO et al., 2003). Assim, os

mecanismos de mutagênese e carcinogênese parecem estar intrinsecamente ligados (RIBEIRO et al., 2003).

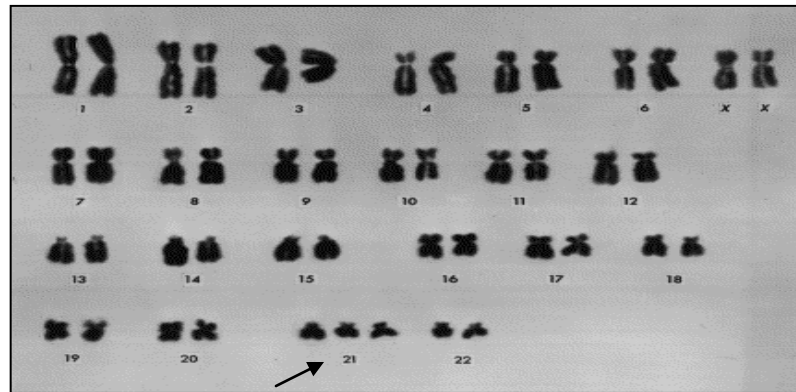
Para o estudo do efeito dos agentes genotóxicos nas populações humanas expostas aos compostos mercuriais, atualmente são utilizados alguns parâmetros como a presença de micronúcleos contendo fragmentos de DNA ou cromossomos, a identificação de aberrações cromossômicas e trocas de cromátides irmãs e técnicas de biologia molecular (seqüenciamento de determinadas regiões do DNA, clonagem de genes codificadores de enzimas de biotransformação e técnicas que utilizam PCR de DNA mitocondrial) (FENECH, 2000; SILVA et al., 2003; BONASSI et al., 2005; MATEUCA et al., 2006).

O monitoramento das populações humanas expostas aos agentes genotóxicos é normalmente realizado pela combinação das evidências genéticas citadas anteriormente. Por exemplo, os testes de aberrações cromossômicas e micronúcleos estão se convertendo nos parâmetros de maior validade para detectar alterações genéticas (FENECH, 2000; SILVA et al., 2003; BONASSI et al., 2005; MATEUCA et al., 2006).

A análise de aberrações cromossômicas (Figuras 2 e 3) identifica dois tipos de substâncias mutagênicas: as que produzem aberrações estruturais (quebras e falhas) denominadas clastogênicas e as que produzem aberrações numéricas (devido uma interferência na formação do fuso mitótico o que provoca alterações na distribuição dos cromossomos durante a divisão celular) denominadas de aneugênicas (SILVA et al., 2003). As falhas e quebras podem ser classificadas em: cromossômicas quando ocorrem nas duas cromátides ou cromatídicas quando ocorrem em apenas uma cromátide.

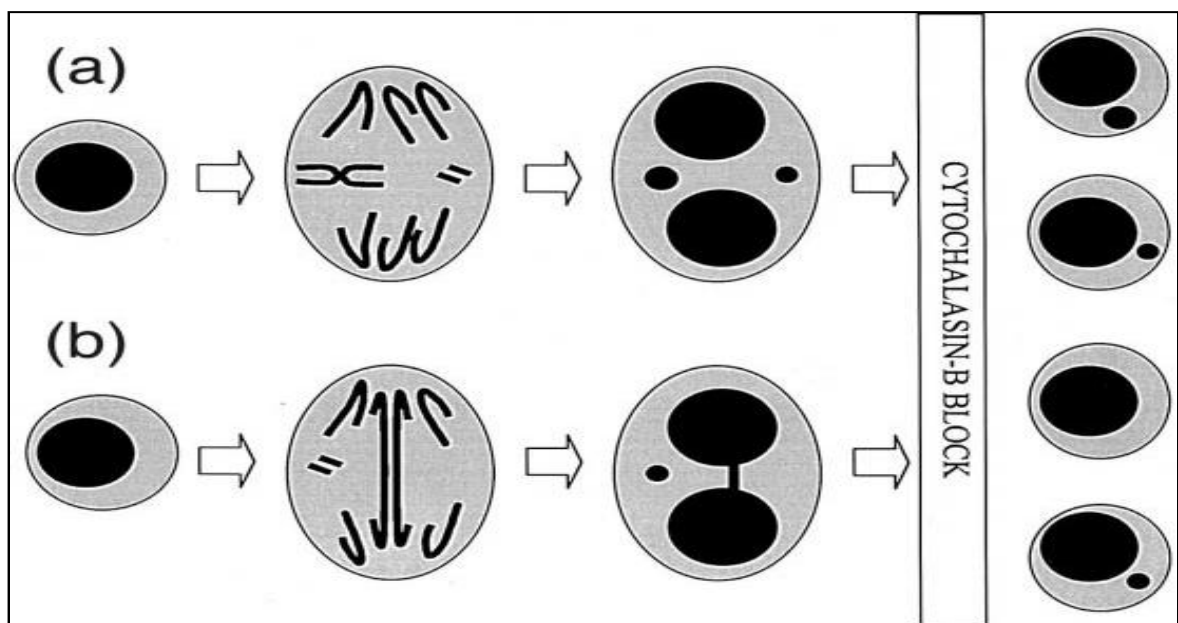


**Figura 2.** Esquema para a diferenciação de quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas nas aberrações estruturais. **a, b** quebras cromossômicas; **c, d** quebras cromatídicas; **e** falha cromossômica; **f** falha cromatídica. Fonte: Citogenética Humana (Bernardo Beiguelman), 1982.



**Figura 3.** Cariótipo humano com uma alteração numérica, a seta indica uma trissomia do cromossomo 21. Fonte: Citogenética Humana (Bernardo Beiguelman), 1982.

Além disso, a análise de micronúcleos detecta pequenos corpúsculos compostos por material cromossômico formados após a separação das cromátides no processo mitótico. Se um cromossomo inteiro ou um fragmento cromossômico acêntrico não se integra aos novos núcleos (por não estar unido ao fuso), este pode constituir a formação de um micronúcleo (Figura 4). Os micronúcleos, então são estruturalmente pequenos núcleos representando o material genético que foi perdido pelo núcleo principal, como consequência de um dano genético que pode ser causado por agentes genotóxicos, capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso, ou que possam induzir a perda de material genético (cromossomos inteiros ou fragmentos) (FENECH, 2000; SILVA et al., 2003).



**Figura 4.** Esquema de formação de micronúcleos. Fonte: Fenech, 2000.

Estas ferramentas revelaram-se extremamente úteis em estudos relacionados com efeitos genotóxicos do mercúrio e seus compostos em indivíduos expostos a este agente.

### 1.3 MERCÚRIO E GENOTOXICIDADE HUMANA

Ainda não está bem esclarecida a relação entre exposição mercurial e câncer (como uma das possíveis conseqüências mais perigosas do dano ao DNA), pois existem estudos com resultados indicativos da ação genotóxica do mercúrio, no entanto outros estudos não confirmaram esta possível ação tóxica no DNA (SCHUURS, 1999; NRC, 2001; TCHOUNWON et al., 2003).

Em 2001, a Comissão de Ciências da Vida do Conselho Nacional de Pesquisa dos Estados Unidos (NCR, 2001) declarou que eram necessários estudos epidemiológicos para avaliar a prevalência de aberrações cromossômicas e câncer nas populações expostas cronicamente aos compostos de mercúrio como o metilmercúrio. Isso é ainda válido atualmente.

Por isso, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (International Agency for Research on Cancer) e a Agência de Proteção Ambiental (Environmental Protection Agency) dos Estados Unidos classificaram o metilmercúrio como “possível” carcinógeno humano (USEPA, 1997; NRC, 2001), e recomendaram que a capacidade do metilmercúrio para causar dano cromossômico e promover o crescimento tumoral deve ser considerada para o estabelecimento de medidas de proteção.

Apesar das recomendações do NRC e da USEPA, até agora poucos estudos epidemiológicos foram conduzidos sobre intoxicação mercurial e incidência de morte por câncer. Esses estudos são resumidos na tabela 1.

Os primeiros estudos *in vivo* com o objetivo de compreender os efeitos genotóxicos do mercúrio foram realizados por Skerfving e colaboradores em 1970 (SKERFVING et al., 1970 apud FLORA et al., 1994). Depois disso, alguns estudos foram realizados durante os anos 70 e 80 (KATO AND NAKAMURA, 1976; MONSALVE AND CHIAPPE, 1987 apud FLORA et al., 1994) a fim de esclarecer se os biomarcadores de genotoxicidade, tais como aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs e

micronúcleos, poderiam revelar danos ao DNA por exposição ao mercúrio (revisado por FLORA et al., 1994).

**Tabela 1.** Principais estudos epidemiológicos sobre mercúrio e câncer. Fonte: NRC (2001); BOFFETTA et al. (1998).

Tipo de estudo	Tamanho da Amostra	Conclusões	Referências
Coorte Retrospectiva	334 mortes em Coorte com alta exposição; 668 em Coorte com baixa exposição.	Nenhum aumento de casos de óbitos por câncer; não foi analisado por órgão específico.	TAMASHIRO et al. (1984).
Coorte Retrospectiva	416 mortes em Coorte com alta exposição; 2.325 mortes em Coorte com baixa exposição.	Aumento de números de óbitos por câncer de fígado avaliado entre homens.	TAMASHIRO et al. (1986).
Estudo de caso controle de concentrações de mercúrio no cabelo em pacientes com leucemia.	47 casos; 79 controles.	Concentrações aumentadas de mercúrio no cabelo em pacientes com leucemia aguda.	JANICKI et al. (1987).
Coorte Retrospectiva de sobreviventes da Doença de Minamata (DM).	1.351 sobreviventes DM; 5.667 população geral.	Aumento de mortes por leucemia avaliada entre sobreviventes DM.	KINJO et al. (1996).
Estudo com trabalhadores expostos às minas de mercúrio	6784 homens e 265 mulheres	Relação positiva entre exposição mercurial e números de casos de câncer no fígado	BOFFETTA et al. (1998)

Na maior parte destes trabalhos, especialmente aqueles que incluíram técnicas de aberrações cromossômicas não detectaram diferenças entre os controles e as pessoas expostas por acidente, por ocupação ou pela dieta aos compostos de mercúrio. No entanto, o número de indivíduos incluídos nestes estudos foi relativamente baixo (por exemplo, no estudo de Skerfving e colaboradores (1970) apenas nove pessoas expostas e 4 controles participaram do estudo), e talvez tenha afetado os resultados finais.

Na verdade, Skerfving e colaboradores, em 1970, mostraram que a frequência das aberrações cromossômicas não foi significativamente diferente nos grupos expostos e de controles, mas quando, em 1974, aumentaram o número de indivíduos do estudo, a frequência foi ligeiramente superior nos indivíduos expostos (FLORA et al., 1994).

Depois disso, nos anos 90, os estudos epidemiológicos realizados já incluíam um maior número de indivíduos tornando os resultados mais confiáveis. Assim, por exemplo, em 1994 foi realizado um estudo envolvendo um grupo de 51 pescadores que estavam expostos ao mercúrio pelo consumo de mariscos (FRANCHI et al., 1994). Neste estudo, foi encontrada uma correlação positiva entre a frequência de micronúcleos presentes nos linfócitos periféricos e a concentração de mercúrio no sangue, assim como correlação positiva entre a idade das pessoas e a frequência de micronúcleos presentes nos linfócitos, o que aponta para a presença de micronúcleos como um instrumento útil para a detecção precoce de dano de DNA.

Outro interessante estudo sobre a exposição crônica através da dieta (peixes contendo mercúrio) foi realizado na Bacia do Rio Tapajós, principal afluente do rio Amazonas (AMORIM et al., 2000). Até agora, este é um dos dois únicos estudos que analisaram a genotoxicidade *in vivo* em populações ribeirinhas da Amazônia. Através dos resultados observados Amorim e colaboradores apóiam a hipótese de uma atividade genotóxica associada ao mercúrio. As principais mudanças observadas foram poliploidias e uma diminuição no índice mitótico (AMORIM et al., 2000). O primeiro estudo realizado sobre genotoxicidade e mercúrio na Região Amazônica foi realizado por Ferrari e colaboradores (1993) em populações indígenas e garimpeiros. Os resultados observados neste estudo foram: os micronúcleos revelaram-se mais frequentes nos índios e as aberrações cromossômicas numéricas nos garimpeiros (FERRARI et al., 1993).

Além destes estudos de exposição crônica por dieta alimentar, desde a publicação da revisão de Flora et al. (1994), poucos estudos epidemiológicos com humanos foram realizados sobre genotoxicidade provocada por outras formas de exposição ao mercúrio. Recentemente, Pietro et al. (2008) determinaram o potencial genotóxico de compostos de restaurações dentais em jovens (18 a 27 anos), utilizando uma nova ferramenta, o ensaio de eletroforese de célula única (SCGE) para a detecção de fragmentação de DNA em células individuais. Com este método sensível, eles descobriram que linfócitos de indivíduos que possuem obturações dentárias apresentavam parâmetros de fragmentação do DNA (comprimento da cauda, percentagem de DNA na cauda) duas vezes superior dos linfócitos nos indivíduos controles. Este trabalho demonstra pela primeira vez o efeito adverso sobre a saúde humana das restaurações dentárias (amálgamas e metacrilatos).

Além disso, a genotoxicidade causada pela exposição ocupacional com concentrações relativamente baixas de mercúrio foi o objetivo de outros dois estudos

epidemiológicos (QUEIROZ et al., 1999; CEBULSKA-WASILESKA et al., 2005). Queiroz e colaboradores (1999) encontraram um aumento significativo no percentual de micronúcleos em linfócitos de trabalhadores cronicamente expostos a níveis biológicos considerados seguros para a população exposta. O segundo estudo, realizado por CEBULSKA-WASILESKA et al. (2005), analisou vinte e cinco trabalhadores intoxicados por exposição ocupacional ao vapor de mercúrio, que trabalhavam numa empresa de produção de eletrólise do cloro localizada na cidade de Tarnów, Polônia. Embora a exposição ocupacional não causasse diferenças significativas com a técnica de detecção de cromátides irmãs, o dano cromossômico detectado pelo SCGE foi significativamente aumentado em linfócitos dos trabalhadores expostos.

Precisamente, as diferenças observadas na sensibilidade dos métodos de detecção da genotoxicidade e a dificuldade para evitar outros fatores que possam interferir nos resultados epidemiológicos têm sido uma das principais dificuldades na hora de analisar os resultados dos estudos em humanos, e especialmente das populações amazônicas.

Assim, este estudo teve por objetivo contribuir na solução desses dois grandes problemas. Primeiro, para esclarecer se existe diferente sensibilidade entre as técnicas e se é possível comparar resultados, foram analisados os resultados de um modelo *in vitro* de intoxicação mercurial com as duas técnicas mais usadas atualmente de detecção de genotoxicidade (micronúcleos e aberrações cromossômicas). Posteriormente, para poder eliminar interferências e apoiar os estudos genotóxicos que já foram feitos na região amazônica, foi selecionada uma população e foram analisados quais seriam os valores controles de genotoxicidade nesse tipo de população.

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho visa contribuir no estudo da genotoxicidade do metilmercúrio procurando: 1) esclarecer qual é a técnica mais adequada para analisar essa genotoxicidade em populações amazônicas; e 2) estabelecer valores dessa genotoxicidade em uma população ribeirinha amazônica sem exposição mercurial para avaliar os dados já publicados de estudos realizados em populações amazônicas com exposição ao mercúrio.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em relação ao esclarecimento de qual é a técnica mais adequada para o estudo da genotoxicidade do metilmercúrio em populações amazônicas:

2.2.1. Analisar os efeitos genotóxicos da exposição de culturas primárias de linfócitos humanos a diferentes concentrações de metilmercúrio (0-500  $\mu\text{g/l}$ ) usando a técnica de detecção de micronúcleos

2.2.2. Analisar os efeitos genotóxicos da exposição de culturas primárias de linfócitos humanos a diferentes concentrações de metilmercúrio (0-500  $\mu\text{g/l}$ ) usando a técnica de detecção de aberrações cromossômicas

2.2.3. Comparar os resultados das duas técnicas e esclarecer qual parâmetro é mais sensível à genotoxicidade provocada pelo metilmercúrio, e, portanto, o mais adequado para o estudo de populações humanas

Para o estabelecimento dos valores controles de genotoxicidade em uma população ribeirinha amazônica:

2.2.4. Selecionar uma população ribeirinha amazônica não exposta ao mercúrio com características semelhantes às da população exposta onde já foi demonstrada a existência de genotoxicidade

2.2.5. Aplicar nessa população a técnica de detecção de genotoxicidade mais sensível encontrada no objetivo 2.2.3. e estabelecer os valores de genotoxicidade nesse tipo de população

2.2.6. Comparar os resultados com os estudos realizados em populações amazônicas ribeirinhas expostas ao metilmercúrio.



### 3.0 METODOLOGIA

#### 3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os participantes da pesquisa foram informados sobre o objetivo do estudo e solicitados seu consentimento por escrito para participar da pesquisa. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Núcleo de Medicina Tropical (Protocolo Nº 023/2007-CEP/NMT).

#### 3.2 POPULAÇÕES DE ESTUDO

##### 3.2.1 Doadores Voluntários:

Para os testes *in vitro* foram usadas culturas de linfócitos de doadores voluntários oriundos da cidade de Belém. Todos os doadores eram estudantes universitários que freqüentam a Universidade Federal do Pará, e que passaram por avaliações através dos critérios 3.3 e 3.4.

##### 3.2.2 População Ribeirinha Amazônica Controle

Comunidade ribeirinha de Panacauera do município de Igarapé-Miri fez parte deste estudo como população controle (Figura 1). Essa comunidade é formada por pescadores com aproximadamente 260 habitantes. Pertence à região das ilhas, situada na margem do rio Panacauera, próximo à foz do rio Tocantins, no estado do Pará. Essa comunidade consome semanalmente peixe em 5 refeições ou mais, já que estes constituem a principal fonte protéica da dieta. É importante frisar que esta área não sofre influência de exposição por mercúrio.

#### 3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

3.3.1 Para os Doadores Voluntários: adultos ( $\geq 18$  e  $\leq 40$  anos de idade) de ambos os sexos

3.3.2 Para a População Ribeirinha Controle: adultos ( $\geq 18$  e  $< 60$  anos de idade), ambos os sexos, ribeirinhos que consomem semanalmente peixe em 5 refeições ou mais, indivíduos saudáveis (foi aplicado uma análise clínica básica).

### 3.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

Os critérios de exclusão para todos os participantes neste estudo foram: fumantes de mais de quatro cigarros ao dia, ser portador de doenças aguda e crônica graves, que estejam em tratamento à base de medicamentos nos últimos dois meses, uso de fármacos-dependentes, indivíduos que bebam quantidades significativas de álcool (mais de 200ml) ao dia, exposição ocupacional e outras atividades que produzam genotoxicidade e estar em trânsito pela cidade.

### 3.5 COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE

De cada indivíduo foram extraídos 3 ml de sangue venoso com material estéril e de uso único que foi aberto pela primeira vez diante do participante.

As amostras dos participantes da Comunidade de Panacauera eram armazenadas a -4° em tubos de vacutainer heparinizados e eram transportados ao laboratório num prazo de até 24 horas para evitar qualquer tipo de interferência aos experimentos. As amostras dos doadores voluntários eram coletadas em seringa já previamente heparinizada e realizada a cultura após alguns minutos após a coleta.

### 3.6 CULTURA PRIMÁRIA DE LINFÓCITOS HUMANOS

Para cultura de linfócitos são suficientes 500µl de sangue total com heparina (Roche) no meio de cultura RPMI 1640 (Gibco), suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado (Cultilab), antibióticos (Sigma) e glutamina (Sigma). Os linfócitos foram estimulados com 1.5% (200µl) de fitohemaglutinina (Cultilab) e incubados a 37 °C por 72 horas (MOORHEAD et al., 1960).

### 3.7 EXPOSIÇÃO AO CLORETO DE METILMERCÚRIO E À LUZ ULTRAVIOLETA (CONTROLE POSITIVO)

O cloreto de metilmercúrio (Sigma) foi previamente diluído em água destilada e completado com meio de cultura RPMI 1640 para obtenção das concentrações finais utilizadas no estudo (1µg/l, 10 µg/l, 50 µg/l, 100 µg/l, 500 µg/l). As culturas de linfócitos

humanos foram incubadas com estas concentrações de cloreto de metilmercúrio nas últimas 24 horas do início da cultura e mantidas a 37 °C.

A exposição à luz ultravioleta de culturas de linfócitos foi realizada para verificar a validação dos resultados das técnicas de AC e MN, para isso, as culturas de linfócitos foram expostas à luz ultravioleta durante 30 e 45 minutos que foram usadas como controles positivos.

### 3.8 TÉCNICA DE DETECÇÃO MICRONÚCLEOS

Após um período de incubação de 48 horas foi adicionada citocalasina B (Sigma) a uma concentração final de 6µg/ml (20µl). Estas culturas foram incubadas a 37°C até completar às 72 horas desde o início do cultivo (BURGAZ et al., 1998; SRÁM et al., 1998; LEE et al., 1999).

As células dos cultivos foram separadas após centrifugação por 5 minutos em 1000 rpm (rotações por minuto) à temperatura ambiente. Depois foi retirado 4,5 ml da amostra deixando 0.5 ml de sedimento. Este sedimento foi homogeneizado e tratado com uma solução hipotônica de KCl (Vetec) 0,075M (temperatura de 37 °C) e 0,5 ml de formalina (formol à 40%, Sigma) durante 5 minutos na mesma temperatura. Em seguida, foi realizada uma pré-fixação com 0.5 ml de metanol: ácido acético (Merck) (5:1) e centrifugado por 5 minutos a 1000 rpm, à temperatura de 37°C.

Para a fixação final, 1 ml do sedimento foi homogeneizado e acrescentado 5 ml dos fixadores metanol e ácido acético (5:1), para manter a morfologia celular. Em seguida, foi centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente. O fixador (5:1) foi preparado minutos antes da fixação da amostras (LEE et al., 1999).

As células fixadas foram depositadas sobre lâminas limpas e ficaram ao ar para secar. As lâminas foram marcadas com Giemsa (Merck) durante 5 minutos. Todas as lâminas foram observadas em microscópio (objetivas de x10, x40 e x100). Para determinar a frequência de micronúcleos, foram estudadas 1000 células por cultura. Micronúcleos e pontes nucleoplasmáticas foram identificados de acordo aos critérios já estabelecidos (FENECH, 2000; FENECH et al., 2003; THOMAS et al., 2003).

### 3.9 TÉCNICA DE DETECÇÃO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Nas culturas de linfócitos humanos, as células foram cultivadas a 37°C durante 72 horas. Durante as duas últimas horas adicionou-se ao cultivo 50µl de demecolcina (Sigma) a uma concentração final de 10µg/ml (SRÁM et al., 1998; LAZUTKA et al., 1999).

As células dos cultivos foram separadas após centrifugação por 5 minutos em 1000 rpm (rotações por minuto) à temperatura ambiente. Depois foi retirado 4ml da amostra deixando 1ml de sedimento. Este sedimento foi homogeneizado e tratado com uma solução hipotônica de KCl 0,075M (temperatura à 37 °C) durante 5 minutos na mesma temperatura. Em seguida, foi centrifugada por 5 minutos a 1000 rpm, à temperatura de 37°C.

Foram realizadas três fixações consecutivas: 1ml do sobrenadante foi homogeneizado e acrescentado com 5ml dos fixadores metanol e ácido acético (3:1) para manter a morfologia celular e centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente (LEE et al., 1999).

As células fixadas foram depositadas sobre lâminas limpas e ficaram ao ar para secar. Depois, as lâminas foram marcadas com Giemsa durante 5 minutos. Todas as lâminas foram observadas em microscópio (objetivas de x10, x40 e x100). Para determinação de AC, foram analisadas 100 metáfases por indivíduo e quantificado o Índice Mitótico (nº de metáfases/ por 1000 células).

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na avaliação estatística foi utilizada a análise de variância (ANOVA) para evidenciar as diferenças entre os grupos. Quando se observou um valor significativo de F ( $p < 0.05$ ), se aplicou o teste de Tukey para a realização de comparação múltipla. Também foi utilizado a Correlação de Pearson para verificação de associação das variáveis estudadas. Para todas estas análises foi aplicado o programa estatístico BioEstaT 5.0 (AYRES et al., 2007).

## 4.0 RESULTADOS

### 4.1 EFEITOS GENOTÓXICOS DA EXPOSIÇÃO *IN VITRO* DE LINFÓCITOS HUMANOS A METILMERCÚRIO USANDO A TÉCNICA DE DETECÇÃO DE MICRONÚCLEOS

A técnica de detecção de micronúcleos, uma das técnicas tradicionais de detecção de genotoxicidade, identifica agentes genotóxicos clastogênicos (quebras de DNA) e os que interferem na formação do fuso mitótico. Assim, esta técnica foi utilizada em oito experimentos *in vitro* com culturas de linfócitos sangüíneos de quatro doadores diferentes para verificar a concentração de metilmercúrio que possui efeito genotóxico.

Foram contabilizados o número total de células (N), o número de células binucleadas (B), o número de células com um, dois, três ou mais micronúcleos, o número de células em metáfase (M), e o número de células com pontes nucleoplasmáticas. Na tabela 2, estão representados os resultados dos valores de índice de binucleação (B/N), frequência de células micronucleadas, número de micronúcleos por cada célula micronucleada (índice de micronucleação), proporção de células em metáfase (índice mitótico) e fração de células contendo pontes nucleoplasmáticas (índice de pontes nucleoplasmáticas) parâmetros observados com a técnica de detecção de micronúcleos.

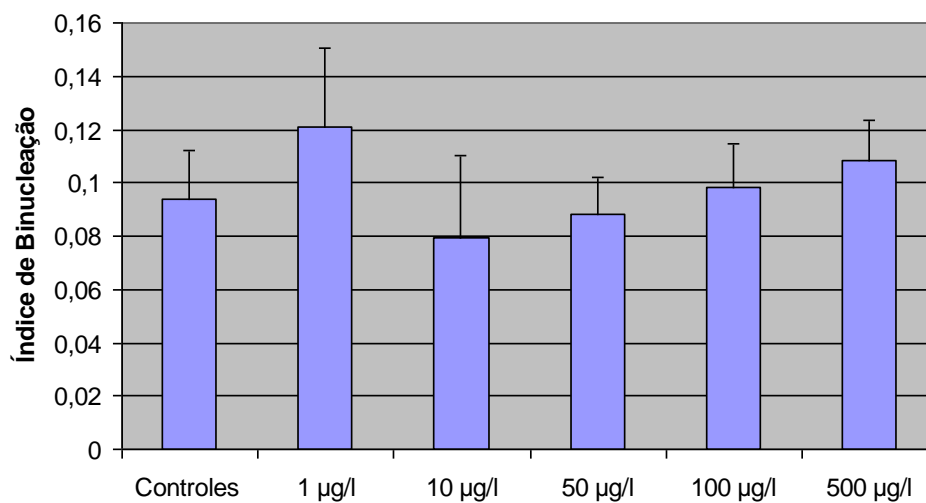
Os valores do índice de binucleação (IB) foram variáveis entre os diferentes doadores. Por exemplo, nas culturas dos doadores 1 e 2 os IB foram mais altos quando as culturas foram tratadas com metilmercúrio na concentração de 1 µg/l. Nos experimentos realizados com o doador 3 o maior IB foi registrado quando as culturas foram tratadas com 500 µg/l. Finalmente, as culturas do doador 4 apresentaram os valores máximos de IB com 100 µg/l e 500 µg/l de metilmercúrio.

A presença de micronúcleos foi detectada apenas nas concentrações de 1 µg/l, 10 µg/l e 50 µg/l, mas o número de micronúcleos foi pouco abundante. Além disso, foram detectadas células com pontes nucleoplasmáticas em dois doadores, porém o número de células com essas alterações foram relativamente baixo.

Os resultados de IB encontrados não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de metilmercúrio utilizadas (Figura 5). Contudo, parece existir certa tendência ao aumento de células binucleadas com a concentração de 1 µg/l.

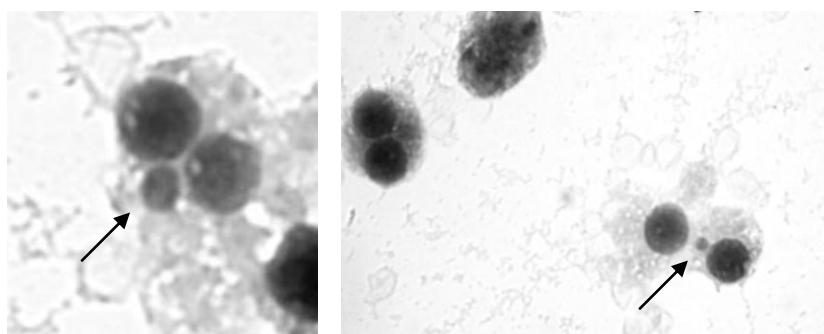
**Tabela 2.** Índice de binucleação (IB), frequência de células micronucleadas (FCM), índice de micronucleação (IMn), índice mitótico (IM) e índice de pontes nucleoplasmáticas (IPN) de culturas de linfócitos expostos a metilmercúrio (0-500 µg/l) usando a técnica de detecção de micronúcleos.

<i>Concentrações CH<sub>3</sub>Hg (µg/l)</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>10</i>	<i>50</i>	<i>100</i>	<i>500</i>
<u>Doador 1</u>						
Experimento 01						
IB	0.102	0.189	0.142	0.113	0.142	0.137
FCM	0	0	0	0	0	0
IMn	0	0	0	0	0	0
IM	0	0	0	0	0	0
IPN	0.005	0.003	0.002	0.002	0	0.002
Experimento 02						
IB	0.142	0.172	0.098	0.089	0.112	0.123
FCM	0	0	0	0	0	0
IMn	0	0	0	0	0	0
IM	0	0	0	0	0	0
IPN	0.002	0.007	0.004	0.002	0.001	0
<u>Doador 2</u>						
Experimento 01						
IB	0.110	0.107	0.077	0.101	0.085	0.101
FCM	0	0.2	0	0	0	0
IMn	0	1	0	0	0	0
IM	0	0	0	0	0	0
IPN	0.001	0.001	0	0	0.001	0.001
Experimento 02						
IB	0.083	0.116	0.056	0.101	0.071	0.088
FCM	0	0	0	0	0	0
IMn	0	0	0	0	0	0
IM	0	0	0	0	0	0
IPN	0	0	0	0	0.001	0.001
<u>Doador 3</u>						
Experimento 01						
IB	0.075	0.096	0.105	0.072	0.091	0.113
FCM	0	0.1	0.3	0.1	0	0
IMn	0	1	1	1	0	0
IM	0	0	0	0	0	0
IPN	0	0	0	0	0	0
Experimento 02						
IB	0.086	0.111	0.121	0.093	0.107	0.122
FCM	0	0	0.1	0.1	0	0
IMn	0	0	1	1	0	0
IM	0	0	0	0	0	0
IPN	0	0	0	0	0	0
<u>Doador 4</u>						
Experimento 01						
IB	0.086	0.080	0.071	0.061	0.081	0.097
FCM	0	0	0	0	0	0
IMn	0	0	0	0	0	0
IM	0	0	0	0	0	0
IPN	0	0	0	0	0	0
Experimento 02						
IB	0.069	0.096	0.055	0.076	0.098	0.085
FCM	0	0	0	0	0	0
IMn	0	0	0	0	0	0
IM	0	0	0	0	0	0
IPN	0	0	0	0	0	0



**Figura 5.** Média dos índices de binucleação ( $\pm$ desvio médio) encontrados através da técnica de detecção de micronúcleos realizada em culturas de linfócitos humanos tratadas *in vitro* com cinco diferentes concentrações de metilmercúrio (n=8).  $p < 0.05$  vs Controle.

Finalmente, com o objetivo de validar a metodologia empregada foram realizados controles positivos com culturas de linfócitos expostas à luz ultravioleta onde foram detectados micronúcleos (Figura 6) e o índice de binucleação aumentou significativamente com o tempo de exposição (Tabela 3).



**Figura 6.** Micronúcleos (setas) detectados nas culturas de linfócitos sanguíneos expostas *in vitro* à luz ultravioleta durante 30 minutos. (aumento de 1000 x)

**Tabela 3.** Índices de binucleação de culturas de linfócitos sanguíneos expostas *in vitro* à luz ultravioleta

Tempo de Exposição	Índice de Binucleação	Desvio Médio
Sem exposição	0.089	± 0,004
30 minutos	0.140	± 0,036
45 minutos	0.135	± 0,039

#### 4.2 EFEITOS GENOTÓXICOS DA EXPOSIÇÃO *IN VITRO* DE LINFÓCITOS HUMANOS A METILMERCÚRIO USANDO A TÉCNICA DE DETECÇÃO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

A técnica de detecção de aberrações cromossômicas, outra das técnicas tradicionais de detecção de genotoxicidade, identifica alterações nas metáfases e nos cromossomos como quebras, falhas ou deformações. Assim, esta técnica foi utilizada em dez experimentos *in vitro* com culturas de linfócitos sanguíneos de cinco doadores diferentes para verificar a concentração de metilmercúrio que possui efeito genotóxico. Na tabela 4, estão representados os resultados do número de metáfases encontradas e valores de índice mitótico (proporção de células em metáfase) em 1000 células contadas em cada experimento.

As culturas com índice mitótico (IM) mais elevado foram aquelas tratadas com metilmercúrio na concentração de 1µg/l, exceto nos experimentos do doador 2. Porém, quando as culturas foram tratadas com metilmercúrio na concentração de 10µg/l, os valores de IM diminuíram, menos nos experimentos efetuados com o doador 3. Nas culturas tratadas com metilmercúrio na concentração de 50µg/l destaca-se que o IM volta a aumentar em relação ao controle, exceto nos experimentos do doador 3. Nas culturas tratadas com 100µg/l de metilmercúrio ocorreram variações de IM (nos doadores 1, 2 e 4 aconteceu uma redução do IM se comparado com a concentração de 50µg/l, enquanto nos doadores 3 e 5 houve aumento deste IM em relação à concentração de 50µg/l).

Finalmente, a exposição das culturas de linfócitos à concentração de 500 µg/l de metilmercúrio, também produziu resultados diversos de índice mitótico variando de 0.022 para o doador 5 a 0.077 para o doador 2.

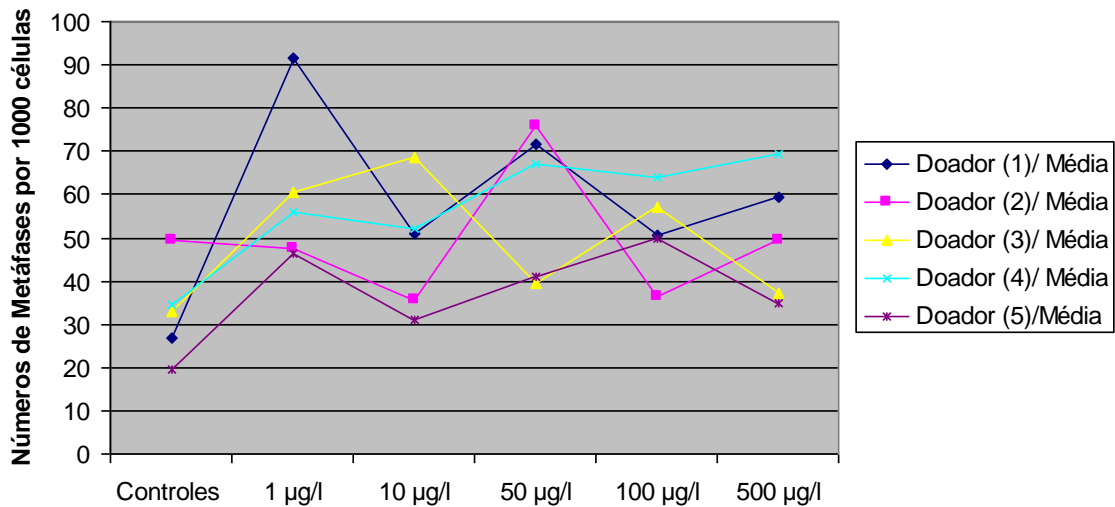
Toda a descrição anterior pode ser visualizada na Figura 7.



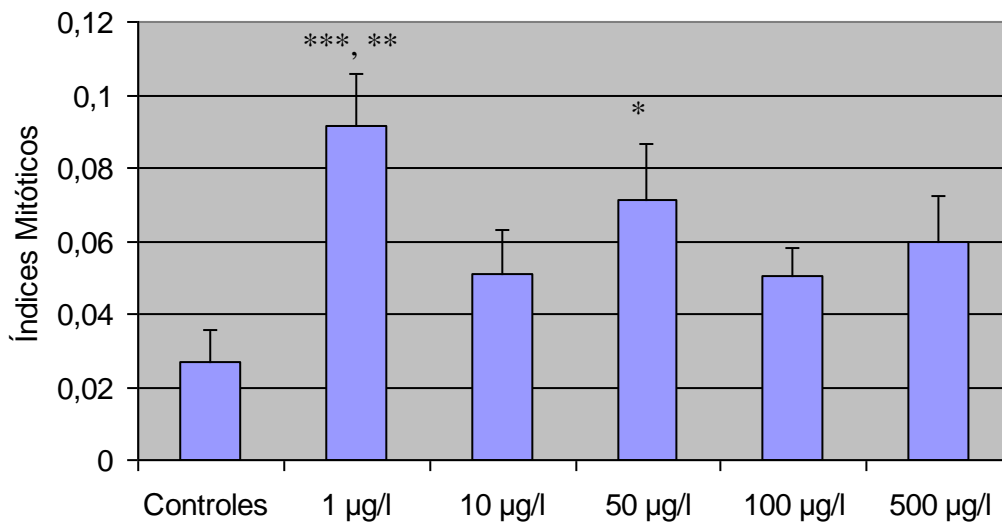
Os resultados de IM encontrados demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de 1µg/l e 50 µg/l metilmercúrio utilizadas quando comparadas ao controle (Figura 8). Esse aumento significativo do IM indica um aumento da proliferação celular, ou seja, alterações no processo de divisão celular quando comparados com o controle.

**Tabela 4.** Número de metáfases (NM) e índice mitótico (IM) de culturas de linfócitos expostas *in vitro* ao metilmercúrio (0-500 µg/l) usando a técnica de detecção de aberrações cromossômicas.

<i>Concentrações CH<sub>3</sub>Hg (µg/l)</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>10</i>	<i>50</i>	<i>100</i>	<i>500</i>
<u>Doador 1</u>						
Experimento 01						
NM	29	88	46	80	51	69
IM	0.029	0.088	0.046	0.08	0.051	0.069
Experimento 02						
NM	25	95	56	63	50	50
IM	0.025	0.095	0.056	0.063	0.05	0.05
<u>Doador 2</u>						
Experimento 01						
NM	52	51	35	79	34	42
IM	0.052	0.051	0.035	0.079	0.034	0.042
Experimento 02						
NM	47	44	36	73	39	57
IM	0.047	0.044	0.036	0.073	0.039	0.057
<u>Doador 3</u>						
Experimento 01						
NM	36	69	76	44	52	32
IM	0.036	0.069	0.076	0.044	0.052	0.032
Experimento 02						
NM	30	52	61	35	62	42
IM	0.03	0.052	0.061	0.035	0.062	0.042
<u>Doador 4</u>						
Experimento 01						
NM	38	53	50	65	60	77
IM	0.038	0.053	0.05	0.065	0.06	0.077
Experimento 02						
NM	31	59	54	69	68	62
IM	0.031	0.059	0.054	0.069	0.068	0.062
<u>Doador 5</u>						
Experimento 01						
NM	18	42	26	42	47	22
IM	0.018	0.042	0.026	0.042	0.047	0.022
Experimento 02						
NM	21	51	36	40	53	48
IM	0.021	0.051	0.036	0.04	0.053	0.048



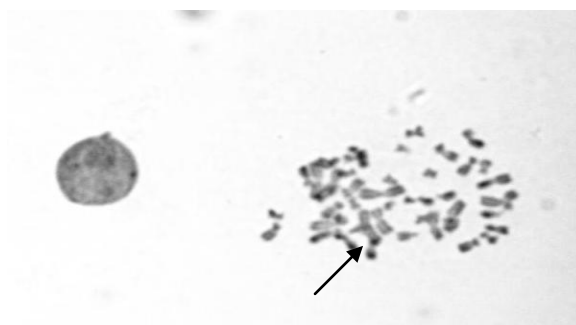
**Figura 7.** Número de metáfases encontradas nas culturas de linfócitos, expostas *in vitro* ao metilmercúrio, dos cinco doadores usando a técnica de detecção de aberrações cromossômicas.



**Figura 8.** Média dos Índices Mitóticos ( $\pm$  desvio médio) de culturas de linfócitos tratadas com diferentes concentrações de metilmercúrio. \* $p < 0.05$  vs Controle; \*\*  $p < 0.05$  vs 10 $\mu$ g/l e 100  $\mu$ g/l; \*\*\*  $p < 0.01$  vs Controle.

Para evitar qualquer influencia de outros fatores que não fosse a intoxicação mercurial, também foi testada a Correlação de Pearson entre a idade de cada doador e o índice mitótico das culturas tratadas com metilmercúrio nas concentrações de 1  $\mu$ g/l e 50  $\mu$ g/l (estas concentrações foram consideradas as mais significativas). Foi observada uma correlação negativa ( $r = -0.4662$ , para 1  $\mu$ g/l e  $r = -0.3791$ , para 50  $\mu$ g/l) entre o IM e a idade, com nível de significância igual a  $p = 0.4286$  (1  $\mu$ g/l) e  $p = 0.5292$  (50  $\mu$ g/l). Assim, a idade pode ser considerada um fator que não influenciou diretamente nos valores de IM.

Finalmente, com o objetivo de validar a metodologia empregada foram realizados controles positivos com culturas de linfócitos expostas à luz ultravioleta onde foram detectados aberrações cromossômicas (Figura 9) e o IM aumentou com o tempo de exposição de 30 minutos e diminuiu com 45 minutos em comparação com o controle (Tabela 5).



**Figura 9.** Exemplo de aberração cromossômica encontrada nas culturas de linfócitos sanguíneos expostas *in vitro* à luz ultravioleta durante 30 minutos. A seta indica um cromossomo triradial. (aumento de 1000 x)

**Tabela 5.** Índices mitóticos de culturas de linfócitos sanguíneos expostas *in vitro* à luz ultravioleta

Tempo de Exposição	Índices Mitóticos	Desvio Médio
Sem exposição	0.023	± 0,007
30 minutos	0.041	± 0,007
45 minutos	0.016	± 0,006

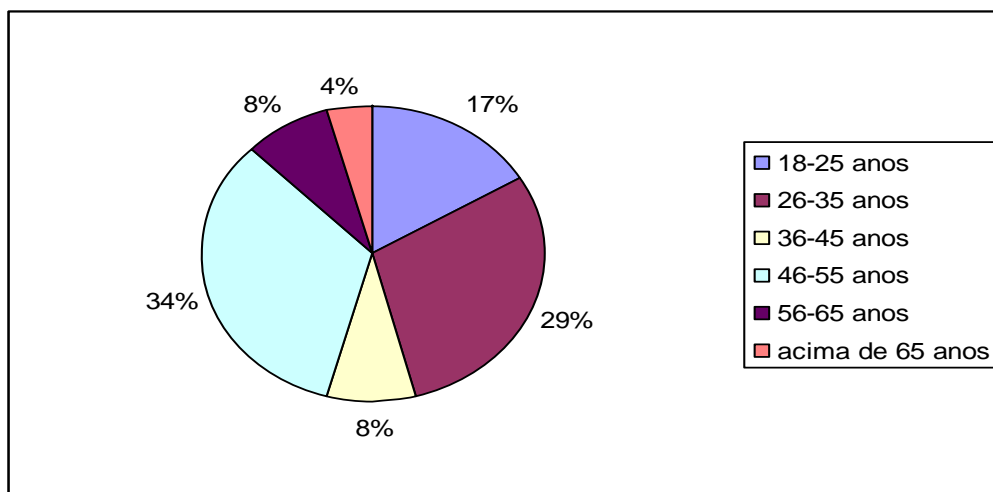
#### 4.3 SELEÇÃO DA POPULAÇÃO CONTROLE E APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE DETECÇÃO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

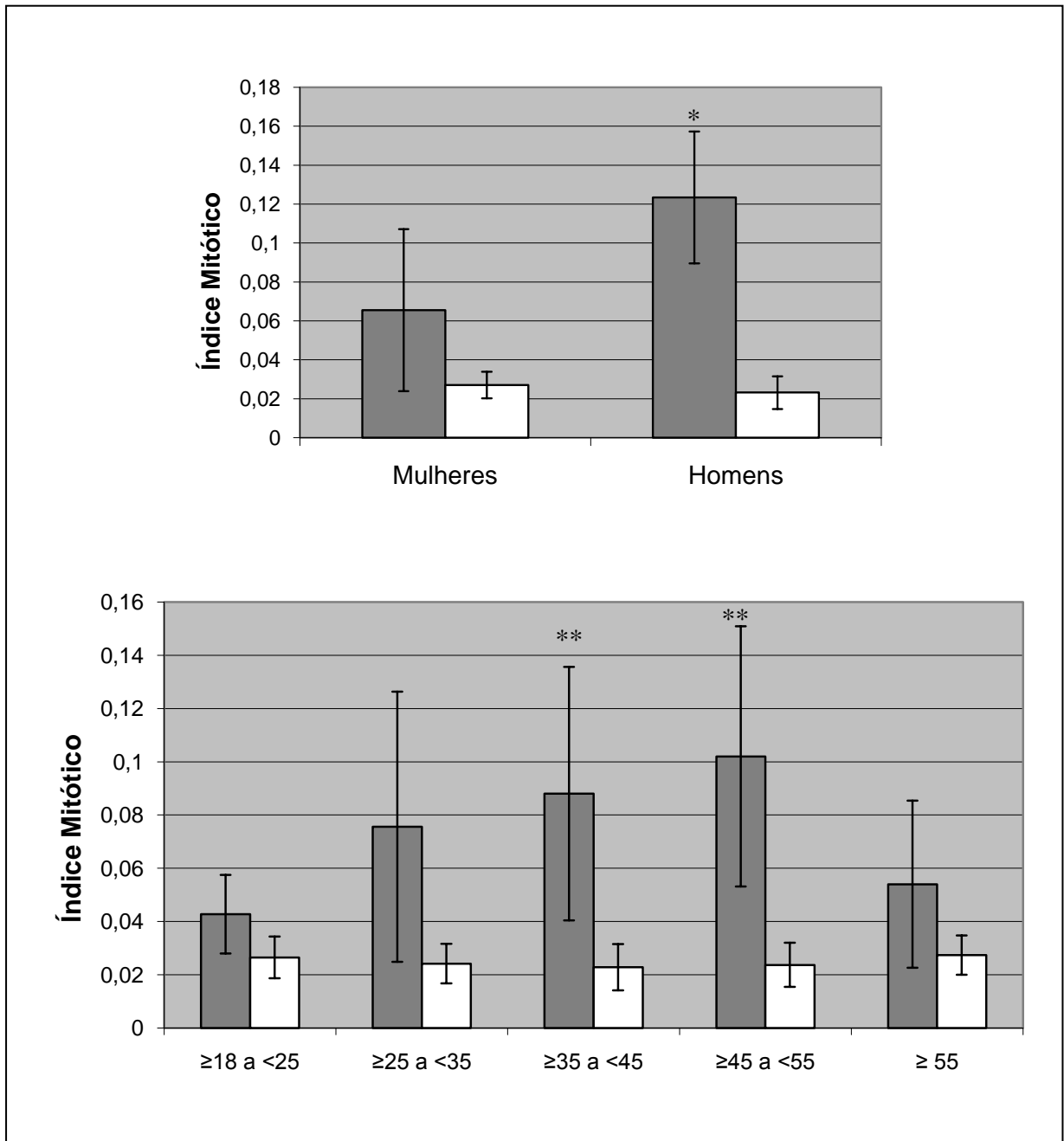
Após os experimentos realizados *in vitro* com culturas de linfócitos tratadas com metilmercúrio observou-se que a técnica mais sensível foi a de detecção de aberrações cromossômicas, que foi escolhida para ser aplicada em uma população que venha servir como controle para estudos epidemiológicos de genotoxicidade de mercúrio. A população selecionada foi à comunidade de Panacauera (Figura 1), por ter características muito semelhantes às populações ribeirinhas de Tapajós, mas sem exposição mercurial.

Foi realizada uma expedição à comunidade de Panacauera onde foram coletadas amostras de sangue de 30 doadores voluntários. Não foram detectadas aberrações cromossômicas em nenhuma das culturas. Os resultados de índices mitóticos obtidos para cada indivíduo estão representados na tabela 6. A média dos índices mitóticos e o desvio médio para toda a população foram de  $0.077 \pm 0.045$ .

**Tabela 6.** Dados da população controle (Panacauera) de acordo com a idade, sexo e o índice mitótico observado.

População Controle	Sexo	Idade	Índice Mitótico
Doador 1	F	49	0.033
Doador 2	F	28	0.151
Doador 3	F	41	0.041
Doador 4	F	21	0.054
Doador 5	F	21	0.061
Doador 6	F	22	0.033
Doador 7	F	34	0.014
Doador 8	F	44	0.078
Doador 9	F	53	0.151
Doador 10	F	76	0.023
Doador 11	F	19	0.023
Doador 12	F	33	0.022
Doador 13	F	64	0.038
Doador 14	F	49	0.026
Doador 15	M	49	0.157
Doador 16	F	49	0.169
Doador 17	F	35	0.026
Doador 18	M	31	0.127
Doador 19	M	26	0.064
Doador 20	M	47	0.098
Doador 21	M	35	0.171
Doador 22	F	48	0.08
Doador 23	F	42	0.124
Doador 24	F	64	0.101
Doador 25	-	-	0.04
Doador 26	-	-	0.106
Doador 27	-	-	0.037
Doador 28	-	-	0.132
Doador 29	-	-	0.175
Doador 30	-	-	0.087

**Figura 10.** Distribuição da população controle (Panacauera) de acordo com intervalos de idade.



**Figura 11.** Índices mitóticos (média  $\pm$  desvio médio) dos indivíduos de Panacuera (verde) e Brasília Legal (branco) agrupados por sexo (acima) ou intervalo de idade (abaixo). Os dados de Brasília Legal procedem de AMORIM et al. (2000). \* $p < 0.05$  vs Mulheres; \*\* $p < 0.05$  vs  $18 \geq a < 25$ .

Devido à proporção relativamente elevada de pessoas com mais de 35 anos (Figura 10), foi testada a correlação de Pearson entre idade e índice mitótico, onde foi observada uma correlação positiva ( $r = 0.0872$ ), entre esses dados, com nível de significância igual a  $p = 0.6853$ . Portanto, não se pode inferir que a idade influencia diretamente nos resultados dos índices mitóticos.

Para uma melhor análise dos resultados, os dados de índice mitótico de Panacauera foram agrupados por sexo ou idade (Figura 11) e comparados com os resultados de AMORIM et al. (2000) para a população de Brasília Legal (Figura 1).

As médias dos índices mitóticos de todos os grupos da população de Panacauera foram superiores às da população de Brasília Legal (população exposta ao metilmercúrio pela dieta), mostrando uma tendência que chegou a ser estatisticamente significativa para os grupos de 35 a 44 anos, de 45 a 54 anos e para os homens (Figura 8).

## 5.0 DISCUSSÃO

O estudo epidemiológico de qualquer agente genotóxico é extremamente complicado devido à dificuldade de eliminar o efeito de outros fatores que podem interferir nos resultados. Para começar, características individuais, como por exemplo, a raça, pode determinar uma sensibilidade diferenciada ao efeito genotóxico de agentes genotóxicos, como é o caso da radiação solar (MARROT et al., 2005). As imigrações de populações de diferentes continentes e a existência de numerosos povos indígenas fizeram que a população amazônica possuísse características físicas muito diferentes de outras populações. Assim, a primeira parte deste trabalho teve por objetivo a aplicação e comparação de técnicas tradicionais (micronúcleos e aberrações cromossômicas) de detecção de genotoxicidade mercurial em linfócitos sanguíneos de voluntários oriundos da região amazônica e a determinação de qual seria a técnica mais adequada para a detecção de genotoxicidade nas populações amazônicas.

Exceto nos garimpos, onde a exposição ocupacional acontece por inalação direta do vapor de mercúrio, o tipo de exposição mercurial mais comum na região amazônica é através da dieta pelo consumo de peixe contaminado com metilmercúrio (GODCHFELD, 2003; CRESPO-LÓPEZ et al., 2005; SÁ et al., 2006; PINHEIRO et al., 2006; PINHEIRO et al., 2007). Na região do rio Tapajós (Figura 1), por exemplo, este tipo exposição provocou que os níveis de exposição nas populações ribeirinhas tenham sido elevados no passado (SÁ et al., 2006). Atualmente, estes níveis são menores (mas ainda ligeiramente acima do limite determinado pela OMS (WHO, 1990), estando, as populações ribeirinhas, expostas à níveis relativamente baixos de metilmercúrio (revisado por SÁ et al., 2006; PINHEIRO et al., 2007; PINHEIRO et al., 2008). Assim, este trabalho usou concentrações relativamente baixas de metilmercúrio (1-500 µg/l ou 0,004-2 µM) para testar *in vitro* as técnicas de detecção de genotoxicidade.

A principal conclusão que surge dos resultados obtidos com a técnica de detecção de micronúcleos é que ela não parece ser sensível o suficiente para registrar qualquer alteração genotóxica provocada pelas concentrações de metilmercúrio usadas (em muitos poucos casos foram encontrados micronúcleos ou pontes nucleoplasmáticas) (Tabela 2). Contudo, parece existir certa tendência ao aumento de células binucleadas com a concentração de 1 µg/l (Figura 5). Essa eventual tendência poderia indicar um aumento da proliferação celular provocada pela exposição a doses muito baixas de metilmercúrio,

entretanto, será preciso aumentar o número de doadores e o número de experimentos para poder ter certeza.

Também não foram detectadas alterações cromossômicas visíveis nos linfócitos expostos a essas baixas concentrações de metilmercúrio (Tabela 4), porém, quando foi determinado o índice mitótico (número de metáfases em 1000 células), se observou um aumento muito significativo deste índice nas células incubadas com 1 e 50 µg/l (Tabela 4 e Figuras 7 e 8). Curiosamente, a concentração de 10 µg/l não teve diferenças significativas com o controle constituindo um fenômeno para o qual não temos explicação ainda (Figura 8).

Quando os linfócitos foram expostos *in vitro* à luz ultravioleta como controle positivo, as duas técnicas revelaram alterações (Tabelas 3 e 5, e Figuras 6 e 9) validando os resultados anteriores.

Precisamente, o índice mitótico representa um dos parâmetros mais usados para a identificação do efeito genotóxico do mercúrio e seus compostos. Por ser um parâmetro bastante sensível e de fácil execução ele já foi destacado por vários trabalhos (AMORIM et al., 2000; BAHIA et al., 2004; SILVA-PEREIRA et al., 2005; CRESPO-LÓPEZ et al., 2007) que estudaram a genotoxicidade do mercúrio. O valor do índice mitótico indica alteração na proliferação celular, ou seja, alterações durante o processo de divisão celular. O aumento do índice mitótico das culturas de linfócitos sanguíneos humanos expostos a baixas concentrações de metilmercúrio indicaria aumento na proliferação celular e um maior risco potencial de início de processos carcinogênicos. Resultados semelhantes foram encontrados também em culturas de neuroblastoma e glioblastoma humanos expostas a 0,1 e 1 µM de metilmercúrio (CRESPO-LÓPEZ et al., 2007).

Todos esses resultados apóiam a idéia de que esse parâmetro seria um dos mais sensíveis para a detecção da genotoxicidade causada pelo metilmercúrio e que a técnica de detecção de aberrações cromossômicas parece ser a mais adequada.

Essas diferenças na sensibilidade de detecção da genotoxicidade de compostos de mercúrio usando diferentes técnicas também foram registradas por outros autores no passado (Tabela 7). Analisando os estudos *in vitro* que foram feitos em culturas de linfócitos sanguíneos humanos desde os anos 90 (Tabela 7), podemos observar que os compostos orgânicos de mercúrio produzem alterações genotóxicas (como micronúcleos e aberrações cromossômicas, entre outras) estatisticamente significativas com concentrações mais baixas,



isto é, o potencial genotóxico desses compostos é muito maior. Entre eles se destaca o metilmercúrio como a substância mais genotóxica das que foram estudadas *in vitro* até agora (BETTI et al., 1992; OGURA et al., 1996; LEE et al., 1997; SILVA-PEREIRA et al., 2005).

Esses estudos usaram várias técnicas de genotoxicidade (detecção de micronúcleos, aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs, e níveis de 8-hidroxideoxiguanina), e muitas vezes, comparando algumas dessas técnicas entre si (Tabela 7). Na tabela 7 podemos observar que a técnica de aberrações cromossômicas foi a mais sensível, como demonstrado também no nosso estudo.

Apesar de que os resultados foram variáveis (Tabela 7), na maioria desses estudos só foram encontradas alterações genotóxicas quando se usou concentrações superiores às utilizadas no nosso estudo, o que poderia explicar a ausência de detecção de micronúcleos e aberrações cromossômicas nos nossos resultados.

Até agora, só existe outro estudo *in vitro* realizado com linfócitos humanos (SILVA-PEREIRA et al., 2005) que tenha usado concentrações tão baixas de metilmercúrio como as usadas no nosso estudo. Curiosamente, naquele estudo o metilmercúrio provocou variações significativas no índice mitótico a partir de uma concentração (100 µ/l) muito maior da encontrada nos nossos resultados (Figura 8). Assim, nossos resultados parecem ser mais condizentes com os estudos *in vivo* realizados nas populações amazônicas (AMORIM et al., 2000; BAHIA et al., 2004), onde variações significativas no índice mitótico foram registradas, mesmo quando a detecção de aberrações cromossômicas não foi muito evidente.

Atualmente, existem várias hipóteses para explicar o mecanismo molecular da genotoxicidade provocada pela exposição aos compostos de mercúrio nos estudos *in vitro* relatados acima. Essas hipóteses incluem a ligação direta do mercúrio ao DNA, a produção de radicais livres e estresse oxidativo, a inibição da formação do fuso mitótico (pela ação do mercúrio nos microtúbulos), e a influência no mecanismo de reparo do DNA.

De acordo com os dados de Li e colaboradores (2006), os compostos de mercúrio são capazes de se ligar diretamente ao DNA formando ligações covalentes com os átomos de nitrogênio da cadeia. Esses autores revelaram que os compostos orgânicos de mercúrio como metilmercúrio, etilmercúrio e fenilmercúrio exibem uma maior afinidade e se ligam mais rapidamente ao DNA, mostrando um potencial maior para causar dano. Como demonstrado por eletroforese capilar, o metilmercúrio foi o que se ligou mais rapidamente ao DNA,

sugerindo que este composto possui uma capacidade maior que os outros compostos para a formação de complexos estáveis com o DNA (LI et al., 2006).

**Tabela 7.** Concentrações mínimas, encontradas na literatura, de diferentes compostos de mercúrio que provocaram alterações genotóxicas significativas em culturas de linfócitos humanos expostos *in vitro*.

Composto Mercurial	BETTI et al., 1992	OGURA et al., 1996	LEE et al., 1997	WESTPHA L et al., 2002	SILVA-PEREIRA et al., 2005	EKE AND ÇELIK, 2008
Metilmercúrio	>0.6 $\mu$ M (AC)	2 $\mu$ M (AC) 5 $\mu$ M (MN) 5 $\mu$ M (8-OHdG)	20 $\mu$ M (TCI) 10 $\mu$ M (IPR)		0.1 $\mu$ g/l (AC) 100 $\mu$ g/l (IM)	
Dimetilmercúrio	43.4 $\mu$ M (TCI) 1.73 $\mu$ M (ACn)					
Timerosal (etilmercúrio)				0.05 $\mu$ g/ml (MN) ns abaixo de 0.5 $\mu$ g/ml (IDN)		0.2 $\mu$ g/ml (TCI) 0.2 $\mu$ g/ml (IPR) 0.4 $\mu$ g/ml (IM)
Mercúrio inorgânico		10 $\mu$ M (AC) 20 $\mu$ M (MN) 10 $\mu$ M (8-OHdG)	ns abaixo de 30 $\mu$ M (TCI) 30 $\mu$ M (IPR)		1 mg/l (AC) ns abaixo de 1 mg/l (IM)	
Acetato de fenilmercúrio			10 $\mu$ M (TCI) 10 $\mu$ M (IPR)			

ns = não significativo

AC = presença de aberrações cromossômicas (s=estrutural; n=numérica)

MN = presença de micronúcleos

8-OHdG = aumento dos níveis de 8-hidroxideoxiguanina

TCI = presença de troca de cromátides irmãs

IPR = redução do índice de proliferação (definido como: [(1 x número de metáfases na primeira divisão) + (2 x número de metáfases na segunda divisão) + (3 x números de metáfases em subseqüentes divisões)]/total do números de metáfases)

IDN = índice de divisão nuclear (não definido)

IM = redução do índice mitótico (definido como: números de metáfases em 1000 células)

A segunda hipótese considera que a genotoxicidade da exposição mercurial seria provocada pelo aumento de estresse oxidativo celular através da formação de radicais livres ou alterações nas defesas antioxidantes. Existem evidências de que o mercúrio e seus compostos possuem capacidade de induzir lesões celulares através do aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO), principal tipo de radicais livres envolvidos em mecanismos

patogênicos (ERCAL et al., 2001). Por exemplo, Schurz e colaboradores (2000) registraram um aumento significativo dos níveis de ERO (determinados indiretamente pela quantidade intracelular de  $H_2O_2$ ) em células expostas a cloreto de mercúrio. Esse aumento foi proporcional ao aumento na frequência de mutações observadas nas células expostas. Os resultados obtidos por estes autores também confirmaram a influência do mercúrio nos níveis das defesas antioxidantes, observando um incremento inicial nos níveis de glutathione e metalotioneínas em resposta à exposição com baixas doses de mercúrio, seguido por uma diminuição dos níveis de glutathione com doses muito elevadas de mercúrio.

Outras evidências que apóiam a produção de radicais livres como responsável pela genotoxicidade causada pelos compostos mercuriais consistem na proteção exercida por substâncias antioxidantes como vitamina C (RAO et al., 2001), glutathione (SCHURZ et al., 2000; HERCULANO et al., 2006) ou metalotioneínas (SCHURZ et al., 2000), entre outras. Esses compostos podem influir na genotoxicidade provocada pelo mercúrio. De acordo, com resultados obtidos por Rao et al. (2001), compostos mercuriais em baixas concentrações podem induzir efeito citotóxico (na avaliação do índice de proliferação) e a formação de mitoses anormais em culturas de linfócitos. No entanto, esse efeito pode ser evitado com a adição de vitamina C nas culturas de linfócitos, devido a ação antioxidante desta vitamina.

As conseqüências da geração de radicais livres são extensas, mas duas delas são particularmente importantes para classificar os radicais livres como genotóxicos:

- à interação direta dos radicais livres com ácidos nucléicos que provocaria alterações tais como mutações gênicas (OLSZEWERI et al., 1995)
- à alteração conformacional das proteínas, responsáveis pela formação e manutenção do DNA. Os radicais livres são capazes de alterar a conformação de uma gama de proteínas, como as enzimas de reparo, as DNA-polimerases, e até as proteínas motoras tubulina e cinesina, responsáveis pelo fuso mitótico e segregação cromossômica (STOIBER et al., 2004).

Assim, o terceiro mecanismo proposto para explicar a genotoxicidade do mercúrio está relacionado com a ação mercurial nos microtúbulos. Existem evidências indicativas da ação dos compostos mercuriais interagindo na rede de microtúbulos (estruturas que participam de diversos processos celulares, como na formação do citoesqueleto, fuso mitótico e segregação cromossômica) (THIER et al., 2003; BONACKER et al., 2004; STOIBER et al., 2004). Baixas doses de mercúrio inorgânico inibem de maneira dose-

dependente a montagem e a velocidade de montagem dos microtúbulos. Esse processo gera problemas no momento da segregação cromossômica durante a mitose, impedindo o fenômeno de translocação dos cromossomos e induzindo micronúcleos (THIER et al., 2003; BONACKER et al., 2004; STOIBER et al., 2004). Não se tem conhecimento do mecanismo molecular que leva a essas alterações microtubulares, entretanto, o mais provável é que a ligação do mercúrio aos grupos sulfidrilas (alvos preferenciais do mercúrio) da tubulina e cinesina impeça a ligação do GTP (nucleosídeo trifosfato) a estas proteínas, bloqueando a cascata bioquímica responsável pelo funcionamento da célula (LEONG et al., 2001).

Recentemente, também está sendo defendida uma última hipótese para explicar a genotoxicidade do mercúrio baseada na influência do mercúrio no mecanismo de reparo do DNA. Os mecanismos de reparo do DNA constituem um complexo sistema de defesa desenhado para proteger a integridade do genoma e qualquer deficiência deste sistema pode conduzir eventualmente ao processo de carcinogênese. Em um estudo realizado com trabalhadores intoxicados por exposição ocupacional a vapor de mercúrio ( $0,025 \text{ mg/m}^3$ ), foram induzidos *in vitro* danos no DNA por raios X e luz UV nas culturas de linfócitos sanguíneos, observando-se a capacidade de reparo do DNA em cada indivíduo através do ensaio de eletroforese de célula única (técnica que determina a fragmentação do DNA individual de cada célula) (CEBULSKA-WASILEWSKA et al., 2005). A análise mostrou uma associação negativa entre a eficiência de reparo e a exposição ocupacional e o tempo de trabalho dos indivíduos expostos. Sugeriu-se ainda neste estudo que os danos mercuriais seriam ocasionados pelas alterações no reparo da recombinação e excisão de bases, e não pelas alterações no mecanismo de reparo de excisão de nucleotídeos, como sugerido por Au e colaboradores (2003). Essa deficiência nos mecanismos de reparo seria causada pela ligação do mercúrio aos grupos sulfidrilas contidos nas enzimas de reparo de DNA, deformando severamente a integridade estrutural e a atividade destas enzimas (CEBULSKA-WASILEWSKA et al., 2005).

Todas as quatro hipóteses não são excludentes entre si, de forma que o mais provável é que o mercúrio consiga desencadear todos esses mecanismos, e talvez outros ainda desconhecidos, para produzir genotoxicidade nas populações expostas. Esses estudos demonstram também que os limites de tolerância para a exposição humana ao mercúrio devem ser reavaliados, levando-se em conta a genotoxicidade e a intoxicação crônica pelo metal. Para isso, torna-se imprescindível o desenvolvimento de estudos epidemiológicos contínuos que visem estabelecer o estado de genotoxicidade das populações.

Assim, nossa contribuição para esse problema consistiu em determinar quais seriam os valores de genotoxicidade em uma população amazônica ribeirinha para poder eliminar interferências e apoiar os estudos que são realizados na região amazônica. Para isso, foi escolhida a população de Panacauera (Figura 1), com características muito semelhantes às de populações ribeirinhas da região de Tapajós. Essa população de Panacauera vem sendo monitorada e já foi usada como população controle em estudos comparativos devido à ausência de exposição mercurial (PINHEIRO et al., 2006; PINHEIRO et al., 2007; PINHEIRO et al., 2008). Os níveis de mercúrio total encontrados nas amostras de cabelo dos habitantes de Panacauera sempre foram de 2-3 ppm em todos os estudos realizados (PINHEIRO et al., 2006; PINHEIRO et al., 2007; PINHEIRO et al., 2008), o que fica muito abaixo do limite de tolerância de 10 ppm estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1990).

Como referido na Introdução, existem unicamente dois estudos epidemiológicos realizados em comunidades da Amazônia que avaliam a genotoxicidade por intoxicação mercurial (AMORIM et al., 2000; BAHIA et al., 2004). Ambos os estudos foram conduzidos na população de Brasília Legal (Figura 1) e usaram a técnica de detecção de aberrações cromossômicas em linfócitos sanguíneos. Essa comunidade está exposta à intoxicação mercurial através da dieta pelo consumo de peixe contaminado (AMORIM et al., 2000; BAHIA et al., 2004). Porém, praticamente não foram detectadas aberrações cromossômicas, mas sim variações no índice mitótico. Os autores tentaram estabelecer uma correlação entre o valor de índice mitótico dos linfócitos sanguíneos e a quantidade de mercúrio encontrada no cabelo de cada indivíduo. Amorim e colaboradores (2000) demonstraram uma correlação negativa entre ambos os fatores que, posteriormente, foi rebatida por Bahia e colaboradores (2004). Essa diferença nos resultados foi atribuída à diferença de cinco anos entre um estudo e o outro, e a uma ligeira diminuição dos níveis de mercúrio registrados (de 13,5 a 9,6 ppm) (BAHIA et al., 2004). No entanto, em nenhum desses estudos foi usada uma população ribeirinha sem exposição mercurial que possa servir como controle para comparação.

A tentativa de associação entre ambos os fatores (nível de mercúrio no cabelo e índice mitótico nos linfócitos) pode ser discutível desde que o mercúrio detectado no cabelo se refere a uma exposição relativamente recente e o índice mitótico pode refletir alterações acumuladas durante anos. A quantidade de mercúrio absorvida pelo corpo humano em um mês é acumulada em aproximadamente 1 cm de cabelo. O primeiro centímetro de cabelo desde a raiz contém o mercúrio absorvido no último mês, o seguinte centímetro contém o

mercúrio absorvido há dois meses, e assim sucessivamente constituindo um registro temporal da intoxicação mercurial. Nos homens, por exemplo, o mercúrio quantificado no cabelo corresponde normalmente à exposição dos dois últimos meses, devido a que normalmente usam o cabelo curto. Além disso, nas populações ribeirinhas, devido à dificuldade para tratar adequadamente do cabelo longo, a tendência é que as mulheres também usem o cabelo relativamente curto. Assim, as medidas de mercúrio refletem só a exposição recente. Porém, o dano no DNA pode ser acumulado durante anos conduzindo finalmente a alterações na proliferação celular em um momento determinado da vida. Portanto, eventualmente seria possível detectar alterações na proliferação celular sem existir necessariamente uma correlação com os níveis de intoxicação mercurial dos últimos dois meses. Isso poderia constituir uma explicação alternativa para os resultados de Bahia et al. (2004).

Assim, a única forma de esclarecer se existem alterações causadas pelo mercúrio é através do uso de uma população controle com baixa ou nenhuma exposição mercurial. Esse é o caso da comunidade de Panacauera.

Os valores de índice mitótico detectados nos linfócitos sangüíneos da população de Panacauera apresentaram uma variabilidade (Tabela 6) que não esteve relacionada com a idade ou o sexo. Embora a diferença encontrada entre as médias de índice mitótico das populações de Panacauera (este estudo) e de Brasília Legal (AMORIM et al., 2000) não foi significativa, foi detectada certa tendência que sim foi significativa para os grupos de 35 a 44 anos, de 45 a 54 anos e para os homens (Figura 11). Quando ambas as populações foram agrupadas dessa forma, o índice mitótico de Brasília Legal foi inferior ao de Panacauera, o que indicaria uma inibição da progressão do ciclo celular e/ou uma perda da capacidade proliferativa causada pela intoxicação mercurial (AMORIM et al., 2000; SILVA-PEREIRA et al., 2005). Todavia será necessário aumentar o número amostral para ter certeza dessas conclusões no nível epidemiológico.

A conclusão epidemiológica anterior parece contradizer outros resultados *in vitro* onde já foi encontrado um aumento do índice mitótico provocado pelo mercúrio (CRESPO-LÓPEZ et al., 2007; este estudo). Porém, as doses de metilmercúrio utilizadas neste estudo e no estudo de Crespo-López et al. (2007) foram muito baixas. Nossa hipótese é que o índice mitótico é um dos primeiros parâmetros a ser afetado pelo mercúrio, e que concentrações baixas de mercúrio aumentam a proliferação celular, enquanto concentrações mais elevadas inibem a proliferação e/ou produzem morte celular.

Estes resultados apóiam a idéia de que o índice mitótico poderia servir como parâmetro essencial para o diagnóstico precoce do dano causado pela exposição mercurial e contribuem para o escasso conhecimento epidemiológico sobre as conseqüências que está tendo a intoxicação crônica de mercúrio nas populações da Amazônia.

## 6.0 CONCLUSÕES

- A técnica de detecção de aberrações cromossômicas foi a mais sensível quando comparada com a técnica de detecção de micronúcleos para a verificação da genotoxicidade do metilmercúrio em voluntários oriundos da região amazônica.
- Através da revisão dos trabalhos realizados desde os anos 90 (Tabela 7) com diferentes concentrações de compostos de mercúrio verificamos que a técnica de detecção de aberrações cromossômicas também foi a mais sensível, com demonstrado por nossos resultados.
- O índice mitótico pode ser considerado um dos parâmetros mais sensíveis para a detecção de genotoxicidade do metilmercúrio.
- O fato encontrado no nosso estudo de que o índice mitótico varie significativamente com concentrações relativamente baixas de metilmercúrio que não chegam a provocar a aparição visível de aberrações cromossômicas parece condizer com os estudos *in vivo* realizados nas populações amazônicas, onde variações significativas no índice mitótico foram registradas, mesmo quando a detecção de aberrações cromossômicas não foi muito evidente.
- A população de Panacauera (comunidade ribeirinha amazônica) pode servir, pelas suas características como população controle para os estudos que estão sendo desenvolvidos na Região Amazônica.
- A variação no índice mitótico parece depender da dose de mercúrio: doses baixas como as utilizadas neste trabalho produzem um aumento da proliferação celular, enquanto que doses altas parecem inibir essa proliferação e/ou produzir morte celular
- O índice mitótico poderia servir como parâmetro essencial para o diagnóstico precoce de dano causado pela exposição mercurial.



## 7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S dos. **BioEstat 5.0**. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, 2007.

AU, W. W.; SALAMA, S. A.; SIERRA-TORRES, C. H. Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 15, p.1843-1850, 2003.

AZEVEDO, F. A. **Toxicologia do Mercúrio**. São Paulo: RiMa, 2003.

BAHIA, M. O.; AMORIM, M. I.; BURBANO, R. R.; VINCENT, S.; DUBEAU, H. Genotoxic effects of mercury on *in vitro* cultures of human cells. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, n. 3, p. 437-443, 1999.

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.

BERLIN, M. **Mercury**. Handbook on the Toxicology of Metals. New York: Elsevier Science Publishers, 1986.

BETTI, C.; DAVINI, T.; BARALE R. Genotoxic activity of methyl mercury chloride and dimethyl mercury in human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 281, n. 4, p. 255-260, 1992.

BISHOP, J. M. Molecular themes in oncogenesis. **Cell**, v. 64, n. 2 p. 235-248, 1991.

BOENING, D.W. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. **Chemosphere**, v. 40, n. 12, p. 1335-1351, 2000.

BOFFETTA, P.; GARCIA-GOMEZ, M.; POMPE-KIRN, V.; ZARIDZE, D.; BELLANDER, T.; BULBULYAN, M.; CABALLERO, J.D.; CECCARELLI, F.; COLIN, D.; DIZDAREVIC, T.; ESPAÑOL, S.; KOBAL, A.; PETROVA, N.; SALLSTEN, G.; MERLER, E. Cancer occurrence among European mercury miners. **Cancer Causes Control**, v. 9, n. 6, p. 591-599, 1998.

BONACKER, D.; STOIBER, T.; WANG, M.; BOHM, K.J.; PROTS, I.; UNGER, E.; THIER, R.; BOLT, H.M.; DEGEN, G.H. Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function. **Archives of Toxicology**, v. 78, n. 10, p. 575–583, 2004.

BONASSI, S.; UGOLINI, D.; KIRSCH-VOLDERS, M.; STROMBERG, U.; VERMRMEULEN, R.; TUCKER, J. D. Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future prospectives. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 45, n. 2-3, p. 258-270, 2005.

BURGAZ, S.; KARAHALIL, B.; BAYRAK, P.; TASKIN, L.; YAVUZASLAN, F.; BOKESYOY, I.; ANZION, R. B.; BOS, R. P.; PLATIN, N. Urinary cyclophosphamide excretion and micronuclei frequencies in peripheral lymphocytes and in exfoliated buccal epithelial cells of nurses handling antineoplastics. **Mutation Research**, v. 439, n. 1, p. 97-104, 1998.

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**, v. 13, n. 2-3, p. 285-297, 1997.

CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; PANEK, A.; ZABINSKI, Z.; MOSZCZYNSKI, P.; AU, W. W. Occupational exposure to mercury vapour on genotoxicity and DNA repair. **Mutation Research**, v. 586, n. 2, p. 102–114, 2005.

CRESPO-LÓPEZ, M. E.; SÁ, A.L. de; HERCULANO, A. M.; BURBANO, R. R.; NASCIMENTO, J. L. M do. Methylmercury genotoxicity: a novel effect in human cell lines of the central nervous system. **Environment International**, v. 33, n. 2, p.141-146, 2007.

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.

EKE, Dilek; CELIK, Ayla. Genotoxicity of thimerosal in cultured human lymphocytes with and without metabolic activation sister chromatid exchange analysis proliferation index and mitotic index. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 4, p. 927-934, 2008.

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**, v. 1, n. 6, p. 529-539, 2001.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

FENECH, M.; CHANG, W. P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 534, n. 1-2, p. 65-75, 2003.

FERRARI, I.; GONÇALVES, A.; SERRA, O. J.; BARBOSA, A.; BRASILEIRO, I.; GONÇALVES, N. N. S.; PADOVANI, C. R. Saúde, garimpo e mercúrio entre os Kayapós: Estudo Exploratório. **Revista Saluvista**, v. 12, n. 1, p. 113-126, 1993.

FLORA, Silvio de; BENNICELLI, Carlo; BAGNASCO, Maria. Genotoxicity of mercury compounds. A review. **Mutation Research**, v. 317, n. 1, p. 57-79, 1994.

FRANCHI, E.; LOPRIENO, G.; BALLARDIN, M.; PETROZZI, L.; MIGLIORE, L. Cytogenetic monitoring of fishermen with environmental mercury exposure. **Mutation Research**, v. 320, n. 1-2, p. 23-29, 1994.

GOCHFELD M. Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, n. 1, p. 174-179, 2003.

HERCULANO, A. M.; CRESPO-LÓPEZ, M. E.; LIMA, S. M.; PINCANÇO-DINIZ, D. L. M.; NASCIMENTO, J. L. M. do. Methylmercury intoxication activates nitric oxide synthase in chick retinal cell culture. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 3, p. 415-418, 2006.

KATO, Ryijichi; NAKAMURA, Akihiro apud FLORA, Silvio de; BENNICELLI, Carlo; BAGNASCO, Maria. Genotoxicity of mercury compounds. A review. **Mutation Research**, v. 317, n. 1, p. 57-79, 1994.

LAZUTKA, J. R.; LEKECICIUS, R.; DEDONYTE, V.; MACIULEVICIUTE-GERVERS, L.; MIERAUSKIENE, J.; RUDAITIENE, S.; SLAPSYTE, G. Chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges in Lithuanian populations: effects of occupational and environmental exposures. **Mutation Research**, v. 445, n. 2, p. 225-239, 1999.

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.

LEE, T. K.; O'BRIEN, K.; EAVES, G. S.; CHRISTIE, K. I.; VARGA, L. Effect of blood storage on radiation-induced micronuclei in human lymphocytes. **Mutation Research**, v. 444, n. 1, p. 201-216, 1999.

LEE, C. H.; LIN, R. H.; LIU, S. H.; LIN-SHIAU, S. Y. Distinct genotoxicity of phenylmercury acetate in human lymphocytes as compared with other mercury compounds. **Mutation Research**, v. 14, n. 392, p. 269-276, 1997.

LEONG, C. C.; SYED, N. I.; LORSCHIEDER, F. L. Retrograde degeneration of neurite membrane structural integrity of nerve growth cones following in vitro exposure to mercury. **Neuroreport**, v. 12, n. 4, p. 733-737, 2001.

LI, Yna; JIANG, Yan, YAN, Xiu-Ping. Probing mercury species-DNA interactions by capillary electrophoresis with on-line electrothermal atomic absorption spectrometric detection. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 17, p. 6115-6120, 2006.

LIN, Che Jen; PEHKONEN, Simo. The chemistry of atmospheric mercury: a review. **Atmospheric Environment**, v. 33, n.13, p. 2067-2079, 1999.

MALM O. Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon. **Environmental Research**, v.77, n. 2, p. 73-78, 1998.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P.V.; DECORDER, I.; KIRSCH-VOLDERS M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1515-1531, 2006.

MONSALVE, Maria Victoria; CHIAPPE, Cinzia apud FLORA, Silvio de; BENNICELLI, Carlo; BAGNASCO, Maria. Genotoxicity of mercury compounds. A review. **Mutation Research**, v. 317, n. 1, p. 57-79, 1994.

MOORHEAD, P. S.; NOWELL, P. C.; MELLMAN, W. J.; BATTIPS, D. M.; HUNGERFORD, D. A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Experimental Cell Research**, v. 20, p. 613-616, 1960.

MARROT, L.;BELAIDI, J. P.; JONES, C.; PEREZ, P.; MEUNIER, J. R. Molecular responses to stress induced in normal human caucasian melanocytes in culture by exposure to simulated solar UV. **Photochemistry Photobiology**, v. 81, n. 2, p. 367-75, 2005.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Toxicological Effects of Methylmercury**. Washington: National Academy of Sciences, 2001.

OGURA, Hiroko; TAKEUCHI, Toru; MORIMOTO, Kanehisa. A comparison of the 8-hydroxydeoxyguanosine, chromosome aberrations and micronucleus techniques for the assessment of the genotoxicity of mercury compounds in human blood lymphocytes. **Mutation Research**, v. 340, n. 2-3, p. 175-182, 1996.

OLSZEWER, E. **Tratado de Medicina Ortomolecular**. São Paulo: Nova Linha, 1995.

PIETRO, A. di; VISALLI, G.; MAESTRA, S.; MICALE, R.; BALUCE, B., MATARESE, G.; CINGANO, L.; SCOGLIO, M. E. Biomonitoring of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of subjects with dental restorative fillings. **Mutation Research**, v. 650, n. 2, p. 115-122, 2008.

PINHEIRO, M. C.; MACCHI, B. M.; VIEIRA, J. L.; OIKAWA, T.; AMORAS, W. W.; CRESPO-LÓPEZ, M. E.; GUIMARÃES, G. A.; COSTA, C. A.; 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.

QUEIROZ, M. L.; BINCOLETTI, C.; QUADROS, M. R.; CAPITANI, E. M de. Presence of Micronuclei in Lymphocytes of Mercury Exposed Workers. **Immunopharmacology Immunotoxicology**, v. 21, n. 1, p. 141-150, 1999.

RAO, M. V.; CHINOY, N. J.; SUTHAR, M. B.; RAJVANSHI, M. I. Role of ascorbic acid on mercuric chloride-induced genotoxicity in human blood cultures. **Toxicology In Vitro**, v.15, n. 6, p. 649–654, 2001.

RIBEIRO, Lúcia Regina; SALVADORI, Dayse Maria Fávero; MARQUE, Edmundo Kana. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003.

SÁ, A. L. de; HERCULANO, A. M.; PINHEIRO, M. C.; SILVEIRA, L. C. L.; CRESPO-LÓPEZ, M. E; 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.

SANFELIU, C.; SEBASTIA, J.; CRISTOFOL, R.; RODRIGUEZ-FARRE, E. Neurotoxicity of organomercurial compounds. **Neurotoxicity Research**, v. 5, n. 4, p. 283–305, 2003.

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.

SCHURZ, F.; SABATER-VILAR, M.; FINK-GREMMELS, J. Mutagenicity of mercury chloride and mechanisms of cellular defence: the role of metal-binding proteins. **Mutagenesis**, v. 15, n. 6, p. 525-530, 2000.

SCHUURS, A. H. Reproductive toxicity of occupational mercury. A review of the literature. **Journal of Dentistry**, v. 27, n.4, p. 249-256, 1999.

SILVA-PEREIRA, L. C.; CARDOSO, P. C. S.; LEITE, D. S.; BAHIA, M. O.; BASTOS, W. R.; SMITH, M. A. C.; BURBANO, R. R. Cytotoxicity and genotoxicity of low doses of mercury chloride and methylmercury chloride on human lymphocytes in vitro. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 6, p. 901–907, 2005.

SILVA, Juliana da; ERDTMANN, Bernardo; HENRIQUES, João Antônio Pêgas. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SKERFVING apud FLORA, Silvio de; BENNICELLI, Carlo; BAGNASCO, Maria. Genotoxicity of mercury compounds. A review. **Mutation Research**, v. 317, n. 1, p. 57-79, 1994.

SRÁM, R. J.; ROSSNER, P.; PELTONEN, K.; PODRAZILOVÁ, K.; MRACKOVÁ, G.; DEMOPOULOS, N. A.; STEPHANOU, G.; VLACHODIMITROPOULOS, D.; DARROUDI, F.; TATES, A. D. Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, cells with high frequency of SCE, micronuclei and comet assay parameters in 1,3-butadiene-exposed workers. **Mutation Research**, v. 419, n. 1-3, p. 145-154, 1998.

STOIBER, T.; BONACKER, D.; BOHM, K. J.; BOLT, H. M.; THEIR, R.; DEGEN, G.; UNGER, E. Disturbed microtubule function and induction of micronuclei by chelate complexes of mercury(II). **Mutation Research**, v. 563, n. 2, p. 97-106, 2004.

TCHOUNWOU, P. B.; AYENSU, W. K.; NINASHVILI, N.; SUTTON, D. Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. **Environmental Toxicology**, v. 18, n. 3, p. 149-175, 2003.

THEIR, R.; BONACKER, D.; STOIBER, T.; BOHM, K. J.; WANG, M.; UNGER, E.; BOLT, H. M.; DEGEN, G. Interaction of metal salts with cytoskeletal motor protein systems. **Toxicology Letters**, v. 140-141, p. 75-81, 2003.

THOMAS, P.; UMEGAKI, K.; FENECH, M. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutagenesis**, v. 18, n. 2, p. 187-194, 2003.

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.

WESTPHAL, G. A.; ASGARI, S.; SCHULZ, T. G.; BUNGER, J.; MULLER, M.; HALLIER, E. Thimerosal induces micronuclei in the cytochalasin B block micronucleus test with human lymphocytes. **Archives of Toxicology**, v.77, n. 1, p. 50-55, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Environmental health criteria: methylmercury. **International program on Chemical Safety**, Geneva: WHO, p. 101-140, 1990.