



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

**Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia**



**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO E ÓRGÃO-ESPECÍFICO
NA INTOXICAÇÃO CRÔNICA POR CLORETO DE MERCÚRIO**

Dissertação de Mestrado

LUCILA LUDMILA PAULA GUTIERREZ

Porto Alegre, 2002.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

**Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia**



**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO E ÓRGÃO-ESPECÍFICO
NA INTOXICAÇÃO CRÔNICA POR CLORETO DE MERCÚRIO**

LUCILA LUDMILA PAULA GUTIERREZ

Orientadora: Dra. Adriane Belló Klein

Dissertação apresentada ao curso de pós graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia, do Instituto de Ciências Básica da Saúde da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Porto Alegre, Agosto de 2002.

“Se as coisas te parecem inatingíveis
Não é motivo para não querê-las
Triste seria o caminho se não fora
A presença constante das estrelas”

Mário Quintana

Dedico este trabalho a todos os seres que
visam melhorar a vida neste planeta.

AGRADECIMENTOS

A esta força maravilhosa que move os mundos.

À minha orientadora Adriane e ao inesquecível Prof. Belló, por terem me dado a chance de encontrar meu caminho, pela confiança que me depuseram e por todo o carinho, desvelo e ensinamentos durante todos estes anos.

À professora Susana Llesuy, pela dedicação e cuidado.

À Tânia, por ser sempre presente e disponível nas horas de aperto e também nas de descontração.

Ao Alex, ao Klipel e à Nicolle, por toda ajuda e participação na realização dos experimentos.

Às minhas super amigas, incentivadoras e companheiras das horas mais felizes e das mais tristes, dentro e fora do laboratório: Maristela, Patrícia, Jaqueline e Cláudia.

Aos meus amigos de todos os momentos...

A todos do laboratório, Dani, Beta, Pati, Helena, Martine, Bel, Pedro, Mauro, Felipe, Gilberti, Cris Campos, Marcus, Jorge, Fabiano, Cassiana, (desculpem se esqueci alguém) pelas conversas, risadas, besteiras, apoio e pelo ambiente amistoso.

A todos do Laboratório de Análises Clínicas Toxilab e ao seu coordenador Renato Nesralla Mattar, pela colaboração e pelo empenho em prol da Ciência.

Ao Fabiano, por ser meu companheiro de todas as horas, sempre paciente e compreensivo.

A minha querida irmã, Bárbara, por ter-me ensinado o valor da amizade.

Aos meus amados pais, por terem ensinado suas filhas a confiar na Vida, por sempre nos mostrar que é preciso ir atrás daquilo que se deseja e perseverar no caminho escolhido. Obrigada, Mãe e Pai, por vocês terem lutado pelos seus e pelos nossos sonhos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS, 8

LISTA DE TABELAS, 10

LISTA DE ABREVIATURAS, 11

RESUMO, 12

1. INTRODUÇÃO, 14

1.1- ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO, 14

1.1.1- EFEITO DAS EAO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS, 16

1.1.1.1- Reatividade, 16

1.1.1.2- Lipoperoxidação, 17

1.2- ANTIOXIDANTES: DEFESA BIOLÓGICA CONTRA AS EAO, 21

1.2.1- DEFESAS ANTIOXIDANTES, 21

1.2.1.1- Defesas Antioxidantes Enzimáticas, 21

1.2.1.2- Defesas Antioxidantes Não –Enzimáticas, 24

1.3- MERCÚRIO, 25

1.3.1- FORMAS QUÍMICAS E FONTES DE MERCÚRIO, 27

1.3.2- QUÍMICA DO MERCÚRIO E MECANISMO DE AÇÃO, 28

1.3.3- BIOTRANSFORMAÇÃO DO MERCÚRIO, 29

1.3.4- TOXICIDADE DO MERCÚRIO, 30

2. HIPÓTESE, 36

3. OBJETIVOS, 37

4. MATERIAL E MÉTODOS, 39

4.1- ANIMAIS, 39

4.2- GRUPOS EXPERIMENTAIS, 39

4.3- ADMINISTRAÇÃO DO CLORETO DE MERCÚRIO, 39

4.4- COLETA DE SANGUE, 40

4.5- SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E PREPARO DOS HOMOGENEIZADOS, 40

4.6- DOSAGEM DE MERCÚRIO NO SANGUE, 41

4.7- PREPARO DO SANGUE PARA ANÁLISE DE ESTRESSE OXIDATIVO, 41

4.8- QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS, 42

- 4.9- DOSAGEM DE HEMOGLOBINA, 42
- 4.10- QUIMILUMINESCÊNCIA INICIADA POR t-BOOH, 43
- 4.11- SUPERÓXIDO DISMUTASE, 43
- 4.12- CATALASE, 45
- 4.13- GLUTATIONA PEROXIDASE, 45
- 4.14- GLUTATIONA-S-TRANSFERASE, 47
- 4.15- CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP), 49
- 4.16- ANÁLISE ESTATÍSTICA, 49

5. RESULTADOS, 50

- 5.1- CURVA DE PESO DOS ANIMAIS, 50
- 5.2- DOSAGEM DE MERCÚRIO NO SANGUE, 52
- 5.3- RESULTADOS SISTÊMICOS, 53
 - 5.3.1- QUIMILUMINESCÊNCIA EM ERITRÓCITOS, 53
 - 5.3.2- ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM ERITRÓCITOS, 57
 - 5.3.3- CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DE AMOSTRA PLASMÁTICA, 62
- 5.4- RESULTADOS EM HOMOGENEIZADOS DE TECIDOS, 65
 - 5.4.1- QUIMILUMINESCÊNCIA NOS TECIDOS TESTADOS, 65
 - 5.4.2- ENZIMA ANTIOXIDANTE NOS TECIDOS ESTUDADOS, 66
 - 5.4.3- CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DAS AMOSTRAS TECIDUAIS, 69

6. DISCUSSÃO, 70

7. CONCLUSÃO, 78

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS, 79

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, 80

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Redução monoelétrica do oxigênio formando EAO, 15
- Figura 2: Reação de Fenton, 16
- Figura 3: Reação de Haber-Weiss, 16
- Figura 4: Representação esquemática da reação da LPO, 20
- Figura 5: Dismutação do radical superóxido pela SOD, 22
- Figura 6: Decomposição do peróxido de hidrogênio pela Catalase, 22
- Figura 7: Redução de hidroperóxidos pela Glutathione Peroxidase e regeneração da Glutathione Reduzida pela Glutathione Redutase, 23
- Figura 8: Exemplo de reação de detoxificação do clorodinitrobenzeno através da Glutathione-S-Transferase (GST), 24
- Figura 9: Curva de peso corporal (g) que compara o crescimento dos animais em ambos os grupos, medidos por 4 semanas, 52
- Figura 10: Níveis de concentração de mercúrio encontrados no sangue total de ambos os grupos experimentais, dados em $\mu\text{g/L}$, 53
- Figura 11: Níveis de lipoperoxidação obtidos através da técnica de Quimiluminescência, descritos em cps/ mg de Hemoglobina no sangue dos diferentes grupos experimentais, na 1^o, 2^o e 4^o semanas de estudo, 55
- Figura 12: Variação dos níveis de lipoperoxidação obtidos através da Quimiluminescência, descritos em cps/ mg de Hemoglobina ao longo de 4 semanas de estudo em amostras de sangue, em cada grupo experimental, 56
- Figura 13: Variação de atividade da enzima Glutathione-S-Transferase, descritos em nmoles /min/ mg de proteína ao longo de 4 semanas de estudo em amostras de sangue, em cada grupo experimental, 59
- Figura 14: Variação da atividade da enzima Glutathione Peroxidase, descritos em nmoles/ min/ mg de proteína ao longo de 4 semanas de estudo em amostras de sangue, em cada grupo experimental, 60
- Figura 15: Variação da atividade da enzima Superóxido Dismutase, descritos em u/ mg de proteína ao longo de 4 semanas de estudo em amostras de sangue, em cada grupo experimental, 61

Figura 16: Variação da atividade da enzima Catalase, descritos em pmoles/ mg de proteína ao longo de 4 semanas de estudo em amostras de sangue, em cada grupo experimental, 62

Figura 17: Níveis plasmáticos de capacidade antioxidante total obtidos através da técnica de TRAP, descritos em mM de Trolox, no plasma dos diferentes grupos experimentais, na 1^o, 2^o e 4^o semanas de estudo, 63

Figura 18: Variação dos níveis de antioxidantes totais, descritos em mM de Trolox, ao longo de 4 semanas de estudo, em amostras de sangue em cada grupo experimental, 64

Figura 19: Níveis de lipoperoxidação obtidos através da Quimiluminescência, descritos em cps/mg de proteína, no tecido cardíaco e hepático nos diferentes grupos experimentais, ao final do estudo, 66

Figura 20: Níveis teciduais de capacidade antioxidante total obtidos através da técnica de TRAP, descritos em mM de Trolox, no coração, fígado e rim, nos diferentes grupos experimentais ao término do estudo, 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variação de peso corporal (g) dos animais em ambos os grupos, medidos por 4 semanas, 51

Tabela 2: Níveis de lipoperoxidação obtidos através da Quimilunescência, descritos em cps/ mg de Hemoglobina em amostras de sangue nos diferentes grupos experimentais, 54

Tabela 3: Atividade das enzimas Catalase, Superóxido Dismutase, Glutathione Peroxidase e Glutathione-S-Transferase em amostras de sangue, nos diferentes grupos experimentais, no 1º, 2º e 4º semanas de estudo, 58

Tabela 4: Níveis de lipoperoxidação obtidos através de Quimilunescência, descritos em cps/ mg de proteína, em homogeneizado renal, nos diferentes grupos experimentais, 65

Tabela 5: Atividade das enzimas Catalase, Superóxido Dismutase, Glutathione Peroxidase e Glutathione-S-Transferase em homogeneizado cardíaco, hepático e renal, nos diferentes grupos experimentais, ao final do tempo de estudo, 68

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT – Catalase

DNA – Ácido Desoxi-ribonucléico

EAO – Espécies Ativas de Oxigênio

EDTA – Edetato Dissódico de Cálcio

GPx – Glutaciona Peroxidase

GR – Glutaciona Redutase

GSH – Glutaciona Reduzida

GSSG – Glutaciona Oxidada

GST – Glutaciona-S-Transferase

KCl – Cloreto de Potássio

LPO – Lipoperoxidação

NADP⁺ – Nicotinamida Adenina dinucleotídeo Fosfato (forma oxidada)

NADPH – Nicotinamida Adenina dinucleotídeo Fosfato (forma reduzida)

PMSF – Fluoreto de Fenil Metil Sulfonila

QL – Quimiluminescência

SOD – Superóxido Dismutase

TRAP – Capacidade Antioxidante Total

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AValiação DO ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO E ÓRGÃO-ESPECÍFICO NA INTOXICAÇÃO CRÔNICA POR CLORETO DE MERCÚRIO

Autora: Lucila Ludmila Paula Gutierrez

Orientador: Adriane Belló-Klein

Os dejetos de mercúrio utilizados industrialmente atingem a natureza e, por este motivo, isto se tornou um problema de Saúde Pública. O mercúrio pode agir como iniciador de lipoperoxidação (LPO) e promover formação de radicais livres. Estudos prévios demonstraram que o HgCl_2 , de forma aguda, diminui a atividade mecânica do coração e afeta a frequência cardíaca. Foi objetivo deste estudo reproduzir um modelo de intoxicação crônica por cloreto de mercúrio através da administração subcutânea deste metal por 30 dias e verificar se muda a concentração sanguínea deste metal nos ratos tratados. Buscou-se também observar se o cloreto de mercúrio produz modificações temporais sistêmicas no estresse oxidativo e alterações na lipoperoxidação, na capacidade antioxidante total e na atividade das enzimas antioxidantes em homogeneizado cardíaco, hepático e renal entre os grupos, após 30 dias de intoxicação. Para isto, foram utilizados 20 ratos machos Wistar com peso aproximado de 250g, divididos em dois grupos: grupo Controle (C), que foram injetados subcutaneamente sem introdução de substâncias e grupo HgCl_2 (H), os quais receberam injeção subcutânea deste composto na concentração de 5mg/Kg de peso, diluídos em soro fisiológico. Ambos foram injetados durante 30 dias consecutivos, sempre à mesma hora. Foi coletado sangue do plexo retroorbital dos animais na 1^o, 2^o e 4^o semana de tratamento para medida do estresse oxidativo. Após o término do tratamento, o sangue total de cada rato foi retirado e, então, estes animais foram sacrificados e seus corações, fígados e rins foram retirados e homogeneizados. Os eritrócitos lavados e os sobrenadantes teciduais foram utilizados para medidas de lipoperoxidação, através de quimiluminescência e para medida das atividades enzimáticas da Catalase (CAT), Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione-S-Transferase (GST) e Glutathione Peroxidase (GPx). A capacidade antioxidante total (TRAP) foi medida em plasma e sobrenadante tecidual. Como resultados, observamos que os ratos tratados diminuíram de peso significativamente (diferença de peso de quase 50% entre os grupos). A concentração sanguínea de mercúrio no grupo tratado estava aumentada significativamente. Comparando-se

os grupos experimentais, observou-se, em relação ao estresse oxidativo temporal sangüíneo, que na 2ª semana de tratamento as enzimas antioxidantes GST e GPx aumentaram suas atividades (14% e 28%, respectivamente), em relação ao grupo controle. A SOD mostrou-se diminuída na 1ª e 2ª e aumentou na 4ª semana, significativamente (25%, 50% e 43%, respectivamente). A atividade da CAT não variou no sangue. O TRAP esteve diminuído pela metade na 1ª semana de estudo. Quando se comparou o comportamento de cada grupo com ele mesmo como referência ao longo do tempo de estudo, notou-se que o grupo controle apresentou um aumento progressivo na atividade da GST, com o passar das semanas. Em relação à GST, o grupo controle apresenta uma queda de atividade na 2ª semana, tendo esta atividade aumentada na 1ª e 4ª semana. A enzima SOD e o TRAP mantiveram-se aproximadamente constantes no decorrer dos trinta dias de experimento, no grupo controle. A atividade da CAT mostrou-se diminuída na 1ª semana, em relação às demais, no grupo controle. Já o grupo tratado, quando comparado a si mesmo durante o tempo de intoxicação, apresentou-se com a atividade da enzima GST diminuída na 1ª semana, aumentando na 2ª e, a partir daí, constante. A atividade da GPx e da SOD mostrou o mesmo perfil neste grupo, estando aumentada na 1ª semana, diminuída na 2ª e aumentada novamente na 4ª semana de tratamento. A CAT aumentou progressivamente no grupo tratado no decorrer do tempo de intoxicação, o mesmo ocorrendo com o TRAP. Em relação aos tecidos, no coração a atividade da CAT encontrou-se diminuída e houve aumento significativo de LPO ao final do estudo. O TRAP apresentou-se aumentado em 225%. No rim, a CAT diminuiu significativamente no grupo que recebeu HgCl₂ e a GST encontrou-se muito aumentada, quando comparada ao grupo controle. O TRAP aumentou 100%. No fígado, a lipoperoxidação aumentou 44% e as enzimas antioxidantes estudadas tiveram suas atividades diminuídas significativamente, com exceção da GST. O TRAP mostrou-se diminuído 55%. Os resultados encontrados sugerem que a administração de HgCl₂ por injeção subcutânea, de forma crônica, aumentou o estresse oxidativo sistêmico principalmente na fase aguda, causando uma piora do estado de saúde geral dos animais. Da mesma forma, o estresse oxidativo cardíaco e hepático mostrou-se aumentado, no período de intoxicação crônica determinando adaptações seletivas no sistema antioxidante.

1. INTRODUÇÃO

1.1 - ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO

A sobrevivência de organismos aeróbios num meio ambiente rico em oxigênio envolve um complicado equilíbrio entre a formação biológica de espécies químicas reativas, chamadas radicais livres, e a habilidade do organismo em controlar estas substâncias (DEL MAESTRO, 1980).

O oxigênio é um agente oxidante e, como tal, recebe elétrons de moléculas que se oxidam em sua presença, ficando com elétrons desemparelhados em seu orbital anti-ligante, assim podendo transformar-se em radical livre ou espécie intermediária que leve à formação deste último, ditas espécies ativas de oxigênio (EAO) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Mais de 95% do oxigênio consumido pelo corpo humano sofre a ação da citocromo oxidase mitocondrial, que adiciona quatro elétrons, de uma só vez, em cada molécula de oxigênio para gerar duas moléculas de água (HALLIWELL, 1992). Porém, devido a sua configuração eletrônica, o oxigênio tem uma forte tendência a receber um elétron de cada vez (Figura 1), formando compostos intermediários altamente reativos, como o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\bullet}), sendo que alguns destes compostos são formados em, aproximadamente, 5% do processo de transformação celular do oxigênio até a água. Algumas das EAO são fortemente oxidantes e apresentam pelo menos um elétron desemparelhado, geralmente, no orbital mais externo, sendo denominados de radicais livres (MENECHINI, 1987).

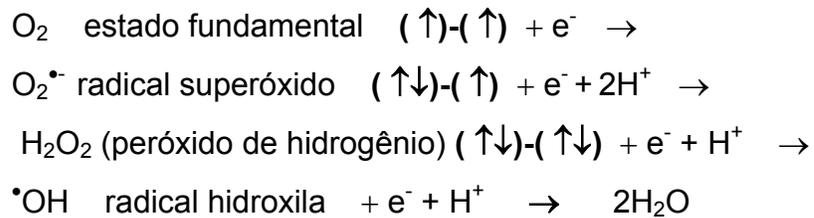


Figura 1: Redução monoelétrica do oxigênio formando EAO. Entre parêntesis a configuração eletrônica do orbital externo de cada espécie.

Os principais sistemas enzimáticos que catalisam a redução univalente do oxigênio são as cicloxigenases, lipoxigenases, xantina oxidase, aldeído oxigenase, flavina desidrogenase e peroxidases. A redução univalente do oxigênio também ocorre em reações não enzimáticas e em reações de autooxidação como as que ocorrem com catecolaminas, flavinas e ferridoxinas, além de reações catalisadas por ferro, cobre e radiações ionizantes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Há também a formação de EAO em processos inflamatórios e quando ocorre isquemia-reperfusão, ativação de neutrófilos, hiperóxia, exposição à radiação, entre outros (Mc CORD, 1987; HARRIS, 1992).

São espécies ativas de oxigênio o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil, além de formas de oxigênio com o spin alterado, como o oxigênio “singlet”. Os oxigênios “singlets” podem estar sob a forma Δ ou Σ e por não possuírem restrição de spin, são mais reativos que o oxigênio molecular no estado fundamental (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Cada EAO tem suas próprias características, com diferentes reatividades e tempos de meia-vida (DEL MAESTRO, 1980; YU, 1994).

O peróxido de hidrogênio não é um radical livre por não possuir elétrons desemparelhados, ao contrário do ânion superóxido e do radical hidroxil. É uma espécie que não causa danos por si mesmo mas, sim, por produzir o radical hidroxil, pela Reação de Fenton (Figura 2). O peróxido de hidrogênio pode ser produzido indiretamente pela redução univalente do oxigênio, seguida pela

dismutação do ânion radical superóxido ou diretamente pela redução divalente do oxigênio molecular (DEL MAESTRO, 1980).

A mais reativa das espécies é o radical hidroxil, que se forma através de reações entre o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio em presença de íons divalentes de metais de transição - Reação de Haber-Weiss (Figura 3), descrita em 1934 ou de reações que necessitam da presença de íons metais de transição como o ferro e o cobre. O radical hidroxil é extremamente tóxico, apesar de seu tempo de meia-vida ser muito curto (DEL MAESTRO, 1980).

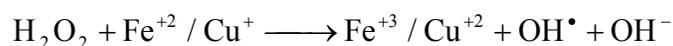


Figura 2: Reação de Fenton (1894).

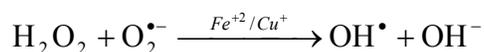


Figura 3: Reação de Haber-Weiss (1934).

Assim que o radical hidroxil é formado, reage instantaneamente com qualquer biomolécula em suas imediações que, se for uma molécula pequena e não possuir carga, atravessará membranas e causará dano ao DNA.

O ânion superóxido possui um tempo de meia-vida mais longo que o radical hidroxil sendo, por este motivo, mais estável quimicamente e também podendo reagir com biomoléculas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

1.1.1 – EFEITOS DAS EAO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

1.1.1.1 - Reatividade

A reatividade dos radicais livres ocorre pela forte tendência dos elétrons desemparelhados interagirem com outros elétrons para se tornarem estáveis (DEL MAESTRO, 1980). Por este motivo, os radicais livres podem levar ao dano oxidativo. As espécies ativas de oxigênio são implicadas como importantes

mediadores patogênicos em muitas desordens clínicas, por serem tóxicas. São capazes de produzir danos reversíveis ou não em componentes de todas as classes bioquímicas, incluindo ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos livres, lipídeos, lipoproteínas e carboidratos. Ainda, possuem um impacto nas atividades celulares, como na permeabilidade das membranas, metabolismo e expressão de genes (CROSS,1987). A sua ação também está associada a processos degenerativos como a catarata, o enfisema, a artrite, a doença de Parkinson, a porfiria aguda intermitente, a lesão isquêmica, o diabetes aloxânico (MENEHINI, 1987) ou condições clínicas como inflamação, glomerulonefrite, doenças autoimunes, sobrecarga de ferro, deficiência de vitamina E, deficiência de Selênio, efeitos tóxicos do cigarro, malária, aterosclerose, artrite reumatóide, demência senil, trauma cerebral, sobrecarga de alumínio, toxicidade da doxorubicina, de metais pesados, do álcool, da primaquina, da bleomicina, do tetracloreto de carbono, envelhecimento cutâneo, mutações, câncer, etc. (CROSS,1987).

1.1.1.2 - Lipoperoxidação

Sabe-se que as EAO atacam os lipídios de membrana num processo chamado lipoperoxidação (LPO), um processo fisiológico contínuo que ocorre nas membranas celulares. Por serem formadas em grande parte por lipídios insaturados e proteínas, as membranas são particularmente vulneráveis ao ataque oxidativo, podendo haver modificação das propriedades da membrana, da permeabilidade e capacidade de transporte e liberação de enzimas que degradam os lisossomos, destruindo células.

A LPO, no entanto, é um fator de renovação de membrana, além de ser um passo essencial na biossíntese de prostaglandinas e leucotrienos a partir do ácido araquidônico e está envolvida na formação de vesículas de endocitose e exocitose (MENEHINI, 1987). As EAO podem também levar à destruição de proteínas, através da oxidação de grupamentos sulfidril, além de poderem oxidar o DNA (HALLIWELL & GUTTERIDGE,1999).

As reações em que os radicais livres e a lipoperoxidação estão envolvidos são reações em cadeia - um radical livre reage com um composto não radical,

formando outro radical livre e assim sucessivamente - e são divididas em três partes: iniciação, propagação e terminação (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A iniciação é a reação na qual são formados os radicais livres. Um composto orgânico normal, chamado de iniciador, é de alguma forma convertido em uma partícula ativa. Para esta reação é necessária uma certa quantidade de energia, que pode ser fornecida por fotólise, radiações, calor, quebra homolítica ou durante reações de oxidação e redução. Também os metais podem promover a formação destes radicais. No caso de um ácido graxo poliinsaturado, um átomo de hidrogênio vizinho aos carbonos de dupla ligação, é mais instável que os demais e, portanto, susceptível de sofrer mais facilmente a oxidação (VALFRÈ, 1983). Nesta fase, provavelmente o radical hidroxil ou o oxigênio "singlet", que são espécies com spins antiparalelos, ataca uma molécula orgânica, atraindo um átomo de hidrogênio do lipídio, formando um radical centrado no carbono, o qual, tende a se estabilizar por um rearranjo molecular, transformando-se em um dieno conjugado. Este, ao se combinar com o oxigênio, produz um radical peroxil, que reage com uma nova molécula de lipídio, gerando o lipoperóxido e um novo radical centrado no carbono - esta é a reação de propagação. A reação em cadeia continua até que a fase final ocorre quando dois radicais reagem entre si formando um tetróxido que é instável e pode ser decomposto - reação de terminação (Figura 4). O lipoperóxido pode produzir malondialdeído e outros aldeídos por reações catalisadas por metais (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; THOMAS, 1997; DEL MAESTRO, 1980).

O tetróxido pode ser decomposto dando origem ao oxigênio "singlet" e carbonilas excitadas (RUSSEL, 1957). Estas espécies excitadas retornam ao seu estado fundamental emitindo quantas de luz visível. Este processo é conhecido como quimiluminescência e constitui-se em um importante método de quantificação da LPO.

Os efeitos da lipoperoxidação podem ser observados pela mudança não somente no ambiente lipídico das membranas biológicas (modificações na fluidez e na seletividade), mas também pelas alterações de suas proteínas (receptores e canais iônicos) (YU, 1994).

As proteínas também sofrem reações oxidativas iniciadas pelas EAO, que levam a alterações nas suas estruturas e nos seus estados conformacionais. (YU, 1994). Também pode haver ataque ao DNA nuclear pelo radical hidroxil, identificado pela presença de bases oxidadas de DNA como a 8-hidroxideoxiguanosina, assim como ao DNA mitocondrial, uma vez que a mitocôndria é a grande fonte de EAO (YU, 1994).

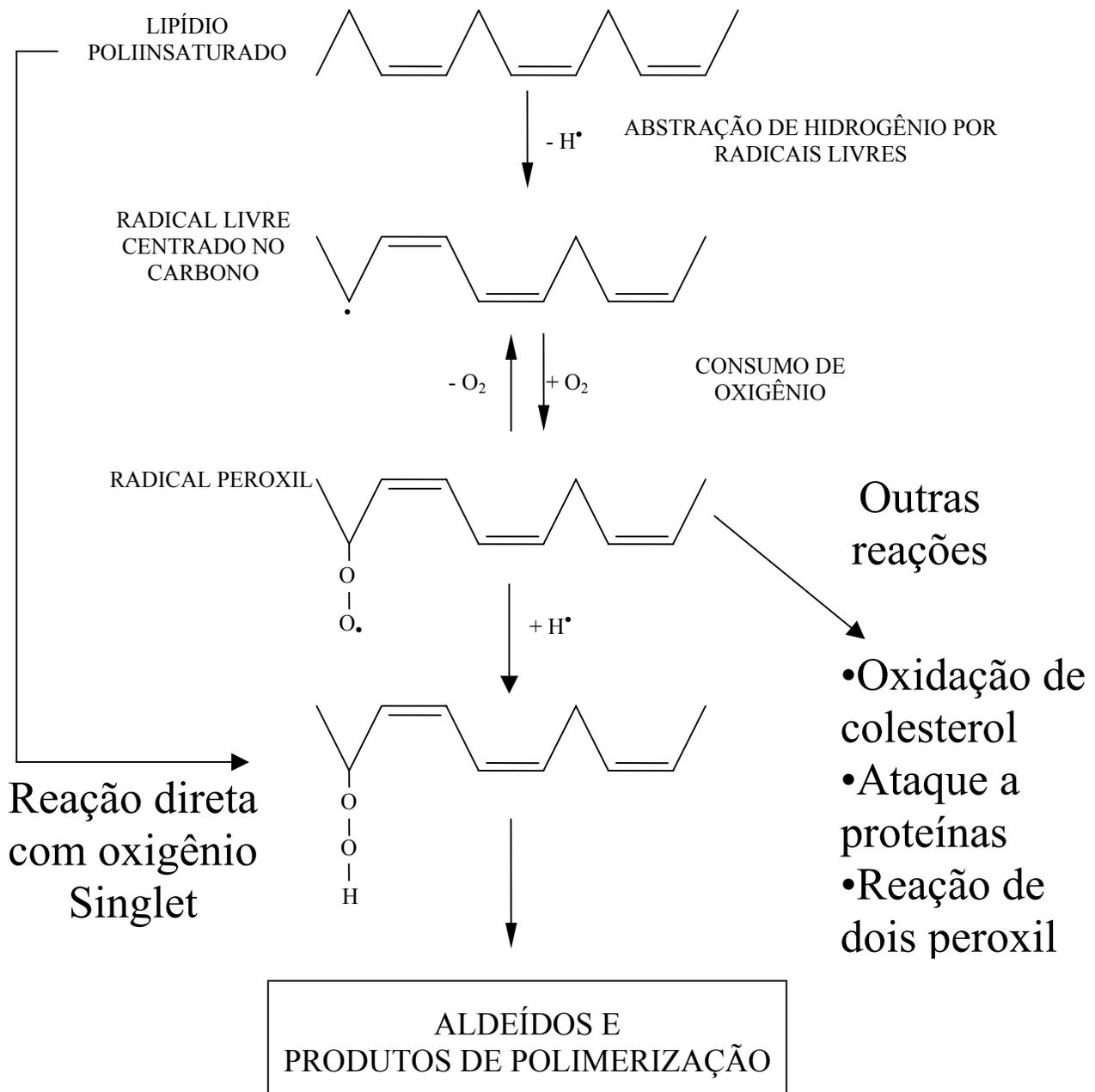


Figura 4: Representação esquemática da reação da LPO (modificado de HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

1.2 – ANTIOXIDANTES: DEFESA BIOLÓGICA CONTRA AS EAO

1.2.1 – DEFESAS ANTIOXIDANTES

Para neutralizar a ação dos radicais livres em sistemas biológicos, os organismos vivos desenvolveram recursos extremamente eficientes de defesa e proteção. Tais mecanismos incluem a ação enzimática e a não-enzimática, que atuam concomitantemente e desempenham um importante papel na proteção celular.

Incontáveis substâncias agem como antioxidantes naturais: sementes oleosas, grãos, legumes, frutas, folhas e cera de folhas, cascas e raízes, especiarias, ervas e drogas em estado bruto (OSAWA, 1995). Dentre efetivos inibidores fisiológicos da lipoperoxidação podemos citar as vitaminas A e E, a glutatona e o ácido úrico. Além disto, temos como inibidores da LPO compostos utilizados como aditivos alimentares ou em cosméticos, tendo, por exemplo, o hidroxi-butil-tolueno e o hidroxi-butil-anisol (ARUOMA *et al*, 1990).

Os antioxidantes minimizam os distúrbios no meio interno e preservam a ótima atividade celular além de estarem estrategicamente compartimentalizados nas organelas celulares para gerarem proteção máxima (YU, 1994).

Quando uma substância neutraliza a ação dos radicais livres na fase de iniciação ou na de propagação da LPO, formando produtos menos tóxicos, esta substância é chamada de “scavenger”. Se a substância absorver a energia de excitação dos radicais, neutralizando-os, será chamada de “quencher” (SIES & MURPHY, 1991; HALLIWELL, 1997).

1.2.1.1 – Defesas Antioxidantes Enzimáticas

Os organismos também dispõem de sistemas enzimáticos específicos que oferecem a primeira linha de defesa frente à produção de EAO. Estas enzimas evitam o acúmulo de ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio para que não

haja produção do radical hidroxil, contra o qual não existe sistema enzimático de defesa.

A regulação das enzimas antioxidantes, necessária para manutenção da homeostase celular em condições adversas ao organismo, depende de vários fatores, como especificidade do órgão, idade, estágio de desenvolvimento, perfil hormonal e disponibilidade de cofatores (HARRIS, 1992).

Dentre as enzimas responsáveis pela detoxificação das espécies ativas de oxigênio salientam-se três: a Superóxido Dismutase (SOD), a Catalase (CAT) e a Glutathiona Peroxidase (GPx) (SIES, 1997).

As Superóxido Dismutases (SOD₁ e SOD₂) são metaloenzimas que catalisam muito eficientemente a dismutação de dois radicais superóxido para formar o peróxido de hidrogênio – que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas – e oxigênio (Figura 5) (DEL MAESTRO, 1980). Esta reação pode ocorrer espontaneamente em pH fisiológico, porém, com presença da SOD, a velocidade desta reação é 10⁴ vezes maior (FRIDOVICH, 1975; YU, 1994; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Esta enzima está amplamente distribuída, com uma variedade de formas, as que contém cobre e zinco em seu sítio de ativação são encontradas no citoplasma das células eucarióticas (SOD₁), as que contém manganês que se encontram na mitocôndria (SOD₂), mais precisamente na matriz mitocondrial e há ainda um ferro-enzima que foi identificada em bactérias (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; CHANCE *et al.*, 1979).



Figura 5: Dismutação do radical superóxido pela SOD.

A Catalase é a enzima que catalisa a transformação de duas moléculas de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Figura 6) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999), sendo altamente específica por atuar apenas em hidroperóxidos de hidrogênio, de etila e de metila (CHANCE *et al.*, 1979).

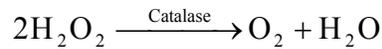


Figura 6: Decomposição do peróxido de hidrogênio pela Catalase.

Em animais, a Catalase está distribuída por todo o organismo e especialmente concentrada no fígado e eritrócitos, estando presente principalmente nos peroxissomas. Órgãos que possuem poucos ou nenhum peroxissoma estão mais expostos a danos oxidativos, como é o caso do coração, pulmão e cérebro. Nestes, a defesa se dá por um mecanismo que pode ser a difusão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para o sangue, onde reage com a Catalase eritrocitária (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). A localização da Catalase nos peroxissomas e sua relativa ineficácia a baixas concentrações de H_2O_2 intracelular sugerem que existam outros mecanismos que neutralizem o peróxido de hidrogênio produzido.

A Glutathione Peroxidase reage com uma grande variedade de doadores de elétrons, como o H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos (YU, 1994). Para a redução dos peróxidos, esta enzima utiliza o grupamento sulfidril da glutathione reduzida, que pode ser regenerada pela interação da forma oxidada com NADPH através da enzima Glutathione Redutase (GR). Os grupamentos sulfidril doam dois hidrogênios, formando uma ligação dissulfeto, que pode transformar a molécula de peróxido em um álcool ou, no caso do H_2O_2 em água (Figura 7) (DEL MAESTRO, 1980).

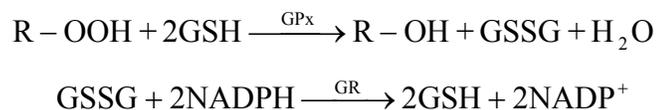


Figura 7: Redução de hidroperóxidos pela Glutathione Peroxidase e regeneração da glutathione reduzida pela Glutathione Redutase.

A Glutathione Peroxidase tem alta atividade no fígado e eritrócitos, porém sua ação é moderada no coração, nos pulmões e baixa no músculo (MILLS, 1960). Há três tipos de Glutathione Peroxidase que utilizam o selênio como cofator

(sendo, portanto, dependentes de selênio): uma que é solúvel no meio intracelular, uma que é solúvel no plasma e uma que está presente em membranas celulares e que tem preferência em metabolizar o peróxido de hidrogênio (FLOHÉ & GUNZLER, 1989; ROTRUCK *et. al.*, 1973; URSINI & BINDOLI, 1987).

Ainda, existe outro tipo de Glutathione Peroxidase, selênio independente, encontrada apenas no citosol, que metaboliza exclusivamente hidroperóxidos orgânicos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Outra classe de enzimas que também tem um importante papel fisiológico na detoxificação pertence as enzimas chamadas Glutathione-S-Transferases (GSTs). Estas enzimas agem na detoxificação de potentes agentes alquilantes, incluindo compostos farmacologicamente ativos como herbicidas, pesticidas e xenobióticos. As GSTs catalisam a reação destes compostos com o grupamento SH da glutathione, neutralizando assim seus sítios eletrofílicos e transformando-os em produtos mais hidrossolúveis, que são de mais fácil excreção (Figura 8) (HABIG, 1974).

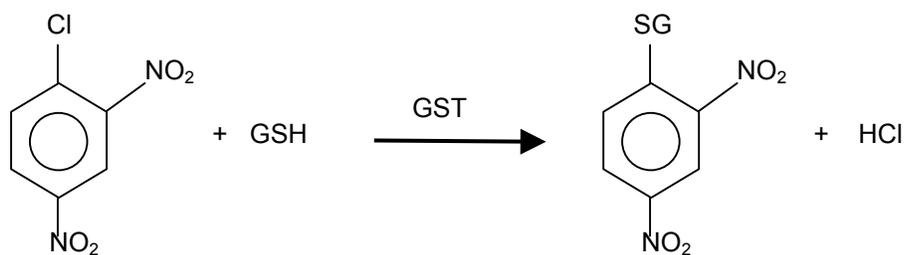


Figura 8: Exemplo de reação de detoxificação do clorodinitrobenzeno através da ação da Glutathione-S-Transferase (GST).

A distribuição das enzimas antioxidantes está intimamente relacionada com as fontes de espécies ativas de oxigênio. Sem estas enzimas, e sem as defesas não-enzimáticas, o equilíbrio celular seria alterado e seria facilitado o surgimento de disfunções que poderiam levar a processos patológicos (HARRIS, 1992).

1.2.1.2 – Defesas Antioxidantes Não-Enzimáticas

As defesas não-enzimáticas incluem antioxidantes como os tocoferóis (vitamina E), os carotenóides, os bioflavonóides, a vitamina A, o ácido ascórbico, o ácido úrico, a glutathione, a melatonina, indóis, catecóis (SIES & MURPHY, 1991; SIES, 1997) e os estrogênios (NIKI & NAKANO, 1990). Os mecanismos de ação dos antioxidantes são diversos, e podem incluir remoção do oxigênio presente no meio, varredura das EAO ou seus precursores e ainda a inibição da formação das EAO, envolvendo muitas vezes integração funcional de vários destes componentes (HALLIWELL, 1997). Também há a proteção por sistemas especiais de defesa do organismo, como o mecanismo de seqüestro (quelação) de íons metálicos, através de proteínas transportadoras, como a ferritina e transferrina; o sistema de reparo do DNA e a degradação de proteínas lesadas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

1.3- MERCÚRIO

O mercúrio, durante séculos, foi ingrediente de muitos diuréticos, antibacterianos, anti-sépticos, pomadas para pele e laxantes. Medidas mais específicas, eficazes e seguras têm substituído os mercuriais nas últimas décadas. Atualmente, o mercúrio tem um número importante de usos industriais, como em clorálcali (descorantes), equipamentos elétricos, tintas, fabricação de plásticos e papel, lâmpadas incandescentes, fungicidas, inseticidas, pigmentos, termômetros, uso dental e laboratorial. Durante muito tempo, surtos de epidemia por envenenamento por mercuriais ficaram sem diagnóstico em populações humanas de muitos países, devido ao início insidioso da doença, a inespecificidade dos primeiros sinais clínicos e a falta de familiarização dos médicos com a afecção (KLAASSEN *apud* GOODMAN & GILMAN, 1996). Em pesquisas feitas com estudantes e profissionais de Odontologia em uma universidade da Turquia, encontrou-se nível aumentado de mercúrio no plasma e eritrócitos destes indivíduos (TEZEL *et al.*, 2001). As indústrias modernas produzem um elevado número de produtos químicos e subprodutos que podem

contaminar a natureza. Hoje em dia, a atenção está voltada para a poluição provocada por metais pesados, como o mercúrio, o cádmio e o cobre. Todos estes metais são despejados no meio ambiente em baixas concentrações, exceto quando há acidentes ou desastres que envolvam estes produtos (Organização Mundial da Saúde, 2002).

Apesar de o mercúrio ser largamente usado na indústria em muitas aplicações, já são comprovados muitos efeitos tóxicos que ele pode provocar em animais e nos seres humanos, particularmente em gestantes, donas de casa e crianças (Organização Mundial da Saúde, 2002), uma vez que muitos acidentes como manipulação e ingestão de produtos contendo metais pesados ocorrem dentro de casa envolvendo, principalmente, crianças de até 9 anos de idade (SINITOX, 2002).

O envenenamento por exposição ocupacional e a poluição ambiental por dejetos de mercuriais lançados sem tratamento, são motivo de preocupação da Saúde Pública, pois o mercúrio atinge os níveis mais baixos da nossa cadeia alimentar, provocando danos nas plantas, nos animais e no ser humano. Sabe-se que no meio ambiente, os peixes podem reter quantidades de mercúrio orgânico e inorgânico no organismo (MAC DOUGAL *et al.*, 1996). Seu emprego na extração do ouro nos garimpos tem sido responsável não apenas por intoxicações humanas como também por sérios problemas ambientais.

O Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas - SINITOX - tem como principal atribuição coordenar o processo de coleta, compilação, análise e divulgação dos casos de intoxicação e envenenamento registrados por uma Rede composta de 31 Centros de Controle de Intoxicações, localizados em 17 estados brasileiros. A estatística calculada, referente ao ano de 2000, consolida 72.786 casos de intoxicação humana e 377 óbitos registrados por 30 dos 31 Centros que compõem a Rede SINITOX. Com esta publicação, e a revisão da Estatística de 1999, que apresentou 70.613 casos e 423 óbitos, a base do SINITOX contempla, para o período de 1985 a 2000, 740.848 casos e 4.890 óbitos.

Em 2000, foram registrados 72.786 casos de intoxicação humana no país. A Região Sudeste, com maior número de Centros, registrou mais da metade dos casos de intoxicação (50,7%), seguida pelas Regiões Sul (25,8%), Nordeste (15,7%), Centro-Oeste (6,6%) e Norte (1,3%).

O Centro de Informações Toxicológicas do Rio Grande do Sul, como vem ocorrendo ao longo dos anos, apresentou a maior participação percentual, 16,4% do total de casos registrados no país, seguido pelo Centro de Informações Toxicológicas de São Paulo com 12,3%. Quanto às solicitações de informação, foram registradas no país 14.779, sendo a Região Sudeste responsável por 42,5% desse total, seguida pela Região Sul com 39% (SINITOX, 2002).

No ano 2000, foram registrados 377 óbitos, o que gerou uma letalidade de 0,52% para o país como um todo. A Região Nordeste registrou o maior número de óbitos, 122 (32,4%) e a maior letalidade (1,07%). A menor letalidade foi registrada pela Região Sudeste (0,32%). As duas maiores letalidades para o país como um todo foram geradas pelos agrotóxicos de uso agrícola (na composição destes temos o mercúrio) e pelos raticidas, com valores de 2,75% e 1,60%, respectivamente (SINITOX, 2002).

Deve ser levado em consideração que nem todos os casos de intoxicação são registrados e que muitos deles não são acompanhados e, por este motivo, não refletem exatamente a realidade. É provável que o número de intoxicações seja maior do que temos informação.

Como se pode observar a partir destas informações, já existe uma preocupação crescente em melhorar a qualidade de vida da população brasileira em relação às intoxicações, uma vez que elas estão muito presentes no nosso cotidiano. Através destes dados, nota-se a relevância de estudos referentes a intoxicações, realidade neste país.

1.3.1 - FORMAS QUÍMICAS E FONTES DE MERCÚRIO

Com relação à toxicidade do mercúrio, têm-se três principais formas químicas: vapor de mercúrio (mercúrio elementar), sais inorgânicos de mercúrio e

mercuriais orgânicos. Estas formas são encontradas no ar, em alimentos e peixes contaminados, na água potável e em amálgamas dentários, em maior ou menor quantidade, e que podem ser retidas no nosso organismo diariamente (KLAASSEN *apud* GOODMAN & GILMAN, 1996).

O mercúrio elementar é a mais volátil das formas inorgânicas do metal, causando intoxicações por acidentes laboratoriais. Também é sabidamente liberado de restaurações dentárias que utilizam prata (KLAASSEN *apud* GOODMAN & GILMAN, 1996).

Os sais inorgânicos de mercúrio existem em dois estados de oxidação, como sais mercuriosos monovalentes (Hg^{1+}) ou mercúricos bivalentes (Hg^{2+}). O cloreto mercurioso (HgCl), ou calomelano, o mais conhecido composto mercurioso, foi usado em alguns cremes de pele como anti-séptico e foi empregado como diurético e catártico. Já os sais mercúricos são a forma mais tóxica e irritante do metal. O cloreto de mercúrio (HgCl_2), antes um anti-séptico amplamente usado, também teve uso amplo para fins suicidas. Estes últimos ainda são muito requisitados na indústria e a descarga industrial nos rios é grande, introduzindo mercúrio no ambiente em muitas partes do mundo. O mercúrio inorgânico tem uso industrial, principalmente hoje em dia, na produção de clorálcali e na eletrônica, além de ser utilizado na produção de plásticos, fungicidas e germicidas e na formação de amálgamas na Odontologia (KLAASSEN *apud* GOODMAN & GILMAN, 1996).

Por fim, os organomercuriais em uso atualmente contêm mercúrio com uma ligação covalente a um átomo de carbono. Este é um grupo heterogêneo de compostos e seus membros têm possibilidades variadas de produzir efeitos tóxicos. Os sais de alquilmercúrio são os mais perigosos destes compostos, como, por exemplo, o metilmercúrio. São amplamente empregados como fungicidas e também jogados no meio ambiente como resíduos industriais, provocando muitos efeitos tóxicos no ser humano, já tendo causado inúmeros acidentes nos quais milhares de pessoas pereceram. A exemplo disto, temos o caso ocorrido no Iraque em 1972, em que grãos contaminados de trigo e cevada foram plantados e a farinha foi utilizada para o feitiço de pães. Como resultado, 6.530 vítimas foram

hospitalizadas e 500 morreram (KLAASSEN *apud* GOODMAN & GILMAN, 1996). Quando o mercúrio que se encontra sob outra forma que não a orgânica e é despejado pelas fábricas nos rios e nos mares, ocorre sua conversão até metilmercúrio por ação de bactérias do sedimento aquático. Assim, peixes são atingidos e depois consumidos, alcançando, dessa maneira, diferentes níveis tróficos. Isto ocorreu há alguns anos na Baía de Minimata, no Japão. Cerca de 20.000 pessoas foram atingidas desde 1956, quando o envenenamento ficou conhecido (Organização Mundial da Saúde, 2002).

1.3.2 - QUÍMICA DO MERCÚRIO E MECANISMO DE AÇÃO

O mercúrio forma rapidamente ligações covalentes com grupos tióis e é esta propriedade que contribui para a maioria dos efeitos biológicos do metal (KLAASSEN *apud* GOODMAN & GILMAN, 1996; GSTRAUNTHALER *et al.*, 1983; ZALUPS *et al.*, 1993). Quando o enxofre está sob a forma de grupos sulfidril, o mercúrio bivalente substitui o átomo de hidrogênio para formar mercaptidas, X-Hg-SR e Hg(SR)₂, onde X é um radical eletronegativo e R é uma proteína. Como as proteínas, enzimas e membranas celulares possuem, muitas vezes, grupamentos sulfidril em sua formação (STRYER, 1995), mesmo concentrações baixas de mercuriais são capazes de inativar estes grupos e, portanto, interferir no metabolismo e no funcionamento da célula (KLAASSEN *apud* GOODMAN & GILMAN, 1996). No plasma, o Hg²⁺, proveniente do cloreto de mercúrio, forma complexos com ligantes que contém sulfidrila, como a albumina e a glutatona (YANAGISAWA, 1998). Além disso, o mercúrio também se combina com outros ligantes de importância fisiológica, como grupamentos fosforila, carboxila, amina e amida (KLAASSEN *apud* GOODMAN & GILMAN, 1996), presentes em muitas células (STRYER, 1995). As várias ações terapêuticas e tóxicas dos mercuriais estão associadas a substituintes químicos que afetam a solubilidade, dissociação, afinidade relativa por vários receptores celulares, distribuição e excreção.

O dimercaprol e a penicilamina são agentes usados no tratamento de envenenamento por mercúrio, visto que o mercúrio tem alta afinidade por tióis

(KLAASSEN *apud* GOODMAN & GILMAN, 1996). Em estudo recentemente realizado, o rim de coelhos foi tratado *in vitro* com EDTA, ácido lipóico, penicilamina e glutatona. Como resultado, obteve-se que a penicilamina confere uma maior proteção renal, vindo em seguida em ordem decrescente de eficácia a glutatona e, por fim, o EDTA e o ácido lipóico (KEITH *et al.*, 1997).

1.3.3 - BIOTRANSFORMAÇÃO DO MERCÚRIO

O mercúrio inorgânico tem uma distribuição acentuadamente não uniforme após a absorção. O tecido com maior absorção de Hg^{2+} é o renal, onde o metal é retido por mais tempo que em outros tecidos, em mamíferos (KLAASSEN *apud* GOODMAN & GILMAN, 1996). Em peixes de zona tropical e temperada, o fígado também é descrito como grande retentor do metal (GUIMARÃES & PFEIFFER, 1996). As concentrações de mercúrio inorgânico são similares no sangue total e no plasma, não atravessando a placenta ou barreira hematoencefálica facilmente (YANG *et al.*, 1996).

1.3.4 - TOXICIDADE DO MERCÚRIO

O cloreto de mercúrio pode provocar grave toxicidade aguda. A precipitação de proteínas das mucosas pelos sais de mercúrio resulta em uma aparência acinzentada da mucosa da boca, faringe e intestino, e também causa dor intensa, que pode ser acompanhada de vômitos. Na ausência de tratamento adequado, podem ocorrer choque hipovolêmico e morte (KLAASSEN *apud* GOODMAN & GILMAN, 1996). A toxicidade sistêmica pode começar algumas horas após a exposição ao mercúrio e durar vários dias. Um forte gosto metálico é seguido de estomatite com irritação da gengiva e afrouxamento dos dentes (KLAASSEN *apud* GOODMAN & GILMAN, 1996).

O efeito sistêmico mais grave encontrado é a toxicidade renal. Está bem descrito que em raças suscetíveis de camundongos, o tratamento crônico, com subdoses de cloreto de mercúrio, produz formação de complexos auto-ímmunes que

modulam a glomerulonefrite (AL-BALAGHI *et al.*, 1996). Além disso, o Hg^{2+} reage com grupamentos SH, como descrito anteriormente, depletando a glutatona nas células tubulares renais (GSTRAUNTHALER *et al.*, 1983) e nas células de mamíferos em cultura (De FLORA *et al.*, 1994). Esta ação do mercúrio causa modificação na integridade das membranas celulares (processos peroxidativos) e levam à disfunção renal (GSTRAUNTHALER *et al.*, 1983). O cloreto de mercúrio causa potente efeito nefrotóxico, pois o mercúrio se complexa com a glutatona para ser eliminado, mas o produto de degradação posteriormente formado se acumula nas células epiteliais do túbulo proximal, causando citotoxicidade (YANAGISAWA, 1998; ZALUPS *et al.*, 1993). Se for feito um pré-tratamento com a enzima antioxidante Superóxido Dismutase (SOD), antes que ocorra a intoxicação aguda, o rim encontrar-se-á protegido de alterações histológicas (GIRARDI & ELIAS, 1995), assim como quando usamos substâncias que possuam grupamentos sulfidríla, em quem o mercúrio se liga preferencialmente (ZALUPS *et al.*, 1993).

A lipoperoxidação também estaria apontada como causadora de morte celular induzida por mercúrio, provocando nefrotoxicidade (GIRARDI & ELÍAS, 1994). Várias evidências experimentais sugerem que a lipoperoxidação está implicada na toxicidade de muitos xenobióticos, como o tetracloreto de carbono, etanol e cloreto de mercúrio (TAYLOR *et al.*, 1973). Conforme Nath e colaboradores, o cloreto de mercúrio estimula produção de H_2O_2 no rim *in vitro* e *in vivo* e que isto contribui ao aparecimento de disfunção renal. Estes pesquisadores também descobriram que, em resposta ao HgCl_2 , genes sensíveis ao estresse oxidativo são expressos, incluindo a enzima heme oxigenase (NATH *et al.*, 1996). Estudos demonstram que o cloreto de mercúrio aumenta a formação de radicais livres e de peróxidos e que aumentam a lipoperoxidação renal, provocando insuficiência renal aguda (GSTRAUNTHALER *et al.*, 1983).

Este metal possui efeitos tóxicos bem documentados também no cérebro (CLARKSON, 1990). Compostos mercuriais são neurotóxicos com grande especificidade para células granulares cerebelares. Eles são capazes de interagir com receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA) por alquilação de

grupamentos SH de resíduos de cisteína encontrados neste receptor, afetando a neurotransmissão (FONFRIA *et al.*, 2001). Além disto, o mercúrio inorgânico diminui a atividade da enzima Superóxido Dismutase significativamente no cerebelo, enquanto a atividade da Glutathione Peroxidase foi afetada no cerebelo e tronco cerebral, quando administrado por 7 dias. Assim, acredita-se que o estresse oxidativo deve contribuir para o desenvolvimento de desordens neurodegenerativas causadas pela intoxicação por mercúrio (HUSSAIN *et al.*, 1997). Hussain e seu grupo de pesquisa também avaliaram os efeitos deste sal na atividade das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase, Glutathione Peroxidase e Glutathione Redutase no fígado, rins e cérebro de camundongo após a administração de diferentes doses deste metal por 14 dias. Viu-se que a dose de 1mg/kg/dia aumentou significativamente a atividade das enzimas antioxidantes no rim e no fígado. Uma vez que o mercúrio é sabidamente produtor de espécies ativas de oxigênio, é fácil pensar que as atividades destas enzimas aumentaram para “varrer” os níveis de radicais livres produzidos como resultado do acúmulo de mercúrio inorgânico e isto demonstra a capacidade de adaptação dos organismos (HUSSAIN *et al.*, 1999).

Schurz *et al.* observaram mutações em células do organismo que podem ser conseqüência do processo oxidativo provocado por doses subtóxicas de $HgCl_2$, mas não devidas à ação direta do mercúrio no DNA nuclear (SCHURZ *et al.*, 2000). Em outro estudo utilizando cultura de leucócitos humanos tratados com cloreto de mercúrio, foi demonstrado que o Hg^{2+} não tinha efeito no ciclo cinético dessas células, mas aumentava a freqüência de trocas de cromátides irmãs, na dose de 5.262 μ M, e que também induzia significativamente a anáfase (mitoses anormais) em cultura de sangue. Estes efeitos foram prevenidos pela adição de vitamina C à cultura tratada com cloreto de mercúrio, indicando que este metal tem atividade mutagênica e que a vitamina C tem efeito protetor na genotoxicidade induzida por mercúrio em cultura de células sanguíneas humanas, provavelmente devida a sua ação antioxidante e natureza nucleofílica (RAO, *et al.*, 2001).

Em fêmeas de ratos tratados agudamente com cloreto de mercúrio não foram encontradas modificações patológicas na placenta, ovário, fígado e rim;

entretanto, encontrou-se inflamação nas células epiteliais do túbulo proximal renal. Os fetos gerados por estas ratas tratadas não tinham mal formações em órgãos e ossos, talvez devido ao fato de o mercúrio não ultrapassar a barreira placentária. Ratos machos tratados agudamente com o metal apresentaram diminuição do número de espermatozoides (YANG *et al.*, 1996). Em tratamento crônico, o HgCl₂ produz redução da contagem de espermatozoides no esperma epididimal de ratos, na sua mobilidade e, também, viabilidade. Se houver coadministração de vitamina E, este antioxidante previne as alterações bioquímicas que ocorrem devido à toxicidade reprodutiva que o mercúrio provoca nos animais (RAO & SHARMA, 2001).

Quando ratos têm cloreto de mercúrio administrado via oral (0,5µM/mL) por 5 dias consecutivos, a glutatona no plasma e no fígado dos animais tratados diminui e há aumento da atividade das enzimas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase no soro e fígado, demonstrando que há danos causados neste tecido (EL-DEMERDASH, 2001). Em outra pesquisa, o cloreto de mercúrio foi dado a ratos, machos e fêmeas, na alimentação (4mg/Kg/dia - técnica de gavagem) por 14 dias consecutivos. Notou-se que houve significativa perda de peso corporal dos ratos tratados com o sal em relação ao grupo controle. Após o final do tratamento, estes animais tiveram o cérebro, as gônadas, o coração, os rins, o fígado, os pulmões, o pâncreas e o baço retirados para medida de concentração de mercúrio nestes órgãos. Apresentou-se um acúmulo maior do metal nos rins em relação aos outros tecidos (KHAN *et al.*, 2001).

Este metal acumula-se também nas células cardíacas (THOMAS *et al.*, 1988). No entanto, os efeitos do mercúrio no organismo humano ainda não estão completamente entendidos. No miocárdio, o cloreto de mercúrio reduz a atividade da Na⁺, K⁺-ATPase e da Ca²⁺-ATPase (HALBACH *et al.*, 1981; AHAMMAD- SAHIB *et al.*, 1988), enzimas importantes para a manutenção dos potenciais de membrana e para a regulação da concentração citoplasmática de cálcio. Os efeitos tóxicos do mercúrio (1µM) foram estudados em músculos papilares de rato, observando-se um pequeno aumento da força de contração; doses maiores produziram uma redução dose-dependente da força contrátil

(OLIVEIRA *et al.*, 1994). A inibição da bomba de Sódio e Potássio resulta num efeito semelhante ao produzido por digitálicos, aumentando a concentração de sódio e reduzindo, assim, a atividade do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. A redução da extrusão do cálcio aumenta a concentração intracelular deste íon e, portanto, a força de contração. O aumento do inotropismo observado pode, também, estar relacionado com o aumento da liberação endógena de catecolaminas. Os dados acumulados até o momento sugerem que o mercúrio exerce seus efeitos tóxicos no miocárdio via ações no sarcolema, no retículo sarcoplasmático e nas proteínas contráteis. As alterações na permeabilidade das membranas podem levar a mudanças na homeostasia do cálcio, produzindo disfunção contrátil do miocárdio. Em outra pesquisa encontrou-se que o mercúrio inorgânico afeta o ritmo cardíaco e a condução átrio-ventricular, causa arritmia, diminui a pressão sangüínea arterial e aumenta a atividade neurotransmissora autonômica (MASSARONI *et al.*, 1995). Tem-se, ainda, que o cloreto de mercúrio, dado em água de beber na concentração de $50\mu\text{g/mL}$ de forma crônica, aumentou o inotropismo cardíaco sem mudanças cronotrópicas e induziu hipertensão em ratos tratados por 350 dias (CARMIGNANI & BOSCOLO, 1984). Ainda, este metal atua no sistema vascular de músculo esquelético, provocando vasoconstrição. Os resultados encontrados são consistentes, sugerindo que este efeito provocado pelo mercúrio pode ser mediado pela formação do ânion superóxido, por estimular a ação de um agente vasoconstritor derivado da ciclooxigenase (COX) e por diminuir a atividade vasodilatadora endotelial (DA CUNHA *et al.*, 2000). O superóxido pode reagir diretamente com o NO, inativando-o e formando nitratos com atividade biológica reduzida, ou ainda, formando o radical peroxinitrito que é um subproduto tóxico fortemente oxidante, além de inativar diretamente a guanilato ciclase no endotélio (LAURINDO & LUZ, 1995).

A intoxicação por Hg^{2+} também tem conseqüências no sistema imune. Um dos motivos de sua toxicidade renal seria o desenvolvimento de doença auto-imune, caracterizada pelo aumento de níveis séricos de anticorpos IgG1 e IgE, pela produção de anticorpos anti-nucleolar e de complexos auto-imunes (AL-BALAGHI *et al.*, 1996). A administração repetida de HgCl_2 em ratos, camundongos

e coelhos induziu resposta auto-imune e nefropatia, em contraste com ratos Lewis, que quando injetados com o metal não desenvolviam auto-imunidade, mas imunossupressão (MOSZCZYNSKI, 1997). O cloreto de mercúrio tem sido relatado como mitogênico de linfócitos humanos *in vitro*. Entretanto, a ativação requer concentrações muito maiores que as encontradas *in vivo*. Em quantidades menores, o mercúrio estimula preferencialmente células T CD4⁺ (transformação de blastos e síntese de DNA) e as células CD8⁺ não são afetadas na mesma proporção (LOFTENIUS *et al.*, 1997). A interação entre moléculas co-estimuladoras de células aderentes e células T maduras contribuem para a indução da proliferação das células T pelo HgCl₂. Entre estas moléculas co-estimuladoras, acredita-se que a IL-1 tenha um papel muito importante. A proliferação de células T ativadas pelo HgCl₂ apresenta propriedade de resposta induzida a antígeno (POLLARD & LANDBERG, 2001). A ativação inicial de células T que reconhecem o Hg²⁺ como antígeno, eventualmente resulta na ativação de células T específicas que passam a não reconhecer as próprias proteínas do organismo - daí a formação de doença auto-imune provocada pelo mercúrio (KUBICKA *et al.*, 1996). Doses subtóxicas de HgCl₂ ativam leucócitos de peixes, alterando os processos que regulam a magnitude e a especificidade da resposta imune aos patógenos do meio ambiente (MAC DOUGAL *et al.*, 1996).

O Hg²⁺ e a glutathiona podem interagir em concentrações biológicas e *in vitro* com o H₂O₂, gerado pela cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, para formar radicais livres capazes de oxidar porfirinas (porfirinogênios) (WOODS *et al.*, 1990) e a administração de cloreto de mercúrio na dose de 0,7mg/100g de peso em ratos aumenta o nível de heme livre (KALIMAN *et al.*, 1999). A interação de mercúrio com eritrócitos inchados, devido à inflamação, causa rápida agregação celular. Este fenômeno parece prevenir a penetração dos íons mercuriais nas hemácias e, assim, evita qualquer efeito hemolítico induzido pela entrada do cátion divalente (ZOLLA *et al.*, 1997).

2. HIPÓTESE

O presente trabalho foi desenvolvido para a análise da relação entre o cloreto de mercúrio e o estresse oxidativo tecidual e sangüíneo, uma vez que se sabe que metais pesados podem promover a formação de radicais livres (VALFRÉ, 1983; De FLORA *et al.*, 1994). Assim sendo, nossa hipótese de trabalho foi que o cloreto de mercúrio poderia induzir um aumento de estresse oxidativo tecidual e sistêmico, tempo e tecido dependente, levando a uma adaptação do sistema antioxidante enzimático e não-enzimático.

3. OBJETIVOS

Os objetivos gerais deste trabalho foram:

⇒ Reproduzir um modelo de intoxicação crônica por cloreto de mercúrio através da administração subcutânea deste metal por 30 dias;

⇒ Verificar a concentração deste metal, após o término do tratamento, no sangue total dos animais tratados e compará-la com o grupo controle;

⇒ Observar se o cloreto de mercúrio produz modificações temporais sistêmicas e teciduais no estresse oxidativo ao longo e ao final do tratamento.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

◆ *Em nível sistêmico:*

⇒ Averiguar alterações de antioxidantes não-enzimáticos hidrossolúveis (TRAP), em período subagudo, agudo e crônico, provocado por este sal inorgânico, no plasma dos animais experimentais;

⇒ Analisar a relação do cloreto de mercúrio com a lipoperoxidação em eritrócitos dos animais controles e tratados com cloreto de mercúrio na 1^o, 2^o e 4^o semana de tratamento;

⇒ Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes nas hemácias dos animais controles e tratados com cloreto de mercúrio, nos mesmos tempos definidos, em ambos os grupos experimentais.

◆ *Em nível tecidual:*

⇒ Observar se ocorrem alterações no nível de antioxidantes não-enzimáticos hidrossolúveis (TRAP), provocado por este sal inorgânico, após intoxicação crônica nos tecidos referenciados, nos animais tratados, comparando-os com o grupo controle;

⇒ Analisar a relação do cloreto de mercúrio com a lipoperoxidação em coração, fígado e rim de todos os animais experimentais, ao término do tempo de tratamento;

⇒ Determinar a atividade das enzimas antioxidantes nos homogeneizados dos tecidos citados, em ambos os grupos experimentais, ao final do tratamento.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - ANIMAIS

Foram utilizados vinte ratos machos Wistar, com peso médio no início do tratamento de aproximadamente 250g. Os animais foram provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS, sendo mantidos em caixas plásticas de 270 x 260 x 310mm, com cinco ratos em cada uma, tendo o assoalho recoberto por serragem. Receberam alimentação e água *ad libitum* e foram mantidos sob períodos de 12 horas luz/ 12 horas escuro, a uma temperatura de 22°C.

4.2 - GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram estabelecidos dois grupos experimentais, sendo eles:

- Grupo controle (n = 10): introduziu-se a agulha de uma seringa de insulina subcutaneamente, sem injeção de substâncias, diariamente e no mesmo horário, durante trinta dias.
- Grupo HgCl₂ (n = 10): foram injetados subcutaneamente com uma solução feita de cloreto de mercúrio em solução fisiológica 0,9% NaCl, preparada na hora, na concentração de 5mg/kg de peso, com a utilização de uma seringa de insulina. Este procedimento foi repetido por 30 dias, onde os ratos eram injetados diariamente, à mesma hora.

4.3 - ADMINISTRAÇÃO DO CLORETO DE MERCÚRIO

Os ratos de ambos os grupos foram pesados semanalmente, para que fosse feito um controle do estado geral dos animais.

Os animais eram manipulados sempre a mesma hora, feita a assepsia local com álcool 70% e tinham suas caixas limpas de dois em dois dias, para que não desenvolvessem infecção, pois o mercúrio provoca lesões da pele. As mesmas

atitudes foram tomadas em relação ao grupo controle. Os grupos não foram tratados com antibiótico.

A concentração de cloreto de mercúrio injetada foi de 5mg/kg de peso, diluídos em 0,2 mL de soro fisiológico, conforme Huang e colaboradores (1996).

4.4 - COLETA DE SANGUE

O sangue foi coletado ao final da primeira, segunda e quarta semana de tratamento com cloreto de mercúrio, do mesmo modo que os animais controle. Ambos os grupos tiveram as amostras coletadas sempre no mesmo dia da semana e à mesma hora, através de punção do plexo venoso retro-orbital com um tubo de microhematócrito com uma das extremidades quebrada em bisel (HALPERN, 1951). Para isso, os animais foram previamente anestesiados com éter etílico.

4.5 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E PREPARO DOS HOMOGENEIZADOS

Após o término do tratamento, os ratos foram mortos por deslocamento cervical e procedeu-se a coleta de 7mL de sangue através de punção cardíaca.

O sangue total coletado foi armazenado em tubos de ensaio contendo heparina, gentilmente doados pelo Laboratório de Análises Clínicas Toxilab. O sangue foi, em seguida, mandado para o Laboratório Toxilab sob refrigeração, para posterior análise das concentrações de cloreto de mercúrio do sangue total de ambos os grupos de animais.

Os corações, fígados e rins foram rapidamente retirados e homogeneizados durante 30 segundos em Ultra-Turrax, na presença de KCl 1,15% (5 mL por g de tecido) e de fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), na concentração de 100 mM em isopropanol (10µL por mL de KCl adicionado). O PMSF é um inibidor de proteases e foi utilizado para que não houvesse degradação das enzimas cuja atividade foi medida. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24) e o

sobrenadante foi retirado e congelado em freezer a -80°C para as dosagens posteriores (LLESUY et al., 1985).

4.6 - DOSAGEM DO MERCÚRIO NO SANGUE

A dosagem da quantidade de mercúrio existente no sangue de ambos os grupos experimentais foi feita utilizando-se, em duplicata, 2mL do sangue total, através da técnica de Espectrofotometria de Absorção Atômica, que se baseia na absorção de energia radiante por átomos neutros, não excitados, em estado gasoso. Uma certa espécie atômica, neutra e no estado fundamental é capaz de absorver as radiações com comprimentos de onda iguais aos das que ela, quando excitada aos níveis energéticos mais altos, emite. Na absorção atômica, o elemento a ser determinado é levado à condição de uma dispersão atômica gasosa, através da qual se faz passar, então, um feixe de radiação com comprimento de onda que possa ser convenientemente absorvido. O processo mais correntemente usado consiste em introduzir a solução da amostra, em forma de um aerossol, em uma chama apropriada. A energia térmica da chama provoca a atomização da amostra; mas, a chama exerce, também, a importante função de conter o sistema absorvente durante o processo da absorção (OHLWEILER, 1981). Resultados são expressos em $\mu\text{g/L}$.

4.7 - PREPARO DO SANGUE PARA ANÁLISE DE ESTRESSE OXIDATIVO

Rapidamente após a coleta, o sangue foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24), o plasma foi retirado e congelado em freezer a -80°C para posteriores dosagens de estresse oxidativo. Os eritrócitos foram lavados com soro fisiológico (NaCl 0,9%), novamente centrifugados e aliquotados. Uma parte foi ressuspensa em soro para medida imediata de lipoperoxidação, ao restante foi adicionado uma solução de ácido acético 1mM e sulfato de magnésio 4mM, e as amostras foram congeladas em freezer a -80°C para posteriores dosagens das enzimas antioxidantes.

4.8 – QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores, que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/mL (LOWRY *et al.*, 1951). Para a realização das dosagens os reagentes usados foram o Reativo de Folin Ciocalteau, diluído em água destilada na proporção de 1:3, e Reativo C, que é composto por 50mL do reativo A, 0,5mL do reativo B1 e 0,5mL do reativo B2, onde os reativos A, B1 e B2 são respectivamente:

- ⇒ NaHCO_3 (bicarbonato de sódio) 2% (P/V) em NaOH (hidróxido de sódio) 0,1N;
- ⇒ $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (sulfato de cobre) 1% (P/V);
- ⇒ $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (tartarato de sódio e potássio) 2% (P/V).

Em tubo de ensaio, foram adicionados 20 μ L de sangue em 0,8mL de água destilada e 2mL de reativo C preparado a fresco, aguardando-se 10 minutos. Após, adicionou-se 0,2mL do reativo de Folin Ciocalteau diluído, aguardando-se mais 30 minutos. Assim, a solução adquiriu uma coloração azulada que foi medida em espectrofotômetro, marca Varian modelo Cary, a 625 nm. O cálculo foi feito utilizando-se o fator de correção médio calculado a partir da solução padrão de albumina bovina.

4.9 - DOSAGEM DE HEMOGLOBINA

A hemoglobina foi dosada nas amostras de sangue preparadas para a medida de lipoperoxidação, ou seja, eritrócito diluído em soro fisiológico. Esta análise foi feita utilizando-se uma mistura de cianetos para se obter o reativo de Drabkin, este reativo reage com a hemoglobina formando cianometahemoglobina, que foi medida, em espectrofotômetro marca Varian modelo Cary, a 546 nm.

SOLUÇÃO DE DRABKIN:

- ⇒ 0,85mL de KCN 9mM

⇒ 6,6mL de $K_3[Fe(CN)_6]$ 0,9mM

⇒ q.s.p. 10mL água destilada

Em um tubo de ensaio foi adicionado 5mL de Drabkin e 20 μ L de amostra, deixou-se reagir por 5 minutos e a absorbância foi lida em espectrofotômetro. Os resultados são expressos em mg/mL de hemoglobina.

4.10 - QUIMILUMINESCÊNCIA INICIADA POR t-BOOH

Este método consiste em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética (hidroperóxido de tert-butila, o t-BOOH) à amostra sangüínea, avaliando a capacidade de resposta produzida por esta amostra. A realização deste tipo de teste consiste no fato de que os hidroperóxidos são espécies químicas bastante instáveis, reagindo com lipídios por um mecanismo radicalar que gera produtos que emitem luz pela amostra em estudo. Este método é um dos mais sensíveis para a medida de LPO.

A QL foi medida em um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Brommma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio. As determinações foram realizadas em sala escura, em frascos de vidro mantidos na penumbra para evitar a fosforescência ativada pela luz fluorescente. O meio de reação no qual foi realizado o ensaio, com o homogeneizado de tecido, consistiu em 3,5mL de uma solução reguladora de KCl 140mM, fosfatos 20mM, pH 7,4, na qual foi adicionado 0,5mL de homogeneizado. Já para a amostra de sangue utilizou-se 4mL do mesmo tampão e 10 μ L de eritrócito diluído em soro fisiológico. Após, foi realizada uma leitura inicial, considerada a emissão de luz basal. A concentração de hidroperóxido de tert-butila utilizada foi de 400mM, dos quais foram adicionados 30 μ L no meio de reação, para uma concentração final de 3mM. Foi medida, então, a emissão de luz e, desta, foi descontada a emissão basal para fins de cálculos. Os resultados foram expressos em contagens por segundo (cps) por miligrama de hemoglobina (GONZALEZ- FLECHA, 1991).

4.11 - SUPERÓXIDO DISMUTASE

A técnica utilizada para determinação da SOD baseou-se na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O superóxido é gerado pela autooxidação do pirogalol quando em meio básico. A SOD presente na amostra compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. Portanto, quanto maior for a concentração de SOD na amostra, menor seria a autooxidação do pirogalol.

Neste ensaio, não se pode determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, por isso, se utiliza a quantificação em unidades relativas. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector. A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420 nm. A atividade da SOD é determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado (MARKLUND, 1985).

Utilizaram-se os seguintes reagentes:

- ⇒ Solução tampão (Tris-base na concentração de 50mM; EDTA na concentração de 1mM em pH 8,2);
- ⇒ Pirogalol 24mM (em ácido clorídrico a 10mM);
- ⇒ Catalase a 30 μ M.

Para se ter o resultado em unidade de SOD, necessita-se de um fator de calibração. Por isso, fez-se necessário a construção de uma curva padrão com uma solução de SOD de concentração conhecida. Desta forma, calculou-se o fator de calibração necessário para converter a percentagem de inibição da autooxidação em unidades de enzima.

No ensaio, adicionou-se à cubeta 988 μ L de tampão Tris, 4 μ L de Catalase. Zerou-se o espectrofotômetro e adicionou-se 8 μ L de pirogalol, observando a oxidação do mesmo. Desta forma, obtivemos o máximo (100%) de oxidação desta substância, para calcular a percentagem de inibição causada pela SOD da amostra. Com a amostra, procedeu-se da mesma forma, apenas com o reajuste do volume de tampão de acordo com a quantidade de sangue ou de

homogeneizado de tecido adicionada, para se ter um volume final de 1mL. Os resultados foram expressos em U SOD/mg proteína.

4.12 - CATALASE

A atividade da Catalase é diretamente proporcional a taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, e obedece a uma cinética de pseudo primeira ordem. Sendo assim, a atividade da enzima Catalase pode ser medida através da avaliação do consumo do peróxido de hidrogênio.

Este teste consiste em avaliar a diminuição da absorvância no comprimento de onda de 240 nm, sendo este o comprimento de onda onde há a maior absorção pelo peróxido de hidrogênio, utilizando-se cubetas de quartzo devido à alta energia do comprimento de onda no qual foram realizadas as medidas.

Para realização deste ensaio foram utilizados os seguintes reagentes:

- ⇒ solução tampão de fosfato de sódio a 50mM e pH 7,4;
- ⇒ peróxido de hidrogênio 0,3M.

Em cubeta de quartzo, foram adicionados 955 μ L do tampão fosfato e 10 μ L de amostra do tecido ou 30 μ L de amostra de sangue, esta cubeta foi colocada em espectrofotômetro e descontada contra um branco de tampão fosfato. Após, foram adicionados 35 μ L do peróxido de hidrogênio para o tecido e 15 μ L para amostra de sangue e foi feito o monitoramento da diminuição da absorvância no comprimento de onda selecionado. Os resultados foram expressos em pmoles por mg de proteína (BOVERIS & CHANCE, 1973).

4.13 - GLUTATIONA PEROXIDASE

A enzima Glutationa Peroxidase (GPx) catalisa a reação de hidroperóxidos com a glutaciona reduzida (GSH) para formar glutaciona oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido. Por este motivo, sua atividade pode ser determinada medindo-se o consumo de NADPH na reação de redução acoplada à reação da GPx.

A amostra é previamente preparada adicionando-se uma mistura de cianetos (cianeto de potássio KCN 9mM e ferrocianeto de potássio $K_3[Fe(CN)_6]$ 0,9mM), para inibir a atividade pseudo-peroxidase da hemoglobina. Inicialmente utiliza-se a mistura de cianetos para se obter o reativo de Drabkin, para medir a quantidade de hemoglobina. Depois de conhecida a concentração de hemoglobina, estas mesmas soluções foram utilizadas, em diferentes proporções, para se obter a solução transformante, que vai transformar toda a hemoglobina em cianometahemoglobina.

SOLUÇÃO DE DRABKIN:

- ⇒ 0,85mL de KCN 9mM;
- ⇒ 6,6mL de $K_3[Fe(CN)_6]$ 0,9mM;
- ⇒ q.s.p. 10mL água destilada.

SOLUÇÃO TRANSFORMANTE:

- ⇒ 5,0mL de KCN 9mM;
- ⇒ 5,0mL de $K_3[Fe(CN)_6]$ 0,9mM.

A atividade da GPx foi medida em um espectrofotômetro da marca Varian, modelo Cary. Foi monitorada a diminuição de absorbância do NADPH a 340 nm, em um meio de reação contendo os seguintes reagentes:

- ⇒ Solução tampão de fosfatos 143mM e EDTA 1mM, com pH 7,5;
- ⇒ NADPH 0,24mM;
- ⇒ Azida sódica 1mM, utilizada para inibir a atividade da Catalase;
- ⇒ GSH 5mM;
- ⇒ Glutathione Redutase (GR) 0,25U/mL;
- ⇒ Hidroperóxido de tert-butila 0,5mM.

Na cubeta do espectrofotômetro, foram adicionados 330 μ L de tampão, 50 μ L de homogeneizado de tecido, 500 μ L de NADPH, 10 μ L de azida sódica, 50 μ L de GSH e 10 μ L de GR. A absorbância foi registrada por um período de aproximadamente 3 minutos, até haver uma certa estabilização da linha base. Após, foram adicionados 50 μ L de hidroperóxido de tert-butila, e a diminuição da absorbância, devido ao consumo de NADPH, foi monitorada por aproximadamente

5 minutos. Os resultados foram expressos em nmoles por minuto por mg de proteína (FLOHÉ & GUNZLER, 1984).

Para medida da atividade da GPx em sangue, tomou-se os glóbulos vermelhos previamente preparados e determinou-se a concentração de hemoglobina por meio do reativo de Drabkin (8,5% de KCN 9mM e 66% de $K_3[Fe(CN)_6]$ 0,9mM). Para isto, misturou-se 100 μ L de eritrócitos com 1 mL de Drabkin e leu-se a 546nm.

Uma vez conhecida a concentração de hemoglobina, tomou-se, para cada 0,6mg/mL de hemoglobina, 100 μ L de solução transformante para converter toda a hemoglobina em cianometahemoglobina a fim de inibir a atividade peroxidante da hemoglobina (50% de KCN 9mM e 50% de $K_3[Fe(CN)_6]$ 0,9mM). Adicionou-se na cubeta do espectrofotômetro 2,15mL de tampão (EDTA 1mM em fosfato de potássio 100mM, ph=7,7), 100 μ L de NADPH (10mM), 150 μ L de hidroperóxido de tert-butila (10mM e 50 μ L de glutatona redutase). Leu-se então a absorbância a 340nm por um minuto, para obter-se a linha de base.

Adicionou-se 50 μ L de glutatona reduzida (100mM em ácido metafosfórico a 5%) e leu-se por mais 1 minuto. Logo após, adicionou-se 500 μ L da amostra transformada e leu-se novamente por mais 1 minuto.

A atividade da GPx foi expressa em μ moles/min/mg de proteínas.

4.14 – GLUTATIONA-S-TRANSFERASE

As glutatona transferases são um grupo de enzimas que catalisam reações de conjugação de glutatona com vários substratos, tendo um papel importante na detoxificação de agentes alquilantes. Todas as transferases são ativas com o composto clorodinitrobenzeno (CDNB). A Glutatona-S-Transferase (GST) vai catalisar a reação de conjugação da glutatona reduzida (GSH) com outras substâncias tóxicas, que possam a vir a prejudicar o funcionamento celular. Essa combinação forma os conjugados de glutatona que serão exportados para fora do meio interno da célula. Deste modo, esta enzima desempenha um papel importante na detoxificação celular.

Este ensaio está baseado na capacidade da GST de combinar o 1-cloro-2,4-dinitro-benzeno (CDNB) com a GSH formando 2,4 dinitro-fenil-glutationa (DNP-SG), que é um composto corado. A formação do DNP-SG pode ser observada espectrofotometricamente no comprimento de onda de 340 nm, utilizando os seguintes reagentes:

- ⇒ Tampão fosfato de sódio 0,2M pH 6,5;
- ⇒ GSH 20mM;
- ⇒ CNDB.20mM

Na cubeta de 1mL foram adicionados 850 μ L de tampão, 50 μ L de amostra, mais 50 μ L de GSH (de concentração final de 1mM), zerou-se o espectrofotômetro a 340nm, e, por fim, adicionou 50 μ L de CDNB e observou-se a formação do DNP-SG. O resultado é dado em μ moles/minuto/mg proteína (MANNERVIK & GLUTHENBERG, 1981).

4.15 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP)

A técnica utilizada para medir a capacidade antioxidante total esta baseada na formação de um radical que emite luz, e que vai ser detectado em um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Brommma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio, como descrito por Lissi e colaboradores em 1992. As determinações foram realizadas em sala escura, em frascos de vidro mantidos na penumbra para evitar a fosforescência ativada pela luz fluorescente.

Esta técnica é dependente da temperatura. Em baixas temperaturas é muito mais lenta, porque está baseada na decomposição do 2,2'Azo-bis (2-amidino-propano) diidrocloreto, que gera radicais livres. Esta substância tem uma ligação dupla entre dois nitrogênios, bastante instável e que, com o aumento da temperatura, há rompimento gerando dois radicais livres.

Estes radicais livres por sua vez vão reagir com o luminol e gerar um outro radical livre mais energético e com maior emissão de luz e, sendo assim, mais facilmente detectado pelo contador. No entanto se tivermos presente no meio de

reação um antioxidante, ele irá neutralizar os radicais livres e assim diminuir a emissão de luz. Como padrão utiliza-se o antioxidante Trolox que forma um radical estável. Quando todo o antioxidante tiver reagido, o luminol reage novamente com o Azo radical e, novamente, há um aumento na emissão de luz.

Para medir a capacidade antioxidante da amostra, coloca-se o plasma ou o homogeneizado do tecido que se está estudando no vial contendo Azo e luminol e observa-se por quanto tempo ele é capaz de inibir a formação dos radicais do luminol. Esta análise foi feita utilizando-se os seguintes reagentes:

- ⇒ Tampão fosfato 50mM, pH 7,4;
- ⇒ 2,2' Azo-bis (2-amidino-propano) diidrocloreto 0,5% em tampão fosfato;
- ⇒ Luminol 1mg/mL em NaOH 0,1N;
- ⇒ Trolox 8mg% em tampão fosfato.

O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consistiu em 3,0mL de uma solução de Azo, em que se adicionou 10 μ L de luminol. A leitura esperada deve ser superior a 50000. Após, adicionou-se amostra (50 μ L de plasma ou 5 μ L de homogeneizado de rim ou 10 μ L de homogeneizado de coração ou 5 μ L de homogeneizado de fígado). Para fazer a curva padrão, foram feitas duas leituras utilizando-se o Trolox nas quantidades de 5 μ L e 10 μ L. O TRAP é expresso em mM de Trolox (LISSI *et al.*, 1992; EVELSON *et al.*, 2001).

4.16 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após efetuados todos os testes, foram calculadas as médias e os erros padrões da média para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados. Para a análise estatística dos dados realizados em homogeneizado de tecido, utilizou-se o teste t de Student para dados não pareados, sendo as diferenças consideradas significativas para $p < 0,05$ (nível de significância de, pelo menos, 5%). A análise estatística foi efetuada com o auxílio do programa computacional GraphPad InStat. Para as avaliações realizadas em sangue, procedeu-se a análise de variância para medidas repetidas para cada variável resposta através do programa computacional SAS.

5. RESULTADOS

Os resultados aqui descritos são relativos à média de cada grupo estudado \pm erro padrão da média. O desenvolvimento corporal dos animais, assim como a concentração de mercúrio no sangue total, foram avaliados e comparados entre os grupos.

A lipoperoxidação e as atividades de enzimas antioxidantes e os antioxidantes totais foram avaliados no sangue dos animais. O mesmo ocorreu referente aos homogeneizados de coração, fígado e rim. Para cada análise, há uma Figura e/ou uma tabela, para que se obtenha uma melhor visualização dos dados.

5.1 – CURVA DE PESO DOS ANIMAIS

Fez-se uma curva de peso para monitoramento dos animais, em que ambos os grupos eram pesados semanalmente e controlados quanto a este item.

Na Tabela 1 e na Figura 9 estão representados os resultados.

Verificou-se que houve diferença significativa de peso entre os grupos, durante as quatro semanas de tratamento. Entre o grupo controle na Semana 1 e o mesmo na Semana 4 observou-se um aumento de peso significativo. Encontraram-se importantes diferenças de peso entre ambos os grupos na Semana 4. Houve perda de peso significativa entre a Semana 1 e Semana 4 no grupo tratado com cloreto de mercúrio. Os pesos iniciais dos animais em ambos os grupos não mostraram diferenças significativas.

Tabela 1: Variação de peso corporal (g) dos animais em ambos os grupos, medidos por 4 semanas. Os valores são expressos como a Média \pm Erro Padrão da Média.

Semanas	Controle (n=10) Peso (g)	HgCl ₂ (n=10) Peso (g)
0	252,6 \pm 3,3	255,1 \pm 3,9
1	262,8 \pm 3,4	209,8 \pm 5,0
2	274,4 \pm 4,0	206,7 \pm 5,1
3	290,6 \pm 5,2	209,4 \pm 6,2
4	318,3 \pm 8,1*	206,7 \pm 4,2**#

* diferença significativa em relação ao grupo controle no tempo zero ($p < 0,05$).

** diferença significativa em relação à primeira semana de tratamento do grupo HgCl₂ ($p < 0,05$).

diferença significativa em relação ao grupo controle na quarta semana de tratamento ($p < 0,05$).

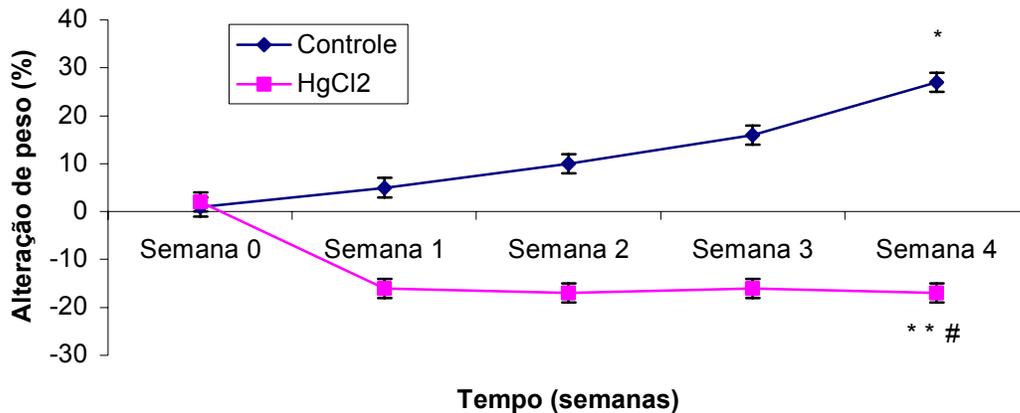


Figura 9: Curva de peso corporal (g) que compara o crescimento dos animais em ambos os grupos, medidos por 4 semanas. Os valores são expressos em porcentagem (%).

* diferença significativa em relação ao grupo controle no tempo zero ($p < 0,05$).

** diferença significativa em relação à primeira semana de tratamento do grupo HgCl₂ ($p < 0,05$).

diferença significativa em relação ao grupo controle na quarta semana de tratamento ($p < 0,05$).

5.2 – DOSAGEM DE CLORETO DE MERCÚRIO NO SANGUE

A concentração de cloreto de mercúrio encontrada no sangue total dos animais tratados foi significativamente maior do que a do grupo controle, mostrando-nos que a administração subcutânea foi realmente efetiva ($p < 0,05$).

Na Figura 10, observam-se as variações da concentração em ambos os grupos experimentais dadas em $\mu\text{g/L}$.

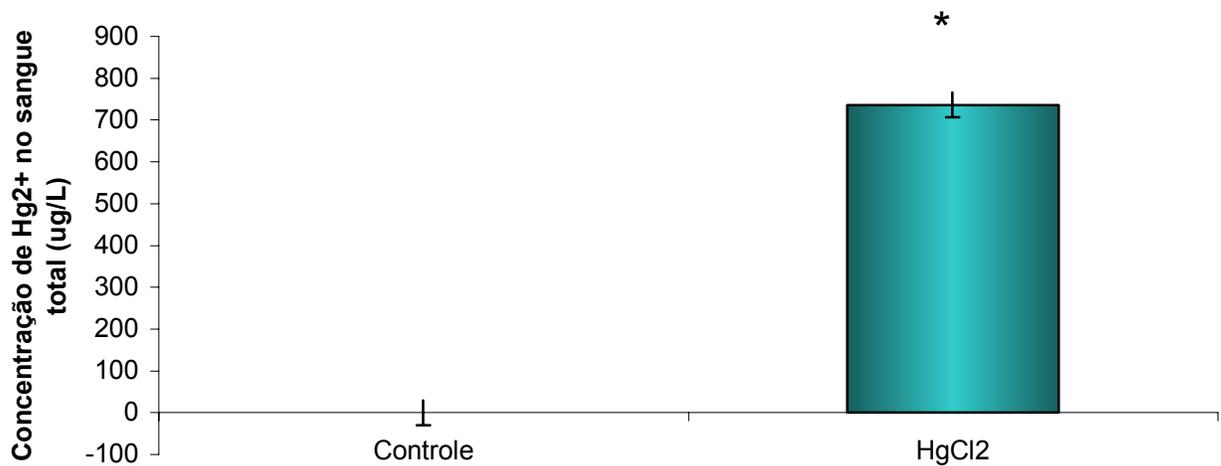


Figura 10: Níveis de concentração de mercúrio encontrados no sangue total de ambos os grupos experimentais, dados em $\mu\text{g/L}$. Os valores são expressos como a Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

5.3 – RESULTADOS SISTÊMICOS

5.3.1- Quimiluminescência em Eritrócitos

A lipoperoxidação medida através da técnica de quimiluminescência, em amostras sangüíneas do grupo tratado com cloreto de mercúrio apresentou diferenças significativas quando comparada com o grupo controle, na segunda semana de tratamento ($p < 0,05$).

Os resultados são apresentados na Tabela 2 e na Figura 11, em cps/mg de hemoglobina.

Tabela 2: Níveis de lipoperoxidação obtidos através da Quimiluminescência, descritos em cps/mg de hemoglobina, em amostras de sangue, nos diferentes grupos experimentais. Os valores são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média.

Grupos Experimentais		1° semana	2° semana	4° semana
Controle	(cps/mg Hb)	213 \pm 12 (n=5)	143 \pm 10 (n=5)	214 \pm 12 (n=5)
HgCl ₂	(cps/mg Hb)	168 \pm 12* (n=5)	181 \pm 11* (n=5)	239 \pm 11 (n=6)

* diferença significativa em relação ao grupo controle no mesmo tempo de tratamento ($p < 0,05$).

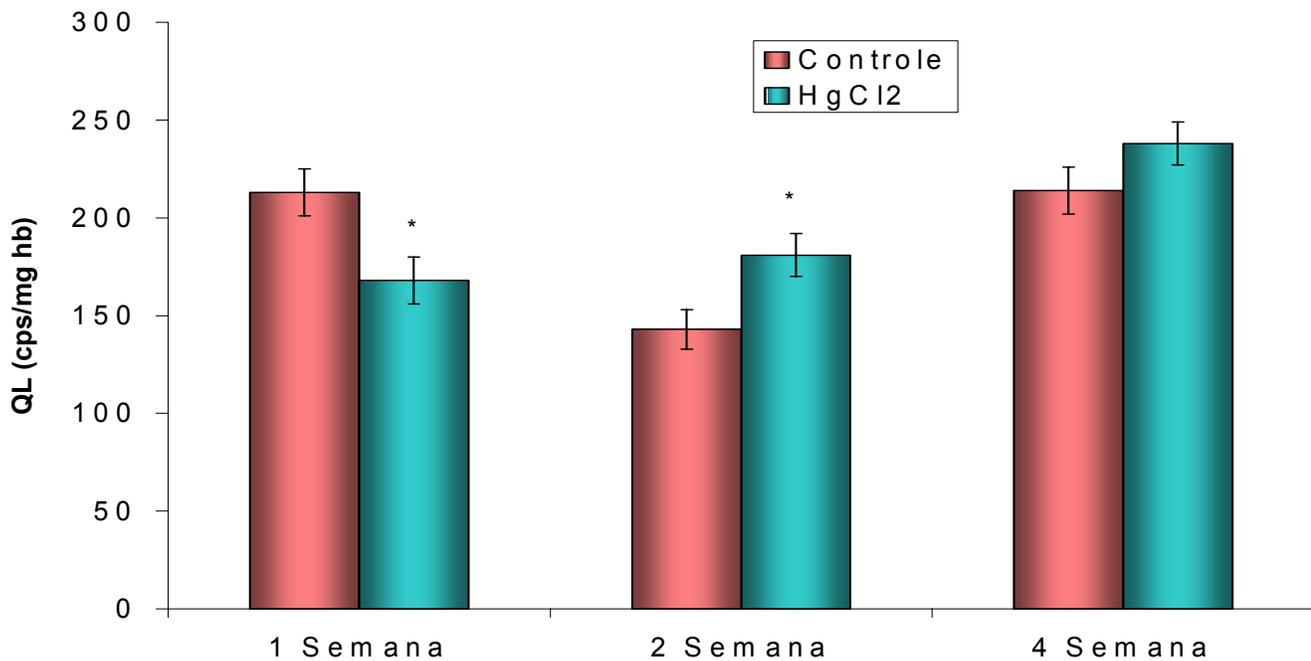


Figura 11: Níveis de lipoperoxidação obtidos através da Quimiluminescência, descritos em cps/mg de hemoglobina, no sangue dos diferentes grupos experimentais, na 1^o, 2^o e 4^o semanas de estudo. Os valores são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa em relação ao grupo controle no mesmo tempo de estudo (p<0,05).

Na Figura 12, pode-se observar o gráfico da variável QL (cps/mg Hb) em relação ao tempo para cada grupo estudado.

Considerando apenas o grupo controle, temos que a 2^o semana foi a que apresentou menor lipoperoxidação, diferenciando-se significativamente das demais semanas. A 1^o e a 4^o semana não se diferenciam entre si.

Quando consideramos o grupo mercúrio, temos que a 4^o semana apresentou maior lipoperoxidação diferenciando-se significativamente das demais.

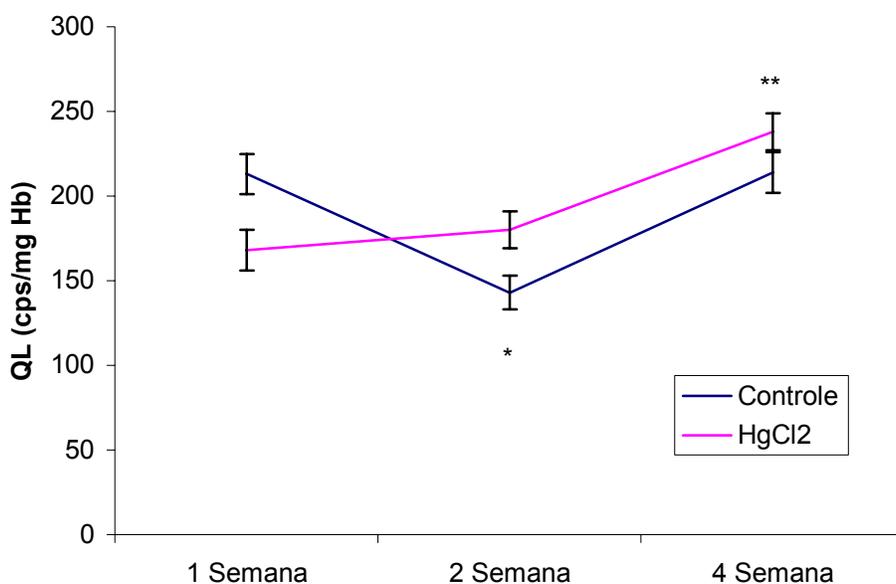


Figura 12: Variação dos níveis de lipoperoxidação obtidos através da Quimiluminescência, descritos em cps/mg de hemoglobina, ao longo de quatro semanas de estudo em amostras de sangue, em cada grupo experimental. Os valores são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa do grupo controle na 2^o semana de estudo em relação às outras semanas no mesmo grupo ($p < 0,05$).

** diferença significativa do grupo tratado na 4^o semana de estudo em relação às outras semanas no mesmo grupo ($p < 0,05$).

5.3.2 – Enzimas Antioxidantes em Eritrócitos

Determinou-se a atividade das enzimas antioxidantes Catalase (CAT), Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GPx) e Glutathione-S-Transferase (GST) em sangue de ambos os grupos experimentais. Na Tabela 3, estão apresentados os níveis de atividade destas enzimas nas diferentes semanas estudadas nos dois grupos experimentais.

Em relação à enzima Catalase, não se observa diferença significativa entre os grupos durante o tempo de estudo.

A atividade da SOD no grupo tratado foi reduzida em 25% na primeira semana de estudo, 50% na segunda semana e apresentou um aumento significativo (43%) na quarta semana, quando comparado com o grupo controle, como pode ser visto na Tabela 3 ($p = 0,046$, $p < 0,01$ e $p = 0,03$, respectivamente).

A GPx e a GST tiveram aumento significativo em suas atividades (28% e 14%, respectivamente) na 2ª semana de tratamento com cloreto de mercúrio, ambas com $p < 0,01$.

Tabela 3: Atividade das enzimas Catalase, Superóxido Dismutase, Glutaciona Peroxidase e Glutaciona -S-Transferase em amostras de sangue nos diferentes grupos experimentais, na 1°, 2° e 4° semanas de estudo. Os valores são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média.

Enzimas Antioxidantes em Eritrócitos	1ªSemana de Tratamento		2ªSemana de Tratamento		4ªSemana de Tratamento	
	Controle	HgCl ₂	Controle	HgCl ₂	Controle	HgCl ₂
CAT (pmoles/mg prot)	27,2 \pm 1,7 (n=6)	30,4 \pm 1,4 (n=6)	36,2 \pm 1,9 (n=6)	37,0 \pm 1,4 (n=7)	37,2 \pm 0,9 (n=6)	41,2 \pm 0,8 (n=5)
SOD (U/mg prot)	5,5 \pm 0,4 (n=5)	4,1 \pm 0,5* (n=5)	4,3 \pm 0,3 (n=5)	2,0 \pm 0,5* (n=5)	4,6 \pm 0,3 (n=5)	6,6 \pm 0,7* (n=5)
GPx (nmoles/min/mg prot)	44,7 \pm 3,0 (n=6)	36,5 \pm 3,0 (n=6)	15,9 \pm 1,0 (n=5)	20,3 \pm 1,0# (n=5)	58,2 \pm 3,5 (n=5)	50,1 \pm 3,5 (n=5)
GST (nmoles/min/mg prot)	0,3 \pm 0,01 (n=6)	0,3 \pm 0,01 (n=6)	0,7 \pm 0,04 (n=6)	0,8 \pm 0,03 Ψ (n=6)	0,8 \pm 0,04 (n=6)	0,8 \pm 0,06 (n=5)

* diferença significativa em relação ao grupo controle na primeira, segunda e na quarta semana de estudo ($p=0,046$, $p<0,01$ e $p= 0,03$, respectivamente).

diferença significativa em relação ao grupo controle na segunda semana de estudo ($p= 0,045$).

Ψ diferença significativa em relação ao grupo controle na segunda semana de estudo ($p= 0,018$).

Analisando-se cada variável “atividade de enzima antioxidante” em relação ao tempo de estudo e a resposta orgânica em cada grupo experimental, podemos observar a variação ocorrida durante as quatro semanas.

Começando pela atividade da enzima GST, nota-se que para o grupo controle os valores de GST se diferenciam significativamente em todas as semanas de estudo, aumentando progressivamente da 1° para a 4° semana.

Para o grupo mercúrio, a atividade da GST na primeira semana foi significativamente inferior às medidas nas 2° e 4° semanas, que não se diferenciam entre si.

Todos estes dados estão apresentados na Figura 13.

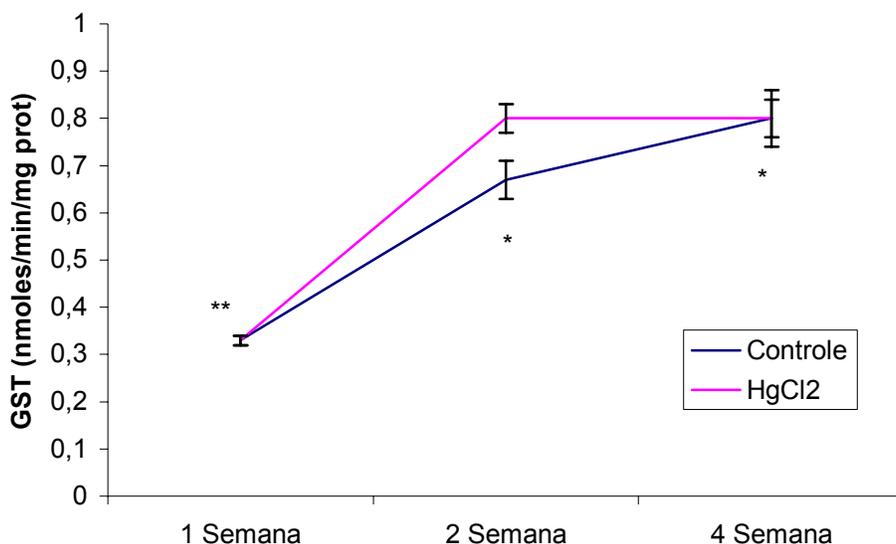


Figura 13: Variação da atividade da enzima Glutathione-S-Transferase, descritos em nmoles/min/mg de proteína, ao longo de quatro semanas de estudo em amostras de sangue, em cada grupo experimental. Os valores são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa do grupo controle na 2° e 4° semana de estudo em relação a 1° semana no mesmo grupo ($p < 0,05$).

** diferença significativa do grupo tratado na 1° semana de estudo em relação às demais semanas no mesmo grupo ($p < 0,05$).

Quando se analisam as medidas de GPx para o tratamento controle, encontramos diferenças significativas entre os valores na 1º, 2º e 4º semanas, sendo que a última semana foi a que apresentou a maior atividade de GPx e a 2º semana, a menor.

O mesmo perfil foi observado para o grupo tratado com cloreto de mercúrio. Estes dados estão descritos na Figura 14.

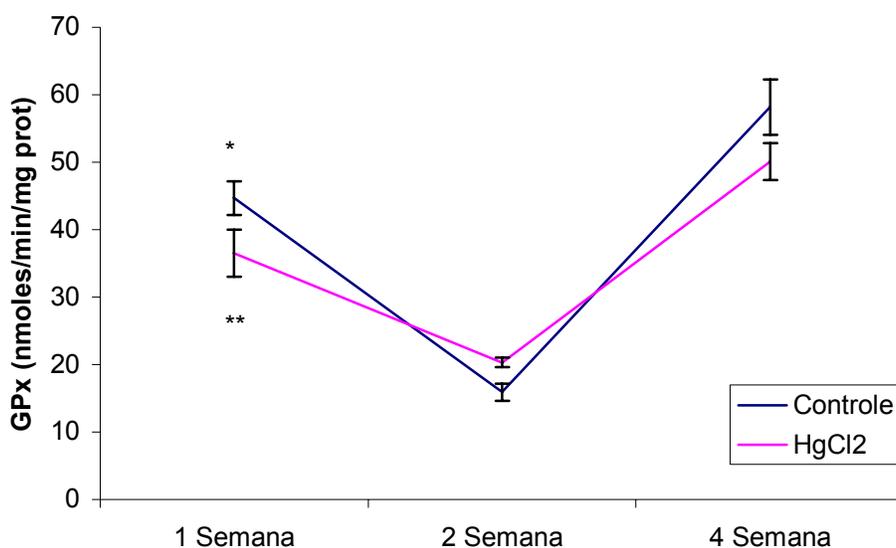


Figura 14: Variação da atividade da enzima Glutathione Peroxidase, descritos em nmoles/min/mg de proteína, ao longo de quatro semanas de estudo em amostras de sangue, em cada grupo experimental. Os valores são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa do grupo controle na 1º semana de estudo em relação às demais semanas no mesmo grupo ($p < 0,05$).

** diferença significativa do grupo tratado na 1º semana de estudo em relação às demais semanas no mesmo grupo ($p < 0,05$).

Não há diferenças significativas entre as atividades de SOD medidas durante as semanas de estudo para o grupo controle.

Há diferenças significativas para todos os valores semanais de atividade de SOD no grupo mercúrio. A 2ª semana apresentou a menor média de atividade, enquanto que a 4ª semana apresentou a maior. Os dados são mostrados na Figura 15.

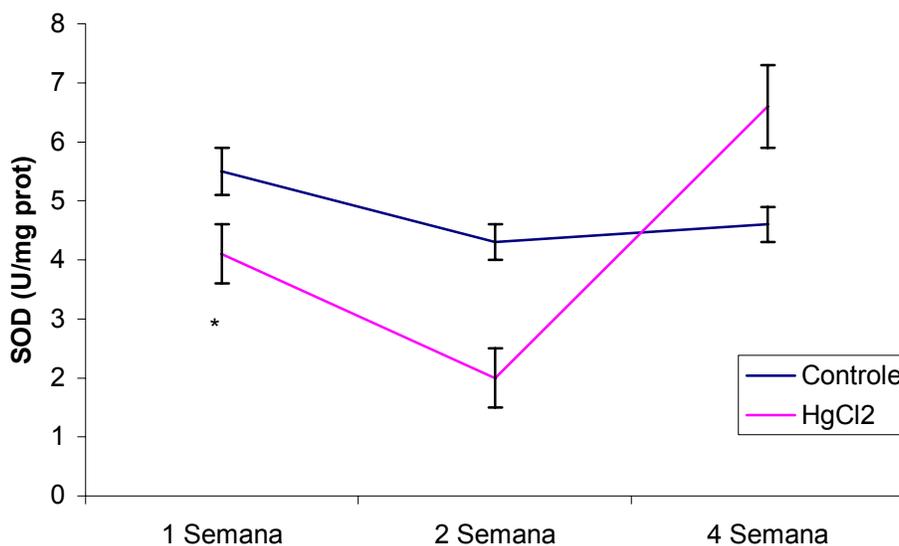


Figura 15: Variação da atividade da enzima Superóxido Dismutase, descritos em U/mg de proteína, ao longo de quatro semanas de estudo em amostras de sangue, em cada grupo experimental. Os valores são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa do grupo tratado na 1ª semana de estudo em relação às demais semanas no mesmo grupo ($p < 0,05$).

O teste de comparação de valores de atividade indica que a média de CAT para a 1ª semana foi significativamente inferior às demais semanas, para ambos os grupos. Isto pode ser visto na Figura 16.

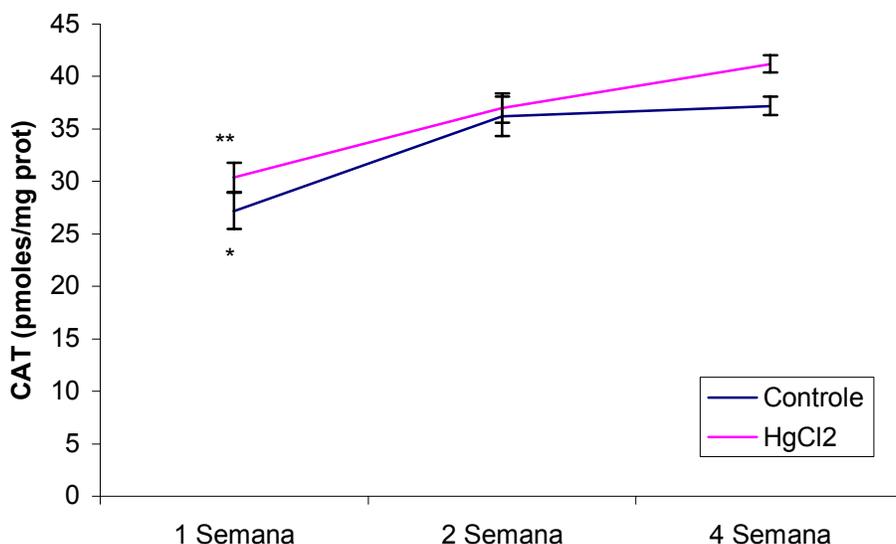


Figura 16: Variação da atividade da enzima Catalase, descritos em pmoles/mg de proteína, ao longo de quatro semanas de estudo em amostras de sangue, em cada grupo experimental. Os valores são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa do grupo controle na 1^o semana de estudo em relação às demais semanas no mesmo grupo ($p < 0,05$).

** diferença significativa do grupo tratado na 1^o semana de estudo em relação às demais semanas no mesmo grupo ($p < 0,05$).

5.3.3- Capacidade Antioxidante Total da Amostra Plasmática

A capacidade antioxidante total (TRAP) plasmática (em mM de Trolox) na 1^o semana de tratamento com HgCl_2 foi reduzida à metade quando comparado com o grupo controle. Com o passar do tempo, esta capacidade antioxidante foi sendo aumentada, até que na última semana de intoxicação, já numa situação crônica, o TRAP mostrou uma tendência de aumento no grupo tratado em relação ao grupo controle, embora este aumento não tenha sido significativo ($p=0,26$). Os resultados obtidos podem ser analisados na Figura 17.

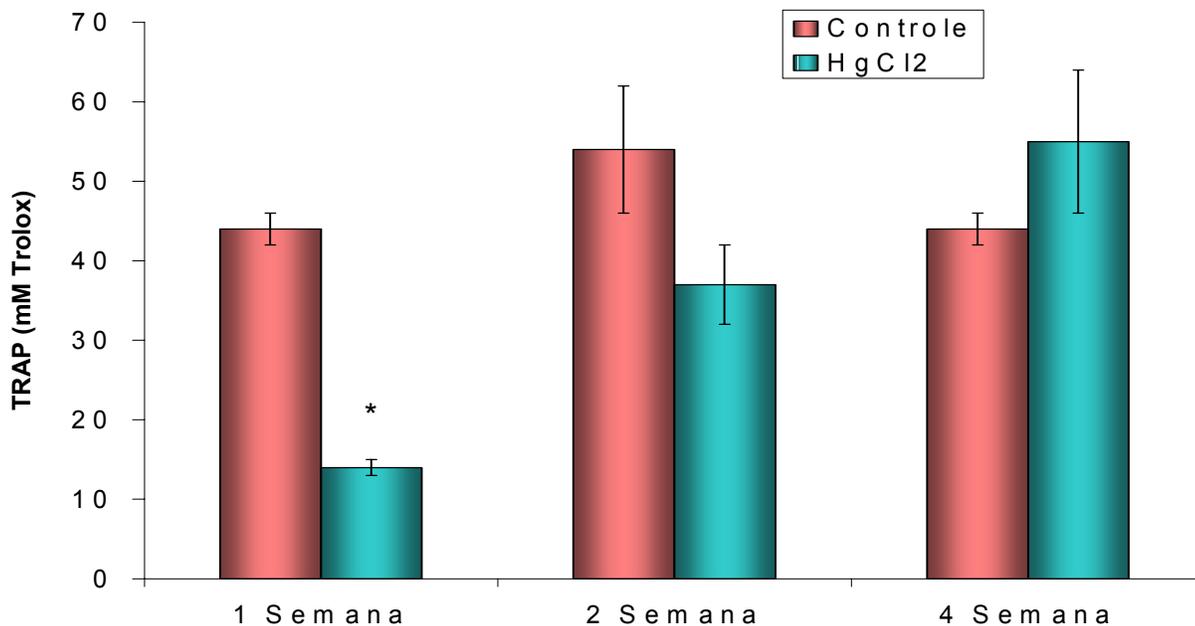


Figura 17: Níveis plasmáticos de capacidade antioxidante total obtidos através da técnica de TRAP, descritos em mM de Trolox, no plasma dos diferentes grupos experimentais, na 1^o, 2^o e 4^o semanas de estudo. Os valores são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa em relação ao grupo controle na 1^o semana de estudo (p=0,0001).

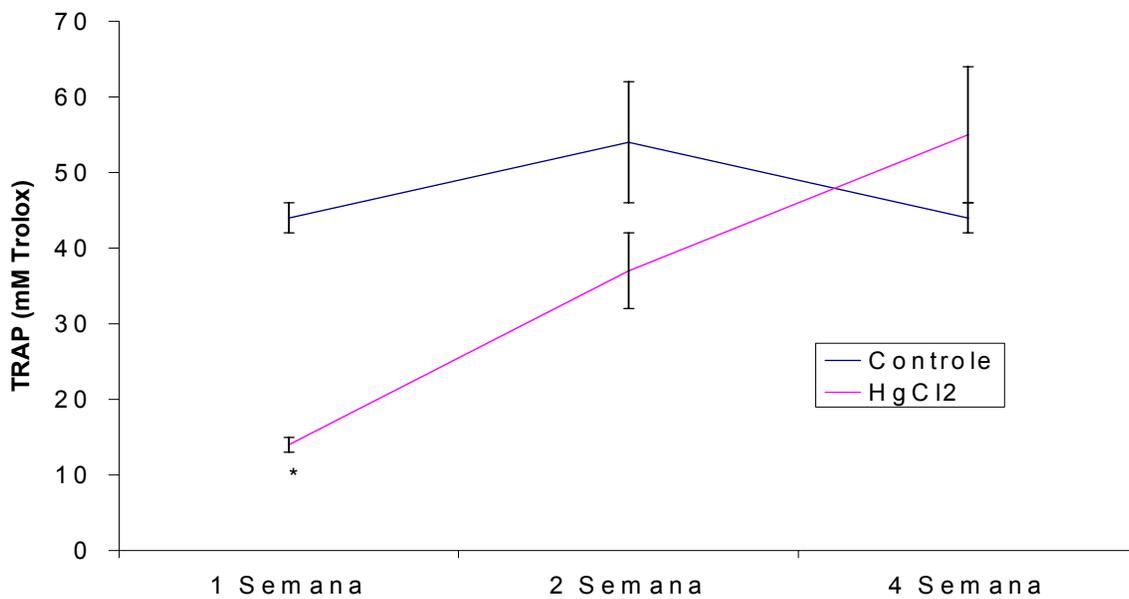


Figura 18: Variação dos níveis antioxidantes totais, descritos em mM de Trolox, ao longo de quatro semanas de estudo em amostras de sangue, em cada grupo experimental. Os valores são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa do grupo tratado com cloreto de mercúrio da 1^o semana de estudo em relação às outras semanas no mesmo grupo ($p < 0,05$).

5.4- RESULTADOS EM HOMOGENEIZADOS DE TECIDO

5.4.1- Quimiluminescência nos Tecidos Testados

A lipoperoxidação, medida através da técnica de quimiluminescência, em homogeneizado cardíaco e hepático do grupo tratado com cloreto de mercúrio apresentou diferenças significativas quando comparada com o grupo controle (aumento percentual de 25% e 44%, respectivamente), com $p=0,04$ para o coração e $p=0,013$ para o fígado. Entretanto, observa-se que não houve diferença entre os grupos experimentais quando o tecido renal é analisado.

Os resultados de LPO renal são apresentados na Tabela 4. A LPO cardíaca e hepática está representada na Figura 19.

Tabela 4: Níveis de lipoperoxidação obtidos através da Quimiluminescência, descritos em cps/mg de proteína, em homogeneizado renal, nos diferentes grupos experimentais. Os valores são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média.

Órgão	Controle (cps/mg prot.)	HgCl ₂ (cps/mg prot.)
Rim	1631,0 \pm 132,0 (n=8)	1466,0 \pm 82,0 (n=10)

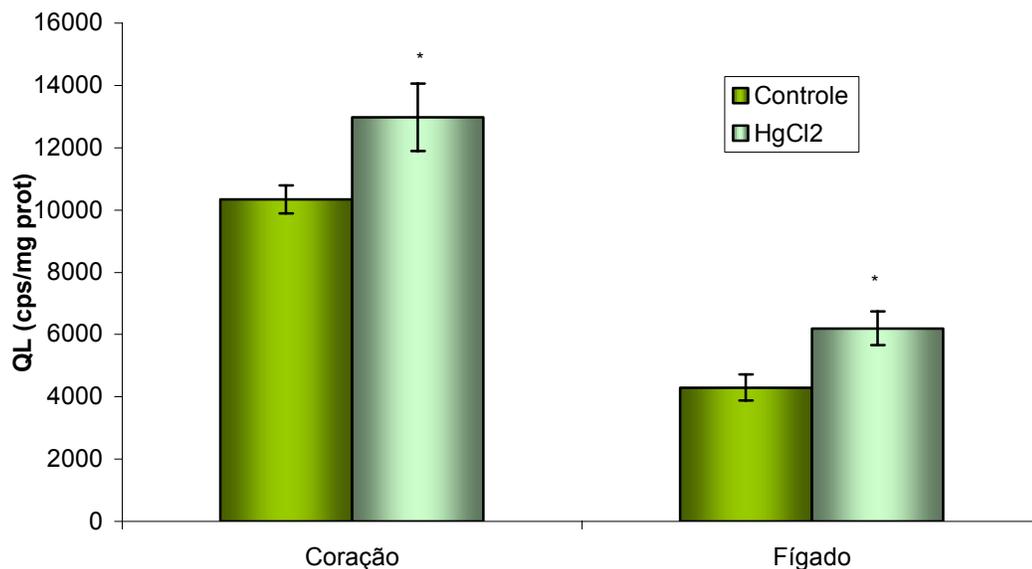


Figura 19: Níveis de lipoperoxidação obtidos através da Quimiluminescência, descritos em cps/mg de proteína, no tecido cardíaco e hepático nos diferentes grupos experimentais, ao final do estudo. Os valores são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle ao final do estudo ($p=0,04$ e $p=0,03$, respectivamente).

5.4.2 – Enzimas Antioxidantes nos Tecidos Estudados

Determinou-se a atividade das enzimas antioxidantes Catalase (CAT), Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GPx) e Glutathione-S-Transferase (GST) em homogeneizado cardíaco, hepático e renal de ambos os grupos experimentais. Todos os dados obtidos podem ser analisados na Tabela 5.

Em relação à atividade da enzima antioxidante Catalase em homogeneizados, observou-se uma diferença significativa ($p<0,05$) nos três tecidos estudados, nos quais se vê a queda desta atividade no grupo tratado em relação ao grupo controle. A Catalase cardíaca teve queda de atividade de 44%, seguida por uma diminuição de 43% e 25% no fígado e no rim, respectivamente.

A atividade da SOD foi reduzida no tecido hepático, ao final do tratamento, no grupo tratado com cloreto de mercúrio, em relação ao grupo controle, em 13%, com $p < 0,01$. Esta enzima não apresentou diferença significativa de atividade nos tecidos cardíaco e renal.

A medida da atividade da enzima antioxidante Glutathione Peroxidase em homogeneizado cardíaco não apresentou diferença, mas mostrou uma tendência à diminuição em relação ao grupo controle. Já a atividade desta em tecido hepático foi diminuída significativamente ($p < 0,05$). O rim exibiu uma tendência ao aumento da atividade da GPx, embora não significativo, comparando-se entre os grupos.

A GST teve um aumento significativo em sua atividade (362%) ($p < 0,001$) no homogeneizado de rim dos animais tratados comparados ao grupo controle, ao passo que nos tecidos cardíaco e hepático não se mostrou diferente em ambos os grupos, ao término do estudo.

Na Tabela 5, estão apresentados os níveis de atividade das enzimas Catalase, Superóxido Dismutase, Glutathione Peroxidase e Glutathione-S-Transferase nos diferentes tecidos estudados nos dois grupos experimentais.

Tabela 5: Atividade das enzimas Catalase, Superóxido Dismutase, Glutathione Peroxidase e Glutathione-S-Transferase em homogeneizado cardíaco, hepático e renal nos diferentes grupos experimentais, ao final do tempo de estudo. Os valores são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média.

Enzimas Antioxidantes nos Tecidos Estudados	CORAÇÃO		FÍGADO		RIM	
	Controle	HgCl ₂	Controle	HgCl ₂	Controle	HgCl ₂
CAT (pmoles/mg prot)	275,0 \pm 30,7 (n=6)	153,1 \pm 6,7* (n=7)	718,2 \pm 92,2 (n=6)	410,7 \pm 33,9* (n=7)	487,0 \pm 24,5 (n=6)	363,8 \pm 29,4* (n=8)
SOD (U/mg prot)	9,4 \pm 0,5 (n=6)	9,8 \pm 0,5 (n=5)	10,5 \pm 0,2 (n=6)	9,2 \pm 0,3** (n=6)	15,8 \pm 0,5 (n=6)	15,5 \pm 0,7 (n=6)
GPx (nmoles/min/ mg prot)	71,0 \pm 6,4 (n=7)	60,1 \pm 6,3 (n=6)	171,7 \pm 7,5 (n=6)	101,3 \pm 13,0# (n=5)	45,6 \pm 2,4 (n=7)	50,7 \pm 5,1 (n=7)
GST (nmoles/min/ mg prot)	1,1 \pm 0,1 (n=6)	1,1 \pm 0,1 (n=5)	2,3 \pm 0,05 (n=6)	2,5 \pm 0,09 (n=6)	1,9 \pm 0,1 (n=6)	9,2 \pm 0,4 Ψ (n=5)

* diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$ para todos os tecidos) ao final do estudo.

** diferença significativa em relação ao grupo controle ao final do estudo ($p < 0,01$).

diferença significativa em relação ao grupo controle ao término do estudo ($p < 0,05$).

Ψ diferença significativa em relação ao grupo controle ao término do estudo ($p < 0,001$).

5.4.3- Capacidade Antioxidante Total das Amostras Teciduais

A capacidade antioxidante total (TRAP) hepática (em mM de Trolox) dos ratos tratados com HgCl_2 , ao final de trinta dias, foi reduzida a menos da metade quando comparado com o grupo controle (diminuição de 55%), com $n=5$ no grupo controle e $n=6$ no grupo tratado ($p=0,0007$). Esta mesma capacidade antioxidante encontrou-se aumentada significativamente nos tecidos cardíaco (ambos os grupos com $n=6$ e $p=0,0003$) e renal (ambos os grupos com $n=6$ e $p=0,0009$) (225% e 100%, respectivamente), estando os animais tratados já numa situação crônica, em relação ao grupo controle que não foi intoxicado. Os resultados obtidos podem ser analisados na Figura 20.

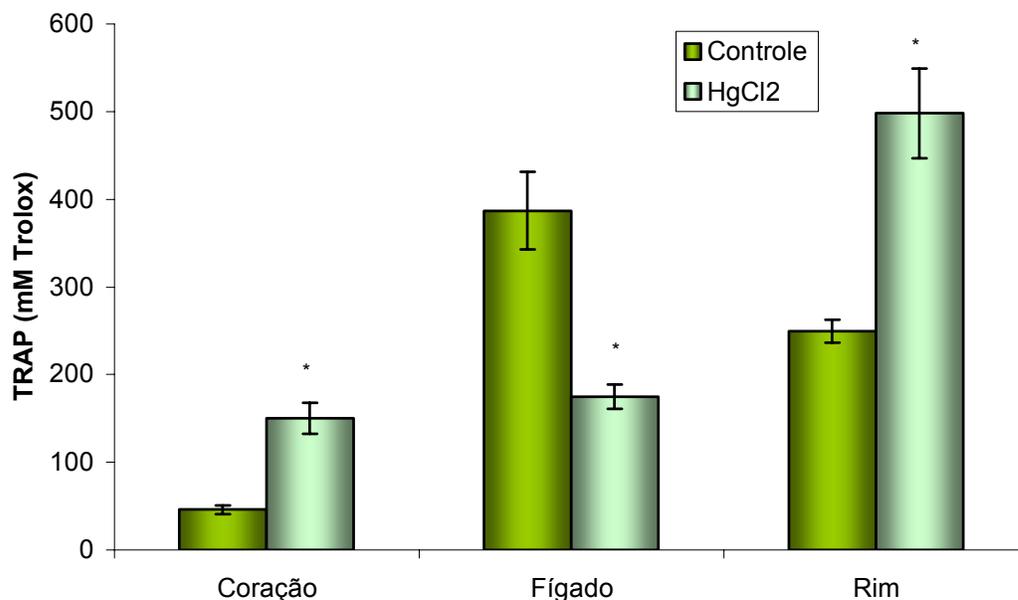


Figura 20: Níveis teciduais de capacidade antioxidante total obtidos através da técnica de TRAP, descritos em mM de Trolox, no coração, fígado e rim nos diferentes grupos experimentais, ao término do estudo. Os valores são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média.

* diferença significativa em relação ao grupo controle ao término do estudo ($p<0,001$ para todos os tecidos).

6. DISCUSSÃO

Em 1999, o SINITOX registrou 316 intoxicações por metais no Brasil, com dois óbitos (um por suicídio) e cinco pessoas seqüeladas. Noventa e sete vítimas não tiveram sua evolução acompanhada. Destas intoxicações, 161 ocorreram na Região Sul, sendo a metade por meio ocupacional (SINITOX, 2002).

Analisando-se os dados obtidos pelo SINITOX no ano de 2000, observa-se que há o registro de 282 intoxicações por metais, nenhum óbito e apenas uma pessoa com seqüelas registradas. Entretanto, 78 casos não tiveram evolução acompanhada. A exposição ocupacional continuou sendo a principal causa de intoxicação (57 casos), seguida de tentativas de suicídio (12 casos) e homicídio (2 casos). Na Região Sul ocorreram 109 destas intoxicações, sendo que 20% das exposições registradas foram ocupacionais. Para crianças até 9 anos, o SINITOX teve 62 casos registrados. A faixa etária mais atingida por intoxicações varia de 0 a 9 anos, pois nesta fase ocorre muito comumente a ingestão de substâncias tóxicas, assim como brincadeiras com as mesmas, para ambos os sexos (SINITOX, 2002).

É provável que os números aqui descritos não correspondam completamente à realidade de vítimas atingidas pela intoxicação por metais, porque muitas vezes o diagnóstico é confuso, não ocorre ou não é notificado às autoridades responsáveis.

Através destes dados, fica lançada a idéia da imensa importância de estudos referentes a este tipo de assunto.

.Para começar a debater os resultados encontrados nestes experimentos, é interessante ressaltar que os animais controle foram submetidos às mesmas circunstâncias que os tratados com cloreto de mercúrio, isto é, passaram pelo mesmo estresse de contenção e injeção. Este procedimento visa padronizar a liberação de catecolaminas, fator este que pode interferir no estresse oxidativo.

Achamos diferenças no peso dos animais tratados com cloreto de mercúrio administrado subcutaneamente, comparado com o grupo controle. Fizemos semanalmente monitoração da estrutura corporal dos animais. Para participarem

deste estudo, foram escolhidos ratos machos Wistar que estavam com peso aproximado de 250g, sendo, portanto, animais adultos. É bem conhecido que o cloreto de mercúrio causa diminuição de peso quando administrado por via oral. Por esta última via, o metal se liga ao epitélio intestinal, diminuindo a absorção de nutrientes (KLAASSEN *apud* GOODMAN & GILMAN, 1996). Khan e colaboradores demonstraram que quando o cloreto de mercúrio era misturado ao alimento e dado aos ratos, eles diminuía de peso (KHAN *et al.*, 2001).

Para explicar a perda de peso nos animais tratados com o mercúrio neste experimento não foram achadas referências bibliográficas que dêem suporte para tal achado, quando se trata de uma administração subcutânea. Acredita-se que a modificação no peso que ocorre seja devida a um dano geral que o metal causa no organismo e que o mercúrio interfira na metabolização dos nutrientes por provocar lesão no fígado, já que a LPO deste órgão aumentou 44% no grupo tratado quando comparado com o grupo controle, conforme demonstrado neste trabalho.

Nossa proposta foi avaliar o estresse oxidativo temporal provocado por intoxicação crônica com cloreto de mercúrio que ocorria sistemicamente e, para isto, escolhemos o sangue como material que melhor representa as mudanças no sistema orgânico. Além disto, queríamos analisar os efeitos, em termos de dano oxidativo, que a intoxicação crônica provocaria sobre os tecidos cardíaco, hepático e renal.

Para que se começasse a estudar estes efeitos do mercúrio, em primeiro lugar, devia-se saber se a intoxicação havia sido efetiva. No plasma, o Hg^{2+} , proveniente do cloreto de mercúrio, forma complexos com ligantes que contêm sulfidrilas, como a albumina e a glutathiona (YANAGISAWA, 1998). Por este motivo, podemos medir este metal pesado no sangue total. O fato de ter-se achado aumentada a concentração de mercúrio no sangue total dos animais que receberam este metal, nos demonstra que o tratamento foi efetivo. A quantidade encontrada no sangue é muito superior aos níveis aceitáveis para que se mantenha a saúde e uma boa qualidade de vida.

A hipótese deste trabalho propôs verificar se o mercúrio inorgânico agiria como iniciador da lipoperoxidação, por ser um metal pesado (VALFRÉ, 1983) e se ele poderia formar radicais livres nesta concentração e por esta via de administração. Além disso, queríamos estudar quando esta intoxicação começa a formar radicais de oxigênio e como o organismo reage ou se adapta.

O estresse oxidativo pode ser definido como uma situação em que se tem aumento da produção de EAO e/ou redução das defesas antioxidantes ou, ainda, por um desequilíbrio no balanço pró-oxidantes / antioxidantes em favor dos pró-oxidantes (SIES & MURPHY, 1991).

Como não se tem medidas diretas de produção de EAO, a determinação de dano oxidativo é feita indiretamente através da quimiluminescência, iniciada por hidroperóxido de tert-butila (QL) em homogeneizado tecido ou amostra sangüínea tem sido utilizada para detectar a ocorrência de estresse oxidativo em várias situações patológicas experimentais. Assim, a QL de homogeneizados previamente sujeitos a estresse oxidativo é maior do que a QL obtida para amostras controle. A realização deste tipo de teste consiste no fato de que os hidroperóxidos são espécies químicas bastante instáveis, reagindo com lipídios por um mecanismo radicalar que gera produtos que emitem luz pela amostra em estudo. Este método é um dos mais sensíveis para a medida de LPO (GONZALEZ- FLECHA, 1991).

Para medir a capacidade antioxidante total de uma amostra, utiliza-se uma técnica baseada na formação de radicais a partir da termólise do 2,2'Azo-bis (2-amidino-propano) diidrocloreto, produzindo emissão de luz (TRAP). Quando se tem presente no meio de reação um antioxidante, ele irá neutralizar estes radicais e, assim, diminuir a emissão de luz. Após todo o antioxidante reagir, o radical, aumentará a emissão de luz. Assim, deve-se observar por quanto tempo ele é capaz de inibir a formação de radicais. Este método permite medir a capacidade da amostra de agir como antioxidante frente a radicais livres formados. Dentre as substâncias, cuja ação é medida por esta técnica, que agem como antioxidantes temos a Vitaminas C, o ácido úrico e a glutathiona, principais antioxidantes não-enzimáticos hidrossolúveis das células. Para se quantificar esta capacidade,

utiliza-se um padrão, que é o Trolox (Vitamina E hidrossolúvel) (LISSI *et al.*, 1992; EVELSON *et al.*, 2001).

As enzimas antioxidantes, o TRAP e a LPO foram medidos em três tempos diferentes para que fosse avaliado como a intoxicação crônica agia no organismo e como este último respondia frente ao estresse oxidativo provocado pelo cloreto de mercúrio.

O mercúrio induziu a diminuição da LPO dos animais tratados na primeira semana de estudo, quando comparados com o grupo controle. O contrário ocorreu na segunda semana de tratamento, que é considerada a fase aguda de intoxicação, encontrando-se a LPO aumentada no grupo tratado em relação ao controle. Após esta fase, ao final do tempo de tratamento, a LPO retornou aos níveis normais, demonstrando a tentativa do organismo de adaptar-se para sobreviver. Se analisarmos o TRAP, veremos que na primeira semana de tratamento a capacidade total antioxidante dos animais está diminuída, provavelmente porque o cloreto de mercúrio promove formação de radicais livres, levando a um consumo dos antioxidantes não enzimáticos que impede o aumento do dano oxidativo (LPO). Assim, sendo, tem-se uma tentativa de busca do equilíbrio orgânico destes animais experimentados. Isto poderia realmente ter ocorrido se o tratamento com o sal fosse aí interrompido, mas, uma vez que ele continuou, a LPO aumentou na segunda semana. Analisando-se o comportamento de cada grupo comparado com ele mesmo durante o tempo de estudo, notou-se que o grupo controle tem sua LPO significativamente menor na segunda semana em relação às demais e não apresenta diferença em relação aos antioxidantes totais. No entanto, encontramos um aumento significativo da GST e CAT nestes tempos, no mesmo grupo. Logo, esta proteção pode ter ocorrido por indução enzimática, provocada possivelmente pela manipulação e estresse que os ratos controle sofreram, pelas sucessivas picadas das injeções. O grupo tratado com cloreto de mercúrio apresentou um padrão de aumento progressivo significativo da LPO, provocado pela intoxicação, quando se compara seu comportamento durante as semanas de estudo. O mesmo ocorre com os níveis do TRAP, mostrando, novamente, esta tendência de adaptação dos seres vivos.

Em relação às enzimas antioxidantes no sangue, presenciamos que houve diferença de atividade na primeira semana de tratamento apenas na SOD, comparando o grupo tratado com o grupo controle. Entretanto, na segunda semana, o grupo que recebeu HgCl_2 teve a atividade aumentada das enzimas GST e GPx. O aumento da atividade enzimática pode representar uma resposta compensatória do sistema antioxidante quando se tem um aumento do estresse oxidativo. Isto pode ser explicado, mais uma vez, como uma forma de os animais intoxicados se defenderem contra o dano continuado. A glutathione S-transferase (GST) vai catalisar a reação de conjugação da glutathione reduzida (GSH) com outras substâncias tóxicas, que possam vir a prejudicar o funcionamento celular. Essa combinação forma os conjugados de glutathione que serão exportados para fora do meio interno da célula. Deste modo, esta enzima desempenha um papel importante na detoxificação celular (MANNERVIK & GLUTHENBERG, 1981). A Glutathione Peroxidase, por ser citosólica, é mais facilmente induzível, respondendo de forma mais rápida. Ela age sobre H_2O_2 e peróxidos orgânicos, não permitindo que estas substâncias venham formar radicais livres. A SOD é uma enzima antioxidante que transforma o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) em uma espécie ativa de oxigênio (o H_2O_2), que é menos lesivo por não ser radicalar. A atividade da SOD apresentou-se diminuída no grupo tratado na 1ª e 2ª semana, comparando-se ao grupo controle, e aumentou significativamente na última semana do experimento. É sabido que o mercúrio pode mediar a formação de ânions superóxido (DA CUNHA *et al.*, 2000). O ânion superóxido pode reagir diretamente com o NO inativando-o ou formando o radical peroxinitrito, também um radical livre (LAURINDO & LUZ, 1995). A SOD pode ter tido sua atividade diminuída por se ter um aumento de produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$, mas igual velocidade da reação deste último com NO, inativando-o. Logo, o ânion superóxido não fica disponível como substrato para a enzima. De qualquer maneira, esta inibição foi de alguma forma suplantada, talvez por um aumento ainda maior na produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$. Isto provavelmente provocou a indução da SOD, visto que na 4ª semana de estudo sua atividade era 43% maior no grupo tratado que no grupo controle. Há a possibilidade deste metal mudar, de algum modo desconhecido, a capacidade

antioxidante desta enzima. Talvez esta diminuição de sua atividade já tenha sido suficiente para aumentar a LPO significativamente no sangue, na segunda semana de tratamento, que é considerada a fase aguda da intoxicação com mercúrio, apesar do aumento da atividade da GPx e GST. A atividade da SOD no grupo controle durante as quatro semanas de tratamento manteve-se aproximadamente constante ao passo que sua atividade no grupo tratado com cloreto de mercúrio ao longo do experimento apresentou uma queda na segunda semana e depois um aumento ao final do estudo. Assim, na última semana de tratamento dos animais com cloreto de mercúrio, como já dito, somente a SOD teve sua atividade aumentada e o TRAP apresentou tendência ao aumento, embora isto não tenha sido significativo. A LPO dos ratos tratados apresentou-se semelhante a LPO medida no grupo controle. Esta resposta demonstra um processo típico de adaptação.

Para a atividade da GPx, ambos os grupos experimentais tiveram o mesmo tipo de resposta frente ao estudo, com o passar das semanas. A atividade desta enzima apresentou-se diminuída na 2ª semana e aumentou significativamente em cada grupo, quando comparados a eles mesmos. Nos dois grupos isto poderia ocorrer devido ao estresse da manipulação e a recuperação da atividade da enzima ocorreria como forma de adaptação do organismo, sendo que o grupo mercúrio ainda teve que se adaptar ao estresse provocado pelo tratamento. A atividade da CAT aumentou na 2ª semana e então permaneceu com valores semelhantes ao longo dos 30 dias de estudo, no grupo controle. Como já comentado, é possível que isto tenha ocorrido por resposta ao estresse da manipulação dos animais, que após duas semanas de contato, acostumaram-se com estas condições. O grupo mercúrio apresentou um perfil de aumento de atividade da CAT com o passar das semanas, sendo este aumento significativo quando comparado a ele mesmo e não significativo quando comparado ao grupo controle, nestes tempos.

Após os trinta dias de intoxicação crônica com cloreto de mercúrio, retiraram-se os corações, rins e fígados dos animais experimentais. Encontrou-se a LPO aumentada em 25 e 44% nos tecidos cardíaco e hepático do grupo tratado

em relação ao grupo controle. O tecido renal do grupo mercúrio não teve sua peroxidação de lipídeos alterada, em relação ao grupo controle.

Comparando estes dados com os valores de TRAP obtidos, notamos que no grupo tratado o rim é o órgão que apresenta maior proteção antioxidante total sendo, talvez, por este motivo que não teve a LPO aumentada em relação ao grupo controle. Ainda, apesar do tecido renal ter apresentado uma queda da atividade da CAT de 25% e a SOD e a GPx não terem suas atividades diferentes do controle, o grupo mercúrio teve um aumento de atividade da GST de 362%. Esta enzima cumpriu muito bem o seu papel antioxidante, não permitindo que ocorresse o aumento da LPO neste órgão.

Para o fígado, tem-se uma diminuição de antioxidantes totais e também valores reduzidos significativamente para a atividade das enzimas CAT, SOD e GPX. A GST foi a única que apresentou valores iguais aos do grupo controle, não tendo se modificado com o tratamento. Assim sendo, a LPO do tecido hepático aumentou, uma vez que todas as suas defesas antioxidantes se encontraram diminuídas e não tiveram condições de combater os radicais livres formados neste órgão.

No coração, a LPO está aumentada no grupo tratado em comparação com o grupo controle, embora a concentração de antioxidantes não-enzimáticos esteja mais alta ao final do tratamento. Isto provavelmente se deve ao fato de a CAT ter apresentado uma queda de 44% neste órgão no grupo mercúrio, e as outras enzimas não terem modificado seu perfil frente a uma situação de intoxicação. Logo, somente o aumento de antioxidantes não-enzimáticos não foi suficiente para conter a ação destrutiva do cloreto de mercúrio.

Em suma, a primeira hipótese gerada por este trabalho propôs verificar se o mercúrio inorgânico agiria como iniciador da lipoperoxidação, O aumento do estresse oxidativo observado é uma evidência de que esta hipótese foi confirmada.

Além disso, queríamos estudar quando esta intoxicação começa a aumentar o dano oxidativo e como o organismo reage ou se adapta. Visávamos averiguar se haveria modificação na quantificação da LPO, da atividade das

enzimas antioxidantes e da capacidade antioxidante total no sangue destes animais ao longo da intoxicação.

Também, queríamos observar se ocorria estresse oxidativo nos tecidos estudados.

Todas estas hipóteses foram confirmadas, apresentando-se como exceção o tecido renal que não teve a lipoperoxidação aumentada. Ficou demonstrado, com este trabalho, que há uma adaptação dos animais ao final do tratamento com cloreto de mercúrio, como forma de sobrevivência, mas não ainda na fase aguda, sendo a segunda semana de intoxicação o momento mais crítico para a sobrevivência.

Em uma fase menos tardia, a manutenção ou o aumento da atividade de algumas enzimas não foram suficientes para impedir o aumento da LPO e para manter a homeostase orgânica.

Concluindo, os resultados obtidos neste estudo comprovam que a intoxicação por cloreto de mercúrio causa danos gerais no organismo, principalmente na fase aguda, mas que se a exposição ao metal for continuada, os seres tendem a adaptar-se, como forma de sobrevivência.

Os achados deste trabalho são originais para as condições de tratamento citadas. No entanto, estudos adicionais são necessários para uma completa compreensão da participação do estresse oxidativo no complexo fenômeno da intoxicação crônica por cloreto de mercúrio.

7. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos, concluímos com este trabalho que:

⇒ O cloreto de mercúrio causa alteração na estrutura corporal de ratos machos Wistar tratados com este sal inorgânico, promovendo uma redução de 44% no peso após 4 semanas de tratamento, em relação ao grupo controle.

⇒ Conseguimos reproduzir um modelo de intoxicação crônica por cloreto de mercúrio através da administração subcutânea deste metal por 30 dias, uma vez que a concentração de cloreto de mercúrio no sangue total dos animais tratados foi muito maior que no grupo controle, demonstrando que a administração foi efetiva;

⇒ O cloreto de mercúrio produz modificações sistêmicas tempo-dependentes na LPO e na atividade das enzimas antioxidantes, assim como no nível de antioxidantes não-enzimáticos hidrossolúveis, em período subagudo, agudo e crônico, no plasma dos animais experimentais;

⇒ Comprovamos a relação do cloreto de mercúrio com a lipoperoxidação em eritrócitos dos animais controles e tratados com cloreto de mercúrio na 1^o, 2^o e 4^o semana de tratamento;

⇒ Detectamos que a atividade das enzimas antioxidantes nas hemácias dos animais controles e tratados com cloreto de mercúrio, nos mesmos tempos definidos, em ambos os grupos experimentais, se modifica com o passar do tempo de estudo.

⇒ Este metal promove alterações do estresse oxidativo no fígado e coração após 30 dias de intoxicação.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo foram coerentes e complementares a outros dados da literatura, sendo originais para as condições de tratamento utilizadas.

Este é um estudo de extrema relevância pelo grande número de ocorrências de intoxicações com metais pesados e, mais precisamente, com o mercúrio, como citado anteriormente.

É importante ressaltar que ainda não se sabe se o estresse oxidativo envolvido no fenômeno de intoxicação por HgCl_2 é causa ou consequência dos danos provocados por este metal. O entendimento dos mecanismos responsáveis pelas alterações observadas no estresse oxidativo permitirão desenvolver abordagens terapêuticas, envolvendo a manipulação da reserva antioxidante, uma vez que se sabe que elas são essenciais para minimizar os danos oxidativos.

Enquanto não se tem resposta para tantos questionamentos, devemos refletir e tentar agir de forma a evitar a poluição e o descaso humano com o meio ambiente em que vivemos. A negligência deste assunto pode prejudicar nossa saúde e bem estar, ocasionando doença e danos para a população.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL- BALAGHI, S.; MOLLER, E.; MOLLER, G.; ABEDI-VALUGERDI, M. Mercury Induces Polyclonal B Cell Activation, Autoantibody Production and Renal Immune Complex Deposits in Young (NZB X NZW) F1 Hybrids. Eur J Immunol, 26 (7): 1519-26, 1996.
- ARUOMA, O. I.; EVANS, P. J.; KAUR, H.; SUTCLIFFE, L.; HALIWELL, B. An Evaluation of the Antioxidant and Potencial Pro- oxidant Properties of Food Additives and Trolox C, Vitamin E and Probucol. Free Rad. Res. Comms. 10(3): 143-157, 1990.
- BOVERIS, A. & CHANCE, B. The Mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide. Biochem. J. 134: 707-716, 1973.
- CARMIGNANI, M. & BOSCOLO, P. Cardiovascular Homeostasis in Rat Chronically Exposed to Mercury Chloride. Arch. Toxicol. Suppl. (7): 383-8, 1984.
- CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs. Physiol. Rev. 59(3): 527-625, 1979.
- CLARKSON, T. W. Mercury – An Element of Mistery. N. Engl. J. Med. Cell. Cardiol. 17: 45-152, 1990.
- CROSS, C. E. Oxygen Radicals and Human Disease. Annals of Internal Med. 107(4): 526-545, 1987.
- DA CUNHA, V.; SOUZA, H. P.; ROSSONI, L. V.; FRANCA, A. S.; VASSALO, D. V. Effects of Mercury on the Isolated Perfused Rat Tail Vascular Bed are Endotelium-Dependent. Arch Environ Contam Toxicol, 39(1): 124-30, 2000.

DALL' AGO, P. Controle da pressão arterial e frequência cardíaca no diabetes experimental: redução da sensibilidade dos pressorreceptores e quimiorreceptores. Dissertação apresentada ao Curso de Pós- Graduação em Ciências Biológicas- Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul , com requisito parcial para obtenção do grau de mestre. p. 19-21. Porto Alegre, 1996.

De FLORA, S.; BENNICELLI, C.; BAGNASCO, M. Genotoxicity of Mercury Compounds. A review. Mutat Res, 317 (1): 57-79, 1994.

DEL MAESTRO, R. F. An Approach to Free Radicals in Medicine and Biology. Acta Physiol. Scand. 40(7): 153-168, 1980.

EL-DEMERDASH, F. M. Effects of Selenium and Mercury on the Enzymatic Activities and Lipid Peroxidation in Brain, Liver and Blood of Rats. J Environ Sci Health B, 36(4): 489-99, 2001.

EVELSON, P.; TRAVACIO, M.; REPETTO, M.; ESCOBAR, J.;LLESUY, S.; LISSI, E.A. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. Arch. Biochem. Biophys. 388(2):261-266, 2001.

FLOHÉ, L. & GUNZLER, W. A. Assay of Glutathione Peroxidase. Methods Enzymol. 105: 114-121, 1984.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W. A. & SCHOCK, H. H. Glutathione Peroxidase: a selenium enzyme. Febs Lett, 32: 132-134, 1989.

FONFRIA, E.; RODRIGUEZ-FARRE, E.; SUNOL, C. Mercury Interaction with the GABA (A) Receptor Modulates the Benzodiazepine Binding Site in Primary Cultures of Mouse Cerebellar Granule Cells. Neuropharmacology, 41(7): 819-33, 2001.

- FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutases. Annal Review of Biochemistry. 44:147-157, 1975.
- GERSTNER, H. B. & HUFF, J. E. Clinical Toxicology of Mercury. J. Toxicol. Environ. Health 2: 491-526, 1977.
- GIRARDI, G. & ELÍAS, M. M. Mercury Chloride Effects on Rat Renal Redox Enzymes Activities: SOD Protection. Free Rad. Biol. & Med. 18(1): 61-66, 1995.
- GONZALES-FLECHA, B.; LLESUY S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. Free Rad Biol & Med, 10:93-100, 1991.
- GSTRAUNTHALER, G. & PFALLER, W.; KOTANKO, P. Glutathione Depletion and *in vitro* Lipid Peroxidation in Mercury on Maleate Induced Acute Renal Failure. Biochem Pharmacol, 32 (19): 2969-72, 1983.
- GUIMARÃES, J. R. & PFEIFFER, W. C. Accumulation and Distribution of Inorganic Mercury in a Tropical Fish (*Trichomycterus zonatus*). Ecotoxicol Environ Saf, 34(2): 190-5, 1996.
- HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBI, W.B. Glutathione S-Transferases. The Journal of Biological Chemistry, vol.249 - n°22:7130-7139, 1974.
- HALBACH, S.; SCHANSTEINER, g.; EBNER, F.; REITER,M. The Effects of p-Chloromercuriphenylsulfonic Acid (PCMBS) on Force of Contraction of Mammalian Myocardium and on ATPHydrolysis bysarcolemmal ATPase. Naunyn- Schimildeberg's Arch. Pharmacol. 318: 121-129, 1981.
- HALLIWELL, B. Antioxidants: The Basis What They Are and How to Evaluate Them. In SIES, H. (ed) Antioxidants in diseases: Mecanisms and Therapy. (Advances in Pharmacology vol. 38) Califórnia: Academic Press, 1997.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.C.M. Free Radicals in Biology and Medicine. 3th ed. Oxford University Press, 1999.

- HALLIWEL, B. Reactive Oxygen Species and the Central Nervous System. J. Neurochem. 59(5): 1609-1623, 1992.
- HALPERN, B.N.; PACAUD, A. Technique de prélèvement d'échantillons de sang chez les petits animaux de laboratoire par ponction du plexus ophtalmique. Comptes Rendu de la Société du Biologie. 145:1465-1466, 1951.
- HARRIS, E.D. Regulation of Antioxidant Enzymes. FASEB Journal, 6:2675-2683, 1992.
- HUANG, Y. L.; CHENG, S. L.; LIN, T. H. Lipid Peroxidation in Rats Administrated with Mercuric Chloride. Biol. Trace Elem. Res. 52(2): 193-206, 1996.
- HUSSAIN, S.; RODGERS, D. A.; DUHART, H. M.; ALI, S.F. Mercuric chloride-induced reactive oxygen species and its effect on antioxidant enzymes in different regions of rat brain. J Environ Sci Health, 32(3):395-409, 1997.
- HUSSAIN, S.; ATKINSON, A.; THOMPSON, S.J.; KHAN, A.T. Accumulation of mercury and its effect on antioxidant enzymes in brain, liver and kidneys of mice. J Environ Sci Health, 34(4):645-60, 1999.
- KALIMAN, P. A.; NIKITCHENKO, I. V.; BARANNIK, T. V.; SOKOL, O. A. Metabolism of Heme and Hemoproteins in Rat Upon Administration of Mercury Chloride. Ukr Biokhim Zh, 71(6): 81-5, 1999.
- KEITH, R. L.; SETIARAHARDJO, I.; FERNANDO, Q.; APOSHIAN, H. V.; GANDOLFI, A. J. Utilization of Renal Slices to Evaluate the Efficacy of Chelating Agents for Removing Mercury from the Kidney. Toxicology, 166: 67-75, 1997.

KHAN, A. T.; ATKINSON, A.; GRAHAM, T. C.; SHIREEN, K. F. Uptake and distribution of mercury in rats after repeated administration of mercuric chloride. J Environ Sci Health Part A Tox Hazard Subst Environ Eng, 36(10): 2039-45, 2001.

KLAASSEN, C. D. Metais Pesados e Antagonistas de Metais Pesados. In Goodman & Gilman ed – As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 9 ed.1227-1230. Rio de Janeiro: 1996.

KUBICKA-MURANYI, M.; KREMER, J.; ROTTMANN, N.; LUBBEN, B.; ALBERS, R.; BLOSMA, N.; LUHRMANN, R.; GLEICHMANN, E. Murine Systemic Autoimmune Disease Induced by Mercuric Chloride: T Helper Cells Reacting to Self Proteins. Int Arch Allergy Immunol, 109(1): 11-20, 1996.

LAURINDO, F.R.M. & LUZ, P.L. Espécies Ativas de Oxigênio Podem Contribuir para Aumento da Resistência Vascular Periférica na Hipertensão: Uma Hipótese. Hiper Ativo, vol.2, nº2, 1995.

LISSI, E.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M.D. Luminol luminescence induced by 2,2'-azobis (2-amidino-propane) thermolysis. Free Rad. Res. Comms. 17:299-311, 1992.

LLESUY, S. F.; MILEI, J.; MOLINA, H.; BOVERIS, A.; MILEI, S. Comparision of Lipid Peroxidation and Myocardial Damage Induced by Adriamicin and 4'-Epiadrimicin in Mice. Tumori, 71: 241-249, 1985.

LOFTENIUS, A.; EKSTRAND, J.; MOLLER, E. In Vitro Effects of Mercuric Chloride (HgCl₂) on Human Mononuclear Cells. Clin Exp Immunol, 110 (3): 418-22, 1997.

- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, A. L.; FARR, A. L.; RANDALL, R. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.
- MAC DOUGAL, K. C.; JOHNSON, M.D.; BURNETT, K. G. Exposure to Mercury Alters Early Activation Events In Fish LeuKocytes. Environ Health Perspect, 104 (10):1102 -6, 1996.
- MANNERVIK, B.; GLUTHENBERG, C. Glutathione Transferase. Methods in Enzymology, 77:231-235, 1981.
- MARKLUND, S. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. Boca Raton. CRC Press. 243-247, 1985.
- MASSARONI, L.; ROSSONI, L. V.; AMARAL, S. M. C., STEFANON, I.; OLIVEIRA, E. M.; VASSALLO, D. Haemodynamic and Electrophysiological Acute Toxic Effects of Mercury in Anaesthetized Rats and in Langendorff Perfused Rat Hearts. Pharmacol. Res. 31(1): 1-10, 1995.
- Mc CORD, J. M. Oxygen – Derived Radicals: a Link Between Reperfusion Injury and Inflammation. Fed. Proc. 46: 2402-2406, 1987.
- MENEGHINI, R. A Toxicidade do Oxigênio. Ciência Hoje, 5-28, 1987.
- MILLS, G.C. Glutathione Peroxidase and the Destruction of Hydrogen Peroxide in Animal Tissues. Arch. Biochem. Biophys. 86: 1-5, 1960.
- MOSZCZYNSKI, P. Mercury Compounds and the immune system: a review. Int J Occup Med Environ Health, 10 (3): 247-58, 1997.
- NATH, K. A.; CROATT, A. J.; LIKELY, S.; BEHRENS, T. W.; WARDEN, D. Renal Oxidant Injury and Oxidant Response Induced by Mercury. Kidney Int, 50(3): 1032-43, 1996.

NIKI, E. & NAKANO, M. Estrogens as Antioxidants. Meth. Enzymol. 186: 330-333, 1990.

OLIVEIRA, E. M.; VASSALLO, D.; SARKIS, J. J. F.; MILL, J. Mercury Effects on the Contractile Activity of Isolated Heart Muscle. Toxicol. Appl. Pharmacol. 128: 86-91, 1994.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Disponível em: <http://www.who.int> Acesso em : Agosto de 2002.

OSAWA, T. Antioxidantes Vegetais: Papel Protetor Contra Espécies Ativas de Oxigênio. Cosmetics & Toiletries 7: 38-50, 1995.

OHLWEILER, O. A. Fundamento de Análise Instrumental. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S. A., p.193, 1981.

POLLARD, K. M. & LANDBERG, G. P. The *in vitro* Proliferation of Murine Lymphocytes to Mercuric Chloride is Restricted to Mature T Cells and is Interleukin 1 Dependent. Int Immunopharma Col, 1(3): 581-93, 2001.

RAO, M. V. & SHARMA, P. S. Protective Effect of Vitamin E Against Mercuric Chloride Reproductive toxicity in Male Mice. Reprod Toxicol, 15(6):705-12, 2001.

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. Toxicol In Vitro, 15(6): 649- 54, 2001.

ROTRUCK, J. T.; POPE, A. L.; GANTHER, H.E.; SWANSON, A.B.; HAFEMAN, D.G. & HOEKSTRA, W.G. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. Science, 179:588-590, 1973.

RUSSEL, G.A. Deuterium – isotopo Effects in the Autoxidation of Aralkyl Hydrocarbons Mecanism of the Interaction of Peroxy Radicals, in: J. Am. Chem. Soc., 79:3871-3880, 1957.

SCHURZ, F.; SABATER-VILAR, M.; FINK-GREMMELS, J. Mutagenicity of Mercury Chloride and Mechanisms of Cellular Defence: the Role of Metal-Binding Proteins. Mutagenesis, 15 (6): 525-30, 2000.

SIES, H. & MURPHY, M. E. Role of Tocopherols in the Protection of Biological Against Oxidative Damage. J. Photochem. Photobiol. B. Biol. 8: 211-224, 1991.

SIES, H. (ed.) Antioxidants in Diseases: Mechanisms and Therapy. (Advances in Pharmacology vol. 38) California: Academic Press, 1997.

SINITOX. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/cict/sinitox> Acesso em: Agosto de 2002.

STRYER, L. Bioquímica. 4ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1996.

TAYLOR, T. J.; RIEDERS, F.; FUCSIS, J. J. The Role of the Hg²⁺ and Methilmercury on Lipid Peroxidation. Fed. Proc. 273: 261-268, 1973.

TEZEL, H.; ERTAS, O. S.; ERAKIN, C.; KAYALI, A. Blood Mercury Levels of Dental Students and Dentists at a Dental School. Br Dent J, 191(8): 449-52, 2001.

- THOMAS, C. E. Approaches and Rationale for the Design of Synthetic Antioxidants as Therapeutic Agents. In PACKER, L. (ed.) Handbook of Synthetic Antioxidants. New York: Marcel Dekker Inc., 1997.
- THOMAS, D. J.; FISHER, H.L.; SUMLER, M. R.; Hall, L. L.; MUSHAK, P. Distribution and Retention of Organic and Inorganic Mercury in Methylmercury Treated Neonatal Rats. Environ. Res. 47:59-71, 1988.
- URSINI, F. & BINDOLI, A. The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. Chem. Phys. Lipids, 44:255-276,1987.
- VALFRÉ, H. Preservação Antioxidativa de Produtos Cosméticos. Aerosol & Cosméticos. 27 :14-19, 1983.
- WOODS, J. S.; CALAS, C. A.; AICHER, L. D. Stimulation of Porphyrinigen Oxidation by Mercuric Ion II. Promotion of Oxidation From the Interaction of Mercuric Ion, Glutathione and Mitochondria - generated Hydrogen Peroxide. Mol Pharmacol, 38(2): 261-6, 1990.
- YANAGISAWA, H. HgCl₂ – Induced Acute Renal Failure and its Pathophysiology. Nippon Eiseigaku Zasshi, 52(4): 618-623, 1998.
- YANG, J. M.; JIANG, X. Z.; CHEN, Q.Y.; LI, P. J.; ZHOU, Y. F.; WANG, Y. L. The Distribution of HgCl₂ in Rat Body and Its Effects on Fetus. Biomed. Environ. Sci. 9(4):437-442, 1996.
- YU, B.P. Cellular Defenses Against Damage From Reactive Oxygen Species. Physiological Reviews. 74(1):139-162, 1994.

ZALUPS, R. K.; KNUTSON, K. L.; SCHNELLMANN, R. G. In Vitro Analysis of the Accumulation and Toxicity of Inorganic Mercury in Segments of the Proximal Tubule Isolated From the Rabbit Kidney. Toxicol Appl Pharmacol, 119(2): 221-7, 1993.

ZOLLA, L.; LUPIDI, G.; BELLELLI, A.; AMICONI, G. Effect of Mercuric Ions on Human Erythrocytes. Relationships Between Hypotonic Swelling and Cell Aggregation. Biochim Biophys Acta, 1328(2): 273-80, 1997.

