



UFSM

Dissertação de Mestrado

**EFEITOS DO MERCÚRIO SOBRE A ATIVIDADE DAS
ENZIMAS ALANINA AMINOTRANSFERASE, LACTATO
DESIDROGENASE E GLICOSE 6-FOSFATASE DE
RATOS JOVENS**

Lucélia Moraes e Silva

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**EFEITOS DO MERCÚRIO SOBRE A ATIVIDADE DAS
ENZIMAS ALANINA AMINOTRANSFERASE, LACTATO
DESIDROGENASE E GLICOSE 6-FOSFATASE DE
RATOS JOVENS**

por

LUCÉLIA MORAES E SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como
requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Ciências Biológicas - Bioquímica Toxicológica

Orientadora: Maria Ester Pereira

SANTA MARIA, RS, BRASIL

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica

A comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITOS DO MERCÚRIO SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS ALANINA
AMINOTRANSFERASE, LACTATO DESIDROGENASE E GLICOSE 6-
FOSFATASE DE RATOS JOVENS**

elaborada por

Lucélia Moraes e Silva

Como requisito parcial para obtenção de grau de
Mestre em Ciências Biológicas - Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO ORGANIZADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Ester Pereira
(Presidente/Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Cristiani Bürger

Prof^a. Dr. Juliano Ferreira

Maria Rosa Chitolina Schetinger

Santa Maria, 25 de Março de 2010

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao que há de mais precioso na minha vida:

À minha filha Eduarda e meu marido Ilo pela paciência, compreensão, apoio e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos, tornando mais fácil essa caminhada.

Aos meus pais que são exemplos de dignidade, força e determinação, que sempre me apoiaram e me ensinaram a ter respeito pela vida e pelos nossos semelhantes.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Maria Ester Pereira, pela orientação para realização deste trabalho, a quem agradeço de coração os rumos indicados, incentivo, confiança, amizade e oportunidade de crescimento profissional.

À Prof^a Nilce Coelho Peixoto, pela contribuição para realização deste trabalho e pela amizade.

À Tania, por ter sido uma colega durante a graduação, estágio de iniciação científica e durante uma parte do mestrado, além de ser uma boa amiga.

À Carina, por ter sido uma colega de laboratório sempre disposta a ajudar em todos os momentos, e por ter contribuído para realização deste trabalho.

À colega de iniciação científica Cláudia, pela colaboração para realização deste trabalho e pela amizade. Também gostaria de agradecer a Quelen que chegou já no final da parte experimental, mas que ainda contribuiu para a realização deste trabalho.

Aos demais colegas, Rafael e Alexandre pela aprendizagem, pelo convívio e pela amizade.

Aos antigos colegas de laboratório, em especial a Juliana pelos primeiros ensinamentos e amizade.

À banca examinadora, constituída pelos professores Cristiane Bürger, Juliano Ferreira e Maria Rosa Chitolina Schetinger pela atenção dispensada para avaliação deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica.

Aos funcionários, em especial a Angélica e o Rinaldo, por toda a ajuda.

À UFSM e aos demais professores e funcionários do PPGBTOX pela colaboração e disponibilidade em ajudar.

À CAPES pela Bolsa de Pós-Graduação concedida.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EFEITOS DO MERCÚRIO SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS ALANINA AMINOTRANSFERASE, LACTATO DESIDROGENASE E GLICOSE 6- FOSFATASE DE RATOS JOVENS

AUTOR: Lucélia Moraes e Silva

ORIENTADOR: Maria Ester Pereira

LOCAL E DATA DA DEFESA: Santa Maria, 25 de março de 2010

O mercúrio é um elemento tóxico, podendo acumular-se em organismos vivos causando-lhes vários danos. Estudos têm demonstrado que esse metal é capaz de causar várias alterações fisiológicas e bioquímicas em ratos jovens, as quais são prevenidas pela pré-exposição ao zinco. Assim, este trabalho investigou os efeitos *in vivo* e *in vitro* do HgCl_2 e ZnCl_2 sobre as atividades das enzimas alanina aminotransferase (ALT), lactato desidrogenase (LDH) e glicose 6-fosfatase (G6Pase) de fígado e rim de ratos jovens para verificar se as alterações fisiológicas e bioquímicas induzidas pelo mercúrio e impedidas pelo zinco, estão relacionadas ao metabolismo hepático e renal. Os níveis glicêmicos e do glicogênio tecidual (fígado, rim e músculo) também foram monitorados. Ratos Wistar com três dias de idade foram tratados (s.c.) com salina ou ZnCl_2 (27 mg/kg/dia) durante cinco dias consecutivos (do 3^o ao 7^o dia de idade) e com salina ou HgCl_2 (5 mg/kg/dia) por mais cinco dias (do 8^o ao 12^o dia de idade). Os animais foram sacrificados 24 horas após a última dose e as amostras foram coletadas (sangue, fígado, rim e músculo). Para realização dos experimentos *in vitro*, amostras foram coletadas de maneira similar, com ratos de 10-13 dias de idade. Com relação aos experimentos *in vivo*, os ratos

tratados com mercúrio apresentaram um aumento da atividade da ALT hepática de aproximadamente seis vezes, sem alteração da atividade da ALT renal e LDH hepática. Ainda, a exposição ao mercúrio aumentou significativamente a atividade da G6Pase em 75%. Os outros dois parâmetros, glicose e glicogênio, não foram alterados. A pré-exposição ao zinco preveniu a alteração da atividade da ALT e parcialmente a alteração da atividade da G6Pase hepática induzida pelo mercúrio. Os resultados *in vitro* demonstraram que as enzimas ALT e LDH sérica e hepática e G6Pase hepática e renal foram inibidas por mercúrio. O efeito inibitório pode estar relacionado às modificações químicas de grupos sulfidrílicos da cisteína, uma vez que o mercúrio tem grande afinidade por esses grupos, o que contribui para a sua toxicidade. O zinco inibiu a atividade da ALT hepática e sérica na concentração de 100 μM . Estes resultados mostram que o mercúrio induziu alterações distintas sobre essas enzimas quando testado *in vivo* e *in vitro*, bem como quando testado em enzimas provenientes de diferentes fontes, hepática e renal. O aumento da atividade das enzimas ALT e G6Pase de fígado sugerem que os animais expostos ao mercúrio apresentam um aumento da atividade gliconeogênica. O zinco previne os efeitos *in vivo* do mercúrio sobre as alterações metabólicas, confirmando seu papel protetor.

Palavras-chave: Cloreto de mercúrio, Cloreto de zinco, Alanina aminotransferase, Glicose 6-fosfatase, Lactato desidrogenase e Ratos jovens.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Post-Graduate Course in Biological Science - Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

**MERCURY EFFECTS ON ENZYMES ALANINE AMINOTRANSFERASE,
LACTATE DEHYDROGENASE AND GLUCOSE 6-PHOSPHATASE
ACTIVITIES FROM YOUNG RATS**

AUTHOR: Lucélia Moraes e Silva

ADVISOR: Maria Ester Pereira

DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: Santa Maria, March, 25, 2010.

Mercury is an environmental contaminant, and may accumulate in living organisms causing several damage. Studies have shown that this metal causes several physiological and biochemical alterations in young rats which are prevented by zinc. Thus, this work investigated the *in vivo* and *in vitro* effects of HgCl₂ and ZnCl₂ on alanine aminotransferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH) and glucose 6-phosphatase (G6Pase) activities from liver and kidney of young rats to verify if the physiological and biochemical alterations induced by mercury, and prevented by zinc, are related to hepatic and renal metabolism. Glycemia and tissue glycogen levels (liver, kidney and muscle) were also monitored. Wistar rats were treated (s.c.) with saline or ZnCl₂ (27 mg/kg/day) and with saline or HgCl₂ (5.0 mg/kg/day) from 3rd to 7th and 8th to 12th days of age, respectively. Pups were sacrificed 24h after the last dose and samples were collected (blood, liver, kidney and muscle). For *in vitro* experimentation, the samples were collected similarly, with rats of 10 to 13 days old. Regarding *in vivo* experiments, the mercury treated rats presented an increase around 6 folds of the hepatic ALT activity, without alteration of renal ALT and hepatic LDH activities. Still, the mercury exposure significantly increases in 75% the G6Pase activity. The other parameters, glucose and glycogen, were not altered. The

pre-exposure to zinc prevented totally the increase of liver ALT activity and partly the increase of hepatic G6Pase activity induced by mercury. *In vitro* results revealed that the serum and liver ALT and liver and kidney G6Pase activities were inhibited by mercury. The inhibitory effect may be related to chemical modification of sulfhydryl group of cysteine, since the mercury has great affinity for these groups, which contributes to its toxicity. Zinc inhibited liver and serum ALT activities in concentration of 100 μ M. These results show that mercury induces distinct alterations in these enzymes when tested *in vivo* or *in vitro*, as well as when different sources of enzyme were used, hepatic and renal. The increased hepatic ALT and G6Pase activities suggest that animals exposed to mercury have an increased gluconeogenic activity in this tissue. Zinc prevents the *in vivo* effects of mercury on metabolic changes, confirming its important preventive role.

Keywords: Mercuric chloride; Zinc chloride, Alanine aminotransferase; Glucose-6-phosphatase, Lactate dehydrogenase, Young rats.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- FIGURA 1 - Esquema das proteínas do retículo endoplasmático (RE) que participam na formação de glicose a partir da glicose 6-fosfato..... 14
- FIGURA 2 - Localização das cisteínas citoplasmáticas da estrutura transmembrana da porção catalítica da G6Pase (G6PC) e transportador da glicose 6-fosfato (G6PT1) de rato. 15

RESULTADOS

- FIGURE 1 - Body weight of young rats treated with ZnCl₂ (27 mg/kg/day; s.c.) for 5 consecutive days (3 – 7 days old) and with HgCl₂ (5 mg/kg/day; s.c.) for 5 subsequent days (8 – 12 days old). 38
- TABLE 1 - Liver and kidney weight, LDH activities and liver and kidney ALT activities from young rats treated with ZnCl₂ (27 mg/kg/day; s.c.) for 5 consecutive days (3 – 7 days old) and with HgCl₂ (5 mg/kg/day; s.c.) for 5 subsequent days (8 – 12 days old). 39
- TABLE 2 - Liver and kidney glucose-6-phosphatase activity, serum glucose, liver, kidney and muscle glycogen of young rats treated as described in Table 1 40
- FIGURE 2 - *In vitro* effects of HgCl₂ on the serum (a), liver (b) and kidney (c) and ZnCl₂ on the serum (d), liver (e) and kidney (f) ALT activity 41
- FIGURE 3 - *In vitro* effects of HgCl₂ on the serum (a) and liver (b) and ZnCl₂ on the serum (c) and liver (d) LDH activity 42
- FIGURE 4 - *In vitro* effects of HgCl₂ on the liver (a) and kidney (b) and ZnCl₂ on the liver (c) and kidney (d) G6Pase activity 43

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT: alanina aminotransferase;

ANOVA: análise de variância (analysis of variance);

°C: grau Celsius;

C₆H₈O₇: ácido cítrico;

C₆H₁₁O₉PBa.H₂O: glicose 6-fosfato sal de bário hidratado;

DNA: ácido desoxirribonucléico (*deoxyribonucleic acid*) (= ADN);

E. C.: Comissão de Enzimas (*Enzyme Comission*);

g: grama;

G6Pase: glicose 6-fosfatase;

G6PC: porção catalítica da enzima glicose 6-fosfatase;

h: hora;

HCl: ácido clorídrico;

Hg: mercúrio;

Hg⁰: mercúrio metálico; mercúrio elementar;

Hg²⁺: íon mercúrico; íon mercúrio II;

HgCl₂: cloreto de mercúrio, cloreto de mercúrio II;

H₂SO₄: ácido sulfúrico;

I₂: iodo metálico;

INT: cloreto de iodofenil-nitrofenil tetrazólio

k (quilo): prefixo que indica uma unidade de medida derivada igual a 1.000 vezes maior;

K₂HPO₄: fosfato de potássio dibásico,

KH₂PO₄: fosfato de potássio monobásico;

KI: iodeto de potássio;

KOH: hidróxido de potássio;

K₂SO₄: sulfato de potássio;

L: litro;

LDH: lactato desidrogenase;

m (mili): prefixo que indica uma unidade de medida derivada igual a 1.000 vezes menor;

M: molar;

μ (micro): prefixo que indica uma unidade de medida derivada igual a 1 milhão de vezes menor;

Mg: magnésio;

min: minuto;

mol: quantidade expressa pelo número de Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$); massa, em g, de 1 mol de moléculas ou 1 mol de átomos;

n: número de repetições;

NaCl: cloreto de sódio;

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo;

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida);

NaHSO₃: bissulfito de sódio;

Na₂SO₃: sulfito de sódio;

(NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O: molibdato de amônio;

ρ : nível de significância;

pCMB: p-cloromercuribenzoato;

pH: potencial hidrogeniônico;

RE: retículo endoplasmático

RPM: rotações por minuto;

Sal: salina;

s.c.: subcutânea; subcutaneamente;

S.E.M.: erro padrão da média (standart error of mean);

SH: grupamento(s) sulfidrílico(s);

T1 ou G6PT1 : transportador de glicose 6-fosfato;

T2: transportador de fosfato;

T3: transportador de glicose;

U: unidade;

w/v: peso/volume (*weight/volume*);

Zn: zinco

ZnCl₂: cloreto de zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2.OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Mercúrio	4
3.1.1. Espécies químicas de mercúrio.....	4
3.1.2. Formas de exposição ao mercúrio inorgânico.....	5
3.1.3. Toxicidade do mercúrio inorgânico.....	6
3.2. Zinco	7
3.3. Animais em desenvolvimento	8
3.4. Metabolismo	9
3.4.1. Alanina aminotransferase.....	11
3.4.2. Lactato desidrogenase.....	12
3.4.3. Glicose-6-fosfatase.....	13
4. RESULTADOS	17
4.1. Manuscrito	17
Mercury chloride increases hepatic alanine aminotransferase and glucose-6-phosphatase activities in newborn rats <i>in vivo</i>	
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÕES	48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

Apresentação

Esta dissertação está descrita na seguinte forma: primeiramente são apresentados a introdução, os objetivos e a revisão bibliográfica. A seguir, os resultados são apresentados na forma de manuscrito, o qual se encontra no item manuscrito. Os itens, discussão e conclusões, encontradas no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho. As referências bibliográficas apresentadas no final da dissertação referem-se somente as citações que aparecem nos itens introdução, revisão bibliográfica e discussão.

1. INTRODUÇÃO

O mercúrio é um metal tóxico que pode causar diversos prejuízos ao organismo devido às diferentes formas químicas as quais pode apresentar-se (Klaassen, 1996). A sua forma orgânica (cloreto de metilmercúrio) e a forma metálica são neurotóxicas, enquanto que a forma inorgânica (cloreto de mercúrio, HgCl_2) é, principalmente, nefrotóxica (Goyer, 1995). O zinco pode ser considerado um agente protetor contra várias alterações tóxicas causadas pelo HgCl_2 , uma vez que estudos têm mostrado que a pré-exposição ao cloreto de zinco (ZnCl_2) previne efeitos tóxicos desse metal pesado em ratos jovens (Peixoto et al., 2003; Peixoto & Pereira, 2007; Franciscato et al., 2009; Franciscato, 2009).

Recentemente foi demonstrado que ratos jovens expostos ao HgCl_2 apresentaram um aumento nos níveis de uréia e creatinina e inibição da atividade da alanina aminotransferase (ALT) sérica, sem alteração da enzima lactato desidrogenase (LDH) sérica. A pré-exposição ao ZnCl_2 foi efetiva na prevenção tanto da toxicidade renal como da inibição da ALT sérica (Peixoto & Pereira, 2007). Efeito inibitório similar do HgCl_2 e preventivo do ZnCl_2 sobre a atividade da ALT sérica também foi observada quando esses parâmetros foram investigados 21 dias após o fim da exposição ao mercúrio (Franciscato, 2009).

Sabe-se que as enzimas ALT e LDH são utilizadas como marcadores da função hepática. Os aumentos da atividade sérica dessas duas enzimas são considerados indicadores de danos nas células do fígado de mamíferos (Meyer et al., 1992; Kopperschlager & Kirchberger, 1996). No entanto, alguns estudos têm mostrado, por exemplo, que o aumento da atividade da ALT de fígado estaria relacionado a um aumento da via gliconeogênica (Rosen et al., 1959; Hagopian et al., 2003).

Em muitas células de mamíferos, a glicose é a principal fonte de energia e seu fornecimento é estritamente regulado (Nordlie, 1999). O fígado desempenha um papel central neste processo, pois uma de suas funções importantes e, em menor extensão, do córtex renal, é fornecer glicose durante

condições de privação. A glicose é formada a partir de precursores gliconeogênicos em ambos os tecidos, e no fígado também a partir do glicogênio. Os principais precursores da glicose nos animais são o lactato, o piruvato, o glicerol e a maioria dos aminoácidos (Lehninger, 2006). Contudo, aminoácidos, principalmente a alanina, e lactato são os principais substratos para gliconeogênese (Stryer, 1996), inclusive em ratos (Rémésy et al., 1978), e podem ser consideradas as maiores fontes de piruvato citosólico (Fafournoux et al, 1983). A reação inicial desses processos é catalisada pelas enzimas ALT e LDH, respectivamente (Lehninger, 2006).

Assim, considerando os efeitos do mercúrio em ratos jovens acima citados, e que a exposição ao mercúrio resulta em um alto teor de mercúrio no fígado e rim destes animais (Peixoto et al., 2003; 2008), este estudo foi conduzido para investigar os efeitos da exposição ao mercúrio sobre a atividade das enzimas ALT, LDH e glicose 6-fosfatase (G6Pase) e sua relação com as alterações bioquímicas e fisiológicas induzidas pelo metal, e prevenidas pelo zinco, em ratos jovens (Peixoto et al., 2003; Peixoto & Pereira, 2007; Franciscato et al. 2009, Franciscato, 2009). Ainda, para melhor compreender os efeitos do mercúrio e zinco, também foram investigados os efeitos *in vitro* destes metais sobre estas atividades enzimáticas. A glicemia e o conteúdo de glicogênio de fígado, rim e músculo também foram monitorados. Para isso, utilizaram-se ratos jovens, uma vez que não há informações sobre alterações no metabolismo hepático e renal causadas pelo mercúrio nesta idade.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo geral investigar o efeito do mercúrio *in vivo* e *in vitro* sobre a atividade das enzimas envolvidas na gliconeogênese e sua relação com as alterações bioquímicas e fisiológicas induzidas pelo metal, e prevenidas pelo zinco, em ratos jovens.

2.2. Objetivos específicos

- 1 - Avaliar o efeito da exposição *in vivo* ao cloreto de mercúrio sobre as atividades das enzimas ALT e G6Pase de fígado e rim e LDH de fígado;
- 2 - Avaliar os níveis de glicose sanguínea e de glicogênio hepático, renal e muscular de ratos jovens expostos ao mercúrio;
- 3 - Avaliar os efeitos *in vitro* do cloreto de mercúrio sobre a atividade das enzimas ALT, LDH e G6Pase de fígado, rim e soro;
- 4 - Verificar os efeitos do cloreto de zinco sobre a atividade destas enzimas *in vivo* e *in vitro*, e sua possível ação preventiva sobre os efeitos do mercúrio *in vivo*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Mercúrio

O mercúrio é um metal pertencente ao grupo 2B do sistema de classificação periódico, não possui função biológica (não essencial) e é altamente tóxico. É encontrado tanto naturalmente como na forma de contaminante introduzido no ambiente. A exposição ao mercúrio de fontes naturais pode ocorrer devido às emissões vulcânicas, desgaste da crosta terrestre e evaporações de fontes de água (WHO et al., 1991; Goyer, 1996). Já as fontes artificiais de exposição ao mercúrio são mais diversificadas. Durante décadas o mercúrio foi utilizado para fins industriais como compostos mercuriais, o que resultou no aumento significativo da contaminação ambiental, especialmente da água e dos alimentos (Salgado, 1996). Apesar de seu uso ter sofrido reduções nas últimas décadas em todo o mundo, este metal continua contaminando rios e solos, pois ainda é utilizado em indústrias e mineração (Lacerda & Pfeiffer, 1992). No Brasil, a principal fonte de exposição ao mercúrio ocorre através dos garimpos, principalmente na Amazônia, onde este metal é utilizado para amalgamar o ouro no processo de extração, seguido pelo uso na indústria e agricultura (Lacerda, 1992; Pinheiro et al., 2000). Além disso, a população em geral, principalmente a ribeirinha, acaba sendo exposta ao mercúrio na forma de metilmercúrio através do consumo de peixes contaminados (UNEP, 2002, Wasserman et al., 2003). Segundo estimativas das emissões de mercúrio atmosférico no Brasil, o garimpo contribui com mais de 65% do total das emissões antrópicas (Lacerda et al., 1997).

3.1.1. Espécies químicas de mercúrio

As principais espécies de mercúrio são o mercúrio elementar e as espécies orgânicas e inorgânicas, sendo estas últimas as formas mais comuns encontradas no meio ambiente. O mercúrio elementar ou mercúrio metálico

possui estado de oxidação zero (Hg^0). O mercúrio orgânico é formado quando se liga ao carbono através de ligação covalente C-Hg, originando compostos organomercuriais que são encontrados principalmente no solo e na água. Destes, destaca-se o metilmercúrio, considerado o mais tóxico. Compostos inorgânicos de mercúrio, também chamados de sais de mercúrio existem em dois estados de oxidação, como sais mercuriosos monovalentes Hg(I) ou mercúricos bivalentes Hg(II) , os quais se combinam com elementos como cloro, enxofre ou oxigênio (UNEP, 2002; Klaassen, 1996). Dentre os representantes da última espécie, a forma mercúrica, cujo principal representante é o cloreto de mercúrio (Couter & Buchanan, 2004), será enfatizada no presente estudo.

3.1.2. Formas de exposição ao mercúrio inorgânico

A exposição a compostos de mercúrio inorgânico (sais de mercúrio) pode ocorrer de forma bastante variada, uma vez que esses compostos são utilizados em certos tipos de bateria, termômetros e lâmpadas fluorescentes, manufatura de tintas, laboratório químico/fotográfico e produção de explosivos (Clarkson, 1997). Ainda, esses compostos de mercúrio têm sido utilizados por muitos anos em inúmeros produtos, incluindo vários medicamentos, germicidas, amálgama dentária e cremes para pele. Segundo alguns estudos muitos desses produtos contendo mercúrio ainda são usados (Ozuah, 2000; Goldman & Shannon, 2001).

A exposição ao mercúrio inorgânico também pode ocorrer indiretamente através da interconversão das formas elementar e orgânica para a inorgânica (Klaassen, 1996) através de processos de biotransformação. O mercúrio metálico pode sofrer oxidação transformando-se em mercúrio divalente envolvendo o sistema enzimático catalase-hidrogênio peroxidase (Salgado, 1996) ou em presença de matéria orgânica, como no ambiente aquático (Goyer, 1996). Além disso, o metilmercúrio pode ser convertido a mercúrio divalente através do rompimento da ligação C-Hg (WHO, 1991; Vahter et al., 1994).

Essas duas últimas formas de exposição ressaltam a importância de se estudar também os efeitos do mercúrio na sua forma inorgânica.

3.1.3. Toxicidade do mercúrio inorgânico

Os efeitos tóxicos da exposição ao mercúrio inorgânico têm sido bastante estudados. Sabe-se que essa forma de mercúrio pode causar vários danos ao organismo, principalmente ao sistema renal uma vez que é um órgão altamente perfundido e, portanto, potencialmente exposto a altos níveis de agentes tóxicos (Au, 2004). Além disso, ressalta-se o fato de que a eliminação urinária é a principal rota de excreção dos metais tóxicos (Fowler, 1992). A toxicidade do mercúrio inorgânico parece ser atribuída principalmente a sua alta afinidade com o enxofre. A ligação desse metal a grupos tiólicos de proteínas, peptídeos e aminoácidos leva a necrose do epitélio renal, acompanhada de proteinúria e glomerulonefrite (Goyer, 1996). Essa forma de mercúrio também está relacionada a danos do sistema hepático, podendo causar alterações histopatológicas, vacuolização citoplasmática, cariorrexia, cariólise, picnose e necrose centro tubular (Kumar et al., 2005).

Embora os mercuriais inorgânicos não atravessem facilmente a barreira hemato-encefálica como os mercuriais orgânicos, mais neurotóxico e teratogênico (Klaassen, 1996), o sistema nervoso também pode ser afetado pelo cloreto de mercúrio uma vez que essa forma de mercúrio pode ser formada nesse órgão como um metabólito de outras formas de mercúrio (Vahter et al., 1994). A autópsia de indivíduos expostos ao metilmercúrio (índios canadenses) revelou que a maior parte do mercúrio cerebral estava na forma de mercúrio inorgânico (Salgado, 1996). Estudos têm demonstrado que esse metal pode causar alterações comportamentais em animais expostos durante a gestação (Szász et al., 2002), através da lactação (Franco et al., 2007) ou durante os primeiros dias de vida pós-natal (Rocha et al., 2001; Peixoto et al., 2007a; Franciscato et al., 2009).

Muitos dos experimentos com mercúrio inorgânico foram conduzidos em animais adultos (Friberg, 1956; Mengel & Karlog, 1980; Nielsen & Andersen,

1989, 1990). Contudo, a sensibilidade dos animais em desenvolvimento, para vários compostos (incluindo metais), podem diferir daquelas observados em adultos (Kostial et al., 1978; Walsh, 1982, Pereira et al., 1999).

Utilizando ratos jovens, vários estudos têm mostrado que a exposição ao HgCl_2 (5 mg/kg) durante cinco dias consecutivos causa perda de peso corporal (Rocha et al., 1995; Peixoto et al., 2003, Franciscato, 2009) e de cérebro (Rocha et al., 1995; Roza et al., 2005), aumento do peso renal (Rocha et al., 1995; Peixoto et al., 2003; Roza et al., 2005), e acúmulo de mercúrio nos tecidos (Peixoto et al., 2003; Roza et al., 2005, Peixoto et al., 2008; Franciscato et al., 2009). Ainda neste modelo de exposição verificou-se: inibição da atividade da porfobilinogênio sintase (Rocha et al., 1995; Peixoto et al., 2003; Roza et al., 2005; Franciscato, 2009), alteração das funções renais, hepáticas e da glicemia (Peixoto & Pereira, 2007), alteração dos níveis de metais essenciais (Peixoto et al., 2008), inibição da atividade da acetilcolinesterase (Franciscato et al., 2009) e alterações comportamentais (Peixoto et al., 2007a; Franciscato et al., 2009).

3.2. Zinco

O zinco (Zn) também é um metal divalente, mas ao contrário do mercúrio, é classificado como um metal essencial (Dunn et al., 1987) com várias funções biológicas comprovadas (Vallee, 1995). Entre outras funções, o zinco exerce um importante papel no crescimento e diferenciação celular, especialmente na síntese protéica e replicação e transcrição do DNA (Cherian et al., 2003). Ele é um elemento estrutural de muitas proteínas (Mathie et al., 2006), é requerido como cofator para mais de 300 metaloenzimas (Vallee & Auld, 1990). Além disso, o zinco é um excelente indutor da síntese de metalotioneínas as quais possuem uma grande afinidade por metais devido ao seu alto conteúdo do aminoácido cisteína (Chan et al., 2002). Esta característica justifica a importante função desta metaloproteína na destoxificação de metais não essenciais como mercúrio e na homeostase de metais essenciais tais como o zinco e o cobre (Hidalgo, 2001).

Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado que o zinco pode ser considerado um agente protetor contra várias alterações tóxicas causadas pelo mercúrio. Entre as alterações causadas pelo mercúrio e prevenidas pelo zinco estão: alterações do ganho de peso corporal, alterações bioquímicas, comportamentais e alterações dos níveis de metais essenciais induzidas pelo mercúrio inorgânico (Peixoto et al., 2003, 2008; Peixoto & Pereira, 2007; Franciscato et al., 2009). Esses estudos têm demonstrado também que os efeitos preventivos do zinco ocorrem em paralelo a um aumento do conteúdo de metalotioneínas no fígado e rim (Peixoto et al., 2003; 2007b).

3.3. Animais em desenvolvimento

Os animais em desenvolvimento apresentam características peculiares em relação aos demais uma vez que as deficiências provocadas por insultos nesta idade precoce da vida podem ser irreversíveis (Rice & Gilbert, 1995). A alta sensibilidade dos animais em relação a insultos externos, tal como a exposição ao mercúrio, imposta durante o período de desenvolvimento, pode ser observada em alguns trabalhos (Rocha et al., 1993; Peixoto et al., 2003; 2007a; 2007b; 2007c; 2008; Franciscato, 2009; Franciscato et al., 2009). A diferença entre esses animais em desenvolvimento e aqueles que já passaram por essa fase quanto à suscetibilidade a agentes químicos está relacionada à imaturidade dos órgãos e membranas e à incapacidade de processar adequadamente os mesmos (Nies & Spielberg, 1996). Gottlieb et al. (1977) divide o período pós-natal dos roedores em três fases relacionadas ao seu crescimento cerebral, as quais se situam entre o nascimento até o desmame, intercalados por períodos em que existe pouco aumento do peso cerebral.

- 1ª fase (0-6 dias de idade) - caracterizada por hiperplasia cerebral, com síntese de proteína e DNA;

- 2ª fase (8-12 dias de idade) - o crescimento é mais rápido do que nos dias anteriores e ocorre hipertrofia e hiperplasia;

- 3ª fase (17-23 dias de idade) - ocorre síntese de mielina e hipertrofia cerebral.

Alguns estudos têm investigado a consequência de insultos em diferentes períodos de desenvolvimento pós-natal (Sakamoto et al., 1993; Sakamoto & Nakano, 1995; Peixoto et al., 2007a, 2007c). Vários estudos têm investigado os efeitos do cloreto de mercúrio principalmente durante a segunda fase de desenvolvimento (Rocha et al., 1995; Peixoto et al., 2003, 2007a; 2007b; 2007c 2008; Roza et al., 2005; Peixoto & Pereira, 2007; Franciscato et al, 2009) a qual parece ser mais sensível aos efeitos tóxicos desse metal (Peixoto et al., 2007a; 2007c).

De fato, animais expostos ao cloreto de mercúrio durante diferentes fases revelaram que o segundo período parece ser mais sensível, visto que nessa fase os ratos apresentaram maiores alterações no peso corporal, de cérebro e de rim, inibição expressiva na atividade hepática e renal da PBG-sintase (Peixoto et al., 2007c) além de alterações comportamentais durante as duas primeiras fases (Peixoto et al., 2007a).

3.4. Metabolismo

A glicose tem um papel central no metabolismo e tem sido altamente conservada no decorrer da evolução dos seres vivos permanecendo como combustível quase universal. Nos mamíferos, alguns tecidos dependem quase exclusivamente desse combustível para suprir sua energia metabólica (Lehninger, 2006). A glicose é o único combustível utilizado, em quantidades significativas, por alguns tecidos especializados (eritrócitos, córnea, cristalino, medula renal, testículos, leucócitos e fibras musculares brancas) e o principal combustível utilizado pelo cérebro. O cérebro humano adulto usa, aproximadamente, 120g de glicose por dia para suprir suas necessidades de ATP (Devlin, 1997).

Células especializadas como os eritrócitos, a córnea, o cristalino e regiões da retina são desprovidos de mitocôndria e, portanto, são incapazes de

converter piruvato em CO_2 e H_2O , tornando-os dependente da glicose como principal mecanismo para produção de ATP. A medula renal, os testículos, leucócitos e fibras musculares brancas também dependem quase que totalmente da glicose como fonte de ATP, uma vez que estes tecidos têm relativamente poucas mitocôndrias. Em um adulto normal, o consumo de glicose por estes tecidos que dependem primariamente da glicólise para produção de ATP é de aproximadamente 40g por dia (Devlin, 1997).

A capacidade de sintetizar glicose é crucial para a sobrevivência dos seres humanos e de outros animais e, portanto os níveis de glicose sangüínea devem ser mantidos para sustentar o metabolismo dos tecidos que utilizam glicose como substrato primário (Devlin, 1997).

A gliconeogênese permite a manutenção dos níveis de glicose no sangue, muito tempo depois de toda a glicose da dieta ter sido absorvida e completamente oxidada. Assim, quando não houver disponibilidade de glicose na dieta ou quando o fígado esgotar seu suprimento de glicogênio, a glicose será sintetizada a partir de precursores não-glicídicos pela gliconeogênese (“criação de açúcar de novo”), a qual converte o piruvato e outros compostos com três carbonos a ele relacionados em glicose. Os precursores não glicídicos que podem ser convertidos em glicose incluem os produtos da glicólise, o lactato e o piruvato, o glicerol e as cadeias carbonadas da maioria dos aminoácidos (Voet, 2000).

A maioria das reações da gliconeogênese corresponde às reações da via glicolítica, em sentido inverso. Entretanto, três reações de desvios (que contornam as reações irreversíveis da via glicolítica) são necessárias na gliconeogênese para a glicose ser regenerada. Estas reações requerem a participação das enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinase, frutose 1,6-bifosfatase e G6Pase (Voet, 2000; Lehninger, 2006).

Neste trabalho, foi investigado o efeito da exposição ao mercúrio sobre a atividade de três das várias enzimas importantes para a manutenção da glicemia: ALT e LDH, responsáveis pelas principais fontes de piruvato citosólico a partir dos substratos alanina e lactato, e G6Pase a qual catalisa a reação final da via gliconeogênica e glicogenólica (Stryer, 1996).

3.4.1. Alanina aminotransferase

A ALT (E.C. 2.6.1.2, também conhecida como transaminase glutâmico pirúvica) possui o piroxal 5-fosfato como cofator, e catalisa a transaminação reversível entre L-alanina e α -cetoglutarato para formar piruvato e glutamato. Através da produção desses quatro metabólicos intermediários, a ALT exerce função importante na gliconeogênese e no metabolismo de aminoácidos, particularmente durante o jejum e o exercício, quando o piruvato formado a partir da glicose é convertido em alanina por uma reação de transaminação (Felig, 1973; Stryer, 1996). Essa enzima também contribui para a síntese de glutamato, o qual é um importante neurotransmissor no cérebro (Peng, 1991).

A maior atividade da ALT é encontrada no citoplasma de células de fígado, rim, músculo esquelético e cardíaco. Contudo, essa enzima também apresenta atividade mitocondrial. A isoenzima citosólica mostra menor afinidade (maior K_m) para L-alanina estando provavelmente envolvida na conversão do piruvato em L-alanina. A ALT mitocondrial apresenta afinidade relativamente alta para L-alanina, e está envolvida, principalmente, na formação do piruvato a partir da L-alanina (DeRosa, 1975).

A distribuição das isoenzimas da ALT em vários tecidos tem sido estudada e tem sido sugerida a existência de duas isoformas, a ALT1 e a ALT2, identificadas em humanos e ratos. ALT1 está principalmente expressa no intestino, fígado, rim e coração, enquanto que a ALT2 é principalmente expressa em músculo, cérebro, rim e fígado (Yang et al., 2002; Jadhao et al., 2004 apud Liu et al., 2008). O cofator piridoxal 5-fosfato e os grupos-SH livres estão diretamente envolvidos na atividade catalítica de ambas isoenzimas. Ambas as enzimas são completamente inibidas por p-hidroximercuribenzoato e $HgCl_2$ os quais são reagentes típicos de grupos sulfidrílicos (Vedavathi et al., 2004)

Um aspecto bem conhecido sobre a ALT é a sua utilização como marcadora da função hepática. Sua atividade sérica elevada em conjunto com o aumento da LDH são indicadores de lesão tecidual (Meyer et al., 1992; Kopperschlager & Kirchberger, 1996). A ALT também pode ser indicadora de

alterações dos mecanismos metabólicos, tais como o aumento da atividade gliconeogênica quando analisada em órgãos como fígado (Rosen et al., 1959; Hagopian et al., 2003). O aumento da atividade da ALT hepática pode estar relacionado a quatro condições associadas à gliconeogênese: a ingestão de proteínas, diabetes, jejum e tratamento com hidrocortisona (Rosean et al., 1959).

3.4.2. Lactato desidrogenase

A LDH (E.C. 1.1.1.27) é uma enzima regulatória importante quando tecidos animais não são supridos com oxigênio suficiente para suportar a oxidação aeróbia do piruvato e do NADH produzidos na glicólise. Essa enzima catalisa a conversão reversível do L-lactato a piruvato e usa como suporte coenzimático o sistema $\text{NAD}^+/\text{NADH} + \text{H}^+$. Exerce um importante papel metabólico no metabolismo glicolítico, uma vez que a reoxidação do NADH fornece NAD^+ para a reação da gliceraldeído-fosfato desidrogenase, frente às necessidades metabólicas do tecido (Lehninger, 2006).

A LDH tem papel importante para alguns tecidos e tipos celulares como eritrócitos que não tem mitocôndria e, portanto não podem oxidar o piruvato a CO_2 . Além disso, permite que o lactato formado pelo músculo esquelético em atividade possa ser reciclado; ele é transportado pelo sangue até o fígado onde é convertido em glicose durante a recuperação da atividade muscular (Voet, 2000).

Cada molécula de LDH é uma proteína tetramérica de PM 140.000 Dalton, formada pelas subunidades M (músculo) e/ou H (coração). As isoenzimas H e M são similares no peso molecular, mas diferem grandemente em propriedades físicas, químicas e imunológicas, como também nas propriedades catalíticas e em sua distribuição nos tecidos (Kaneko, 1997). A combinação dessas subunidades resulta em cinco isoenzimas diferentes de LDH. A LDH1 (ou H4) (predominante no músculo cardíaco e eritrócitos) e LDH5 (ou M4) (predominante no músculo esquelético e no fígado) são formadas somente pelos monômeros H e M, respectivamente. LDH2, LDH3 e LDH4 são

híbridos das subunidades M e H, e são encontrados em vários órgãos diferentes (Devlin, 1997). As duas subunidades (M e H) favorecem reações distintas. A isoenzima M4 favorece a rápida redução de baixas concentrações de piruvato à lactato em músculo esquelético, o que permite que a glicólise se processe em condições anaeróbias. A isoenzima H4 tende a favorecer a rápida oxidação de lactato à piruvato no músculo cardíaco. O metabolismo aeróbico do coração permite que ele encaminhe o piruvato para o ciclo do ácido cítrico (Phillips et al, 1981; Stryer, 1996).

Um terceiro tipo de LDH, denominada LDH X ou isoenzima C vem sendo estudada em alguns vertebrados e sua subunidade está presente em poucos tecidos (Kopperschlager & Kirchberger, 1996).

A LDH pode ser inibida por reagentes ligantes de grupos sulfidrílicos, tal como p-cloromercuribenzoato (Zheng et al., 2003) e HgCl_2 (Smith & Acosta, 1986). É bem conhecido que resíduos de cisteína são essenciais para a atividade da LDH, porém estudos mostram que o grupo sulfidril de cisteínas não se liga ao substrato (Abad-Zapatero et al., 1987). Modificações desses grupos sulfidril por p-cloromercuribenzoato levam a inativação e mudanças conformacionais da enzima (Zheng et al., 2002, 2003).

3.4.3. Glicose 6-fosfatase

A G6Pase (E.C. 3.1.3.9) desempenha papel fundamental na homeostase da glicose. Essa enzima catalisa o último passo comum de ambos os processos glicogenólise e gliconeogênese, que ao hidrolisar a glicose 6-fosfato permite que o fígado libere glicose (Lehninger, 2006).

Quanto à distribuição tecidual, essa enzima ocorre principalmente em fígado e córtex renal, os dois mais importantes tecidos gliconeogênicos. Também se encontra presente nas células- β das ilhotas pancreáticas e na mucosa intestinal do homem, camundongo e rato, mais particularmente no jejum e diabetes. Baixa atividade também tem sido descrita em músculo esquelético e astrócitos (Schaffingen & Gerin, 2002).

A G6Pase é uma proteína hidrofóbica e consiste de um sistema de multiproteínas localizado principalmente na membrana do retículo endoplasmático (RE) de células do fígado e rim (Arion et al., 1975; Stryer, 1996), com seu sítio ativo voltado para a face luminal do RE (Leskes et al., 1971; Stryer, 1996).

Assim, a etapa final na geração de glicose não ocorre no citosol. Em vez disso, a glicose 6-fosfato é transportada por uma proteína carreadora específica do citosol para a luz do RE, onde é hidrolisada pela G6Pase (Stryer, 1996).

Para sua atividade, a porção catalítica da enzima G6Pase, necessita que seu substrato, glicose 6-fosfato, e produto da reação, glicose e P_i , atravessem a bicamada de fosfolipídios do RE (Clottes & Burchell, 1998). Atualmente, o modelo mais aceito para explicar as propriedades da G6Pase é o modelo proposto por Arion et al. (1975), posteriormente denominado “modelo de transporte de substrato”. O transportador da glicose 6-fosfato (T1 ou G6PT1) está definitivamente identificado e clonado, no entanto, os transportadores de fosfato (T2) e glicose (T3) são ainda mal caracterizados (Schaffingen & Gerin, 2002). O T1 transporta a glicose 6-fosfato para a luz do RE, enquanto que T2 e T3 transportam, respectivamente, P_i e glicose de volta, ao citosol (Figura 1). A G6Pase é estabilizada por uma proteína ligante de Ca^{2+} (SP) essencial para a atividade da fosfatase (Stryer, 1996).

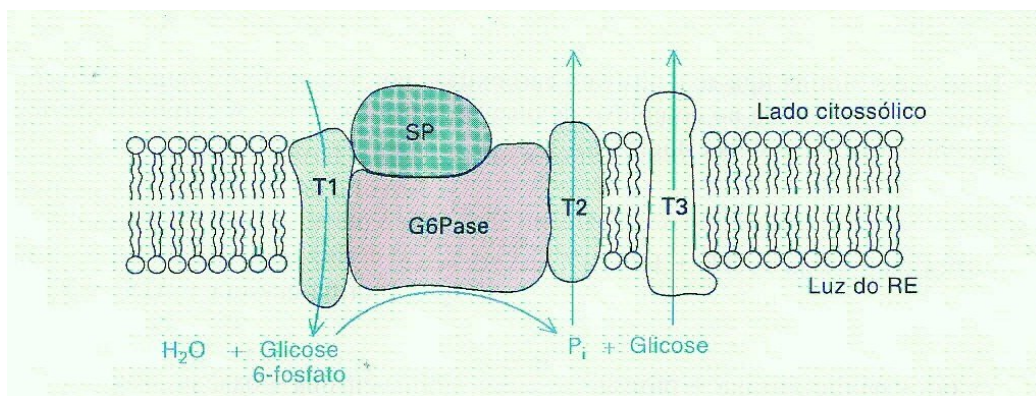


Figura 1 - Esquema das proteínas do retículo endoplasmático (RE) que participam na formação da glicose a partir da glicose 6-fosfato (Stryer, 1996).

Os grupos tióis são importantes para a atividade da enzima (Clottes & Burchell, 1998). Modificações químicas no sistema G6Pase de fígado de ratos têm sido realizadas (Clottes & Burchell, 1998; Wallin, 1972; Schulze, 1986). Alguns autores têm mostrado que grupos tióis estão envolvidos nas modificações químicas da G6Pase, tanto na porção catalítica da enzima, localizada na porção luminal da membrana do RE, como no transportador T1 (Clottes & Burchell, 1998; Clottes et al., 2002).

A figura 2 ilustra a porção catalítica da G6Pase (G6PC) e o T1 (ou G6PT1) presente no retículo endoplasmático destacando seus resíduos de cisteína, da região citosólica, suscetíveis a inibição (Clottes et al., 2002).

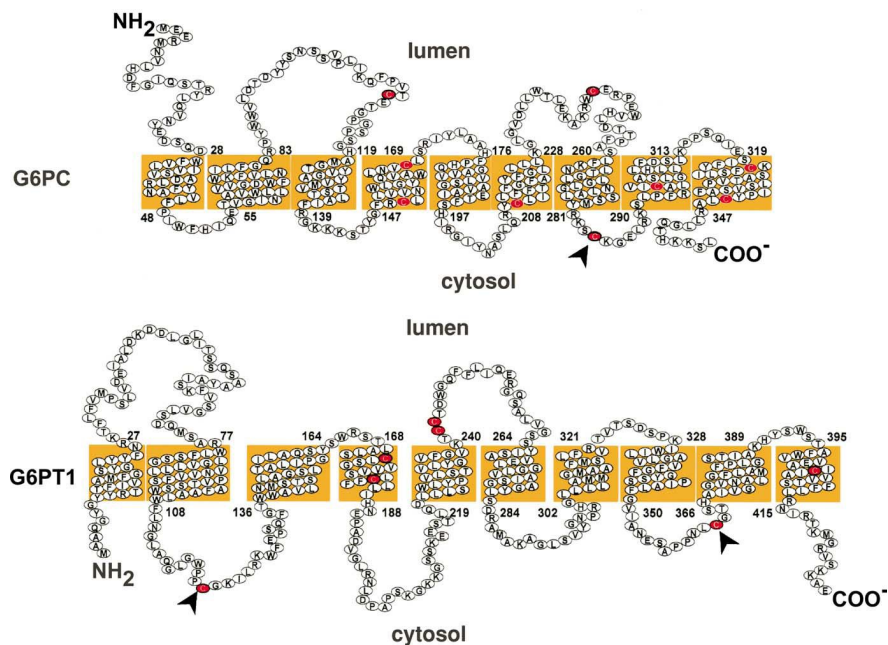


Figura 2 – Localização das cisteínas citoplasmáticas da estrutura transmembrana da porção catalítica da G6Pase (G6PC) e transportador da glicose 6-fosfato (G6PT1) de rato. Os resíduos de cisteína estão sombreados de cinza. Setas pretas indicam os grupos tióis voltados para o citosol (Clottes et al., 2002).

Experimento utilizando compostos mercuriais, tais como o p-hidróxi-mercúrio fenil sulfonato e o ácido p-hidróxi-mercuriobenzóico demonstrou que a atividade da G6Pase é inibida, sendo que esta inibição estaria relacionada a um grupo tiol da enzima, não relacionado à catalítica da enzima e voltado para o citosol. Nesse experimento também foi possível observar que, pelo menos um grupo tiol citosólico de G6PT1 reagiu com esses compostos mercuriais, levando a baixa captação de glicose 6-fosfato (Clottes et al., 2002).

Assim, considerando os efeitos do mercúrio em ratos jovens verificados em trabalhos anteriores, este estudo foi conduzido para investigar os efeitos da exposição ao mercúrio *in vivo* e *in vitro* sobre a atividade das enzimas envolvidas na gliconeogênese e sua relação com as alterações bioquímicas e fisiológicas induzidas pelo metal, e prevenidas pelo zinco, em ratos jovens.

4. RESULTADOS

Os resultados inseridos nesta dissertação apresentam-se sob a forma de um manuscrito científico. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontra-se no próprio manuscrito.

4.1. Manuscrito

Mercury chloride increases hepatic alanine aminotransferase and glucose 6-phosphatase activities in newborn rats *in vivo*

LUCÉLIA MORAES E SILVA, TANIA MARIA BUENO, CARINA FRANCISCATO, CLAUDIA SIRLENE DE OLIVEIRA, NILCE COELHO PEIXOTO, MARIA ESTER PEREIRA.

Mercury chloride increases hepatic alanine aminotransferase and glucose 6-phosphatase activities in newborn rats *in vivo*

Lucélia Moraes-Silva¹, Tania Maria Bueno¹, Carina Franciscato¹, Claudia Sirlene de Oliveira², Nilce Coelho Peixoto³ and Maria Ester Pereira^{1,2,*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica,

²Departamento de Química, CCNE, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

³Departamento de Enfermagem, Centro de Educação Superior Norte-RS, Campus Palmeira das Missões.

Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

*Correspondent author:

Maria Ester Pereira

Departamento de Química, CCNE, UFSM

97105-900 – Santa Maria, RS, Brasil

Fax number: +55 55 32208799

Email: pereirame@yahoo.com.br

Abstract

This work investigated the *in vivo* and *in vitro* effects of HgCl₂ and ZnCl₂ on alanine aminotransferase, lactate dehydrogenase and glucose 6-phosphatase activities from tissues of young rats to verify if the physiological and biochemical alterations induced by mercury, and prevented by zinc, are related to hepatic and renal glucose metabolism. Wistar rats were treated (s.c.) with saline or ZnCl₂ (27 mg/kg/day) from 3rd to 7th, and with saline or HgCl₂ (5.0 mg/kg/day) from 8th to 12th day of age. Pups were sacrificed 24h after the last dose. For *in vitro* experimentation the samples were collected from 10 to 13 days old rats. Regarding *in vivo* experiments, mercury increased the hepatic alanine aminotransferase (around 6 folds) and glucose 6-phosphatase (75%) activities; zinc pre-exposure prevented totally and partially these mercury alterations, respectively. Glucose and glycogen levels were not altered. *In vitro*, serum and liver alanine aminotransferase activities were inhibited by 10 (22%) and 100 (54%) μM HgCl₂, respectively. Serum and liver lactate dehydrogenase activities were inhibited in 53% and 64%, respectively, using 10 μM HgCl₂. Glucose 6-phosphatase activities from liver and kidney were inhibited by 100 μM HgCl₂ in 53% and 41%, respectively. These results show that mercury induces distinct alterations in these enzymes when tested *in vivo* or *in vitro*, as well as when different sources were used. The increase of hepatic alanine aminotransferase and glucose 6-phosphatase activities suggests that the mercury-exposed rats present an increase of the gluconeogenic activity in the liver. Zinc prevents, even that partially, the *in vivo* effects on metabolic changes induced by mercury.

Keywords: Alanine aminotransferase; Glucose-6-phosphatase, Lactate dehydrogenase; Mercuric chloride; Young rats; Zinc chloride.

1. INTRODUCTION

Mercury is a toxic metal, and may accumulate in living organisms causing damage (Counter and Buchanan, 2004; Rooney, 2007). The toxicity of this metal depends on its chemical form (Clarkson, 1997). The exposure to inorganic mercury, which is the object of this study, is mainly occupational-like, occurring in industrial activities and mining (Nevado et al., 2003). This form is primarily nephrotoxic (Clarkson, 1997; Emanuelli et al., 1996; Goyer, 1995) and causes renal insufficiency, changes in body and organ weights and decreases the porphobilinogen synthase activity of rats exposed to metal during the precocious phase of development (8th-12th day of age) (Peixoto et al., 2003, 2007a).

Several of physiology and biochemistry changes presented by young-rats exposed to HgCl₂ are prevented by pre-exposition to ZnCl₂ (Peixoto and Pereira, 2007; Franciscato et al., 2009, Franciscato et al., 2010 submitted in revision). This is an essential metal involved in several metabolic functions (Fang et al., 2002). It is a catalytic and structural element of several proteins (Mathie et al., 2006) and plays an important role in the metallothionein synthesis (Pedersen et al., 1998; Peixoto et al., 2003, 2007b).

Recently, we showed that young rats exposed to mercury present an increase of serum urea and creatinine levels, as well as an inhibition of serum alanine aminotransferase (ALT) activity, without alteration of the serum lactate dehydrogenase (LDH) activity. The pre-exposure to zinc was effective in preventing renal toxicity as well as serum ALT inhibition (Peixoto and Pereira, 2007). Similar mercury inhibitory and zinc preventive effects on ALT activity were also observed when these parameters were investigated 21 days after the end of mercury exposure (Franciscato et al., 2010 submitted in revision). However, the lower serum ALT activity does not characterize hepatic lesion (Devlin, 1997).

It is known that these enzymes (ALT and LDH) are used as markers of the hepatic function. Serum ALT and LDH activities from mammalian cells are considered indicators of liver cell damage (Kopperschlager and Kirchberger,

1996). However, some studies have shown, for example, that the increase of the liver ALT activity would be related to an increase of the gluconeogenic pathway (Rosen et al., 1959; Hagopian et al., 2003).

In many mammalian cells, glucose is the major energy source and its supply is strictly regulated (Nordlie, 1999). The liver plays a central role in this process since one of its important functions, and in lesser extent of the renal cortex, is to provide glucose during starvation conditions. Glucose is formed from gluconeogenic precursors in both tissues, and in the liver also from glycogen. The major precursors of glucose in animals are lactate, pyruvate, glycerol and most of the amino acids (Lehninger, 2006). However, amino acids, mainly alanine, and lactate are the main substrates for gluconeogenesis (Stryer, 1996) even in rats (Rémésy et al, 1978) and may be considered as a major source of cytosolic pyruvate (Fafournoux et al, 1983). The initial reactions of these processes are catalyzed by the enzymes ALT and LDH, respectively (Lehninger, 2006).

ALT has an important role in gluconeogenesis and amino acid metabolism, particularly during fasting and intense exercise (Felig, 1973). This enzyme (EC 2.6.1.2) has pyridoxal as cofactor and catalyzing reversible transamination between L-alanine and alpha-ketoglutarate to form pyruvate and glutamate. ALT also contributes for the synthesis of glutamate, which is an important neurotransmitter in the brain (Peng, 1991).

Already, LDH (EC 1.1.1.27) catalyzes the reversible conversion of lactate to pyruvate with support coenzyme system $\text{NAD}^+/\text{NADH} + \text{H}^+$. It plays an important metabolic role in the glycolytic metabolism, since the reoxidation of NADH provides NAD^+ to glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase reaction, according with the metabolic needs of the tissue (Lehninger, 2006).

Another important enzyme for glucose metabolism is the glucose 6-phosphatase (G6Pase; EC 3.1.3.9). This enzyme is found mainly in liver and kidney, and plays a key role in glucose homeostasis, catalyzing the terminal step of both gluconeogenesis and glycogenolysis. Glucose is liberated in the blood after glucose 6-phosphate dephosphorilation catalyzed by G6Pase (Schaffingen and Gerin, 2002).

Thus, considering the mercury effects on young rats cited above, and that the mercury exposure results in high content of mercury in the rat liver and kidney (Peixoto et al., 2003; 2008), this study was conducted to investigate the effect of mercury exposure on the hepatic and renal ALT, LDH and G6Pase activities and its relationship with physiological and biochemical alterations induced by mercury and prevented by zinc (Peixoto et al., 2003; Peixoto and Pereira, 2007; Franciscato et al., 2009, 2009, unpublished work). Furthermore, to better understand the effects of mercury and zinc, we investigated the *in vitro* effects of these metals on these enzyme activities. Blood glucose and liver, kidney and muscle glycogen levels were also monitored. To this, young rats were used since there is no information about hepatic and renal glucose metabolism alterations induced by mercury at this age.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Chemicals:

Mercury chloride (HgCl_2), zinc chloride (ZnCl_2), NaCl, KOH, ethanol, HCl, ammonium sulfate, iodine, and KI were obtained from Labsynth (Diadema/SP/Brazil). Bovine serum albumin, Coomassie brilliant blue G, citrate acid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), D-glucose-6-phosphate barium hydrate ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_9\text{PBa}\cdot\text{H}_2\text{O}$), potassium sulphate (K_2SO_4), trichloroacetic acid, ammonium molybdate [$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$], sodium hydrogen sulphite (NaHSO_3), sodium sulphite (Na_2SO_3), 1-Amino-2-naphthol-4-sulphonic acid, potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) were purchased from Sigma Chemical Company. (St. Louis, MO, USA). Glycogen was purchased from Merck (Darmstadt/Germany). The kits for determinations of ALT and LDH were acquired from Labtest (Lagoa Santa/MG/Brazil). The kit for dosage of glucose was purchased from Bioclin (Belo Horizonte/MG/Brazil).

2.2. Experimental Animals:

Wistar rats obtained from the Animal House of the Federal University of Santa Maria were transferred to our breeding colony and maintained on a 12 hr light/dark cycle and controlled temperature ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$). The animals had free access to water and commercial food. The breeding regimen consisted of grouping three females (90 - 120 days old) and one male for 20 days. After this period, pregnant rats were selected and housed individually in opaque plastic cages (50 cm x 25 cm x 18 cm). Pregnant rats were checked once a day between 3:00 and 6:00 p.m. to verify the possible presence of pups.

2.3. Newborn animals:

The day of birth was defined as 0 day old. At 1 day old, the litters were reduced to eight pups. Males and females were used indistinctly.

2.4. Pre-treatment and intoxication:

Three-day-old Wistar rats were treated with NaCl 90 mg/kg/day (saline, control) or ZnCl₂ 27 mg/kg/day during five consecutive days (from 3 to 7 days old). From 8th to 12th day of age they received one daily dose of saline or HgCl₂ 5.0 mg/kg. The doses of HgCl₂ (5 mg/kg/day) and ZnCl₂ (27 mg/kg/day) were selected according to previous studies performed with suckling rats (Peixoto et al., 2003; 2007; 2008; Peixoto and Pereira, 2007; Franciscato et al., 2009). Treatments were administered by subcutaneous (s.c.) injections in a constant volume of 10 ml/kg body weight. Animals were weighed daily to adjust the dose.

2.5. Sample preparation:

Twenty-four hours after the last dose of saline or mercury the pups were euthanized. Blood and muscle (hind paws of the animal) samples, as well as liver and kidneys (total organs) were collected and weighed. For biochemical analysis blood serum was obtained by total blood centrifugation at 3,000 g and was frozen until analyses (until 5 days). Liver and kidney were dissected and portions of each organ were used for determination of enzymatic activity.

Samples of liver and kidney were homogenized in 10 volumes of Tris HCl 10 mM plus MgSO_4 1 mM, pH 7.4 to determine ALT; and liver samples were homogenized in 20 volumes the same buffer to determine LDH enzyme activities. For the G6Pase activity determination, liver and kidney samples were homogenized in 39 and 20 volumes of citrate buffer 0.1 mM, pH 6.5, respectively.

Glycogen was assayed in liver, kidney and muscle tissues. An aliquot of each tissue was removed, weighed and stored at -20°C until glycogen extraction and quantification.

2.6. Biochemical determinations:

2.6.1. Alanine aminotransferase:

The enzymatic activity was determined by the Reitman and Frankel (1957) method, using a commercial kit Labtest, in a medium containing Tris-HCl buffer 55.8 mM pH 7.4, α -ketoglutaric acid 1.67 mM, L-alanine 83.3 mM and sodium azide 12.8 mM. After 2 min of thermoequilibration at 37°C , the incubation was started by adding 25 μL of sample for 30 min at 37°C . Next, HCl 0.45 M (for stopping the reaction) and 2, 4-dinitrophenylhydrazine 0.45 mM (as color reactive) were mixed, and the tubes were placed at room temperature for 20 min. Finally, NaOH 1.02 M was added to produce intense color. The absorbance was determined at 505 nm, and the activity was calculated by comparison with calibration curve utilizing sodium piruvate as standard and expressed as U/mg of protein. All assays were carried out in triplicate.

2.6.2. Lactic dehydrogenase:

The enzyme activity was determined using the commercial kit Labtest. The measure of the enzymatic activity was carried out through the formation of NADH by reduction of absorbance. The reaction was conducted in a medium containing lactic acid 208 mM, sodium azide 6.16 mM, Tris-HCl buffer 160 mM pH 8.2 and the 25 μL of sample, and incubated for 2 min at 37°C . Next, the

color reactive [phenyltetrazolium chloride (INT) 0.64 mM, NAD⁺ 1.2 mM, phenazine 0.256 mM and sodium azide 1.232 mM] was mixed and the tubes were placed again to incubate for 5 min at 37°C. Finally, HCl 123 mM (for stopping the reaction) was mixed and the tubes were placed at room temperature for 5 min. The absorbance was recorded at 500 nm and the activity was expressed as U/mg of protein.

2.6.3. *Glucose 6-phosphatase*

G6Pase was assayed as described by Bergmeyer (1965), with some modifications. The rate of the reaction was measured by inorganic phosphate production. After 5 min of thermoequilibration of the sample (37°C), glucose 6-phosphate (40 mM) was added and the tubes were again incubated for 15 min at 37°C. The trichloroacetic acid solution 10% (for stopping the reaction) was mixed and the tubes were placed at room temperature. The determination of the inorganic phosphorus (Pi) released was made according to Fiske and Subbarow method (1925). The absorbances were measured at 660 nm and compared to phosphate standard curve. The enzyme activity was expressed as nmol Pi formed per hour per mg of protein.

2.6.4. *Glucose:*

The quantification of glucose was carried out by measuring the product formed in a reaction medium containing phosphate buffer 9.9 mM pH 7.4, phenol 9.9 mM, glucose oxidase \geq 12,000 U/L, peroxidase \geq 1,000 U/L and 4-amino-antipirine 0.4 mM. The incubation was started by adding 10 μ L of sample and performed at 37°C for 10 min. The absorbances were measured at 500 nm and compared with glucose standard curve. The glucose levels are presented as mg of glucose per dL of serum.

2.6.5. *Glycogen:*

Tissue glycogen extraction was made as described in Peixoto and Pereira (2007). The samples of liver, muscle and kidney (around 200 mg) were

added to 2.0 mL of KOH 30% and heated at 100°C until full dissolution of tissue and. After, they were cooled in cold water. Ethanol (2.0 mL) was added and the mixture was heated at 70°C for 10 min. Next, the tubes were cooled in ice for 3 min and centrifuged at 3,000 rpm for 5 min. Supernatant was discarded and 0.2 mL of HCl 5 N and 3.8, 1.8 and 0.8 mL of distilled water was added to the pellet of liver, muscle and kidney, respectively. The tubes containing extracted glycogen were frozen until quantification analyses (until 5 days).

The glycogen content was determined by Krisman method (1962). The samples (50 µL to liver and 200 µL to muscle and kidney extracts) were mixed with iodine reactive [I_2 0.01% and KI 0.1% in a saturated solution of $(NH_4)_2SO_4$] and the resultant absorbance was determined at 460 nm and compared with glycogen standard curve. Tissue glycogen contents were expressed as g of glycogen per 100 g of tissue.

2.6.6. Protein dosage:

The protein content was determined according to Bradford (1976) utilizing bovine serum albumin as standard protein.

2.6.7. *In vitro* zinc and mercury assay

Blood samples as well as liver and kidney tissues were collected from 10-13 day-old rats and prepared as described in tissues preparations (item 2.5).

The *in vitro* effects of mercury chloride on serum, liver and kidney ALT activities were tested in the following concentrations: 0; 0.1; 1; 10; and 100 µM. The effect of zinc chloride on this enzyme was tested in the following concentrations: 0; 1; 10 and 100 µM. For termoequilibrium, the metals and substrate were pre-incubated for 2 min and the enzymatic reaction was conducted as described before (item 2.6.1).

For the determination of the LDH activity in serum and liver, the effect of mercury was tested in the concentrations: 0, 1, 5, 10 and 100 µM; and of zinc in the concentrations: 0, 1, 10 and 100 µM. The metals, enzyme and substrate

were incubated and the enzymatic reaction was performed as described before (item 2.6.2).

The effects of mercury (0, 10, 50, 100 and 1000 μM) and zinc (0; 10; 100 and 1000 μM) were also tested on G6Pase activity from liver and kidney. The metals and enzyme sources were pre-incubated for 5 min, and the enzymatic reaction was carried out as described previously (item 2.6.3).

2.7. Statistical analysis:

Results were analyzed by one-way or two-way ANOVA followed by Duncan's multiple range tests when necessary. Data are presented as mean \pm S.E.M. For *in vivo* exposure, each litter contributed only with one animal (*n*) for each one of the determinations. For *in vitro* assays, pools of two or more pups were necessary to provide enough serum enzymatic material (Abbey and Howard, 1973).

2.8. Ethics:

The study was performed in accordance with the University Ethics Committee Guidelines for experiments with animals (Process number 23081.014805/2007-68)

3. RESULTS

The body weight from young rats is shown in Figure 1. The two-way ANOVA revealed significant effect of treatments on body weight [$F(5,180)=1239.91$, $p<0.001$] and on treatment x body weight interaction [$F(15,180)=22.42$; $p<0.001$]. The interaction was due to fact that although all groups presented an increase in body weight, animals treated only with mercury presented lower growth than animals from other groups. In fact, the Hg-treated rats had a little growth from 9 to 11 days of age and did not grow from 11 to 13

days of age. The difference between groups was significant only 24 h after the end of the treatments [one-way ANOVA: $F(3,36)=9.78$; $p<0.01$].

Effects of the treatments on liver and kidney weights, liver and kidney ALT activities and liver LDH activity are showed in Table 1. Kidney, but not liver weight, was significantly modified by treatments [ANOVA, $F(4,15)=6.60$; $p<0.01$]. Mercury exposure significantly increases the renal weight and previous exposure to zinc partially prevented this effect. Treatments did not modify liver LDH and kidney ALT activities, but significantly altered liver ALT activity [ANOVA; $F(3,12)=21.45$, $p<0.01$]. $HgCl_2$ exposure significantly increased liver ALT activity and the previous $ZnCl_2$ exposure totally prevented the mercury effect.

Effects of the treatments on liver and kidney G6Pase activity, serum glucose, liver, kidney and muscle glycogen contents were also analyzed (Table 2). The one-way ANOVA revealed significant effect of treatment on liver G6Pase activity [$F(3,12)=5.10$, $p<0.05$]. The enzyme activity from Hg-exposed rats presented significantly increase and zinc pre-exposure partially prevented this effect. The other parameters were not altered by the treatments.

In vitro effects of mercury and zinc on serum, liver and kidney ALT activities were assessed and results are shown in Figure 2. The one-way ANOVA revealed significant effects of mercury on serum [$F(4,15)=8.31$, $p<0.05$] and liver [$F(4,10)=45.76$, $p<0.01$] but not on renal ALT activity. Serum and liver ALT activities were also significantly inhibited by zinc [one-way ANOVA, serum: $F(3,12)=1.42$, $p<0.01$ and liver: $F(3,8)=5.77$, $p<0.01$] without altering the renal ALT activity. In relation to LDH activity (Figure 3), serum and liver LDH activities were significantly inhibited by mercury [one-way ANOVA, serum: $F(4,27)=30.77$ $p<0.001$; liver: $F(4,27)=11.66$ $p<0.001$]. LDH activity was not altered by zinc. Furthermore, we studied whether the pre-incubation of enzyme with $ZnCl_2$ could modify the effect of $HgCl_2$ on LDH activity *in vitro* (data not shown). The statistical analysis showed that zinc was not able to alter the inhibitory effect of mercury on LDH activity.

The *in vitro* effects of mercury and zinc on liver and kidney G6Pase activities were also analyzed (Figure 4). The one-way ANOVA revealed a

significant effect of mercury on liver [$F(4,18)=17.13$, $p<0.05$] and kidney [$F(4,14)=14.31$, $p<0.01$] G6Pase activities. The enzyme from both tissues was inhibited by 100 and 1000 μM of HgCl_2 . The statistical analysis showed absence of zinc effect.

4. DISCUSSION

The purpose of this work was to investigate the *in vivo* effects of mercury on the hepatic and renal ALT and G6Pase, and on hepatic LDH activities, as well as the preventive effect of zinc on mercury alterations. Furthermore, we investigated the possible *in vitro* effects of mercury and zinc on ALT (serum, liver, and kidney), LDH (serum and liver), and on G6Pase (liver and kidney) activities to better understand the *in vivo* effects of these metals on these enzymes from tissues of young rats.

Results show that animals treated only with mercury presented lower growth than the other groups and an increase in kidney weight. Other works have reported alterations in body and kidney weight of animal exposed to this metal (Rocha et al., 1995; Peixoto et al., 2003; Roza et al., 2005). However, we observed that the significant difference of body weight between groups was verified only 24 h after the end of the treatments. The increase of the renal size and weight in Hg-exposed rats may be related to structural changes due primarily to an increase in proximal tubule volume (Madsen and Maunsbach, 1981).

The Hg-intoxicated rats may undergo changes in their hepatic metabolism, since these animals showed an increase around 6 folds of the liver ALT activity, whereas kidney ALT activity was not altered. This mercury effect seems to be strongly related to some type of compensatory metabolic mechanism such as the increase of gluconeogenic activity (Rosen et al., 1959; Hagopian et al, 2003). This hypothesis to become important when considered that serum ALT activity *in vivo* (Peixoto and Pereira, 2007) as well as serum and liver ALT activities *in vitro* (as discussed below) were inhibited by mercury.

The study of Rosen et al. (1959) showed increase of ALT activity related to four conditions associated with gluconeogenesis: protein intake, diabetes, and fasting and hydrocortisone treatment. However, the Hg exposed rats were not included in no of these metabolic situations. They were lactating rats and were not separated from yours dams to induce starvations.

In attempt of to clear this effect, we investigated the effect of Hg-exposure on G6Pase, the last enzyme involved in the gluconeogenic pathway. Serum glucose as well as liver, kidney and muscle glycogenic levels were also analyzed to discard any effect on glycogen store. We observed that Hg exposed rats presented an increase of the liver G6Pase activity around 75% without renal enzyme alteration. Still, neither glucemia nor glycogen levels were altered by treatments.

Thus, considering the increase of both liver ALT and G6Pase activities, we may suggest that Hg-exposed rats present an increase of hepatic but not of renal gluconeogenesis.

The increase of this pathway in the liver may be related to a nutritional factor. Our results demonstrate that animals poisoned with mercury suffer a decrease in body weight gain, similarly to other study (Peixoto et al., 2003). It is known that mercury induces anorexigenic effects (Counter and Buchaman, 2004) and can cause alteration in absorption of nutrients (Sastry et al., 1982; Farmanfarmaiam et al., 1989). Beside, by visual inspection, it was possible to observer that the Hg-exposed rats presented lower fat deposit and size of skeletal muscle. The muscle proteins broken down might be providing amino acid to glyconeogenesis. In fact, these animals presented an increase of creatinine and urea levels (Peixoto and Pereira, 2007; Franciscato, 2009). Another factor that points to this conclusion is the fact that these two enzymes from different sources are inhibited *in vitro* by mercury. This opposite effect (*in vitro* inhibition) corroborates with the hypothesis that the *in vivo* may be related to a metabolic change caused by mercury, and not at a direct effect of mercury on these enzyme activities.

The glucose level and glycogenic content were not altered by exposition to mercury. These parameters were analyzed to rule out any effect on glycogen

storage. The absence of effect observed on these parameters also collaborates with evidence of an increased hepatic gluconeogenesis, maintaining the normal blood glucose levels of rats exposed to mercury. These results also suggest that the increase of liver G6Pase activity is not related to increase of glycogenolysis, since the levels of liver glycogen were not altered.

In relation to zinc exposure, we observed that this metal did not induce metabolic alterations in these parameters studied. The absence of effects is important since zinc was chosen for not presenting harmful effects on the enzymes studied and on physiological parameters, and it still prevents several toxic effects of mercury (Peixoto et al., 2003; Peixoto and Pereira, 2007; Franciscato et al., 2009, Franciscato et al., 2010 submitted in revision).

The previous treatment with zinc partially impeded the loss in body weight gain and increased kidney weight of rats exposed to mercury. Still, this metal prevented the increase of liver ALT activity and partially the increased of liver G6Pase activity. Studies have shown that several preventive effects occur in parallel to the increase of metallothionein content in liver and kidney (Peixoto et al., 2003; 2007b).

Results *in vitro* revealed that almost all enzymes were inhibited by mercury (except kidney ALT). Serum and hepatic ALT activities presented inhibition of 22% and 54% when in presence of 10 and 100 μM , respectively. LDH was the most sensitive enzyme. The hepatic activity was inhibited in 64% and serum activity in 53% by 10 μM . Hepatic and renal G6Pase activity also was inhibited by mercury in 53% and 41% when in presence of 100 μM , respectively. Literature data have suggested that the chemical modification of sulfhydryl group of cysteine is involved in the inactivation of ALT (Vedavathi et al., 2004), LDH (Zheng et al., 2002, 2003) and G6Pase (Clottes et al., 2002) activities. Mercury is a typical reagent of sulfhydryl groups and its large affinity with these groups contributes to its toxicity (Clarkson, 1997). Vedavathi et al. (2004) showed that the ALT enzyme purified from rat liver is inhibited by *p*-chloro-mercuribenzoate (*p*CMB) and mercury chloride. Some works also using *p*CMB have reported that the LDH enzyme from pig heart undergoes conformational changes and inactivation (Zheng et al., 2002, 2003).

Since *in vitro* the LDH activity was substantially inhibited and *in vivo* it was not altered by mercury exposure, our results suggest that these opposed effects may be due to the fact that Hg levels reached *in vivo* are lower than those incubated *in vitro*. However, as hepatic LDH activity was not increased by Hg-exposure (differently of ALT and G6Pase activity) these results suggest that the pyruvate proceeding from lactate by Cori Cycle is not the principal substrate to the increase of gluconeogenesis in these animals (Stryer, 1996).

In relation to effect of zinc chloride *in vitro* on the activity of enzymes ALT, LDH and G6Pase, we observed that this metal does not affect the activity of most of these enzymes. Furthermore, we studied whether the pre-incubation of the enzymes with ZnCl₂ could modify the effect of HgCl₂ on LDH activity *in vitro* (data not shown). However, zinc did not alter the inhibitory mercury effect on LDH activities. This result showed that the preventive effect of zinc is not related to a direct effect on this metal.

In conclusion, mercury induces alteration in almost all enzymes analyzed from different sources *in vivo* and *in vitro* (except for liver LDH *in vivo* and kidney ALT *in vivo* and *in vitro*). The increased hepatic ALT and G6Pase activities suggest that animals exposed to mercury have an increased gluconeogenic activity in this tissue. Although the effects of toxic metal on these enzymes (marker of liver function) were not expressed in the form of increased levels of serum activity (Peixoto and Pereira, 2007; Franciscato et al. 2010, submitted in revision), further analysis is required, since the inhibition of serum ALT activity is not related to an increase of the activity of this enzyme in liver, and consequently to an increase of the gluconeogenic way as verified by analyzing the activity of G6Pase. Zinc prevents, even in some cases partially, the *in vivo* effects of mercury on the metabolic changes confirming its preventive role. These results corroborated with our previous studies that verified that zinc exposure prevents several biochemical, behavioral and essential metal level alterations induced by inorganic mercury (Peixoto et al., 2003, 2008; Peixoto and Pereira, 2007; Franciscato et al., 2009).

Acknowledgments

Financial support-provided by FINEP research grant “Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)” # 01.06.0842-00. M.E.P is recipient of CNPq fellowships (307814/2008-4); L.M.S and C.F are recipients from CAPES fellowships. C.L.O is recipient from CNPq (PIBIC) fellowships.

5. REFERENCES

Bergmeyer, HU. 1965. Methods in enzymatic analysis. New York and London: Academic Press.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-54.

Clarkson TW. 1997. The toxicology of mercury. *Clin. Lab. Sci.* 34: 369-403.

Clottes E, Middleditch C, Burchell A. 2002. Rat liver glucose-6-phosphatase system: light scattering and chemical characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* 408: 33-41.

Counter AS and Buchanan LH. 2004. Mercury exposure in children: a review. *Toxicol. Appl. Pharm.* 198: 209-230.

Devlin, TM. 1997. *Biochemistry with Clinical Correlations*, 4th ed. Wiley, New York.

Fafournoux P, Rémésy C, Demigné C. 1983. Control of alanine metabolism in rat liver by transport processes or cellular metabolism. *Biochem. J.* 210: 645-652.

Fang YZ, Yang S, Wu G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18: 872-879.

Farmanfarmaian A, Pugliese KA, Sun LZ. 1989. Mercury inhibits the transport of D-glucose by the intestinal brush border membrane vesicles of fish. *Mar. Environ. Res.* 28: 247-251.

Felig P. 1973. The glucose-alanine cycle. *Metabolism* 22: 179-207.

Fiske CH, Subbarow P. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375-400.

Franciscato C, Goulart FR, Lovatto NM, Duarte FA, Flores EMM, Dressler VL, Peixoto NC, Pereira ME. 2009. ZnCl₂ exposure protects against behavioral and acetylcholinesterase changes induced by HgCl₂. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27: 439-68.

Hagopian K, Ramsey JJ, Weindruch R. 2003. Caloric restriction increases gluconeogenic and transaminase enzyme activities in mouse liver. *Exp. Gerontol.* 38: 267-278.

Kopperschlager G, Kirchberger J. 1996. Methods for the separation of lactate dehydrogenases and clinical significance of the enzyme. *J. Chromatog. B.* 684: 25-49.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. 2006. *Principles of Biochemistry*. 4th ed. São Paulo: Sarvier.

Mathie A, Sutton GL, Clark CE, Veale EL. 2006. Zinc and copper: pharmacological probes and endogenous modulators of neuronal excitability. *Pharmacol. Ther.* 111: 567-83.

Nevado JJB, Bermejo LFG, Martn-Doimeadios RCR. 2003. Distribution of mercury in the aquatic environment at Almaden, Spain. *Environ. Pollut.* 122: 261-271.

Nordlie RC, Foster JD, Lange AJ. 1999. Regulation of glucose production by the liver. *Annu. Rev. Nutr.* 19: 379-406.

Pedersen SO, Pedersen KL, Hojrup P, Knudsen J, Depledge MH. 1998. Induction and identification of cadmium-, zinc- and copper- metallothioneins in the shore crab *Carcinus maenas* (L). *Comp. Biochem. Physiol. C* 120: 251-259.

Peixoto NC and Pereira ME. 2007. Effectiveness of ZnCl₂ in protecting against nephrotoxicity induced by HgCl₂ in newborn rats. *Ecotox. Environ. Safe.* 66: 441-446.

Peixoto, N.C.; Kratz, C.P.; Roza, T.; Morsch, V.M.; Pereira, M.E. 2007a. Effects of HgCl₂ on porphobilinogen-synthase (E.C. 1.2.1.24) activity and on mercury levels in rats exposed during different precocious periods of postnatal life. *Cell Biol. Int.* 31: 1057-1062.

Peixoto NC, Rocha LC, Moraes DP, Bebianno MJ, Dressler VL, Flores EMM, Pereira ME. 2008. Changes in levels of essential elements in suckling rats exposed to zinc and mercury. *Chemosphere* 72: 1327-1332.

Peixoto NC, Roza T, Flores EMM, Pereira ME. 2003. Effect of zinc and cadmium on HgCl₂- δ -ALA-D inhibition and Hg levels in tissues of suckling rats. *Toxicol. Lett.* 146: 17-25.

Peixoto NC, Serafin MA, Flores EMM, Bebianno MJ, Pereira ME. 2007b. Metallothionein, zinc and mercury levels in tissues of young rats exposed to zinc and subsequently to mercury. *Life Sci.* 81: 1264-1271.

Peng L, Schousboe L, Hertz L. 1991. Utilization of alpha – ketoglutarate as a precursor for transmitter glutamate in cultured cerebellar granule cells. *Neurochem. Res.* 16: 29-34.

Rémésy C, Demigné C, Aufère J. 1978. Inter-organ relationships between glucose, lactate and amino acids in rats fed on high-carbohydrate or high-protein diets. *Biochem. J.* 170: 321-329.

Rocha JBT, Pereira ME, Emanuelli T, Christofari SR, Souza DD. 1995. Effect of during the aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. *Toxicology* 100: 27-37.

Rooney JPK. The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. *Toxicology* 2007; 234: 145-156.

Rosen F, Roberts NR, Nichol CA. 1959. Glucocorticosteroids and transaminase activity. I. Increased activity of glutamic-pyruvic transaminase in four conditions associated with gluconeogenesis. *J. Biol Chem.* 34: 476-480.

Roza T, Peixoto NC, Welter A, Flores EMM, Pereira ME. 2005. 2, 3-Dimercapto-1-propanol does not alter the porphobilinogen synthase inhibition but decreases the mercury content in liver and kidney of sucking rats exposed to HgCl₂. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 96: 302-308.

Sastry KV, Rao DR, Singh SK. 1982. Mercury induced alterations in the intestinal, absorption of nutrients in the fresh water murrel, *Channa punctatus*. *Chemosphere* 11: 613-619.

Schaffingen EV, Gerin I. 2002. The glucose-6-phosphatase system. *Biochem. J.* 362: 513-532.

STRYER, L. 1996. Bioquímica, 4^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Vedavathi, M, Girish KS, Kumar MK. 2004. Isolation and characterization of cytosolic alanine aminotransferase isoforms from starved rat liver. Mol. Cell. Biochem. 267: 13-23.

Zheng YB, Chen BY, Wang XC. 2002. *p*-Chloromercuribenzoate-induced inactivation and partial unfolding of porcine heart lactate dehydrogenase. Biochemistry 67: 669-704.

Zheng YB, Wang Z, Chen BY, Wang XC. 2003. Multiple effects reagent on enzyme: *o*-phthalaldehyde-induced inactivation, dissociation and partial unfolding of lactate dehydrogenase from pig heart. Int. J. Biol. Macromol. 32: 191-197.

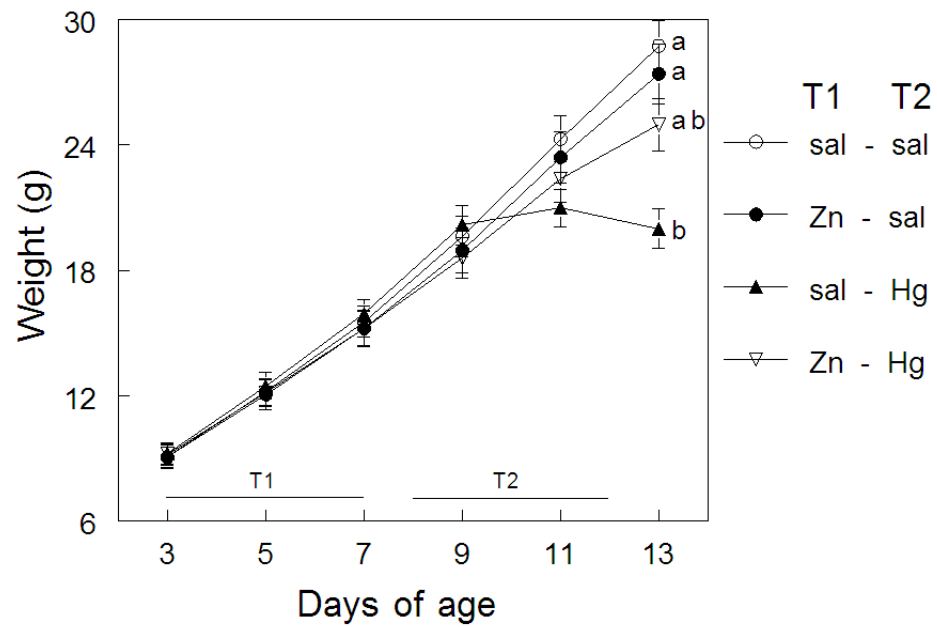


Figure 1. Body weight of young rats treated with ZnCl_2 (27 mg/kg/day; s.c.) for 5 consecutive days (3 – 7 days old) and with HgCl_2 (5 mg/kg/day; s.c.) for 5 subsequent days (8 – 12 days old). Data are presented as mean \pm S.E.M. (n=10). Duncan's multiple range test: different letters confer significant statistical difference between groups ($p < 0.05$).

Table 1. Liver and kidney weight, liver LDH activity and liver and kidney ALT activities from young rats treated with ZnCl₂ (27 mg/kg/day; s.c.) for 5 consecutive days (3 – 7 days old) and with HgCl₂ (5 mg/kg/day; s.c.) for 5 subsequent days (8 – 12 days old).

Treatments	Liver weight (g) (n=10)	Kidney weight (g) (n=5)	Liver LDH (U/mg protein) (n=5)	Liver ALT (U/mg protein) (n=4)	Kidney ALT (U/mg protein) (n=5)
Sal – Sal	0.86 ± 0.07	0.28 ± 0.02 ^a	3.05 ± 0.25	13.88 ± 1.14 ^a	1.13 ± 0.15
Zn – Sal	0.86 ± 0.07	0.24 ± 0.02 ^a	2.31 ± 0.05	21.63 ± 1.09 ^a	1.06 ± 0.06
Sal – Hg	0.76 ± 0.06	0.43 ± 0.06 ^b	2.52 ± 0.27	74.77 ± 11.34 ^b	1.00 ± 0.06
Zn – Hg	0.85 ± 0.05	0.37 ± 0.02 ^{a,b}	2.93 ± 0.43	26.06 ± 3.27 ^a	1.00 ± 0.08

Results are presented as mean ± S.E.M. Duncan's multiple range test: different letters confer significant statistical difference between groups in the same column (p<0.01).

Table 2. Liver and kidney glucose-6-phosphatase activity, serum glucose, liver, kidney and muscle glycogen of young rats treated as described in Table 1

	Treatments			
	Sal – Sal	Zn - Sal	Sal – Hg	Zn – Hg
Liver G6Pase (nmol/h/mg protein)	2.06 ± 0.37 ^a	2.94 ± 0.20 ^{a,b}	3.61 ± 0.26 ^b	2.85 ± 0.27 ^{a,b}
Kidney G-6-Pase (nmol/h/mg protein)	1.77 ± 0.30	1.46 ± 0.46	0.90 ± 0.07	1.83 ± 0.47
Serum glucose (mg/dL)	126.9 ± 5.3	128.1 ± 14.9	119.3 ± 9.1	138.1 ± 7.7
Liver glycogen (g/100g tissue)	4.68 ± 1.06	3.64 ± 0.97	4.69 ± 1.20	3.41 ± 0.95
Kidney glycogen (g/100g tissue)	0.32 ± 0.04	0.29 ± 0.06	0.20 ± 0.03	0.25 ± 0.04
Muscle glycogen (g/100g tissue)	0.44 ± 0.06	0.42 ± 0.05	0.57 ± 0.12	0.49 ± 0.08

Results are presented as mean ± S.E.M. Duncan's multiple range test: different letters confer significant statistical difference between groups in the same line (p<0.05).

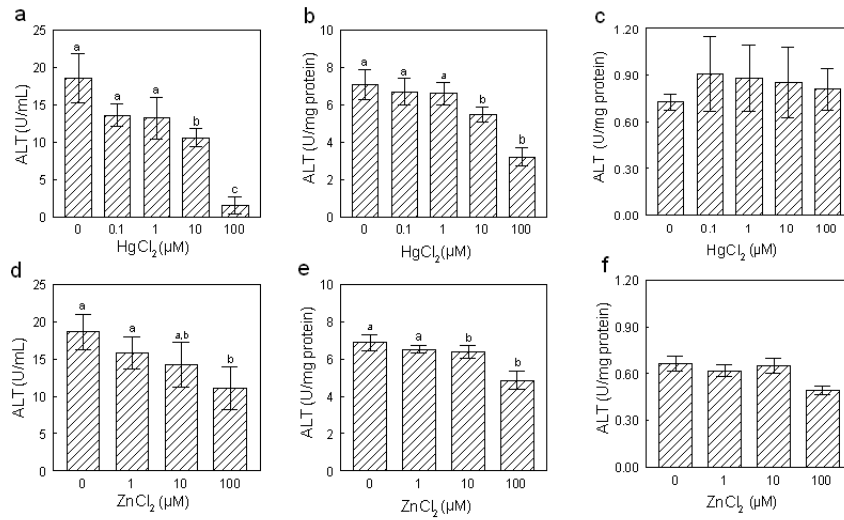


Figure 2. *In vitro* effects of HgCl₂ on the serum (a), liver (b) and kidney (c) and ZnCl₂ on the serum (d), liver (e) and kidney (f) ALT activities of young rats. Results are presented as mean ± S.E.M. (n=3-4). Duncan's multiple range test: different letters confer significant statistical difference among groups (p<0.05).

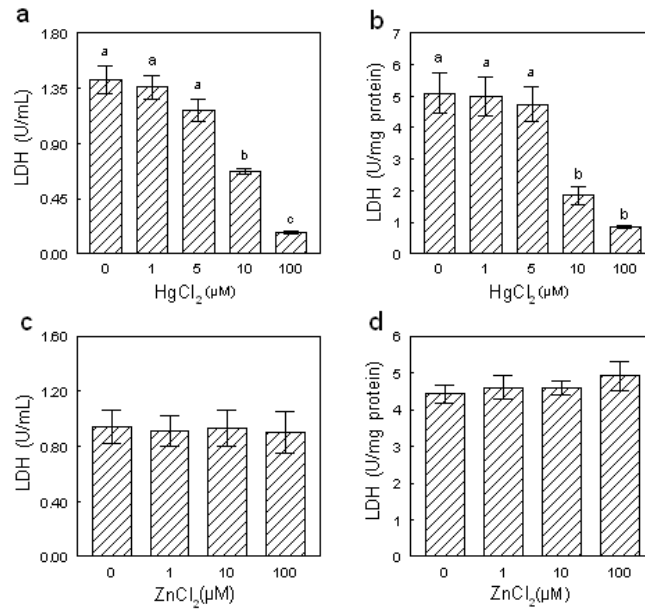


Figure 3. *In vitro* effects of HgCl₂ on the serum (a) and liver (b) and ZnCl₂ on the serum (c) and liver (d) LDH activities of young rats. Results are presented as mean ± S.E.M. (n=4-8). Duncan's multiple range test: different letters confer significant statistical difference among groups (p<0.05).

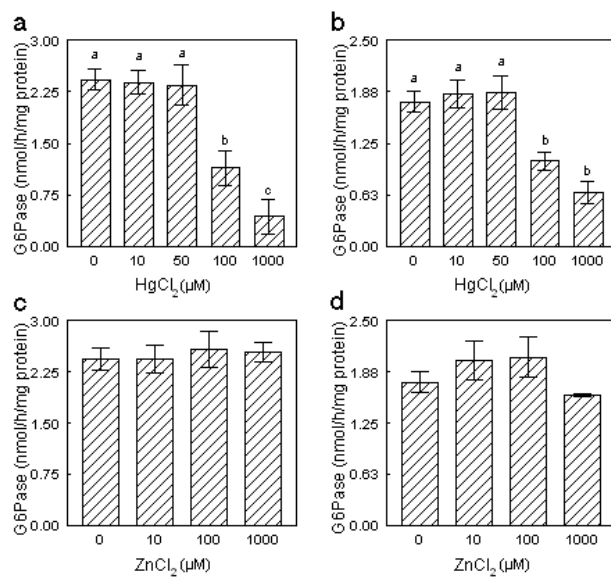


Figure 4. *In vitro* effects of HgCl₂ on the liver (a) and kidney (b) and ZnCl₂ on the liver (c) and kidney (d) G6Pase activities of young rats. Results are presented as mean \pm S.E.M. (n=3-5). Duncan's multiple range test: different letters confer significant statistical difference among groups (p<0.05).

5. DISCUSSÃO

O mercúrio representa um dos principais contaminantes ambientais, podendo acumular-se em organismos vivos causando-lhes vários danos (Counter e Buchanan, 2004; Rooney, 2007). Estudos têm demonstrado que esse metal é capaz de causar várias alterações fisiológicas e bioquímicas as quais são prevenidas pela pré-exposição ao zinco em ratos jovens (Peixoto et al., 2003; Peixoto & Pereira, 2007; Franciscato et al., 2009, Franciscato, 2009). Assim, considerando as informações descritas acima, este trabalho investigou os efeitos *in vivo* e *in vitro* do HgCl_2 e ZnCl_2 sobre as atividades das enzimas ALT, LDH e G6Pase de ratos jovens para verificar se as alterações fisiológicas e bioquímicas induzidas pelo mercúrio e impedidas pelo zinco, estão relacionados ao metabolismo hepático e renal.

Os resultados demonstram que, os animais tratados somente com mercúrio apresentaram um crescimento inferior ao dos outros grupos e um aumento no peso dos rins. Outros trabalhos têm relatado alterações no ganho de peso corporal e renal (Rocha et al., 1995; Peixoto et al., 2003; Roza et al., 2005) dos animais expostos a este metal. No entanto, nós observamos que o menor peso corporal apresentado pelo grupo tratado com mercúrio só foi significativo 24 horas após o término dos tratamentos. O aumento do peso e tamanho dos rins em ratos expostos ao mercúrio pode estar relacionado às alterações estruturais neste órgão causadas pelo mercúrio, como aumento de volume das células dos túbulos proximais (Madsen & Maunsbach, 1981).

Os ratos expostos ao mercúrio podem sofrer alterações no seu metabolismo hepático, uma vez que esses animais apresentaram um aumento em torno de seis vezes da atividade da ALT de fígado, enquanto que a atividade da enzima renal não foi modificada. Esse efeito do mercúrio sobre a atividade da ALT parece estar relacionado a algum tipo de mecanismo metabólico compensatório, tal como o aumento da atividade gliconeogênica (Rosen et al., 1959; Hagopian et al., 2003). Essa hipótese se torna importante quando considerado que a atividade da ALT sérica *in vivo* (Peixoto & Pereira,

2007), bem como a atividade da ALT de soro e fígado *in vitro* (como discutido a seguir) foram inibidas pelo mercúrio.

O estudo de Rosen et al. (1958) mostrou que o aumento da atividade da ALT hepática está relacionado a quatro condições associadas à gliconeogênese: a ingestão de proteínas, diabetes, jejum e tratamento com hidrocortisona. Entretanto, os ratos expostos ao mercúrio não estão incluídos em nenhuma dessas situações metabólicas. Eles eram ratos lactantes e não foram separados de suas mães para indução de privação alimentar.

Na tentativa de esclarecer melhor os resultados mencionados acima, o efeito da exposição ao mercúrio sobre a G6Pase, a última enzima envolvida na via gliconeogênica, foi investigado. Os níveis de glicose e os níveis de glicogênio hepático, renal e muscular também foram analisados para descartar qualquer efeito sobre o armazenamento de glicogênio. Os ratos expostos ao mercúrio apresentaram um aumento na atividade da G6Pase em torno de 75%, sem alteração na enzima renal. Ainda assim, os níveis de glicemia e glicogênio não foram alterados pelo tratamento.

Assim, considerando o aumento da atividade das duas enzimas, ALT e G6Pase de fígado, pode-se sugerir que ratos expostos ao mercúrio apresentam um aumento da gliconeogênese hepática, mas não renal.

O aumento da gliconeogênese no fígado pode estar relacionado a algum fator nutricional, desde que os animais intoxicados por mercúrio sofrem uma diminuição no ganho de peso corporal. Sabe-se que o mercúrio induz efeitos anorexígenos (Counter & Buchaman, 2004), e pode causar alteração na absorção de nutrientes (Sastri et al., 1982; Farmanfarmaiam et al., 1989). Além disso, por inspeção visual, foi possível observar que os ratos expostos ao mercúrio apresentaram menor depósito de gordura e do tamanho do músculo esquelético. A quebra de proteína muscular poderia estar fornecendo aminoácidos para gliconeogênese. De fato, estes animais apresentaram aumento da creatinina e uréia (Peixoto e Pereira, 2007; Franciscato, 2009). Outro fator que aponta para a conclusão de que o HgCl_2 causa uma alteração no metabolismo hepático é o fato de que estas duas enzimas (ALT e G6Pase) hepáticas são inibidas *in vitro* pelo mercúrio. Este efeito oposto (inibição *in*

vitro) demonstra que o efeito verificado *in vivo* (aumento da atividade) não está relacionado a um efeito direto do mercúrio sobre a atividade dessas enzimas e sim a alterações no metabolismo

Os níveis de glicose e conteúdo de glicogênio não foram alterados pela exposição ao mercúrio. Esses parâmetros foram analisados para descartar qualquer efeito sobre o armazenamento de glicogênio. A ausência de efeito sobre esses parâmetros também colabora com a evidência de um aumento da gliconeogênese hepática em ratos expostos ao mercúrio e pode estar mantendo os níveis de glicose sanguínea normais nesses animais. Esses resultados também sugerem que o aumento da atividade da G6Pase no fígado não está relacionado a um aumento da glicogenólise, uma vez que os níveis de glicogênio hepático não foram alterados.

Em relação à exposição ao zinco, foi possível observar que este metal não induz alterações metabólicas nos parâmetros estudados. A ausência de efeitos é importante, uma vez que o zinco foi escolhido por não causar qualquer prejuízo a enzimas estudadas e a parâmetros fisiológicos e ainda previne vários efeitos tóxicos do mercúrio (Peixoto et al., 2003; Peixoto e Pereira, 2007; Franciscato et al., 2009).

O pré-tratamento com zinco preveniu parcialmente o prejuízo no ganho de peso corporal e o aumento do peso renal de ratos expostos ao mercúrio. Ainda, preveniu o aumento da atividade da ALT hepática e parcialmente o aumento da atividade da G6Pase. Estudos têm demonstrado que o efeito preventivo do zinco ocorre em paralelo ao aumento de metalotioneínas em fígado e rim (Peixoto et al., 2003; 2007b) sendo que o fígado é o principal produtor destas (Peixoto et al., 2003, Tandon et al., 2001).

Os resultados *in vitro* demonstraram que quase todas as enzimas (ALT e LDH sérica e hepática e G6Pase hepática e renal) foram inibidas por mercúrio (exceto ALT renal). O efeito inibitório pode estar relacionado a uma interação exclusiva do mercúrio com grupos – SH dessas enzimas. O mercúrio é um reagente típico de grupos sulfidrílicos e sua grande afinidade por esses grupos contribui para a sua toxicidade (Clarkson, 1997).

Dados da literatura têm sugerido que a modificação química de grupos sulfidrílicos das cisteínas estão envolvidos na inativação das atividades da ALT (Vedavathi et al., 2004), LDH (Zheng et al., 2002, 2003) e G6Pase (Clottes et al., 2002). Vedavathi et al. (2004) mostraram que a enzima ALT purificada de fígado de rato é inibida por p-cloro-mercuriobenzoato (pCMB) e cloreto de mercúrio. Alguns trabalhos também utilizando pCMB relataram que a enzima LDH de coração de porco sofre mudanças conformacionais e inativação (Zheng et al., 2002, 2003). A inibição dessa enzima estaria ocorrendo em resposta à presença de resíduos sulfidril que não estão localizados no sítio catalítico da enzima e a oxidação desses grupos leva a uma forma enzimática inativa (Zheng et al., 2003; Abad-Zapatero et al., 1987). A inibição da G6Pase por mercúrio estaria relacionada à ligação do mercúrio a um grupo tiol da enzima diferente da sua porção catalítica voltado para o lado citosólico do RE (Clottes et al., 2002).

Uma vez que, a atividade da LDH *in vitro* foi substancialmente inibida e *in vivo* a atividade da LDH não foi alterada pela exposição ao mercúrio estes resultados sugerem que essa diferença de efeitos pode ser devido ao fato de que os níveis de mercúrio *in vivo* são mais baixos do que aqueles presentes na incubação *in vitro*. Entretanto, diferentemente das enzimas ALT e G6Pase, a LDH não se apresentou aumentada, sugerindo que o piruvato proveniente do lactato via Ciclo de Cori, não seja o principal precursor para a gliconeogênese aumentada no fígado desses animais.

Em relação ao efeito do cloreto de zinco *in vitro* sobre a atividade das enzimas ALT, LDH e G6Pase de diferentes tecidos foi possível observar que esse metal não afeta diretamente a atividade da maioria dessas enzimas. Contudo, inibição sobre a atividade da ALT sérica e hepática foi observada na concentração de 100 μM . Além disso, nós estudamos se a pré-incubação das enzimas com cloreto de zinco poderia modificar o efeito do cloreto de mercúrio sobre a atividade da LDH *in vitro* (dados não mostrados). No entanto, o zinco não alterou o efeito inibitório do mercúrio sobre a atividade dessa enzima. Este resultado mostra que o efeito preventivo do zinco *in vivo* não está relacionado a

um efeito direto deste metal sobre os efeitos do mercúrio. E sim, deve estar relacionado a mecanismos fisiológicos, como discutidos acima.

6. CONCLUSÕES

Observando-se os resultados podemos sugerir que:

1. Os animais expostos ao mercúrio apresentam um aumento da atividade gliconeogênica no fígado, visto que ocorre um aumento da atividade das enzimas ALT e G6Pase, sem alteração da atividade dessas enzimas no rim.

2. O efeito inibitório do mercúrio sobre as atividades das enzimas ALT e LDH sérica e hepática e G6Pase hepática e renal *in vitro* podem estar relacionado às modificações químicas de grupos sulfidrílicos da cisteína, uma vez que o mercúrio tem grande afinidade por esses grupos.

3. O zinco previne, mesmo que em alguns casos parcialmente, os efeitos *in vivo* do mercúrio sobre as alterações metabólicas confirmando seu papel protetor, pois:

a) Reduziu o aumento da ALT hepática *in vivo* para níveis próximos ao controle;

b) Reduziu parcialmente o aumento da G6Pase hepática *in vivo*;

c) Reduziu parcialmente o prejuízo no ganho de peso corporal e o aumento do peso renal.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-ZAPATERO, C.; GRIFFITH, J.P.; SUSSMAN, J.L.; ROSSMANN, M.G. Refined crystal structure of dogfish M4 apo-lactate dehydrogenase. **J. Mol. Biol.**, 198, 445-467, 1987.

ARION, W. J.; WALLIN, B.K.; LANGE, A.J.; BALLAS, L.M. On the involvement of glucose 6-phosphate transport system in the function of microsomal glucose 6-phosphatase. **Mol. Cell. Biochem.**, 6, 75-83, 1975.

AU, D.W.T. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring a review. **Mar. Pollut. Bull.**, 48, 817-834, 2004.

CHAN, J.; HUNG, Z.; MERRIFIELD, M.E.; SALGADO, M.T.; STILLMAN, M.J. Studies of metal binding reactions in metallothioneins by spectroscopic, molecular biology and molecular modelling techniques. **Coord. Chem. Rev.**, 233, 319-339, 2002.

CHERIAN, G.M.; JAYASURYA, A.; BOON-HUAT B. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. **Mut. Res.**, 533, 201-209, 2003.

CLARKSON, T.W. The toxicology of mercury. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, 34, 369-403, 1997.

CLOTTE, E.; BURCHEL, A. Three thiol groups are important for the activity of the liver microsomal glucose-6-phosphatase system. **J. Biol. Chem.**, 31, 19391-19397, 1998.

CLOTTE, E.; MIDDLEDITCH, C.; BURCHELL, A. Rat liver glucose-6-phosphatase system: light scattering and chemical characterization. **Arch. Biochem. Biophys.**, 408, 33-41, 2002.

COUNTER, A.S.; BUCHANAN, L.H. Mercury exposure in children: a review, **Toxicol. Appl. Pharm.**, 198, 209-230, 2004.

DEROSA, G.; e SWICK, R.W. Metabolic implications of the distribution of the alanine aminotransferase isoenzymes. **J. Biol. Chem.**, 250, 7961-7967, 1975.

DEVLIN, T.M. **Textbook of Biochemistry with Clinical Correlation**. 4th ed. New York: Wiley, 1997.

DUNN, M.A.; BLALOK, T.L.; COUSINS, R.J. Metallothionein. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 185, 107-119, 1987.

FARMANFARMAIAM, A.; PUGLIESE, K.A.; SUN, L.Z. Mercury inhibits the transport of D-glucose by the intestinal brush border membrane vesicles of fish. **Mar. Environ. Res.**, 28, 247-251, 1989.

FAFOURNOUX P, RÉMÉSY C, DEMIGNÉ C. Control of alanine metabolism in rat liver by transport processes or cellular metabolism. **Biochem. J.**, 210, 645-652, 1983.

FELIG P. The glucose-alanine cycle. **Metabolism**, 22, 179-207, 1973.

FOWLER, B.A. Mechanisms of kidney cell injury from metals. **Environ. Health Perspect.**, 100, 57-63, 1992.

FRANCISCATO, C., GOULART, F.R., LOVATTO, N.M., DUARTE, F.A., FLORES, E.M.M., DRESSLER, V.L., PEIXOTO, N.C., PEREIRA, M.E. ZnCl₂ exposure protects against behavioral and acetylcholinesterase changes induced by HgCl₂. **Int. J. Dev. Neurosci.**, 27, 439-68, 2009.

FRANCISCATO, C. **Efeitos do zinco sobre alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pelo mercúrio em ratos jovens.** 2009. 101f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

FRANCO, J.L.; BRAGA, H.C.; NUNES, A.K.C.; RIBAS, C.M.; STRINGAR, J.; SILVA, A.P.; POMBLUM, S.C.G.; MORO, A.M.; BOHRER, D.; SANTOS, A.R.S.; DAFRE, A.L.; FARINA, M. Lactational exposure to inorganic mercury: evidence of neurotoxic effects. **Neurotoxicol. Teratol.**, 29, 360-367, 2007.

FRIBERG, L. Studies on the accumulation, metabolism and excretion of inorganic mercury (Hg²⁰³) after prolonged subcutaneous administration to rats. **Acta Farmacol. Toxicol.**, 12, 411-427, 1956.

GOLDMAN, L.R.; SHANNON, M.W. Technical report: mercury in the environment: implications for pediatricians. **Pediatrics**, 108, 197-205, 2001.

GOTTLIEB, A.; KEYDAR, I.; EPSTEIN, H.T. Rodent brain growth stages: An analytical review. **Biol. Neonate**, 32, 166-176, 1977.

GOYER, R.A. Toxic effects of metals. In: KLAASSEN, C.D. (Ed.) **Casarett & Doull's Toxicology: the basic science of poisons.** 5th ed. New York: McGraw-Hill, 1996. Chapter 23, p. 691-736.

HAGOPIAN, K.; RAMSEY, J.J.; WEINDRUCH, R. Caloric restriction increases gluconeogenic and transaminase enzyme activities in mouse liver. **Exp. Gerontol.**, 38, 267-278, 2003.

HIDALGO, J.; ASCHNER, M.; ZATTA, P.; VASÁK, M. Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. **Brain Res. Bull.**, 55, 133-145, 2001.

JADHAO, S.B.; YANG, R.Z.; LIN, Q.; HU, H.; ANANIA, F.A.; SHULDINER, A.R.; GONG D.W. Murine alanine aminotransferase: cDNA cloning, functional

expression, and differential gene regulation in mouse fatty liver. **Hepatology**, 39, 1297-1302, 2004.

KANEKO, J.J.; HARVEY, V.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 5th ed., San Diego: Academic Press, 1997.

KLAASSEN, C.D. Heavy metals and heavy-metals antagonists. In HARDMAN, J.G.; GIMAN, A.G.; LIMBIRD, L.E. (Eds). **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9th ed. New York: McGraw-Hill, 1996. Chapter 66, p. 1649-1671.

KOPPERSCHANGER, G.; KIRCHBERGER, J. Methods for the separation of lactate dehydrogenases and clinical significance of the enzyme. **J. Chromat. B: Biomed. Appl.**, 684, 25-49, 1996.

KOSTIAL, K.; KELLO, D.; JUGO, S.; RABAR, I.; MALJKOVIK, T. Influence of age on metal metabolism and toxicity. **Environ. Health Perspect.**, 25, 81-86, 1978.

KUMAR, M.; SHARMA, M.K.; KUMAR, A. *Spirulina fusiformis*: A food supplement against mercury induced hepatic toxicity. **J. Health Sci.**, 51, 424-430, 2005.

LACERDA, L.D.; PFEIFFER, W.C. Mercury from gold mining in the amazon environmental – an overrview. **Quim. Nova**, 15, 155-160, 1992.

LACERDA, L. D.; MARINS, R. V. Anthropogenic mercury emissions to the atmosphere in Brazil: The impact of gold mining. **J. Geochem. Explor.**, 58, 223-229, 1997.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**, 4^a ed., São Paulo: Sarvier, 2006.

LESKES, A.; SIEKEVITZ, P.; PALADE, G.E. Differentiation of endoplasmic reticulum in hepatocytes. II. Glucose-6-Phosphatase in Rough Microsomes. **J. Biol. Chem.**, 49, 264-287, 1971.

LIU, L.; ZHONG, S.; YANG, R.; HU, H.; YU, D.; ZHU, D.; HUA, Z.; SHULDINER, A.R.; GOLDSTEIN, R.; REAGAN, W.J.; GONG, D.W. Expression, purification, and initial characterization of human alanine aminotransferase (ALT) isoenzyme 1 and 2 in High-five insect cells. **Protein Expr. Purif.**, 60, 225-231, 2008.

MADSEN, K.M.; MAUNSBACH, A.B. Effects of chronic mercury exposure on the rat kidney cortex as studied morphometrically by light and electron microscopy. **Virchows Arch. –B. Cell Pathol.**, 37, 137-152, 1981.

MATHIE, A.; SUTTON, G.L.; CLARK, C.E.; VEALE, E.L. Zinc and copper: pharmacological probes and endogenous modulators of neuronal excitability. **Pharmacol. Ther.**, 111, 567-583, 2006.

MENGEL, H.; KARLOG, O. Studies on the interaction and distribution of selenite, mercuric, methoxyethyl mercuric and methyl mercuric chloride in rats. I. Analysis of brain, liver, kidney and faeces. **Acta Pharmacol. Toxicol.**, 46, 14-24, 1980.

MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J. **Veterinary laboratory medicine, interpretation & diagnosis**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1992.

NIELSEN, J.B.; ANDERSEN, O. Oral mercuric chloride exposure in mice: effects of dose on intestinal absorption and relative organ distribution. **Toxicology**, 59, 1-10, 1989.

NIELSEN, J.B.; ANDERSEN, O. Disposition and retention of mercuric chloride in mice after oral and parenteral administration. **J. Toxicol. Environ. Health**, 30, 167-180, 1990.

NIES A.S.; SPIELBERG, S.P. Principles of therapeutics. In: HARDMAN, J.G.; GILMAN, A.G.; LIMBIRD, L.E. (Eds). **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9th ed. New York: McGraw-Hill, 1996. Chapter 3, p. 34-63.

NORDLIE R. C.; FOSTER, J.D.; LANGE, A.J. Regulation of glucose production by the liver. **Annu. Rev. Nutr.**, 19, 379-406, 1999.

OZUAH, P.O. Mercury poisoning. **Curr. Probl. Pediatr.**, 30, 91-99, 2000.

PEIXOTO, N.C.; KRATZ, C.P.; ROZA, T.; MORSCH, V.M.; PEREIRA, M.E. Effects of HgCl₂ on porphobilinogen-synthase (E.C. 1.2.1.24) activity and on mercury levels in rats exposed during different precocious periods of postnatal life. **Cell Biol. Int.**, 31, 1057-1062, 2007c.

PEIXOTO, N.C.; PEREIRA, M.E. Effectiveness of ZnCl₂ in protecting against nephrotoxicity induced by HgCl₂ in newborn rats. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 66, 441-446, 2007.

PEIXOTO, N.C.; ROCHA L.C.; MORAES, D.P.; BEBIANNO, M.J., DRESSLER, V.L.; FLORES, E.M.M.; PEREIRA, M.E. Changes in levels of essential elements in suckling rats exposed to zinc and mercury. **Chemosphere**, 72, 1327-1332, 2008.

PEIXOTO, N.C.; ROZA, T.; FLORES, E.M.M.; PEREIRA, M.E. Effects of zinc and cadmium on HgCl₂- δ -ALA-D inhibition and Hg levels in tissues of suckling rats. **Toxicol. Lett.**, 146, 17-25, 2003.

PEIXOTO, N.C.; ROZA, T.; MORSCH, V.M.; PEREIRA, M.E. Behavioral alterations induced by HgCl₂ depend on the postnatal period of exposure. **Int. J. Dev. Neurosci.**, 25, 39-46, 2007a.

PEIXOTO, N.C.; SERAFIM, M.A.; FLORES, E.M.M.; BEBIANNO, M.J.; PEREIRA, M.E. Metallothionein, zinc and mercury levels in tissues of young rats exposed to zinc and subsequently to mercury. **Life Sci.**, 81, 1264-1271, 2007b.

PENG L.; SCHOUSBOE, L.; HERTZ, L. Utilization of alpha -ketoglutarate as a precursor for transmitter glutamate in cultured cerebellar granule cells. **Neurochem. Res.**, 16, 29-34, 1991.

PEREIRA, M.E.; MORSCH, V.M.; CHRISTOFARI, R.S.; ROCHA, J.B.T. Methyl mercury exposure during post-natal brain growth alters behavioral response to SCH 23390 in young rats. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 63, 256-262, 1999.

PHILLIPS, D.; BLAKE, C.C.F.; WATSON, H.C. The enzyme of glycolysis: structure, activity and evolution. **Philos Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, 293, 1-214, 1981.

PINHEIRO, M.C.N.; NAKANISHI, J.; OIKAWA, T.; GUIMARÃES, G.; QUARESMA, M.; CARDOSO, B.; AMORAS, W.W.; HARADA, M.; MAGNO, C.; VIEIRA, J.L.F.; XAVIER, M.B.; BACELAR, D.R. Exposição humana ao metilmercúrio em comunidades ribeirinhas da Região do Tapajós, Pará, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 33, 265-269, 2000.

RÉMÉSY, C.; DEMIGNÉ, C.; AUFÈRE, J. Inter-organ relationships between glucose, lactate and amino acids in rats fed on high-carbohydrate or high-protein diets. **Biochem. J.**, 170, 321-329, 1978.

RICE, D.C.; GILBERT, S.G. Effects of developmental methylmercury exposure or lifetime lead exposure on vibration sensitivity functions in monkeys. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 134, 161-169, 1995.

ROCHA, J.B.T.; FREITAS, A.J.; MARQUES, M.B.; PEREIRA, M.E.; EMANUELLI, T.; SOUZA, D.O. Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on negative geotaxis and on deltaaluminolevulinatase of of suckling rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 26, 1077-1083, 1993.

ROCHA J.B.T.; PEREIRA M.E.; EMANUELLI, T.; CHRISTOFARI R.S.; SOUZA D.O. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on δ-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. **Toxicology**, 100, 27-37, 1995.

ROONEY, J.P.K.. The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. **Toxicology**, 234, 145-156, 2007.

ROSEN, F; ROBERTS, NR; NICHOL, CA. Glucocorticosteroids and transaminase activity. I. Increased activity of glutamic-pyruvic transaminase in four conditions associated with gluconeogenesis. **J. Biol Chem.**, 34, 476-480, 1958.

ROZA T., PEIXOTO N.C., WELTER A., FLORES E.M.M., PEREIRA M.E., 2, 3-Dimercapto-1-propanol does not alter the porphobilinogen synthase inhibition but decreases the mercury content in liver and kidney of sucking rats exposed to HgCl₂. **Bas. Clin. Pharmacol. Toxicol.**, 96, 302-308, 2005.

SAKAMOTO, M.; NAKANO, A.; KAJIWARA, Y.; NARUSE, Y., FUJISAKI, T. Effects of methyl Mercury in postnatal developing rats. **Environ. Res.**, 61, 43-50, 1993.

SAKAMOTO, M. AND NAKANO, A. Comparision of mercury accumulation among the brain, liver, kidney, and the brain regions of rats administered methylmercury in various postnatal development. **Environ. Contan. Toxicol.**, 55, 588-596, 1995.

SALGADO, P.E.T. Toxicologia dos Metais, In: OGA, S. **Fundamento de Toxicologia**, São Paulo: Editora Atheneu, 1996.

SASTRY, KV; RAO, DR; SINGH, SK. Mercury induced alterations in the intestinal, absorption of nutrients in the fresh water murrel, *Channa punctatus*. **Chemosphere**, 11, 613-619, 1982.

SCHAFTINGEN, V.E. e GERIN, I. The glucose-6-phosphatase system. **Biochem. J.**, 362, 513-532, 2002.

SMITH, M.A.; ACOSTA D. Development of primary culture system of rat kidney cortical cells to evaluate nephrotoxicity of xenobiotics. **Food Chem. Toxicol.**, 24, 551-556, 1986.

STRYER, L. **Bioquímica**, 4^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

SZÁSZ, A.; BARNA, B.; GAJDA, Z.; GALBÁCS, G.; KIRSCH-VOLDERS, M.; SZENTEM. Effects of of continuous low-dose exposure to organic and inorganic mercury during on epileptogenicity in rats. **Neurotoxicology**, 23, 197-206, 2002.

TANDON, S.K.; SINGH, S.; PRASAD, S.; MATHUR, N. Hepatic and renal metallothionein induction by an oral equimolar dose of zinc, cadmium or mercury in mice. **Food Chem. Toxicol.**, 39, 571-577, 2001.

UNEP. United Nations Environment Programme: Chemicals. **Global Mercury Assessment**, Geneva. 2002.

VALLEE B.L. The function of metallothionein. **Neurochem. Int.**, 27, 23-33, 1995.

VALLEE, B.L.; AULD, D.S. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins, **Biochemistry**, 29, 5647 - 5659, 1990.

VAHTER, M.; MOTTER, M.K.; FRIBERG, L.; LIND, B.; SHEN, D.D.; BURBACHER, T. Speciation of Mercury in the primate blood and brain following long-term exposure to methyl mercury. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 124, 221-229, 1994.

VEDAVATHI, M; GIRISH, KS; KUMAR, MK. Isolation and characterization of cytosolic alanine aminotransferase isoforms from starved rat liver. **Mol. Cell. Biochem.**, 267, 13-23, 2004.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.

WALSH, C.T. The influence of age on the gastrointestinal absorption of Mercury chloride and methyl mercury chloride in the rat. **Environ. Res.**, 27, 412-420.

WASSERMAN, J.C.; HACON, S.; WASSERMAN, M.A. Biogeochemistry of mercury in the Amazonian environment. **Ambio**, 32, 336-342, 2003.

WHO- World Health Organization. **Inorganic mercury**. Geneva, Environmental Health Criteria 118, p. 168. 1991.

YANG, R.Z.; BLAILEANU, G.; HANSEN, B.C.; SHULDINER, A.R.; GONG, D.W. cDNA cloning, genomic structure, chromosomal mapping, and functional expression of a novel human alanine aminotransferase. **Genomics**, 79, 445-450, 2002.

ZHENG, Y.B.; WANG, Z.; CHEN, B.Y.; WANG, X.C. Multiple effects of chemical reagent on enzyme: o-phthalaldehyde-induced inactivation, dissociation and partial unfolding of lactate dehydrogenase from pig heart. **Int. J. Biol. Macromol.**, 32, 191-197. 2003.