



UFSM

Dissertação de Mestrado
EFEITO DE ANTIOXIDANTES SOBRE OS NÍVEIS DE
METALOTIONEÍNAS EM CAMUNDONGOS TRATADOS
COM CLORETO DE MERCÚRIO

Ricardo Brandão

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**EFEITO DE ANTIOXIDANTES SOBRE OS NÍVEIS DE
METALOTIONEÍNAS EM CAMUNDONGOS TRATADOS
COM CLORETO DE MERCÚRIO**

por

Ricardo Brandão

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

Mestre em Bioquímica Toxicológica.

Santa Maria, RS, Brasil

2006

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, pelo apoio, empenho e principalmente incentivo para comigo;

À professora Cristina, minha orientadora, por sua grande dedicação ao trabalho;

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, em especial aos professores Gilson Zeni, Félix Soares e João Batista Teixeira da Rocha e suas respectivas equipes, pela colaboração;

Ao professor Marcelo Farina por todo o incentivo;

Aos meus colegas de laboratório, os quais não poderia deixar de citar: Francielli e Renata (parceiras de alguns trabalhos), Vanessa, Lucielli, Eluza, Alexandre, Simone W., Lysandro, Nilda, Cristiane, Marina, Cristiano, Daniele, Simone P., Gabrielli, Ethel, Ana, Larissa e Gustavo;

À professora Denise Bohrer e sua equipe pela contribuição;

Agradeço a todos os funcionários da UFSM, especialmente a Angélica, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

Agradeço também ao Rinaldo pela sua prestatividade.

À CAPES, pelo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho.

RESUMO

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

EFEITO DE ANTIOXIDANTES SOBRE OS NÍVEIS DE METALOTIONEÍNAS EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM CLORETO DE MERCÚRIO

AUTOR: Ricardo Brandão

ORIENTADORA: Cristina Wayne Nogueira

DATA E LOCAL DA DEFESA: Santa Maria, fevereiro de 2006.

Neste trabalho foram avaliados os efeitos da intoxicação aguda induzida por cloreto de mercúrio (HgCl_2) em sangue, rim e fígado de camundongos. Os animais receberam uma única dose de HgCl_2 (4,6 mg/Kg de peso), via subcutânea, por três dias consecutivos. Investigou-se o possível efeito protetor da terapia com antioxidantes (N-acetilcisteína-NAC e disseleneto de difenila-(PhSe)₂) comparando ao ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfônico (DMPS), um agente quelante efetivo contra intoxicações por mercúrio. Além disto, foi verificado se a indução de metalotioneínas (MT) poderia estar envolvida em um possível mecanismo de proteção contra a intoxicação pelo mercúrio e se as diferentes terapias poderiam modificar os níveis de MT e outros parâmetros toxicológicos. Os resultados demonstraram que os animais tratados com cloreto de mercúrio apresentaram uma redução no ganho de peso corporal e as terapias não foram efetivas em reverter este dano. A exposição ao HgCl_2 causou inibição na atividade da enzima δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) em fígado de camundongos e somente a terapia com DMPS foi efetiva em reverter esta inibição. Os animais tratados com mercúrio apresentaram um aumento nos níveis de NPSH renal e as terapias não modificaram estes níveis. A concentração de uréia foi aumentada nos animais expostos ao cloreto de mercúrio. A terapia com NAC + (PhSe)₂ foi parcialmente efetiva em proteger contra este efeito do mercúrio. Já as terapias com DMPS e (PhSe)₂ foram efetivas em proteger contra o aumento nos níveis de uréia induzido pelo mercúrio. As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), os níveis de ácido ascórbico e as transaminases (aspartato-AST e alanina-ALT) não foram alteradas após a exposição ao HgCl_2 . Além disso, os resultados demonstraram que a exposição ao mercúrio causou um aumento nos níveis de metalotioneínas hepático e renal e as terapias com antioxidantes não modificaram este parâmetro. Nossos dados apontam para a falta de efeito terapêutico dos antioxidantes testados.

Palavras-chave: cloreto de mercúrio, disseleneto de difenila, metalotioneínas, ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfônico, N-acetilcisteína.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EFFECT OF ANTIOXIDANTS ON METALLOTHIONEIN LEVELS IN MICE TREATED WITH MERCURIC CHLORIDE

AUTHOR: Ricardo Brandão

ADVISOR: Cristina Wayne Nogueira

DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: Santa Maria, 2006

In this study, acute effects of mercury on mouse blood, kidneys and liver were evaluated. Mice received a single dose of mercuric chloride (HgCl_2 - 4.6 mg/kg, subcutaneously) for three consecutive days. We investigated the possible beneficial effects of antioxidant therapy (N-acetylcysteine (NAC) and diphenyl diselenide (PhSe_2)) comparing to sodium salt of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS), an effective chelating agent on mercury exposure in mice. We also verified if metallothionein (MT) induction would be involved in a possible mechanism of protection against mercury poisoning and if different therapies would modify MT levels and other toxicological parameters. The results demonstrated that animals treated with mercuric chloride presented a reduction in the body weight gain and therapies did not were effective in reverting this damage. HgCl_2 exposure inhibited δ -aminolevulinic dehydratase (δ -ALA-D) activity in liver and only DMPS treatment prevented the inhibitory effect. Animals treated with mercury presented an increase in renal NPSH and therapies did not modify these levels. Urea concentration was increased after mercury exposure. NAC plus PhSe_2 was partially effective in protecting against this effect of mercury. DMPS and PhSe_2 were effective in restoring the increment in urea concentration caused by mercury. Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), ascorbic acid levels, aspartate (AST) and alanine (ALT) aminotransferases were not modified after mercury exposure. Moreover, mercury poisoning caused an increase in hepatic and renal MT levels and antioxidant therapies did not modify this parameter. Our data pointed out the lack of the therapeutic effect of antioxidants tested.

Key words: mercuric chloride, diphenyl diselenide, metallothionein, 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid, N-acetylcysteine.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

- Figura 1:** Condensação assimétrica de 2 moléculas do ALA, catalisada pela enzima δ -aminolevulinato desidratase 8
- Figura 2:** Estrutura do ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfônico (DMPS) 15
- Figura 3:** Estrutura da N-acetilcisteína 17
- Figura 4:** Estrutura do Disselento de Difenila ((PhSe)₂) 20

Artigo

- Figura 1:** Effect of (PhSe)₂, NAC or DMPS on δ -ALA-D activity in liver of mice exposed to mercuric chloride 51
- Figura 2:** Effect of (PhSe)₂, NAC or DMPS on non-protein thiol groups content in kidney of mice exposed to mercuric chloride 52

LISTA DE TABELAS**Artigo**

Tabela 1 – Effect of acute exposure to mercuric chloride and (PhSe) ₂ , NAC or DMPS on mice body weight gain	40
Tabela 2 - Effect of acute exposure to mercuric chloride and (PhSe) ₂ , NAC or DMPS on AST and ALT activities and urea levels in mice plasma	41
Tabela 3 – Hepatic and renal metallothionein concentration after mercuric chloride administration in mice	42

LISTA DE ABREVIATURAS

δ -ALA – ácido 5'-aminolevulínico ou ácido delta-aminolevulínico

ALT – alanina aminotransferase

AST – aspartato aminotransferase

ANOVA – análise de variância

BAL – 2,3-dimercaptopropanol, dimercaprol

CAT – catalase

δ -ALA-D - delta-aminolevulinato desidratase ou porfobilinogênio sintase

DMPS – ácido 2,3-dimercaptopropano 1-sulfônico

DMSA – ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico

DMSO – dimetilsulfóxido

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

EROs – espécies reativas de oxigênio

GPx – glutathione peroxidase

GR – glutathione reductase

GSH – glutathione reduzida

MDA - malondialdeído

MT- metalotioneína

NAC – N-acetilcisteína

NPSH – tióis não-protéicos

PBG - porfobilinogênio

S.E.M – erro médio padrão

SOD – superóxido dismutase

TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
APRESENTAÇÃO	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 – Toxicologia dos metais	3
2.1.1 – Aspectos gerais	3
2.1.2 – Mercúrio	4
2.1.2.1 – Absorção, distribuição e excreção	5
2.1.2.2 – Toxicidade	6
2.2 – Enzima δ- ALA-D	7
2.2.1 – Histórico e função	7
2.2.2 – Características estruturais	9
2.2.3 – Importância toxicológica	10
2.3 – Metalotioneinas (MT)	10
2.4 – Agentes quelantes	12
2.4.1 – Aspectos gerais	12
2.4.2 – DMPS	14
2.5 – Agentes antioxidantes	15
2.5.1 – Aspectos gerais	15
2.5.2 – N-acetilcisteína (NAC)	16
2.5.3 – Selênio	17
2.5.3.1 – Disseleneto de difenila	18
3. OBJETIVOS	21
4. ARTIGO CIENTÍFICO	22

4.1 - Antioxidants and Metallothionein levels in Mercury-Treated Mice	23
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÕES	57
7. PERSPECTIVAS	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
9. ANEXOS	78
9.1- Demais trabalhos desenvolvidos durante o Curso de Mestrado	78

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual encontra-se no item **ARTIGO CIENTÍFICO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo e representam à íntegra deste estudo.

Os itens **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, DISCUSSÃO e CONCLUSÕES** desta dissertação.

1. INTRODUÇÃO

Os metais pesados são alguns dos principais contaminantes encontrados no meio ambiente. Estes metais têm amplo emprego industrial, constituindo uma das principais formas de intoxicação ocupacional (Salgado, 1996). Tais metais exercem seus efeitos tóxicos combinando-se a grupos reativos, como os grupos sulfidrilas (-SH), os quais são essenciais para as funções fisiológicas normais. Dentre os metais de maior preocupação estão o chumbo, o mercúrio, o arsênico e o cádmio (Klaassen, 1996).

O mercúrio é considerado um dos principais metais tóxicos, devido ao seu elevado uso industrial, sendo de grande importância na exposição ocupacional e na poluição ambiental (Boischio e Henshel, 1996; Klaassen, 1996). Sabe-se que o mercúrio pode causar diversos prejuízos ao organismo, afetando os sistemas nervoso, renal e hepático (Larini et al., 1997).

Este metal possui grande afinidade por grupos -SH de biomoléculas endógenas (Clarkson, 1997). Desta forma, sistemas enzimáticos essenciais, como a enzima sulfidrídica δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), podem ter suas atividades inibidas pela ação do mercúrio (Rocha et al., 1995; Emanuelli et al., 1996).

O estresse oxidativo também pode ser observado em intoxicações pelo mercúrio. A peroxidação lipídica pode ser verificada após exposição ao metal, sendo detectada através do aumento na concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Huang et al., 1996; Hoffman e Heinz, 1998; El-Demerdash, 2001). Desta forma, acredita-se que a terapia por meio de agentes antioxidantes possa ser efetiva em proteger contra os danos causados pelo cloreto de mercúrio.

São diversos os antioxidantes utilizados na tentativa de reverter danos teciduais devido ao estresse oxidativo. A N-acetilcisteína, a qual contém grupos tíois em sua estrutura, é um antioxidante bastante utilizado em condições de estresse oxidativo (Aruoma et al., 1989). Além disto, sabe-se que compostos de

selênio, como o disseleneto de difenila (PhSe)₂, possuem ação antioxidante em ratos e camundongos (Meotti et al., 2004)

A forma mais efetiva de tratamento contra intoxicações com metais consiste na utilização de agentes quelantes (Flora e Kumar, 1993). São exemplos de agentes quelantes, o ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfônico (DMPS, Dimaval®) e o ácido *meso*-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA, Succimer®), os quais são menos tóxicos e possivelmente, mais efetivos do que outros agentes quelantes no tratamento destas intoxicações (Aposhian et al., 1995).

Considerando os aspectos acima mencionados, o presente estudo visa estudar os efeitos *in vivo* do cloreto de mercúrio em camundongos, bem como da terapia com agentes antioxidantes (NAC e (Phse)₂) e um agente quelante de referência (DMPS).

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Toxicologia dos metais

2.1.1- Aspectos gerais

Diversos metais, como o ferro, o zinco, o magnésio, o manganês e o selênio são considerados essenciais, pois são nutrientes requeridos por muitos organismos. Entretanto, sabe-se que estes metais essenciais, dependendo de suas concentrações, podem apresentar efeitos tóxicos em determinados organismos (Kabata-Pendias e Pendias, 1993). Outros metais, como mercúrio, alumínio, chumbo e cádmio, não são essenciais para os seres vivos, podendo causar efeitos tóxicos nos organismos expostos a estes elementos (Bruins et al., 2000). Sabe-se que estes metais pesados são amplamente encontrados em nosso ambiente e que os seres humanos são expostos a tais metais a partir de inúmeras fontes, incluindo o ar, a água, o solo e os alimentos (Miller, 1998).

Os metais pesados talvez sejam os agentes tóxicos mais conhecidos do homem. Há 2000 a.C., quando abundantes quantidades de chumbo eram obtidas de minérios, provavelmente, tenha sido o início da utilização deste metal pelo homem. Arsênico e mercúrio foram citados por Teofrastos de Erebus (387-372 a.C.) e por Plínio, o Velho (23-79 d.C.). Mais tarde, em 1815, o cádmio foi descoberto em minérios contendo carbonato e zinco (Salgado, 1996).

A toxicidade decorrente da exposição a metais pesados pode ser devida ao deslocamento de metais essenciais de seus sítios de ligação ou devida a interações químicas com biomoléculas endógenas, como os grupos -SH. Os efeitos tóxicos geralmente resultam da alteração da estrutura de ácidos nucleicos e proteínas, interferência com o processo de fosforilação oxidativa e balanço osmótico, além de favorecerem o aparecimento do estresse oxidativo (Hughes e Poole, 1989).

O acúmulo de metais pesados no organismo humano representa um risco significativo para a saúde, levando a uma grande variedade de patologias, como a

anemia, o câncer, a insuficiência renal crônica, a hipertensão, a gota, a infertilidade masculina, a gengivite, entre outros (Miller, 1998).

Os mecanismos moleculares pelos quais os metais tóxicos causam seus efeitos ainda não estão totalmente esclarecidos. Porém, sabe-se que a elevada toxicidade dos metais pesados está associada, ao menos em parte, aos seus efeitos pró-oxidantes e, conseqüentemente, as suas capacidades de contribuir para a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o radical hidroxil (HO), o radical superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O aumento da produção de EROs pode resultar na extensiva diminuição das defesas antioxidantes, resultando em uma condição conhecida como estresse oxidativo (Quig, 1998).

2.1.2- Mercúrio

O mercúrio é um metal obtido principalmente a partir do minério cinábrio. Este metal é responsável pelas exposições ocupacionais que ocorrem na produção de cloro, soda cáustica, equipamentos elétricos e eletrônicos (baterias, retificadores, relés, interruptores), aparelhos de controle (termômetros, barômetros, esfigonômetros), tinta látex, amálgamas dentárias, fungicidas, herbicidas, lâmpadas de mercúrio, entre outros (Salgado, 1996; Broussard et al., 2002).

As três principais formas químicas de mercúrio encontradas em nosso ambiente são o vapor de mercúrio (mercúrio elementar), mercúrio inorgânico e compostos orgânicos do metal (Klaassen, 1996).

A população em geral está primariamente exposta ao mercúrio inorgânico, através das amálgamas dentárias, sendo os dentistas e seus auxiliares o grupo de maior risco de exposição (Brune e Evje, 1985). Dependendo do nível de contaminação, o ar e a água também podem se tornar importantes fontes de exposição ao metal. O uso de combustíveis de origem fóssil pode aumentar os níveis de mercúrio no ar (Vimy e Lorscheider, 1985). Industrialmente, a forma inorgânica do metal é utilizada em certos tipos de baterias e como componente de

lâmpadas fluorescentes (Clarkson, 1997). Outras áreas de uso industrial do metal incluem a fabricação de plásticos, fungicidas e germicidas (Klaassen, 1996). Sabe-se também que a alta pressão de vapor de mercúrio metálico tem sido responsável por muitos casos de intoxicação por inalação. Além disso, a alimentação também contribui para a contaminação pelo mercúrio, através da ingestão de peixes que acumulam o metil-mercúrio, uma forma orgânica do metal (Who, 1990).

2.1.2.1- Absorção, distribuição e excreção

A principal via de penetração do mercúrio no organismo humano é a via pulmonar, devido à exposição a vapores ou partículas de mercúrio. Sob condições normais de ventilação pulmonar, a absorção dos vapores de mercúrio corresponde à cerca de 80% da sua concentração total no ambiente (Larini et al., 1997). Em menor proporção, a absorção ocorre pela via dérmica (Salgado et al., 1996). O mercúrio elementar, após ser absorvido, é parcialmente oxidado a mercúrio iônico nos eritrócitos e nos tecidos. O mercúrio inorgânico distribui-se na corrente sanguínea, concentrando-se mais no plasma que nos eritrócitos. Já as formas orgânicas, lipossolúveis, concentram-se nos eritrócitos (Salgado et al., 1996).

Os principais sítios de deposição de mercúrio no organismo são os rins e o cérebro para o mercúrio elementar, os rins para o mercúrio inorgânico e o cérebro para os organomercuriais (Salgado et al., 1996). Taxas menores de mercúrio são acumuladas no fígado, pulmão, coração, baço e intestino (Larini et al., 1997).

A excreção dos compostos de mercúrio se dá principalmente pelas vias fecal e urinária (Larini et al., 1997). A eliminação pelos túbulos proximais é seguida por parcial reabsorção nos túbulos distais. A filtração glomerular é prejudicada em razão da formação de complexos Hg-proteínas. Já a eliminação fecal dos compostos mercuriais ocorre principalmente por via biliar (Salgado et al., 1996). O mercúrio é também excretado na saliva, suor e leite (Larini et al., 1997).

2.1.2.2- Toxicidade

Sabe-se que o mercúrio pode causar vários danos ao organismo, como danos ao sistema reprodutivo (Underwood, 1977; Anderson et al., 1992), ao sistema hepático (Huang et al., 1996), ao sistema nervoso (Lorscheider et al., 1995) e ao sistema renal (Perottoni et al., 2004), sendo este último o alvo primário do metal (Emanuelli et al., 1996; Clarkson, 1997). Segundo alguns autores, a exposição ao mercúrio também pode estar relacionada com a indução de hemólise e isto parece ser devido aos efeitos pró-oxidantes do metal (Zolla et al., 1997; Brandão et al., 2005).

O mercúrio inorgânico possui grande afinidade por grupos -SH de biomoléculas endógenas (Clarkson, 1997). Deste modo, ele pode se complexar com estruturas que contêm estes grupos sulfidrilas, como a cisteína e a glutatona (Zalups, 2000) e também com as metalotioneínas (Yoshida et al., 1999), que são proteínas de baixo peso molecular que podem se complexar tanto com metais essenciais (zinco e cobre) como com metais pesados (mercúrio, arsênico e cádmio) (Foulkes, 1982).

A enzima sulfidrídica δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) pode ter sua atividade inibida pela ação do mercúrio (Rocha et al., 1995; Emanuelli et al., 1996; Perottoni et al., 2004). A inibição desta enzima reduz a síntese do grupamento heme e causa acúmulo do substrato, o ácido δ -aminolevulínico (δ -ALA), que possui atividade pró-oxidante (Bechara et al., 1993; Emanuelli et al., 2001). Farina et al. (2003), entretanto, relataram que a exposição aguda ao cloreto de mercúrio não altera a atividade da δ -ALA-D em fígado e rim de camundongos 24 e 48 horas após exposição ao metal.

O estresse oxidativo é bastante observado em intoxicações pelo mercúrio (Huang et al., 1996; Hoffman e Heinz, 1998; El-Demerdash, 2001). Segundo relatos, o mercúrio estimula a lipoperoxidação por aumentar a formação de hidroperóxido (H_2O_2) na mitocôndria (Lund et al., 1991). Esta geração de radicais livres também pode ser responsável por danos ao ácido desoxirribonucléico (DNA) e pela depleção dos grupos -SH de moléculas endógenas (Lund et al., 1991;

1993). Além disto, vários estudos têm demonstrado que a geração de radicais livres pelo mercúrio pode comprometer a função renal, diminuindo a taxa de filtração glomerular (Yoshioka e Ichikawa, 1989).

Além da geração de radicais livres, tem sido demonstrado que o mercúrio inibe a atividade de diversas enzimas antioxidantes (enzimas “scavengers” de radicais livres), como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) (Benov et al., 1990), que podem proteger contra danos celulares, injúria tecidual, câncer e numerosas patologias relacionadas com a idade (Hussain et al., 1999). A exposição ao mercúrio pode, também, reduzir as defesas antioxidantes não-enzimáticas, como a vitamina C (Perottoni et al., 2004) e a glutathione (GSH) (Zalups et al., 2000).

Conforme descrito acima, o mercúrio pode causar lipoperoxidação, devido à formação de radicais livres e pode, ainda, reduzir as defesas antioxidantes do organismo. Entretanto, alguns resultados controversos são encontrados na literatura. Farina et al. (2003) demonstraram que a exposição aguda ao cloreto de mercúrio não causou aumento na lipoperoxidação em fígado e rim de camundongos 6, 12, 24 e 48 horas após exposição ao metal. De fato, nós demonstramos, em um estudo anterior, que a exposição aguda ao cloreto de mercúrio não causou alteração nos níveis de TBARS em fígado e rim de camundongos 24 horas após a exposição ao metal (Brandão et al., 2006). Além disto, Hussain et al. (1999) demonstraram que o cloreto de mercúrio, administrado em camundongos, ao invés de reduzir as defesas antioxidantes, causava uma elevação nas atividades da SOD e GPx e na concentração de GSH.

2.2- Enzima δ -ALA-D

2.2.1- Histórico e função

Isolada nos anos 50 (Gibson et al., 1955), a metalo-proteína citoplasmática δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D, E.C. 4.2.1.24), também conhecida como porfobilinogênio sintase ou 5-aminolevulinato hidrolase é a enzima que catalisa a

condensação assimétrica de duas moléculas de ácido delta-aminolevulínico (ácido 5-aminolevulínico, ALA), com perda de 2 moléculas de água, para formar o composto monopirrólico porfobilinogênio (PBG) (figura 1) (Jaffe, 2004). Esta reação catalisada pela δ -ALA-D faz parte da rota biossintética dos compostos tetrapirrólicos (corrinas, bilinas, clorofilas e hemes), sendo esta via biossintética semelhante em bactérias, vegetais e animais (Rodrigues, 1989). Nos mamíferos, os tecidos que apresentam maior atividade desta enzima são o hepático, o renal e os tecidos hematopoiéticos (Gibson et al., 1955).

Os compostos tetrapirrólicos têm importância metabólica baseada, principalmente, na sua função como grupos prostéticos de proteínas. O heme (ferroprotoporfirina), por exemplo, faz parte da estrutura de proteínas que participam do transporte e armazenamento de oxigênio (hemoglobina e mioglobina, respectivamente); do transporte de elétrons (citocromos a, b e c); da biotransformação de xenobióticos (citocromo P450) e do sistema de proteção contra peróxidos (catalases e peroxidases) (Timbrell, 1991).

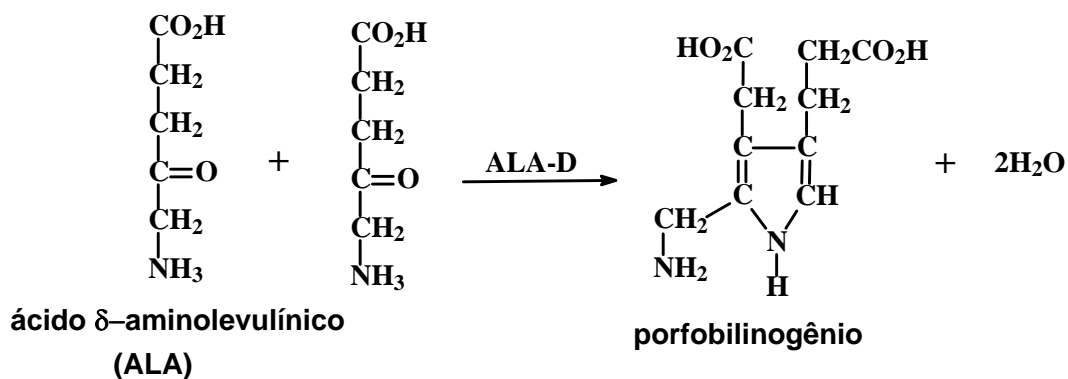


Figura 1: Condensação assimétrica de 2 moléculas do ALA, catalisada pela enzima δ -aminolevulinato desidratase.

2.2.2 Características estruturais

A δ -ALA-D, independente da sua fonte, é uma enzima sulfidrídica (Bevan et al., 1980), sendo, portanto, inibida por agentes bloqueadores de grupos sulfidrídicos, tais como N-etilmaleimida, iodoacetato (Jordan et al., 1976; Barnard et al., 1977), para-cloromercúriobenzoato, monoiodoacetamida e DTNB (Barreiro, 1967; Barnard et al., 1977; Tamai et al., 1979) e por metais pesados que possuam elevada afinidade por grupamentos sulfidrídicos, como o chumbo, o cobre e o mercúrio (Gibson et al., 1955; Rocha et al., 1995; Emanuelli et al., 1996).

A maioria das enzimas δ -ALA-D isoladas até o momento requer um íon metálico bivalente para estarem ativas, mas, dependendo de sua fonte, requerem metais diferentes para sua ativação. A δ -ALA-D, de animais, leveduras e bactérias, é dependente de zinco (Chen e Neilands, 1973; Finelli et al., 1974), sendo também demonstrado que resíduos de cisteína da proteína estão envolvidos na união deste metal (Dent et al., 1990; Spencer e Jordan, 1994). Por outro lado, a enzima proveniente de vegetais, apesar de possuir uma similaridade de 35-50 % com a de outras fontes, não requer zinco, mas sim magnésio (Shibata e Ochiai, 1977; Tamai et al., 1979). A região rica em cisteína presente na enzima de origem animal, e que corresponde à região que supostamente liga zinco, é substituída na enzima de vegetais por uma região rica em aspartato, que caracterizaria o sítio para a união do magnésio (Boese et al., 1991; Schaumburg et al., 1991).

A enzima δ -ALA-D de mamíferos é inibida por quelantes como EDTA e 1,10-fenantrolina (Chen e Neilands, 1976; Sommer e Beyersmann, 1984), sendo esta inibição revertida pela adição de zinco (Bevan et al., 1980). Isto mostra que o zinco faz parte da estrutura da enzima e, possivelmente, tenha um papel fundamental no seu mecanismo catalítico. Entretanto, o papel do zinco na atividade da δ -ALA-D não está, ainda, completamente elucidado. Algumas evidências sugerem uma função catalítica direta, enquanto outras apontam para uma função estrutural do zinco na enzima, ou ambas (Tsukamoto et al., 1979; Dent et al., 1990; Spencer e Jordan, 1995). Após a remoção do zinco pelo EDTA,

os grupos –SH da enzima são facilmente oxidados, com concomitante perda da atividade enzimática. A apoenzima oxidada obtida então, apenas incorporará zinco novamente na presença de um ativador sulfidrílico (Tsukamoto et al., 1979; Bevan et al., 1980).

2.2.3- Importância toxicológica

Devido a sua natureza sulfidrílica, a enzima δ -ALA-D pode ser inibida por uma variedade de metais pesados e não metais que possuam a propriedade química de oxidar grupamentos –SH. A inibição da δ -ALA-D pode prejudicar a rota biossintética do heme, resultando em conseqüências patológicas (Sassa et al., 1989; Goering, 1993). Além da redução na síntese do heme, a inibição desta enzima pode resultar no acúmulo do substrato ALA no sangue, com conseqüente aumento na excreção urinária do mesmo. O acúmulo de ALA pode estar relacionado com a superprodução de espécies reativas de oxigênio (Pereira et al., 1992; Bechara et al., 1993). Além disso, o ALA gerado no fígado e medula óssea pode atravessar a barreira hemato-encefálica, apresentando efeitos neurotóxicos (Becker et al., 1971; Cutler et al., 1979).

2.3- Metalotioneínas (MT)

As metalotioneínas foram primeiramente isoladas em 1957, ligadas ao cádmio, em rim de cavalo (Margoshes et al., 1957). As MT são proteínas citosólicas de baixo peso molecular, que se ligam a vários metais essenciais (zinco, cobre, etc.) e metais pesados (mercúrio, arsênico e cádmio) (Foulkes, 1982). Dados da literatura indicam que, em mamíferos, estas proteínas contêm 61 aminoácidos (Winge, 1991). O papel biológico das MT tem sido relacionado ao controle homeostático do metabolismo do zinco e do cobre e com o processo de detoxificação de cádmio e mercúrio (Cousin 1983). De fato, como as MT são proteínas sulfidrílicas, estas podem se complexar com metais tóxicos, como o

mercúrio, reduzindo a sua toxicidade (Miles et al., 2000). Além disto, as MT têm importante função no Sistema Nervoso Central, protegendo-o contra os danos induzidos por interleucinas, ácido kaínico, injúria física, entre outros (Carrasco et al., 2000; Giralt et al., 2002a;b).

Suzuki et al. (1998) relataram que as MT podem proteger contra a toxicidade induzida por metais pelo seqüestro destes através dos grupos sulfidrilas da proteína. Outra hipótese é que as MT podem proteger os tecidos contra o dano oxidativo (Patrick, 2003). Os resíduos de cisteína das MT são facilmente oxidados, agindo como “scavengers” de radicais de oxigênio (Palmiter, 1998).

As MT estão presentes em vários órgãos e sua síntese pode ser induzida no fígado, rim e pâncreas por vários compostos, como os metais zinco, cobre e cádmio (Nordberg e Nordberg, 2000), além do mercúrio (Cherian e Clarkson, 1976). Vários não-metais também estão envolvidos na indução de MT, incluindo hormônios (Klaassen, 1981), agentes alquilantes (Kotsonis e Klaassen, 1979) e etanol (Sharma et al., 1992). Além disto, a restrição alimentar e o estresse físico e químico podem causar a indução na síntese de MT (Webb e Cain, 1982). Segundo Ilbäck et al. (2004) infecções virais também podem acarretar em uma elevação na síntese de metalotioneínas.

A indução de MT por agentes quelantes, em fígado e rim, também ocorre. Segundo Goering et al. (1985) esta indução é devido a alguns fatores, tais como: os agentes quelantes podem induzir a síntese de MT indiretamente pela alteração na homeostase de metais endógenos essenciais; os quelantes podem aumentar a captação hepática de metais essenciais devido à redistribuição, o que poderia estimular a síntese de MT; e devido ao caráter lipofílico de alguns quelantes, estes poderiam agir intracelularmente e induzir a síntese de MT diretamente.

Segundo Stennard et al. (1994) existem 4 classes de metalotioneínas nos vertebrados; MT-1, MT-2, MT-3 e MT-4. As metalotioneínas das classes 1 e 2 estão presentes na maioria dos tecidos, enquanto que as classes 3 e 4 predominam no cérebro e células epiteliais escamosas, respectivamente (Quaife et al., 1994).

2.4- Agentes quelantes

2.4.1- Aspectos gerais

A terapia com agentes quelantes é a forma mais efetiva de tratamento para intoxicações com metais (Flora e Kumar, 1993). Os compostos sulfidrílicos como o dimercaprol (British Anti-Lewisite, BAL), a D-penicilamina (Klaassen, 1996) e derivados do dimercaprol como o ácido meso 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) (Endo e Sakata, 1995; Flora, 1999; Frumkim et al., 2001) e o ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfônico (DMPS) (Pingree et al., 2001) são os agentes quelantes mais utilizados na terapêutica.

O uso terapêutico de agentes quelantes em casos de intoxicação por metais tóxicos vem sendo praticado há aproximadamente 40 anos. Estes compostos são utilizados clinicamente como antídotos contra intoxicações agudas e crônicas por metais. Os agentes quelantes, além de aumentarem a excreção do metal tóxico, também reduzem a toxicidade dos metais por impedir a ligação destes a moléculas celulares alvo (Aposhian et al., 1995). Entretanto, o tratamento prolongado com agentes quelantes pode causar distúrbios hematopoiéticos (Flora e Kumar, 1993), desequilíbrio do metabolismo celular, síntese de DNA, RNA e proteína (Fischer et al., 1975), ou ainda alteração da homeostase dos elementos traços (Cantilena e Klaassen, 1982).

Gilman e colaboradores (1946) propuseram que os metais pesados são tóxicos aos sistemas biológicos por formarem mercaptídeos reversíveis, a partir de grupos -SH de moléculas protéicas, tais como enzimas. Estes autores também postularam uma hipótese para explicar o mecanismo pelo qual os ditióis são capazes de reativar sistemas enzimáticos e exercer benefícios no tratamento de intoxicações com metais pesados. Segundo esta hipótese, o uso de quelantes ditiólicos proporcionaria a formação de mercaptídeos de baixa dissociabilidade, o que reverteria, efetivamente, a ligação dos metais pesados com sistemas protéicos sensíveis a estes (Gilman et al., 1946).

Os primeiros relatos do uso de agentes quelantes em casos de intoxicações datam da época da Segunda Guerra Mundial, na Inglaterra. Stocken e Thompson, em 1946, descreveram o uso do 2,3-dimercaptopropanol (BAL) como um antídoto para intoxicações pelo dicloro-vinil arsênio. Este composto é um potente agente tóxico presente em gases de guerra, conhecido como Lewisite, o qual é capaz de atuar nos pulmões, nos rins, outros órgãos internos ou outras superfícies do corpo. Segundo relatos, o BAL proporcionava 100 % de sobrevivência em animais expostos topicamente ao Lewisite quando comparado a outros quelantes menos efetivos, como o monotiol 2-mercaptoetanol (Stocken e Thompson, 1946).

Entretanto, devido à sua lipossolubilidade, o BAL pode atravessar a membrana celular e atingir os espaços intracelulares (Andersen, 1989), causando redistribuição de metais, como o arsênio, o metil mercúrio (Hoover e Aposhian, 1983), o mercúrio inorgânico (Aaseth et al., 1995) e o chumbo (Cory-Slechta et al., 1987) dos órgãos periféricos para o cérebro.

Uma vez que a utilização do BAL apresenta diversas limitações devido à sua toxicidade, outros agentes quelantes, potencialmente menos tóxicos, têm sido investigados (Keith et al., 1997). Derivados estruturais do BAL, o DMPS (ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfônico) e o DMSA (ácido *meso* 2,3-dimercaptosuccínico), são mais hidrossolúveis e possivelmente menos tóxicos do que o BAL (Andersen, 1989).

Existem, entretanto, alguns efeitos adversos decorrentes da utilização de agentes quelantes. Como o mecanismo terapêutico dos agentes quelantes envolve a ligação e excreção dos metais tóxicos do organismo, estes compostos podem interagir com metais endógenos essenciais, em especial o zinco, podendo ocasionar uma redistribuição ou até mesmo uma elevação na excreção dos mesmos (Cantilena e Klaassen, 1981). De fato, dados da literatura mostraram que o DMSA e o DMPS aumentam a excreção urinária de cobre e zinco em ratos (Khandelwal et al., 1987) e em humanos (Smith et al., 2000). Como descrito anteriormente, os metais endógenos são componentes essenciais de muitos

sistemas enzimáticos, como a enzima δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), que requer íons zinco para sua atividade catalítica máxima (Jaffe et al., 1995).

2.4.2- DMPS

O DMPS (figura 2) tem sido usado na antiga URSS desde 1958 e encontra-se disponível, comercialmente na Europa, como DIMAVAL[®]. Além disso, este composto tem sido utilizado na Alemanha para o tratamento de intoxicações por mercúrio (Campbell et al., 1986).

Este agente quelante apresenta dois grupos -SH vicinais e caracteriza-se pela maior solubilidade em água (Nadig et al., 1985) e limitada solubilidade lipídica (Aposhian et al., 1983). A presença de dois grupos -SH vicinais é reconhecida como a estrutura essencial para a eficácia do agente quelante (Muckter et al., 1997). Em intoxicações agudas por mercúrio, por exemplo, uma das terapêuticas fundamentais é a utilização de compostos que apresentem na sua estrutura grupos -SH (Schwartz et al., 1992; Klaassen, 1996). Estes compostos ditiólicos possuem a capacidade de complexar este metal pesado e aumentar a velocidade de excreção renal e biliar (Jugo, 1980; Kojima et al., 1989; Shimada et al., 1993).

O DMPS foi descrito como uma droga efetiva no tratamento de intoxicações por mercúrio (Kostygou, 1958). Segundo diversos relatos, é uma alternativa segura e eficaz para substituir o BAL (Toet et al., 1994; Campbell et al., 1986; Cherian et al., 1988), apresentando menor toxicidade local e sistêmica (Hruby e Donner, 1987) e não causando redistribuição de mercúrio para o cérebro de ratos (Buchet e Lauwerys, 1989; Aposhian et al., 1996). Em um estudo anterior, entretanto, foi demonstrado que a associação entre o DMPS e o mercúrio pode ser perigosa, podendo afetar o sistema renal, devido à formação de um complexo Hg-DMPS (Brandão et al., 2006), que poderia ser mais facilmente transportado pelos túbulos renais. De fato, Nogueira e colaboradores (2003b) reportaram a formação de um complexo entre cádmio ou mercúrio e DMPS. Este complexo pode apresentar atividade pró-oxidante maior do que os componentes isolados (Miller e Woods, 1993; Putzer et al., 1995).

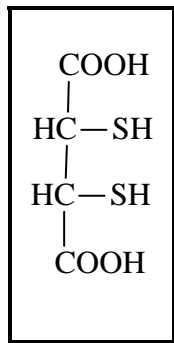


Figura 2- Estrutura do ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfônico (DMPS).

2.5- Agentes Antioxidantes

2.5.1- Aspectos gerais

Conforme descrito anteriormente, o mercúrio possui atividades pró-oxidantes, podendo causar um processo denominado de estresse oxidativo. Desta forma, a utilização de agentes antioxidantes na terapêutica pode ser eficaz para prevenir contra intoxicações causadas por este metal pesado (Sharma et al., 2005). Tais defesas antioxidantes têm ação de “*scavengers*” de radicais livres, ou seja, retirar os radicais formados após a exposição ao mercúrio (Quig, 1998).

Muitos mecanismos de defesa endógenos estão envolvidos na tentativa de proteger contra os danos causados pelo estresse oxidativo. Para isto, tanto as defesas antioxidantes enzimáticas quanto as não-enzimáticas são necessárias (McCord, 1993; Papas; 1996). Dentre as principais defesas antioxidantes não-enzimáticas estão a glutathione (GSH) (Deneke e Fanburg, 1989) e as vitaminas C e E (Rao & Sharma, 2001; Fang et al., 2002). Já entre as principais enzimas antioxidantes presentes em nosso organismo, estão as enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) (Benov et al., 1990)

Tendo em vista que a exposição a agentes tóxicos, como o mercúrio, pode causar alterações nas defesas antioxidantes do nosso organismo, então, com o

objetivo de preservar a integridade das membranas biológicas, muitas substâncias são testadas visando proteger contra os processos oxidativos causados pelos radicais livres. Dentre estes compostos, que possuem ação antioxidante, estão a vitamina E (Rana et al., 1996), substâncias presentes em extratos de plantas (Deiana et al., 1999), a N-acetilcisteína (Moldeus et al., 1986) e compostos de selênio (Nogueira et al., 2004).

2.5.2- N-acetilcisteína (NAC)

A NAC é considerada um importante agente terapêutico e é comumente utilizada na prática clínica (Repine et al., 1997), sendo empregada como agente mucolítico, administrado por inalação, e também como tratamento de intoxicação por acetoaminofeno (Ziment, 1986; Borgström et al., 1986). Além disto, tem sido demonstrado que a NAC possui efeito antimutagênico e anticarcinogênico em animais experimentais (De Flora et al., 1986a; b).

A NAC contém grupos tióis em sua estrutura (figura 3) e também é utilizada como antioxidante em condições de estresse oxidativo (Moldeus et al., 1986). Sabe-se que a NAC pode estimular a síntese de glutathione (Moldeus et al., 1986), e proteger os tecidos contra a peroxidação lipídica (Aruoma et al., 1989). Vários estudos têm indicado que a N-acetilcisteína também possui atividade quelante com relação a diversos metais pesados (Banner et al., 1986).

A utilização da NAC como agente antioxidante ou quelante, entretanto, requer certos cuidados, já que Ritter et al. (2004) descreveram que o uso da NAC pode ter algumas limitações e apresentar efeitos pró-oxidantes, devido à facilidade com que interage com o ferro. Além disto, estudos em animais de laboratório indicam que a NAC, quando utilizada na tentativa de proteger contra os danos causados pelo mercúrio, pode aumentar a captação do metal no rim devido à formação de um complexo Hg-NAC, que seria mais facilmente transportado pelos túbulos renais do que o metal somente (Zalups e Lash, 1994; Zalups & Minor, 1995; Zalups & Barfuss, 1998). De fato, estudos do nosso grupo demonstraram que a terapia com NAC, em animais expostos ao cloreto de mercúrio (HgCl_2),

pode causar danos renais, provavelmente devido à formação destes complexos (Brandão et al., 2006).

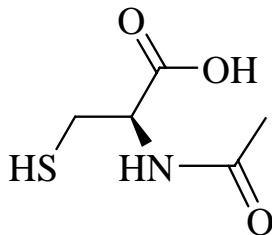


Figura 3- Estrutura da N-acetilcisteína

2.5.3- Selênio

Esse elemento químico foi descoberto em 1817, pelo químico sueco J. J. Berzelius. O selênio é um calcogênio do grupo 16 da tabela periódica, podendo apresentar-se sob quatro estados de oxidação: selenato (Se^{+6}), selenito (Se^{+4}), selênio elementar (Se^0) e seleneto (Se^{-2}).

O selênio compartilha propriedades químicas e físicas com o enxofre. Esta similaridade permite que o selênio substitua o enxofre, promovendo interações selênio-enxofre nos sistemas biológicos. Por outro lado, as diferenças nas propriedades físico-químicas entre selênio e enxofre constituem a base de seus papéis biológicos específicos (Stadtman, 1980).

Os selenóis (R-SeH) são as formas correspondentes aos tióis (R-SH), onde ocorre a substituição do átomo de enxofre pelo átomo de selênio (Klayman e Günther, 1973).

O selênio é um elemento traço essencial, cuja essencialidade nutricional foi demonstrada em 1957, em ratos (Schwartz e Foltz, 1957). Nos últimos anos, têm sido descrito que baixos níveis de selênio podem levar à predisposição para o desenvolvimento de algumas doenças, tais como câncer, esclerose, doença cardiovascular, cirrose e diabetes (Navarro-Alarcón e López-Martinez, 2000).

Neste contexto, a suplementação de dietas com selênio, tanto para animais quanto para humanos, tem sido aceita pela comunidade científica. Para humanos, a Junta de Alimentação e Nutrição da Academia de Ciências dos Estados Unidos propõe uma ingestão diária de 50-200 μg , a qual é considerada segura e saudável para adultos. Por outro lado, sabe-se que a concentração alimentar requerida de selênio é muito próxima da dose que pode ser tóxica (Oldfield, 1987).

Este calcogênio apresenta um grande número de funções biológicas, sendo a mais importante como antioxidante. Sabe-se que moléculas contendo selênio, como por exemplo o disseleneto de difenila (PhSe)₂, podem ser melhores nucleófilos (e portanto antioxidantes) do que os antioxidantes clássicos (Arteel e Sies, 2001). As pesquisas recentes têm procurado estabelecer a função e a biologia molecular de selenoproteínas. Já é conhecido que o selênio está presente como resíduo de selenocisteína no sítio ativo das enzimas glutathione peroxidase (Wingler e Brigelius-Flohé, 1999), tioredoxina redutase (Holmgren, 1985), 5'-deiodinase (Behne e Kyriakopoulos, 1990) e selenoproteína P (Ursini et al., 1990). A atividade redox do selênio tem fundamental importância para o sítio catalítico dessas enzimas.

Muitos trabalhos têm reportado uma interação entre o selênio e o mercúrio, em mamíferos podendo o calcogênio ter um papel protetor contra a toxicidade induzida pelo mercúrio (Sasakura e Suzuki, 1998; Farina et al., 2003). De fato, evidências demonstram que o selênio pode se associar ao mercúrio e com a selenoproteína P e formar um complexo ternário inerte reduzindo, desta forma, a toxicidade do metal (Yoneda e Suzuki, 1997).

2.5.3.1- Disseleneto de difenila

O disseleneto de difenila (PhSe)₂ (figura 4) é um organocalcogênio empregado como intermediário em síntese orgânica (Zeni et al., 2003). A partir da década de 30, os organocalcogênios têm sido alvo de interesse para os químicos orgânicos em virtude da descoberta de aplicações sintéticas (Petragani et al., 1976; Comasseto, 1983), sendo importantes intermediários e reagentes muito

utilizados em síntese orgânica (Paulmier, 1986; Braga et al., 1996; 1997) e de propriedades biológicas desses compostos (Parnham e Graf, 1991; Kanda et al., 1999)

Conseqüentemente, o risco de contaminação ocupacional por organocalcogênios tem motivado estudos toxicológicos. Outro aspecto relevante é a tentativa crescente de desenvolvimento de compostos organocalcogênios que possuam atividades biológicas e aplicações farmacológicas (Parnham e Graf, 1991; Nogueira et al., 2003c).

Conforme alguns estudos, o disseleneto de difenila possui atividade antiinflamatória e antinociceptiva, quando administrado de forma aguda em ratos e camundongos (Nogueira et al., 2003c). Recentemente, tem sido descrito que este composto orgânico de selênio apresenta propriedades antiúlcera (Savegnago et al., 2006) e hepato-protetora (Borges et al., 2005b; 2006). Além disto, diversos trabalhos têm demonstrado que o disseleneto de difenila possui efeito protetor contra a lipoperoxidação em ratos e camundongos (Meotti et al. 2004; Santos et al., 2004; 2005). De fato, Nogueira et al. (2004) sugerem que, pelo fato de o disseleneto possuir atividades semelhantes as da glutathiona peroxidase, este composto é um bom candidato a ser um agente antioxidante. Adicionalmente, também foi demonstrado que o $(\text{PhSe})_2$ pode apresentar atividade quelante em animais expostos ao cádmio (Santos et al., 2005).

Alguns estudos, entretanto, relatam que quando administrado de forma crônica e em altas doses, o disseleneto de difenila pode causar danos cerebrais em camundongos (Maciel et al., 2000; Jacques-Silva et al., 2001). De fato, Nogueira et al (2003d) demonstraram que o disseleneto de difenila pode causar efeitos neurotóxicos em ratos e camundongos. Além disso, o $(\text{PhSe})_2$ pode causar inibição da Na^+ , K^+ -ATPase cerebral de ratos (Borges et al., 2005a) e afetar o sistema glutamatérgico em plaquetas humanas (Borges et al., 2004) e em ratos (Nogueira et al., 2001). Dados da literatura também indicam que o disseleneto de difenila possui efeito teratogênico, causando má-formação óssea e outras anomalias em fetos de ratas tratadas com este composto (Fávero et al., 2005). Já Nogueira et al. (2003a) demonstraram que o $(\text{PhSe})_2$ inibe a atividade da enzima

δ -ALA-D de sangue humano, devido à interação com os grupos $-SH$ da enzima. Além disto, foi demonstrado que camundongos tratados com cloreto de mercúrio ($HgCl_2$) e $(PhSe)_2$, simultaneamente, apresentam alta taxa de letalidade (Brandão et al., 2006)

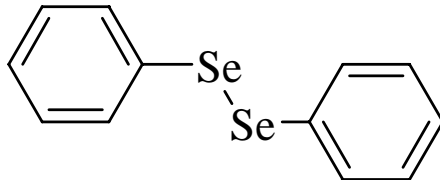


Figura 4 – Estrutura do disseleneto de difenila ((PhSe)₂)

3. OBJETIVOS

Os efeitos tóxicos provocados por metais pesados, como o mercúrio, têm recebido bastante atenção dos pesquisadores. Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de verificar as alterações causadas por este metal no organismo de mamíferos. Da mesma forma, diferentes formas de terapia contra estas intoxicações são testadas. Dessa forma, este trabalho visa abordar dois aspectos principais: (1) avaliar o efeito da exposição aguda ao cloreto de mercúrio na atividade da enzima δ -ALA-D, no processo de lipoperoxidação, nos níveis de –SH não-protéicos (NPSH), na concentração de vitamina C, na concentração de metalotioneínas e em alguns outros parâmetros bioquímicos de dano hepático e renal em camundongos e (2) avaliar o possível papel protetor dos agentes antioxidantes N-acetilcisteína e disseleneto de difenila em camundongos expostos ao cloreto de mercúrio, comparando-os com um agente quelante de escolha, o DMPS, utilizando para isto os mesmos parâmetros citados acima.

4- ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico, o qual encontra-se aqui organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo. O artigo está disposto da mesma forma que foi submetido para publicação na Revista *Environmental Research*.

4.1- Antioxidants and Metallothionein levels in Mercury-Treated Mice

Ricardo Brandão, Francielli W. Santos, Marcelo Farina, Gilson Zeni, Denise

Bohrer, João B.T. Rocha, Cristina W. Nogueira

Artigo submetido para publicação na Revista *Environmental Research*

Antioxidants and Metallothionein levels in Mercury-Treated Mice

Ricardo Brandão¹, Francieli W. Santos¹, Marcelo Farina^{1,2}, Gilson Zeni¹, Denise Bohrer¹, João B.T. Rocha¹, Cristina W. Nogueira^{1,*}

¹Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brazil, ²Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Catarina, Florianópolis, CEP 88040-900, SC, Brazil

*Correspondence should be sent to:

Cristina Wayne Nogueira

Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

Phone: 55-55-3220-8140

FAX: 55-55-3220-8978

E-mail: criswn@quimica.ufsm.br

Abstract

Acute effects of mercury on mouse blood, kidneys and liver were evaluated. Mice received a single dose of mercuric chloride (HgCl_2 - 4.6 mg/kg, subcutaneously) for three consecutive days. We investigated the possible beneficial effects of antioxidant therapy (N-acetylcysteine (NAC) and diphenyl diselenide (PhSe_2)) comparing to sodium salt of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS), an effective chelating agent on HgCl_2 exposure in mice. We also verified if metallothionein (MT) induction would be involved in a possible mechanism of protection against HgCl_2 poisoning and if different therapies would modify MT levels and other toxicological parameters. The results demonstrated that HgCl_2 exposure significantly inhibited δ -ALA-D activity in liver and only DMPS treatment prevented the inhibitory effect. Mercuric chloride caused an increase in renal NPSH and none of the treatments modify renal NPSH levels. Urea concentration was increased after HgCl_2 exposure. NAC plus (PhSe_2) was partially effective in protecting against mercury effect. DMPS and (PhSe_2) were effective in restoring the increment in urea concentration caused by mercury. Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), AST, ALT and ascorbic acid levels were not modified after mercury exposure. Mercuric chloride poisoning caused an increase in hepatic and renal MT levels and antioxidant therapies did not modify this parameter. Our data pointed out the lack of the therapeutic effect of antioxidants tested.

Key-Words: Mercuric chloride, metallothionein, selenium, diselenides, 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid, N-acetylcysteine

1. Introduction

Mercury is being widely used in the industry, medicine, agriculture and other fields (ATSDR, 1989). Mercury is a transitional metal; it promotes the formation of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxides (Miller et al., 1991; Hussain et al., 1999). Accordingly, mercury exposure has been demonstrated to induce lipid peroxidation detected by increased thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in liver, kidney, brain and other tissues (Huang et al., 1996; Hoffman & Heinz, 1998; El-Demerdash, 2001). Thus, it is believed that an antioxidant should be one of the important components of an effective treatment of mercury poisoning.

N-acetylcysteine (NAC) is a thiol-containing antioxidant which has been utilized to mitigate various conditions of oxidative stress. Its antioxidant action is believed to originate from its ability to stimulate glutathione (GSH) synthesis, therefore maintaining intracellular GSH levels (Moldeus et al., 1986) and scavenging ROS (Aruoma et al., 1989). Some studies have indicated that NAC has also chelating activity with regard to diverse heavy metals (Banner et al., 1986).

Selenium is a structural component of several enzymes with physiological antioxidant properties, including glutathione peroxidase and thioredoxin reductase (Rotruck et al., 1973; Xia et al., 2002; Nogueira et al., 2004b). Besides, the ability of selenium to reduce mercury toxicity has been extensively investigated (Cuvín-Aralar and Furness, 1991; Sasakura and Suzuki, 1998; Farina et al., 2003). Wilson et al. (1989) suggest that diselenides are good candidates for antioxidant agents because they possess glutathione peroxidase-like activity and are able to react with –SH groups.

Moreover, it has been demonstrated that diphenyl diselenide presents protective effect against the lipid peroxidation in rats and mice (Meotti et al., 2004).

The therapy with chelating agents is the most effective form for the treatment against metal intoxications (Flora & Kumar, 1993). Several metals are known to disturb cellular functions by binding to thiol groups of biomolecules. Therefore, a possible therapy for metal intoxication is to remove the toxic metals from the bound functional bioligands by administering strong thiol-containing chelators (Lynn et al., 1999). 2,3-Dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS), a metal chelator, has also been shown to be effective for treating the toxicity induced by a number of heavy metals (Andersen, 1989), such as mercury (Campbell et al., 1986) and lead (Kemper et al., 1990). In addition, Aposhian et al. (1996) found that DMPS treatment decreased the renal mercury content, but did not redistribute mercury to the brain of rats. In fact, many authors have reported that DMPS is an effective therapy for mercury intoxication (Kemper et al., 1990; Molin et al., 1991).

Recently, we demonstrated that diphenyl diselenide was as effective in restoring acute cadmium-induced oxidative damage in mice testes as the chelating compound succimer (Santos et al., 2004). Thus, in the present study we investigated the possible beneficial effects of antioxidant therapy (NAC and diphenyl diselenide) comparing to DMPS (an effective chelating agent) on acute mercuric chloride-poisoning in mice. In addition, we verified if metallothionein induction would be involved in a possible mechanism of protection against HgCl_2 poisoning and if different therapies would modify metallothionein levels. Thereby, we evaluated the effect of HgCl_2 on ALA-D activity, TBARS production, non-protein thiol groups, ascorbic acid and metallothionein levels in

mice tissues (liver and kidneys). The parameters that indicate tissue damage such as AST, ALT, urea and creatinine in plasma were also determined.

2. Materials and methods

2.1- Chemicals

Mercuric chloride (HgCl_2) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). 2,3-Dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS), N-acetylcysteine (NAC), δ -aminolevulinic acid (δ -ALA) and *p*-dimethylaminobenzaldehyde were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Diphenyl diselenide was synthesized according to Paulmier (1986). Analysis of the ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. The chemical purity of diphenyl diselenide (99.9%) was determined by GC/HPLC. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers. $(\text{PhSe})_2$ was dissolved in DMSO (dimethylsulfoxide).

2.2- Animals

Male adult Swiss albino mice (25-35g) from our own breeding colony were used. The animals were kept on separate animal rooms, in a 12 hour light/dark cycle, at room temperature of 22°C, with free access to food and water. The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, School of Medicine Veterinary and Animal Science of the University of Sao Paulo, Brazil.

2.3- Exposure

A group of six to eight mice was usually tested in each experiment. Mice received one daily injection of mercuric chloride (HgCl_2), subcutaneously, at the dose of 4.6 mg/kg (dissolved in saline at 0.46 mg/ml), for three consecutive days. The HgCl_2 dose was based on previous studies (Emanuelli et al., 1996; Perottoni et al., 2004). On the fourth day, mice received one injection of DMPS at the dose of 400 $\mu\text{mol/Kg}$ intraperitoneally (i.p.) (Santos et al., 2004) or NAC (300 mg/Kg, i.p.) (Brandão et al., 2006) or diphenyl diselenide (100 $\mu\text{mol/Kg}$, s.c.) (Nogueira et al., 2003b) or NAC (300 mg/Kg, i.p.)+ diphenyl diselenide (100 $\mu\text{mol/Kg}$, s.c.).

The protocol of mice treatment is given below:

Group 1: Sal (saline, s.c.) + DMSO (s.c.) + Sal (saline, i.p.)

Group 2: Sal (saline, s.c.) + DMPS (i.p.)+ Sal (saline, i.p.)

Group 3: Sal (saline, s.c.) + $(\text{PhSe})_2$ (s.c.) + Sal (saline, i.p.)

Group 4: Sal (saline, s.c.) + NAC (i.p.) + DMSO (s.c.)

Group 5: Sal (saline, s.c.) + NAC (i.p.) + $(\text{PhSe})_2$ (s.c.)

Group 6: HgCl_2 (4.6 mg/kg, s.c.) + DMSO (s.c.) + Sal (saline, i.p.)

Group 7: HgCl_2 (4.6 mg/kg, s.c.) + DMPS (i.p.) + Sal (saline, i.p.)

Group 8: HgCl_2 (4.6 mg/kg, s.c.) + $(\text{PhSe})_2$ (s.c.) + Sal (saline, i.p.)

Group 9: HgCl_2 (4.6 mg/kg, s.c.) + NAC (i.p.) DMSO (s.c.)

Group 10: HgCl_2 (4.6 mg/kg, s.c.) + NAC (i.p.) + $(\text{PhSe})_2$ (s.c.)

At 48 h after the last HgCl_2 injection, the blood samples were collected directly from the ventricle of the heart in anesthetized animals. Subsequently, mice were sacrificed and liver and kidney were removed.

2.4. δ -Aminolevulinic dehydratase (δ -ALA-D) activity

δ -ALA-D activity was assayed by the method of Sassa (1982) by measuring the rate of product (porphobilinogen) formation except that 45 mM potassium phosphate buffer, pH 6.4 and 2.5 mM of aminolevulinic acid (ALA) were used (Barbosa et al., 1998). Incubations were carried out for 30 (liver) and 60 minutes (kidney) at 39 °C. The reaction product was determined using modified Ehrlich's reagent at 555 nm, with a molar absorption coefficient of 6.1×10^4 per M for the Ehrlich-porphobilinogen salt.

2.5. Determination of nonprotein thiols (NPSH)

NPSH of kidney, liver and erythrocytes were determined by the method of Ellman (1959). To determine NPSH of liver and kidney, the homogenate was centrifuged at $4,000 \times g$ at 4 °C for ten minutes and supernatant (500 μ L) was mixed (1:1) with 10% trichloroacetic acid (500 μ L). After centrifugation, the protein pellet was discarded and free –SH groups were determined in the clear supernatant.

The erythrocytes (300 μ L) samples were submitted to hemolysis with 10% Triton (100 μ L) and precipitated with 200 μ L of 10% trichloroacetic acid. After centrifugation, the free –SH groups were determined in the supernatant.

2.6. Determination of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS)

Lipid peroxidation was performed by the formation of TBARS during an acid-heating reaction as previously described by Draper and Hadley [34]. Briefly, the samples were mixed with 1 mL of 10% TCA and 1 mL of 0.67% thiobarbituric acid subsequently they

were heated in a boiling water bath for 15 min. The absorbance was read at 532 nm and the data expressed as nmol malondialdehyde (MDA)/g tissue.

2.7. Ascorbic acid determination

Ascorbic acid determination was performed as described by Jacques-Silva et al. (2001). Protein (tissues) was precipitated in 10 volumes of a cold 4 % trichloroacetic acid solution. An aliquot of sample (300 μ L) in a final volume of 1 mL of the solution was incubated at 38°C for 3 hours, then 1 mL H₂SO₄ 65 % (v/v) was added to the medium. The reaction product was determined using color reagent containing 4.5 mg/mL dinitrophenyl hydrazine and CuSO₄ (0.075 mg/mL).

2.8. Aspartate (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities

Plasma AST and ALT enzymes were used as the biochemical markers for the early acute hepatic damage and were determined using a commercial Kit (LABTEST, Diagnostica S.A., Minas Gerais, Brazil).

2.9. Urea and creatinine levels

Renal function was analysed using a commercial Kit (LABTEST, Diagnostica S.A., Minas Gerais, Brazil) by determining plasma urea and creatinine.

2.10. Metallotionein (MT) levels

Total metallotionein concentration in liver and kidneys were measured following the method of Onosaka and Cherian (1982). Briefly, 1 g of liver or 0.5 g of kidney was homogenized in 4 volumes of 0.25 M sucrose and was centrifuged at 18,000 *g* at 4°C

CdCl₂ was added and incubated for 5 min at room temperature. Excess of cadmium was removed and precipitated by the addition of the rat RBC (Red Blood Cells) hemolysate and heat treatment in a water-bath for 1 min. This step was repeated three times. The amount of cadmium in the obtained supernatant fraction is a measure of MT-bound Cd and was determined using atomic absorption spectrophotometer (AAS; Perkin Elmer model Analyst 100 USA). The concentration of MT in each tissue was calculated assuming that a 6-g atom of Cd is bound to each mole of thionein, which has a molecular weight of 6050 by amino acid analysis (Kagi & Nordberg, 1979).

2.11. Protein determination

Protein was measured by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

2.12. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm S.E.M. Statistical analysis was performed to compare treated groups to respective control groups and the antioxidant therapies to DMPS using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Duncan's multiple range test when appropriate. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. For metallothionein determination, a non-parametric Kruskal–Wallis test, followed by Mann–Whitney U test was applied.

3- Results

3.1- Body weight

The body weight gain of mice was monitored for the whole course of the experiment. Mice exposed to HgCl_2 presented a reduction in the body weight gain when compared to the control group. Therapies (NAC, $(\text{PhSe})_2$ and DMPS) were not effective in restoring the body weight (Table 1). In addition, animals treated with HgCl_2 +NAC+ $(\text{PhSe})_2$ presented a decrease (132 %) in the body weight gain when compared to HgCl_2 +DMPS group ($p < 0.05$). The results also demonstrated that mice exposed to NAC, $(\text{PhSe})_2$ and NAC plus $(\text{PhSe})_2$ presented reduction in the body weight gain when compared to control and DMPS groups (Table 1).

3.2- δ -ALA-D activity

Results demonstrated that acute mercury exposure did not inhibit renal δ -ALA-D activity (data not shown). In contrast, the mercuric chloride exposure significantly inhibited δ -ALA-D activity (27.7 %) in liver ($p < 0.05$) (Figure 1). DMPS treatment restored inhibition caused by HgCl_2 in δ -ALA-D activity. The other therapies were not effective in restoring enzyme activity at the control levels (Figure 1).

3.3- Lipid peroxidation

Renal and hepatic TBARS levels remained unchanged after mercuric chloride exposure. Therapies did not modify TBARS levels in relation to control and HgCl_2 groups (data not shown).

3.4- Ascorbic acid concentration

Renal and hepatic ascorbic acid levels were not modified by the mercuric chloride exposition. Animals co-administered with NAC+ $(\text{PhSe})_2$ + HgCl_2 exhibited an increase

(about 19 %) in liver ascorbic acid levels ($p < 0.05$) when compared to control and HgCl_2 groups (data not shown).

3.5 – Nonprotein Thiols (NPSH)

Mercuric chloride intoxication caused an increase of about 1.9-times in renal NPSH when compared to the control group ($p < 0.01$) and none of the treatments restored it to the normal level (Figure 2). Hepatic and erythrocytes NPSH levels remained unchanged after HgCl_2 exposure (data not shown).

3.6- Plasma AST and ALT activities

Animals treated with HgCl_2 did not present alterations in AST and ALT activities. However, ALT activity was increased (about 60 %) ($p < 0.05$) in animals co-administered with $\text{HgCl}_2 + \text{NAC}$ and $\text{HgCl}_2 + \text{NAC} + (\text{PhSe})_2$, when compared to the animals that received HgCl_2 (Table 2).

$(\text{PhSe})_2$ plus NAC enhanced ALT and AST activities (55 and 71%, respectively), while an increase in AST activity (50 %) was observed in animals treated with $\text{HgCl}_2 + \text{NAC}$ ($p < 0.05$) when compared to the control group. Treatment with $\text{HgCl}_2 + \text{NAC}$ increased AST activity (56 %) when compared to $\text{HgCl}_2 + \text{DMPS}$ group ($p < 0.05$), whereas $\text{NAC} + (\text{PhSe})_2$ given alone increased AST and ALT activities (88 and 104%, respectively) when compared to DMPS group ($p < 0.01$) (Table 2).

3.7. Urea and creatinine levels

Urea concentration was increased after HgCl_2 exposure (73 %). Treatment with NAC plus $(\text{PhSe})_2$ was partially effective in protecting (21 %) against HgCl_2 effect, but not at the control levels. Therapies with DMPS and $(\text{PhSe})_2$ were effective in restoring

the enhancement in urea concentration caused by HgCl_2 (Table 2). The treatment with HgCl_2 +NAC increased urea levels (44 %) when compared to HgCl_2 +DMPS group ($p<0.01$). Creatinine levels were not modified in all groups (data not shown).

3.8- Hepatic and renal metallothionein concentration

The concentration of MT in mice liver and kidney following the administration of mercuric chloride is shown in table 3. $(\text{PhSe})_2$, NAC and $(\text{PhSe})_2$ plus NAC enhanced MT concentration in liver about 10-, 7- and 9-times, respectively ($p<0.05$) when compared to the control group.

Mercuric chloride intoxication caused an increase of about 16-times in hepatic MT ($p<0.05$). Therapies did not modify hepatic MT levels in relation to the HgCl_2 group. Animals exposed to HgCl_2 and treated with NAC+ $(\text{PhSe})_2$ increased hepatic MT induction (72 %) when compared to DMPS therapy ($p<0.01$). $(\text{PhSe})_2$ and NAC+ $(\text{PhSe})_2$ given alone increased hepatic MT induction (4.6 and 4.1-times) when compared to the DMPS group ($p<0.05$).

Similarly, mercuric chloride exposure enhanced renal MT and therapies did not change this parameter when compared to the HgCl_2 group. Treatment with HgCl_2 +NAC+ $(\text{PhSe})_2$ increased renal MT induction (47 %) when compared to HgCl_2 +DMPS group ($p<0.05$) (Table 3).

4- Discussion

Mercury is a widespread environmental and industrial pollutant, which induces severe alterations in the tissues of both animals and men (Lund et al., 1993). Various

mechanisms, including lipid peroxidation, have been proposed for the biological toxicity of mercury (Huang et al., 1996). Thus, it is believed that antioxidant should be one of the important components of an effective treatment of mercury poisoning (Chatterjee & Rudra Pal, 1975).

In the present study, mice toxicity was clearly evidenced by the reduction in the body weight gain after HgCl_2 exposure. Our data also pointed out a negative effect of therapies, since mice treated with $\text{NAC}+(\text{PhSe})_2$ presented a reduction in the body weight gain when compared to DMPS group.

Acute administration of HgCl_2 to mice caused inhibition of hepatic δ -ALA-D activity. Accordingly, Emanuelli et al. (1996) found a decrease in liver δ -ALA-D activity and proposed that the inhibitory effect induced by HgCl_2 in δ -ALA-D activity could be related, at least in part, to the pro-oxidative effects of mercuric ions in the essential sulfhydryl groups located at the active site of the enzyme. In addition, we observed that HgCl_2 poisoning did not change ascorbic acid levels and TBARS in liver and kidney. These results are in accordance with Farina et al. (2003), who have observed that renal and hepatic TBARS levels were not altered 6, 12, 24 and 48 hours after mercuric chloride exposition.

It is possible that Hg^{2+} causes a Zn^{2+} displacement leading to δ -ALA-D inhibition. In fact, mammalian δ -ALA-D is a metalloenzyme that requires Zn^{2+} for maximal catalytic activity and data support the hypothesis of a direct competition between bivalent metals and Zn^{2+} in δ -ALA-D activity (Rocha et al., 1995; Nogueira et al., 2003a; Nogueira et al., 2004a). Furthermore, DMPS therapy was more effective and less toxic when compared to the antioxidant therapies, since hepatic δ -ALAD inhibition was ameliorated only by

DMPS treatment. Of note, DMPS is a chelating agent that could be binding with mercury, reducing its availability to interact with sulfhydryl groups from δ -ALA-D.

Inorganic mercury is accumulated in higher levels in kidney than in liver (Emanuelli et al., 1996). In agreement, we observed an increase in plasma urea concentration in mice exposed to HgCl_2 , which was restored by DMPS and $(\text{PhSe})_2$ therapies. Mice treated with NAC presented an increase in urea levels when compared to the DMPS group, suggesting a negative effect of NAC therapy.

Another interesting observation in the present study is the marked enhancement in renal NPSH levels after mercury exposure, which was not restored by therapies. In contrast, hepatic NPSH concentrations remained unchanged after HgCl_2 exposure. Previous studies reported that mice exposed to HgCl_2 presented an increase in renal NPSH levels (Farina et al., 2003, Brandão et al., 2006), but did not have change in hepatic NPSH content (Brandão et al., 2006). Mercury is able to increase glutathione reductase (GR) activity under *in vivo* conditions (Lash and Zalups, 1996). This increment can be related, at least in part, to the direct oxidative effects of mercury on endogenous GSH, which leads to the enhancement in the GR activity. Although renal GR activity was not measured in our protocols, the observed increase in renal NPSH levels can be interpreted as a pathophysiological response to preserve the homeostasis of intracellular thiol status.

Concerning transaminase activity, mercuric chloride did not alter AST and ALT activities but the activity of these enzymes were increased in mice that received antioxidant therapy, indicating a drawback of therapies.

Metallothionein (MT), a low molecular weight protein, binds a variety of essential (zinc, copper etc) and non-essential metals (mercury, arsenic and cadmium) (Kagi and

Nordberg, 1979). The biological roles of MT have been discussed in relation to the homeostatic control of zinc and copper metabolism, and the detoxification of cadmium and mercury (Cousin, 1983). MT is present in numerous organs and its synthesis can be induced in liver, kidney and pancreas by various treatments, the most effective being metals such as zinc, copper and cadmium (Nordberg & Nordberg, 2000).

Importantly, in this study we observed that mercuric chloride exposition caused the enhancement in hepatic and renal MT levels. The induction of MT could be protecting, at least in part, against the toxic effects of HgCl_2 , since TBARS and ascorbic acid levels in mice liver and kidney remained unchanged after metal intoxication. Renal δ -ALAD activity was also not modified by HgCl_2 .

As a stress response protein, metallothionein (MT) confers protection against a variety of stress factors, including toxic metals and oxidative stress (Miles et al., 2000). Mouse models of MT deficiency (Michalska and Choo, 1993; Masters et al., 1994) and MT overexpression (Palmiter et al., 1993; Kang et al., 1997) have been used to evaluate the protective role of the protein (Liu et al., 1995; Wang and Kang, 1999; Coyle et al., 2000). Since metallothionein is a cysteine-rich protein, mercury could be binding to this protein and protecting of the metal toxic effects. Accordingly, renal NPSH levels were increased in response to the mercury poisoning. Thus, it is possible that the metal bound to metallothionein (Hg-MT) or NPSH (Hg-NPSH) and became unavailable to induce toxic effects. Our data demonstrated that $\text{NAC}+(\text{PhSe})_2$ therapy induced little effects on MT level when compared to DMPS therapy, suggesting that their ability to induce MT did not correlate with their biological effects. Although therapies had minor effects on Hg-induced MT, treatment with $(\text{PhSe})_2$ or $\text{NAC}+(\text{PhSe})_2$ given alone increased hepatic MT induction when compared to the DMPS group. Noteworthy, to the

best of our knowledge this is the first time that diphenyl diselenide and NAC are reported as MT inducers.

The results of the present study indicate that MT induction and the enhancement of NPSH levels after mercury exposure could protect, at least in part, against the effects of mercuric chloride, since oxidative stress parameters remained unchanged after metal exposure in mice liver and kidneys. Renal δ -ALAD activity, which is extremely sensitive to mercury, was not modified by metal exposition. Our data pointed out the lack of the therapeutic properties of antioxidants tested, since NAC and diphenyl diselenide did not change toxicological parameters such as metallothionein levels induced by HgCl_2 in mice. However, the predictive value of animal toxicity and extrapolation of animal data to man must be done with caution due to the route of administration of the test compounds.

Acknowledgements: The financial support by FAPERGS, CAPES and CNPq is gratefully acknowledged.

Tables

Table 1 - Effect of acute exposure to mercuric chloride and (PhSe)₂, NAC or DMPS on mice body weight gain

	Body weight gain (g)
Sal	2.45 ± 0.45 (7)
DMPS	2.24 ± 0.56 (7)
(PhSe) ₂	-0.82 ± 1.25 (- 4) ^{a,b}
NAC	-0.11 ± 0.91 (- 0.3) ^{a,b}
(PhSe) ₂ + NAC	-0.68 ± 0.85 (- 2) ^{a,b}
HgCl ₂	-2.17 ± 0.64 (- 7) ^a
HgCl ₂ + DMPS	-1.67 ± 0.53 (- 5) ^a
HgCl ₂ + (PhSe) ₂	-2.91 ± 0.53 (- 6) ^a
HgCl ₂ + NAC	-2.25 ± 0.52 (- 8) ^a
HgCl ₂ + (PhSe) ₂ + NAC	-3.89 ± 0.56 (- 11) ^{a,c}

Data are mean ± S.E.M. from six to eight animals in each group. () % of of the body weight change.

^a Denoted p<0.05 as compared to the control group (one-way ANOVA/Duncan).

^b Denoted p<0.05 as compared to the DMPS group (one-way ANOVA/Duncan).

^c Denoted p<0.05 as compared to the HgCl₂+DMPS group (one-way ANOVA/Duncan).

Table 2 - Effect of acute exposure to mercuric chloride and (PhSe)₂, NAC, or DMPS on AST and ALT activities and urea levels in mice plasma

	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	Urea (mg/dL)
Sal	117.72 ± 6.42	37.75 ± 3.81	54.63 ± 1.90
DMPS	107.58 ± 4.59	28.62 ± 2.52	46.70 ± 3.63
(PhSe) ₂	130.66 ± 16.33	28.0 ± 2.38	37.80 ± 2.08
NAC	149.07 ± 19.72	40.58 ± 2.76	45.07 ± 2.18
(PhSe) ₂ + NAC	201.41 ± 17.23 ^{a, c}	58.50 ± 10.84 ^{a, c}	51.63 ± 4.53
HgCl ₂	128.39 ± 17.24	24.78 ± 2.56	94.91 ± 9.25 ^a
HgCl ₂ + DMPS	113.27 ± 13.58	27.69 ± 2.64	61.20 ± 5.99 ^b
HgCl ₂ + (PhSe) ₂	140.59 ± 11.87	28.0 ± 4.26	45.77 ± 7.88 ^b
HgCl ₂ + NAC	176.62 ± 23.64 ^{a, d}	39.56 ± 6.07 ^b	88.62 ± 14.50 ^{a, d}
HgCl ₂ + (PhSe) ₂ + NAC	149.50 ± 4.46	39.75 ± 5.05 ^b	75.11 ± 5.32 ^{a, b}

Data are mean ± S.E.M. from six to eight animals in each group.

^a Denoted p<0.05 as compared to the control group (one-way ANOVA/Duncan).

^b Denoted p<0.05 as compared to the HgCl₂ group (one-way ANOVA/Duncan).

^c Denoted p<0.05 as compared to the DMPS group (one-way ANOVA/Duncan).

^d Denoted p<0.05 as compared to the HgCl₂ + DMPS group (one-way ANOVA/Duncan).

Table 3 – Hepatic and renal metallothionein concentration after mercuric chloride administration in mice

	Liver MT (mg/g tissue)	Kidney MT (mg/g tissue)
Sal	0.184 ± 0.01	n.d.
DMPS	0.410 ± 0.08	n.d.
(PhSe) ₂	1.88 ± 0.09 ^{a,b}	0.04 ± 0.03
NAC	1.39 ± 0.01 ^a	n.d.
(PhSe) ₂ + NAC	1.70 ± 0.36 ^{a,b}	0.16 ± 0.16
HgCl ₂	2.93 ± 0.54 ^a	1.39 ± 0.09 ^a
HgCl ₂ + DMPS	2.29 ± 0.49 ^a	1.07 ± 0.22 ^a
HgCl ₂ + (PhSe) ₂	2.49 ± 0.03 ^a	1.045 ± 0.16 ^a
HgCl ₂ + NAC	2.52 ± 0.05 ^a	1.025 ± 0.14 ^a
HgCl ₂ + (PhSe) ₂ + NAC	3.94 ± 0.84 ^{a,c}	1.57 ± 0.12 ^{a,c}

Data are mean ± S.E.M. from three animals in each group.

^a Denoted p < 0.05 as compared to the control group by Kruskal–Wallis, followed by Mann–Whitney U test.

^b Denoted p<0.05 as compared to the DMPS group by Kruskal–Wallis, followed by Mann–Whitney U test.

^c Denoted p<0.05 as compared to the HgCl₂ + DMPS group by Kruskal–Wallis, followed by Mann–Whitney U test.

n.d. means undetectable MT level

References

Andersen, O., 1989. Principles and recent developments in chelation treatment of metal intoxication. *Chem. Rev.* 99, 2683-2710.

Aposhian, M.M., Maiorino, R.M., Xu, Z., Aposhian, H.V., 1996. Sodium 2,3-dimercapto-1-propanesulfonate (DMPS) treatment does not redistribute lead or mercury to the brain of rats. *Toxicology* 109, 49-55.

Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M., Butler, J., 1989. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide and hypochlorous acid. *Free Rad. Biol. Med.* 6, 593-597.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 1989. Toxicological Profile for Mercury. ATSDR/US. Public Health Service.

Banner, W. Jr., Koch, M., Capin, D.M., Hopf, S.B., Chang, S., Tong, T.G., 1986. Experimental chelation therapy in chromium, lead and boron intoxication with N-acetylcysteine and other compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 83, 142-147.

Barbosa, N.B.V., Rocha, J.B.T., Zeni, G., Emanuelli, T., Beque, M.C., Braga, A.L., 1998. Effect of organic forms of selenium on δ -Aminolevulinatase from liver, kidney and brain of adult rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 149, 243-253.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Brandão, R., Santos, F.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2006. DMPS and N-Acetylcysteine induced Renal Toxicity in Mice Exposed to Mercury. *Biometals* 00 00-00.

Campbell, J.R., Clarkson, T.W., Omar, M.D., 1986. The therapeutic use of 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonate in two cases of inorganic mercury poisoning. *J. Am. Med. Assoc.* 256, 3127-3130.

Chatterjee, G.C., Rudra Pal, D., 1975. Metabolism of L- ascorbic acid in rats under in vivo administration of mercury: effect of L-ascorbic acid supplementation. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 45, 284-292.

Cousin, R.J., 1983. Metallothionein-aspects related to copper and zinc metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.* 6, 15.

Coyle, P., Niezing, G., Shelton, T.L., Philcox, J.C., Rofe, A.M., 2000. Tolerance to cadmium hepatotoxicity by metallothionein and zinc: in vivo and in vitro studies with MT-null mice. *Toxicology* 150, 53–67.

Cuvín-Aralar, M.L.A., Furness, R.W., 1991. Mercury and selenium interaction: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 21, 348-364.

Draper, H.H., Hadley, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 186, 421-431.

El-Demerdash, F.M., 2001. Effects of selenium and mercury on the enzymatic activities and lipid peroxidation in brain, liver and blood of rats. *J. Environ. Sci. Health* 36, 489-499.

Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem.* 82, 70-77.

Emanuelli, T., Rocha, J.B.T., Pereira, M.E., Porciuncula, L.O., Morsch, V.M., Martins, A.F., Souza, D.O.G., 1996. Effect of mercury chloride intoxication and dimercaprol treatment on delta-aminolevulinatase dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice. *Pharmacol. Toxicol.* 79, 136-143.

Farina, M., Brandão, R., Lara, F.S., Soares, F.A., Souza, D.O., Rocha, J.B., 2003. Profile of nonprotein thiols, lipid peroxidation and delta aminolevulinate dehydratase activity in mouse kidney and liver in response to acute exposure to mercuric chloride and sodium selenite. *Toxicology* 184, 179-187.

Flora, S.J.S., Kumar, P., 1993. Biochemical and Immunotoxicological evaluation of metal chelating drugs in rats. *Drug Investigation* 5, 269-273.

Hoffman, D.J., Heinz, G.H., 1998. Effects of mercury and selenium on glutathione metabolism and oxidative stress in Mallard ducks. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 161-166.

Huang, Y.L., Cheng, S.L., Lin, T.H., 1996. Lipid peroxidation in rats administered with mercury chloride. *Biol. Trace Elem. Res.* 52, 193-206.

Hussain, S., Atkinson, A., Thompson, S.J., Khan, A.T., 1999. Accumulation of mercury and its effect on antioxidant enzymes in brain, liver and kidneys of mice. *J. Environ. Sci. Health* 34, 645-660.

Jacques-Silva, M.C., Nogueira, C.W., Broch, L.C., Flores, E.M., Rocha, J.B.T., 2001. Diphenyl diselenide and ascorbic changes deposition of selenium and ascorbic in liver and brain of mice. *Pharmacol. Toxicol.* 88, 119-125.

Jaffe, M.Z., 1886. Methods determining creatinine. *Physiol. Chem.* 10, 39-40.

Kagi, J.H.R., Nordberg, M., 1979. *Metallothionein*. Birkhauser, Verlag Basel, pp 56-65.

Kang, Y.J., Chen, Y., Yu, A., Voss-McCowan, M., Epstein, P.N., 1997. Overexpression of metallothionein in the heart of transgenic mice suppresses doxorubicin cardiotoxicity. *J. Clin. Invest.* 100, 1501-1506.

Klaassen, C.D., 1990. Heavy metals and heavy-metals antagonists. In: Gilman, A.G., Rall, T.W., Nies, A.S., Taylor, P. (Eds.), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Pergamon Press, New York, pp. 1592-1614.

Kemper, F.H., Jekat, F.W., Bertram, H.P., Eckard, R., 1990. New chelating agents. In: G.M. Volans, J. Sims, F.M. Sullivan, P. Turner (Eds), *Basic Science in Toxicology*, Taylor & Francis, London, pp. 523-546.

Lash, L.H., Zalups, R.K., 1996. Alterations in renal cellular glutathione metabolism after in vivo administration of subtoxic dose of mercuric chloride. *J. Biochem. Toxicol.* 11, 1–9.

Liu, Y., Liu, J., Iszard, M.B., Andrews, G.K., Palmiter, R.D., Klaassen, C.D., 1995. Transgenic mice that overexpress metallothionein-I are protected from cadmium lethality and hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 135, 222–228.

Lund, B.O., Miller, M.D., Woods, J.S., 1993. Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 45, 2017-2024.

Lynn, S., Yu, G.L., Jan, K.Y., 1999. Vicinal-thiol-containing molecules enhance but mono-thiol-containing molecules reduce nickel-induced DNA strand breaks. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 160, 198-205.

Masters, B.A., Kelly, E.J., Quaife, C.J., Brinster, R.L., Palmiter, R.D., 1994. Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 584–588.

Michalska, A.E., Choo, K.H., 1993. Targeting and germ-line transmission of a null mutation at the metallothionein I and II loci in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 8088–8092.

Miles, A.T., Hawksworth, G.M., Beattie, J.H., Rodilla, V., 2000. Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 35, 35–70.

Meotti, F.C., Stangherlin, E.C., Zeni, G., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., 2004. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environ. Res.* 94, 276-282.

Miller, O.M., Lund, B.O., Woods, J.S., 1991. Reactivity of Hg(II) with superoxide: evidence for the catalytic dismutation of superoxide by Hg(II). *J. Biochem. Toxicol.* 6, 293.

Moldeus, P., Cotgreave, I.A., Berggren, M., 1986. Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine. *Respiration* 50, 31-42.

Molin, M., Schutz, A., Skerfving, S., Sallaren, G., 1991. Mobilized mercury in subjects with varying exposure to elemental mercury vapour. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 63, 187-192.

Nogueira, C.W., Soares, F.A., Nascimento, P.C., Muller, D., Rocha, J.B.T., 2003a. 2,3-Dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase mercury- and cadmium-induced inhibition of δ -aminolevulinic acid dehydratase, *Toxicology* 184, 85-95.

Nogueira, C.W., Meotti, F.C., Curte, E., Pilissão, C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2003b. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. *Toxicology* 183, 29-37.

Nogueira, C.W., Santos, F.W., Soares, F.A., Rocha, J.B.T., 2004a. 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid inhibit δ -aminolevulinic acid dehydratase from human erythrocytes in vitro. *Environ. Res.* 94, 254-261.

Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2004b. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem. Rev* 104, 6255–6286.

Nordberg, M., Nordberg, G.F., 2000. Toxicological aspects of metallothionein. *Cell. Mol. Biol.* 46, 451– 463.

Onosaka, S., Cherian, M.G., 1982. Comparison of metallothionein determination by polarographic and cadmium-saturation methods. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 63, 270-274.

Paulmier, C., 1986. Selenoorganic functional groups. In: Paulmier, C. (Ed.), *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis*, First ed. Pergamon Press, Oxford, England, pp. 25-51.

Palmiter, R.D., Sandgren, E.P., Koeller, D.M., Brinster, R.L., 1993. Distal regulatory elements from the mouse metallothionein locus stimulate gene expression in transgenic mice. *Mol. Cell Biol.* 13, 5266–5275.

Perottoni, J., Rodrigues, O.E.D., Paixão, M.W., Zeni, G, Lobato, L.P., Braga, A.L., Rocha, J.B.T., Emanuelli, T., 2004. Renal and hepatic ALA-D activity and selected oxidative stress parameters of rats exposed to inorganic mercury and organoselenium compounds. *Food Chem. Toxicol.* 42, 17-28.

Rocha, J.B.T., Pereira, M.E., Emanuelli, T., Christofari, R.S. and Souza, D.O. 1995. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver kidney and blood of suckling rats. *Toxicology* 100, 27-37.

Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G., Hoekstra, W.G., 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179, 558-560.

Santos, F.W., Oro, T., Zeni, G., Rocha, J.B.T., do Nascimento, P.C., Nogueira, C.W., 2004. Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. *Toxicol. Lett.* 152, 255-263.

Sassa, S., 1982. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 28, 133-145.

Sasakura, C., Suzuki, K.T., 1998. Biological interaction between transition metals (Ag, Cd and Hg), selenide/sulfide and selenoprotein P. *J. Inorg. Biochem.* 71, 159-162.

Wang, G.W., Kang, Y.J., 1999. Inhibition of doxorubicin toxicity in cultured neonatal mouse cardiomyocytes with elevated metallothionein levels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288, 938–944.

Wilson, S.R., Zucker, P.A., huang, R.R.C., Spector, A., 1989. Development of synthetic compounds with glutathione peroxidase activity. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 5936-5939.

Xia, L., Nordman, T., Olsson, J.M., Dandimopoulos, A., Björkhem-Bergman, L., Nalvarte, I., Eriksson, L.C., Arnér, E.S.J., Spyrou, G., Björnstedt, M., 2002. The mammalian selenoenzyme thioredoxin reductase reduces ubiquinone. A novel mechanism for defense against oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 278, 2141-2146.

Legends

Figure 1- Effect of $(\text{PhSe})_2$, NAC or DMPS on δ -ALA-D activity in liver of mice exposed to mercuric chloride. Tissue was pre-incubated at 37°C for ten minutes. Enzymatic reaction was initiated by adding the substrate (ALA) to a final concentration of 2.2 mM in a medium containing 45 mM phosphate buffer, pH 6.8. Data are expressed as mean \pm S.E.M. of six to eight animals per group. (*) Denoted $p < 0.05$ as compared to the control group (one-way ANOVA/Duncan).

Figure 2- Effect of $(\text{PhSe})_2$, NAC or DMPS on non-protein thiol groups content in kidney of mice exposed to mercuric chloride. Data are reported as mean \pm S.E.M. of six to eight animals per group. (*) Denoted $p < 0.01$ as compared to the control group (one-way ANOVA/Duncan).

Figure 1

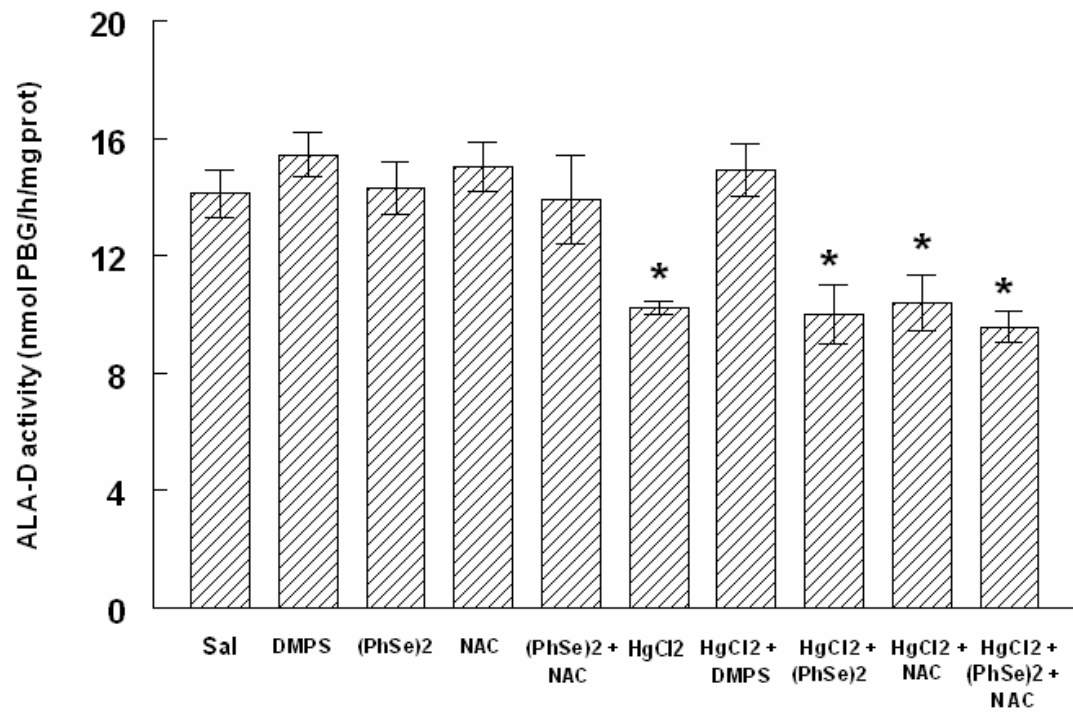
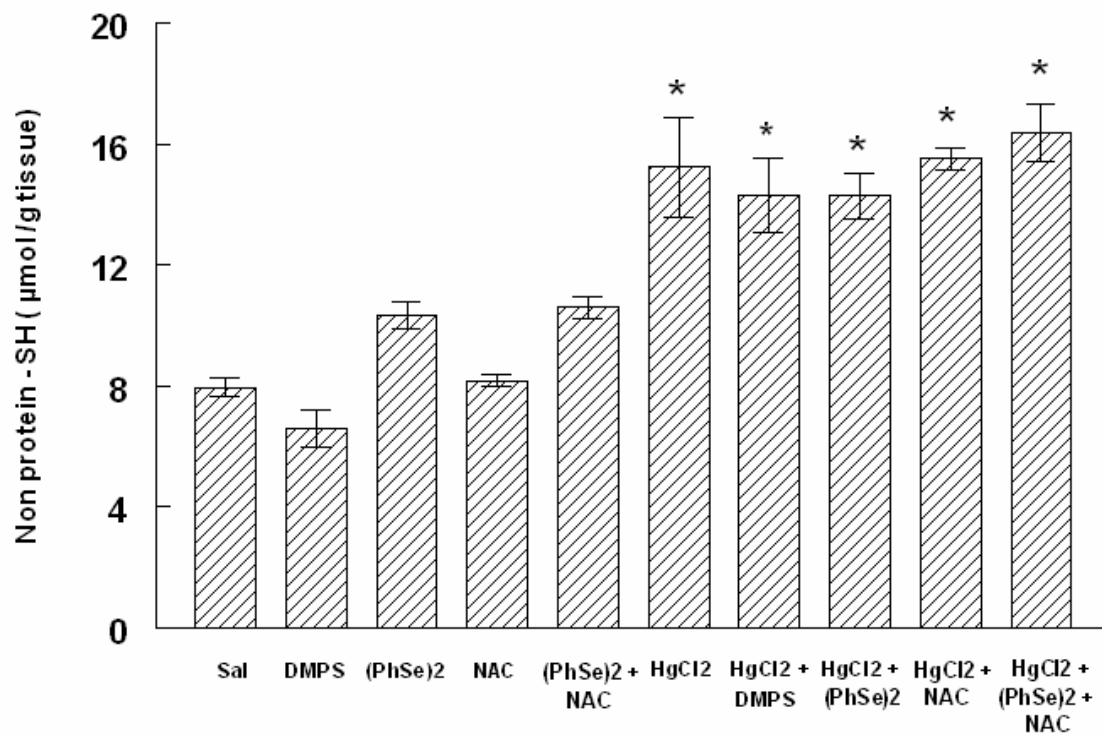


Figure 2



5- DISCUSSÃO

O mercúrio é um metal bastante difundido no meio ambiente e nas indústrias, podendo causar várias alterações, tanto nos animais quanto no homem (Lund et al., 1993). Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a toxicidade decorrente de uma exposição por mercúrio e, dentre estes mecanismos, está o processo de peroxidação lipídica (Huang et al., 1996). Sabe-se que o mercúrio pode estimular a lipoperoxidação por aumentar a formação de H_2O_2 na mitocôndria (Lund et al., 1991). Desta forma, acredita-se que agentes antioxidantes possam ser efetivos em reduzir a toxicidade induzida pelo mercúrio (Chatterjee et al., 1975).

Neste trabalho, um sinal evidente da toxicidade causada pela exposição ao mercúrio foi a redução no ganho de peso corporal nos animais expostos a este metal. As terapias utilizadas não foram eficientes em proteger contra esta alteração. Além disto, os resultados apontaram para efeitos negativos das terapias com os agentes antioxidantes testados, uma vez que os animais tratados somente com NAC e $(PhSe)_2$ ou NAC+ $(PhSe)_2$ apresentaram redução no ganho de peso corporal.

Os animais expostos ao $HgCl_2$ apresentaram inibição na atividade da enzima δ -ALA-D hepática. De acordo com isto, Emanuelli e colaboradores (1996) também relataram que animais expostos ao cloreto de mercúrio, na mesma dose testada neste trabalho, apresentaram inibição na atividade desta enzima no fígado. Esta inibição pode ser devida aos efeitos pró-oxidantes do mercúrio nos grupos sulfidrílicos essenciais localizados no sítio ativo da enzima (Emanuelli et al., 1996). Também é possível que o mercúrio (Hg^{2+}) cause a retirada de Zn^{2+} provocando, desta forma, a inibição da enzima δ -ALA-D. De fato, a δ -ALA-D de mamíferos é uma enzima que requer o elemento Zn^{2+} para sua atividade catalítica máxima e evidências suportam a hipótese de uma competição direta entre os metais bivalentes e o Zn^{2+} na atividade da δ -ALA-D (Rocha et al., 1995; Nogueira et al., 2003b). O DMPS foi eficiente em reverter à inibição causada pelo mercúrio na atividade da enzima δ -ALA-D no fígado. Já as terapias com NAC e $(PhSe)_2$ não

foram efetivas em proteger contra esta inibição. O efeito protetor do DMPS, frente à inibição da enzima δ -ALA-D, deve-se ao fato de que este composto é um agente quelante que pode se complexar ao mercúrio, reduzindo a sua disponibilidade para interagir com os grupos sulfidrílicos da enzima (Klaassen, 1996).

Os resultados deste trabalho também demonstraram que os animais expostos ao HgCl_2 não apresentaram alterações na concentração de ácido ascórbico e nos níveis de TBARS em fígado e rim de camundongos. De acordo com isto, Farina et al. (2003) demonstraram que a exposição aguda ao cloreto de mercúrio não causou aumento nos níveis de TBARS em fígado e rim de camundongos 6, 12, 24 e 48 horas após exposição ao metal. Além disto, nós demonstramos, em um estudo anterior, que a exposição aguda ao cloreto de mercúrio não causou alteração nos níveis de TBARS e na concentração de ácido ascórbico em fígado e rim de camundongos, 24 horas após a exposição ao metal (Brandão et al., 2006).

O mercúrio inorgânico é acumulado em maior quantidade no rim do que no fígado (Emanuelli et al., 1996). Neste contexto, nós observamos um aumento na concentração de uréia plasmática em camundongos expostos ao mercúrio. As terapias com DMPS e $(\text{PhSe})_2$ foram efetivas em proteger contra o aumento de uréia induzido pelo mercúrio. É importante ressaltar que os animais expostos ao mercúrio e tratados com NAC apresentaram um aumento na concentração de uréia quando comparados com os animais expostos ao mercúrio e tratados com DMPS. Este resultado sugere um efeito negativo da terapia com NAC.

Outra observação importante deste estudo foi o significativo aumento nos níveis de NPSH renal após exposição ao mercúrio. Este aumento não foi restaurado pelas terapias. Já os níveis de NPSH hepático não foram alterados após exposição ao mercúrio. De fato, estudos anteriores têm demonstrado que camundongos expostos ao HgCl_2 apresentaram um aumento nos níveis de NPSH renal (Farina et al., 2003, Brandão et al., 2006). Estudos *in vivo* têm demonstrado que o mercúrio é capaz de aumentar a atividade da glutatona redutase (GR) (Lash e Zalups, 1996). Este aumento pode estar relacionado, ao menos em parte, aos efeitos oxidativos diretos do mercúrio na GSH endógena, o que levaria ao

aumento na atividade da GR. Embora a atividade da GR não tenha sido verificada neste trabalho, o aumento observado nos níveis de NPSH renal pode ser interpretado como uma resposta fisiopatológica para preservar a homeostase do conteúdo de tiol intracelular.

Com relação à atividade das transaminases, a exposição ao cloreto de mercúrio não alterou as atividades da AST e ALT. Entretanto, foi observado um aumento na atividade destas enzimas nos animais tratados com os antioxidantes testados, indicando novamente um efeito negativo destas terapias.

As metalotioneínas (MT) são proteínas de baixo peso molecular, as quais possuem a capacidade de se ligar a diversos metais essenciais (zinco, cobre, etc.) e metais pesados (mercúrio, arsênio e cádmio) (Kagi e Nordberg, 1979). Segundo Cousin et al. (1983), a função biológica das MT está relacionada com o controle homeostático de metais como o zinco e cobre e com a detoxificação de outros metais como mercúrio e cádmio. As MT estão presentes em vários órgãos e sua síntese pode ser induzida no fígado, rim e pâncreas por vários tratamentos, como por exemplo o zinco, o cobre e o cádmio (Nordberg e Nordberg, 2000).

Neste estudo nós observamos que a exposição ao mercúrio causou um aumento nos níveis de metalotioneínas renal e hepático. Esta indução nos níveis de MT pode estar protegendo, ao menos em parte, contra os efeitos tóxicos do HgCl_2 , uma vez que alguns parâmetros, como os níveis de TBARS e a concentração de ácido ascórbico em fígado e rim, não foram alterados. Além disto, o tecido renal, o qual é o órgão alvo para o mercúrio, não apresentou inibição na atividade da enzima δ -ALA-D após exposição ao mercúrio.

Miles et al. (2000) relataram que as metalotioneínas conferem proteção contra vários danos ocasionados pelo estresse oxidativo, incluindo intoxicações por metais tóxicos. Uma vez que as MT são proteínas ricas em grupos sulfidrilas (-SH), o mercúrio poderia estar se ligando a esta proteína, com conseqüente proteção contra os possíveis efeitos tóxicos do metal. Além disto, nós verificamos um aumento no conteúdo de NPSH renal após exposição ao HgCl_2 . Desta forma, é possível que o mercúrio se complexe com as MT (Hg-MT) ou com os NPSH (Hg-NPSH) e não se torne disponível para exercer os seus efeitos tóxicos. Os

resultados deste trabalho também demonstraram que, em camundongos expostos ao mercúrio, as terapias com NAC e $(\text{PhSe})_2$ apresentaram poucos efeitos nos níveis de MT quando comparadas com a terapia com DMPS, sugerindo que a habilidade destes compostos em induzir as MT não está diretamente relacionada aos seus efeitos biológicos. Embora as terapias tenham pouco efeito em modificar os níveis de MT em camundongos expostos ao mercúrio, o tratamento com $(\text{PhSe})_2$ ou NAC+ $(\text{PhSe})_2$ *per se* causou uma elevação nos níveis de MT hepático. É importante ressaltar que, pela primeira vez, tanto o $(\text{PhSe})_2$, quanto a NAC são descritos na literatura como indutores de MT. Entretanto, a extrapolação destes resultados, obtidos em animais, para os seres humanos deve ser feita com bastante cuidado devido a rota de administração dos compostos testados.

6- CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo indicaram que a indução de MT e o aumento nos níveis de NPSH, após a exposição ao mercúrio, poderiam estar protegendo, ao menos em parte, contra os possíveis efeitos tóxicos induzidos pelo cloreto de mercúrio.

Os resultados também demonstraram que a N-acetilcisteína e o disseleneto de difenila podem ter a capacidade de induzir a síntese de MT.

Nossos dados também apontaram para a falta de propriedades terapêuticas dos antioxidantes testados (NAC e $(\text{PhSe})_2$).

Além disto, a terapia *per se* com estes antioxidantes causou alterações em alguns parâmetros toxicológicos.

7- PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, as perspectivas para trabalhos posteriores são:

- Realizar estudos *in vitro*, visando elucidar a interação entre o cloreto de mercúrio e agentes antioxidantes, como o $(\text{PhSe})_2$ e a NAC em tecidos de camundongos;
- Realizar estudos sub-crônico *in vivo* com o objetivo de verificar a toxicidade de metais pesados e o papel do $(\text{PhSe})_2$ administrado de forma oral em camundongos;
- Realizar estudos *in vivo* com o objetivo de verificar a habilidade do $(\text{PhSe})_2$, administrado de forma oral em camundongos, em induzir a síntese de metalotioneínas;
- Realizar estudos que visem elucidar os mecanismos da interação entre o cloreto de mercúrio e o $(\text{PhSe})_2$, administrados de forma aguda e simultaneamente em camundongos.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AASETH, J., JACOBENSEM, D., ANDERSEN, O., WICKSTROM, E. Treatment of mercury and lead poisoning with dimercaptosuccinic acid and sodium dimercaptopropanosulfate. **Analyst.**, 120, 853-854, 1995.
- ANDERSEN, O. Oral cadmium exposure in mice: Toxicokinetics and efficiency of chelating agents. **Toxicology**, 20 (2), 83-112, 1989.
- ANDERSON, M.B., PEDIGO, N.G., KATZ, R.P., GEORGE, W.J. Histopathology of testis from mice chronically treated with cobalt. **Reprod. Toxicol.**, 6, 41-50, 1992.
- APOSHIAN, H.V. DMSA and DMPS- Water soluble antidotes for heavy metal poisoning. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 23, 193-215, 1983.
- APOSHIAN, H.V., MAIORINO, R.M., GONZALEZ-RAMIREZ, D., ZUNIGA-CHARLES, M., XU, Z.F., HURLBUT, K.M., JUNCO-MUNOZ, P., DART, R.C., APOSHIAN, M.M. Mobilization of heavy metals by newer, therapeutically useful chelating agents. **Toxicology**, 97, 23-38, 1995.
- APOSHIAN, H.V., APOSHIAN, M.M., MAIORINO, R.M., XU, Z. Sodium 2,3-dimercapto-1-propanesulfonate (DMPS) treatment does not redistribute lead or mercury to the brain of rats. **Toxicology**, 109, 49-55, 1996.
- ARTEEL, G.E. and SIES, H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. **Environ.Toxicol.Pharmacol.**, 10, 153-158, 2001.
- ARUOMA, O.I., HALLIWELL, B., HOEY, B.M., BUTLER, J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide and hypochlorous acid. **Free Rad. Biol. Med.** 6, 593-597, 1989.
- BANNER, W.J.R., KOCH, M., CAPIN, D.M., HOPF, S.B., CHANG, S., TONG, T.G. Experimental chelation therapy in chromium, lead and boron intoxication with N-acetylcysteine and other compounds. **Toxicol Appl. Pharmacol.**, 83, 142-147, 1986.

- BARNARD, G.F.; ITOH, R.; HOHBERGER, L.H.; SHEMIN, D. Mechanism of porphobilinogen synthase – Possible role of essential thiol groups. **J. Biol. Chem.**, v. 252, p. 8965-8974, 1977.
- BARREIRO, O.L.C. 5-Aminolevulinate hydro-lyase from yeast. Isolation and purification. **Biochim. Biophys. Acta**, 139, 479-486, 1967.
- BECHARA, E.J.H., MEDEIROS, M.H.G., MONTEIRO, H.P., HERMES-LIMA, M., PEREIRA, B., DEMASI, M., COSTA, C.A., ABDALL, D.S.P., ONUKI, J., WENDEL, C.M.A., MASCI, P.D. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. **Quim. Nova**, 16, 385-392, 1993.
- BECKER, D.M., VILJOEN, J.D., KRAMER, S. The inhibition of red cell and brain ATPase by δ -aminolevulinic acid. **Biochem. Biophys. Acta**, 255, 26-34, 1971.
- BEHNE, D. and KYRIAKOPOULOS, A. Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. **Biochem. Biophys. Res. Co.**, v. 173, p. 1143-1149, 1990.
- BENOV, L.C., BENCHEV, I.C., MONOVICH, O.H. Thiol antidotes effect on lipid peroxidation in mercury-poisoned rats. **Chem. Biol. Interact.**, 76, 321, 1990.
- BEVAN, D. R., BODLAENDER, P., SHEMIN, D. Mechanism of porphobilinogen synthase. Requirement of Zn^{2+} for enzyme activity. **J. Biol. Chem.**, 255, n. 5, 2030-2035, 1980.
- BOESE, Q.F., SPANO, A.J., LI, J., TIMKO, M.P. δ -Aminolevulinic acid dehydratase in pea (*Pisum sativum* L.). Identification of an unusual metal-binding domain in the plant enzyme. **J. Biol. Chem.**, 266, 17060-17066, 1991.
- BOISHIO, A.A.P. and HENSHEL, D.S. Risk assesment of mercury exposure through fish consumption by the riverside people in the Madeira basin, Amazon. **Neurotoxicology**, 17, 169-176, 1996.

- BORGES, V.C. NOGUEIRA, C.W., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Organochalcogens affect the glutamatergic neurotransmission in human platelets. **Neurochem. Res.**, 29, 1505-9, 2004.
- BORGES, V.C., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W. Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na(+), K(+)-ATPase activity in rats. **Toxicology**, 215, 191-7, 2005a.
- BORGES, L.P., BORGES, V.C., MORO, A.V., NOGUEIRA, C.W., ROCHA, J.B.T., ZENI, G. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. **Toxicology**, 210, 1-8, 2005b.
- BORGES, L.P., NOGUEIRA, C.W. ROCHA, J.B.T., ZENI, G. Acute liver damage induced by 2-Nitropropane in rats: Effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. **Chem. Biol. Interact.**, *in press*, 2006.
- BORGSTRÖM, L., KAGEDAL, B., PAULSEN, O. Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, 31, 217-222, 1986.
- BRAGA, A.L., SILVEIRA, C.C., ZENI, G., SEVERO, W.A., STEFANI, H.A. Synthesis of selenocetals from enol ethers. **J. Chem. Res.**, p. 206-207, 1996.
- BRAGA, A.L.; ZENI, G.; ANDRADE, L.H.; SILVEIRA, C.C. Stereoconservative formation and reactivity of α -chalcogen-functionalized vinylithium compounds from bromo-vinyl chalcogens. **Synlett** v. 5, p. 595-596, 1997.
- BRANDÃO, R., LARA, F.S., PAGLIOSA, L.B., SOARES, F.A., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W., FARINA, M. Hemolytic effect of sodium selenite and mercuric chloride in human blood. **Drug Chem. Toxicol.**, 28, 397-407, 2005.
- BRANDÃO, R., SANTOS, F.W., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W. DMPS and N-acetilcisteína induced renal toxicity in mice exposed to mercury. **Biomaterials**, *in press*, 2006.
- BROUSSARD, L.A., HAMMETT-STABLER, C.A., WINECKER, R.E. **Toxicology of Mercury**. Laboratory Medicine, 33, 614-25, 2002

- BRUINS, M.R., KAPIL, S., OEHME, F.W. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 45, 198-207, 2000.
- BRUNE, D. and EVJE, D. M. Man's mercury loading from a dental amalgam. **Sci. Total Environ.**, 44, 51-63, 1985.
- BUCHET, J.P. and LAUWERYS, R.R. Influence of 2,3 dimercaptopropane-1-sulfonate and dimercaptosuccinic acid on the mobilization of mercury from tissues of rats pretreated with mercuric chloride, phenylmercury acetate or mercury vapors. **Toxicology**, 54, 323-333, 1989.
- CAMPBELL, J.R., CLARKSON, T.W., OMAR, M.D. The therapeutic use of 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonate in two cases of inorganic mercury poisoning. **J. Am. Med. Assoc.**, 256, 3127-3130, 1986.
- CANTILENA, L.R. and KLAASSEN, C.D. Comparison of the effectiveness of several chelators after single administration on the toxicity, excretion and distribution of cadmium. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 58, 452-460, 1981.
- CANTILENA, L.R. and KLAASEN, C.D. The effects of chelating agents on excretion of endogenous metals. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 63, 344-350, 1982.
- CARRASCO, J., PENKOWA, M., HADBERG, H., MOLINERO, A., HIDALGO, J. Enhanced seizures and hippocampal neurodegeneration following kainic acid-induced seizures in metallothionein-I+II-deficient mice. **Eur. J. Neurosci.**, 12, 2311-22, 2000.
- CHATTERJEE, G.C. and RUDRA PAL, D. Metabolism of L- ascorbic acid in rats under in vivo administration of mercury: effect of L-ascorbic acid supplementation. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, 45, 284-292, 1975.
- CHEN, A. and NEILANDS, J.B. Zinc, an essential metal ion for beef liver delta-aminolevulinatase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 55, p. 1060-1063, 1973.

- CHEN, A. and NEILANDS, J.B. The delta-aminolevulinatase dehydratases: molecular and environmental properties. **Struct. Bonding**, Berlin, 29, 123-169, 1976.
- CHERIAN, M.G. and CLARKSON, T.W. Biochemical changes in rat kidney on exposure to elemental mercury vapor: effect on biosynthesis of metallothionein. **Chem. Biol. Interact.**, 12, 109-120, 1976.
- CHERIAN, M.G.; MILES, E.F.; CLARKSON, T.W., COX, C. Estimation of mercury burdens in rats by chelation with dimercaptopropane sulfonate. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 245 (8), 479-484, 1988.
- CLARKSON, T.W. The toxicology of mercury. **Critical Reviews in Clinical and Laboratory Science**, 34, 369-403, 1997.
- COMASSETO, J.V. Vinylic selenides. **J. Organomet Chem.**, v. 253, p. 131-181, 1983.
- CORY-SLECHTA, D.A., WEISS, B., COX, C. Mobilization and redistribution of lead over the course of calcium disodium ethylenediamine tetraacetate chelation therapy. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 243, 804-813, 1987.
- COUSIN, R.J. Metallothionein-aspects related to copper and zinc metabolism. **J. Inherit. Metab. Dis.**, 6, 15, 1983.
- CUTLER, M.G., MOORE, M.R., EWART, F.G. Effects of δ -aminolevulinic acid administration on social behavior in the laboratory mouse. **Psychopharmacolog**, 61, 131-135, 1979.
- De FLORA, S., ROSSI, G.A., De FLORA, A. Metabolic, desmutagenic and anticarcinogenic effects of N-acetylcysteine. **Respiration**, 50, 43-49, 1986a.
- De FLORA, S., ASTENGO, M., SERRA, D., BENNICELLI, C. Inhibition of urethan-induced lung tumors in mice by dietary N-acetylcysteine. **Cancer Lett.**, 32, 235-241, 1986b.

- DENT, A.J., BEYERSMANN, D., BLOCK, C., HASNAIN, S.S. Two different zinc sites in bovine 5-aminolevulinatase dehydratase distinguished by extended X-ray absorption fine structure. **Biochemistry**, 29, 7822-7828, 1990.
- DEIANA, M., ARUOMA, O.I., BIANCHI, M.L., SPENCER, J.P.E., KAUR, H., HALLIWELI, B., AESCHBACH, R., BANNI, S., DESSI, M.A., CORONGIU, F.P. Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base modification and tyrosine nitration by the extra virgin oil-derived antioxidant hydroxytyrosol. **Free Radic. Biol. Med.**, 26, 762-769, 1999.
- DENEKE, S.M. and FANBURG, B.L. Regulation of cellular glutathione. **Am. J. Physiol.**, 257, 163-173, 1989.
- EL-DEMERDASH, F. M. Effects of selenium and mercury on the enzymatic activities and lipid peroxidation in brain, liver and blood of rats. **J. Environ. Sci. Health**, 36, 489-499, 2001.
- EMANUELLI, T., ROCHA, J.B.T., PEREIRA, M.E., PORCIUNCULA, L.O., MORSCH, V.M., MARTINS, A.F., SOUZA, D.O.G. Effect of mercury chloride intoxication and dimercaprol treatment on delta-aminolevulinatase dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice. **Pharmacol. Toxicol.**, 79, 136-143, 1996.
- EMANUELLI, T., PAGEL, F. W., ALVES, L.B., REGNER, A., SOUZA, D.O. Inhibition of adenylate cyclase activity by 5-aminolevulinic acid in rat and human brain. **Neurochem. Int.**, 38, 213-218, 2001.
- ENDO, T. and SAKATA, M. Effects of sulfhydryl compounds on the accumulation, removal and cytotoxicity of inorganic mercury by primary cultures of rat renal cortical epithelial cells. **Pharmacol. Toxicol.**, 76, 190-195, 1995.
- FANG, Y.Z., YANG, S., WU, G. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Nutrition**, 18, 872, 2002.
- FARINA, M., BRANDÃO, R., LARA, F.S., SOARES, F.A., SOUZA, D.O., ROCHA, J.B. Profile of nonprotein thiols, lipid peroxidation and delta-aminolevulinatase dehydratase activity in mouse kidney and liver in response to acute exposure to mercuric chloride and sodium selenite. **Toxicology**, 184, 179-187, 2003.

- FAVERO, A.M., WEIS, S.N., STANGHERLIN, E.C., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W. Teratogenic effects of diphenyl diselenide in Wistar rats. **Reprod. Toxicol.**, 20, 561-8, 2005.
- FINELLI, V.N.; MURHTY, L.; PEIRANO, W.B.; PETERING, H.G. Delta-aminolevulinatase dehydratase, a zinc dependent enzyme. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 60, 1418-1424, 1974.
- FISCHER, D.R., MAYS, C.W., TAYLOR, G.N. Ca-DTPA toxicity in the mouse fetus. **Health Physics**, 29, 780-782, 1975.
- FLORA, S.J.S. and KUMAR, P. Biochemical and immunotoxicological evaluation of metal chelating drugs in rats. **Drug Invest.**, 5, 269-273, 1993.
- FLORA, S.J.S. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility following combined administration of N-aceylcysteine and meso 2,3-dimercaptosuccinic acid in rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, 26, 865-869, 1999.
- FOULKES, E.C. Biological Roles of Metallothionein. **Elsevier / North-Holland**. New York, pp. 69-76, 1982.
- FRUMKIM, H., MANNING, C.C., WILLIAMS, P.L., SANDERS, A., TAYLOR, B.B., PIERCE, M., ELON, L., HERTZBERG, V. S. Diagnostic chelation challenge with DMSA: a biomarker of long-term mercury exposure? **Environment Health Perspectives** 109, 167-171, 2001.
- GIBSON, K.D., NEUBERGER, A., SCOTT, J.J. The purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase. **Biochem. J.**, 61, 618-628, 1955.
- GILMAN, A., PHILIPS, F.S., ALLEN, R.P., KOELLE, E.S. The treatment of acute cadmium intoxication in rabbits with 2,3-dimercaptopropanol (BAL) and other mercaptans. **Chemical Warfare Service**, 87, 85-101, 1946.
- GIRALT M., PENKOWA, M., HERNANDEZ, J., MOLINERO, A., CARRASCO, J., LAGO, N., et al. Metallothionein-1+2 deficiency increases brain pathology in

transgenic mice with astrocyte-targeted expression of interleukin 6. **Neurobiol. Dis.**, 9, 319 – 38, 2002a.

GIRALT M., PENKOWA, M., LAGO, N., MOLINERO, A., HIDALGO, J. Metallothionein- 1+2 protect the CNS after a focal brain injury. **Exp. Neurol.**, 173, 114– 28, 2002b.

GOERING, P.L., TANDON, S.K. & KLAASSEN, C.D. Induction of hepatic metallothionein in mouse liver following administration of chelating agents. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 80, 467-472, 1985.

GOERING, P.L. Lead–protein interactions as a basis for lead toxicity. **Neurotoxicology**, 14, 45–60, 1993.

HOFFMAN, D. J. and HEINZ, G. H. Effects of mercury and selenium on glutathione metabolism and oxidative stress in Mallard ducks. **Environ. Toxicol. Chem.**, 17, 161-166, 1998.

HOLMGREN, A. Thioredoxin. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 54, p. 237-271, 1985.

HOOVER, T.D. and APOSHIAN, H.V. BAL increases the arsenic-74 content of rabbit brain. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 70, 160-162, 1983.

HRUBY, K. and DONNER, A. 2,3-Dimercapto-1-propanesulphonate in heavy metal poisoning. **Med. Toxicol.**, 2, 317-323, 1987.

HUANG, Y. L., CHENG, S. L., LIN, T. H. Lipid peroxidation in rats administrated with mercury chloride. **Biol. Trace Elem. Res.**, 52, 193-206, 1996.

HUGHES, M.N. and POOLE, R.K. **Metals and Micro-organism**, Chapman and Hall, London p. 280-285, 1989.

HUSSAIN, S., ATKINSON, A., THOMPSON, S.J., KHAN, A.T. Accumulation of mercury and its effect on antioxidant enzymes in brain, liver, and kidneys of mice. **J. Environ. Sci. Heath**, 34, 645-660, 1999.

- ILBÄCK, N.G., GLYNN, A.W., WIKBERG, L., NETZEL, E., LINDH, U. Metallothionein is induced and trace element balance changed in target organs of a common viral infection. **Toxicology**, 199, 241–250, 2004.
- JACQUES-SILVA, M.C., NOGUEIRA, C.W., BROCH, L.C., FLORES, E.M., ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide and ascorbic changes deposition of selenium and ascorbic in liver and brain of mice. **Pharmacol. Toxicol.** 88, 119-125, 2001.
- JAFFE, E.K. The porphobilinogen synthase catalyzed reaction mechanism. **Bioorg. Chem.**, 32, 316-25, 2004.
- JORDAN, P.M.; GORE, M.G.; CHAUDHRY, A.G. Subunit modification of 5-aminolevulinic acid dehydratase involving cysteine residues. **Biochem. Soc. Trans.**, 4, 762-763, 1976.
- JUGO, S. The efficiency of chelating agents in eliminating ^{203}Hg from the bodies of young and adult rats. **Health Physics**, 38, 680-682, 1980.
- KABATA-PENDIAS, A. and PENDIAS, H. **Biogeochemistry of trace elements**. PWN, Warsaw, 364pp, 1993.
- KAGI, J.H.R. and NORDBERG, M. Metallothionein. Birkhauser, Verlag Basel, pp 56-65, 1979.
- KANDA, T., ENGMAN, L., COTGREAVE, I.A., POWIS, G. Novel water-soluble diorganyl tellurides with thiol peroxidase and antioxidant activity. **J. Org. Chem.**, v. 64, p. 8161-8169, 1999.
- KEITH, R.L.; SETIARAHARDJO, I.; FERNANDO, Q.; APOSHIAN, H.V., GANDOLFI, A.J. Utilization of renal slices to evaluate the efficacy of chelating agents for removing mercury from the kidney. **Toxicology**, 116, 67-75, 1997.
- KHANDELWAL, S., KACHRU, D.N., TANDON, S.K. Influence of metal chelators on metalloenzymes. **Toxicol. Lett.**, 37, 213-219, 1987.

KLAASSEN, C.D. Induction of metallothionein by adrenocortical steroids. **Toxicology**, 20, 275–279, 1981.

KLAASSEN, C.D. Metais Pesados e Antagonistas de Metais Pesados. *In*: GOODMAN and GILMAN: **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, Editora Mc Graw-Hill, 9ª Edição, Rio de Janeiro, 1996.

KLAYMAN, D. L. and GÜNTHER, W. H. (eds.). **Organic selenium compounds: their chemistry and biology**. New York: John Wiley and sons p. 68-157, 1973.

KOJIMA, S., SHIMADA, H., KIYOZUMI, M. Comparative effects of chelating agents on distribution, excretion and renal toxicity of inorganic mercury in rats. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.**, 64, 471-484, 1989.

KOSTYGOU, N.M. **Pharmakol.Toksikol.** 21, 64, 1958.

KOTSONIS, F.N. and KLAASSEN, C.D. Increase in hepatic metallothionein in rats treated with alkylating agents. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 51, 19–27, 1979.

LARINI, L., SALGADO, P.E.T., LEPERA, J.S. Metais. *In*: LARINI, L.: **Toxicologia**, Editora Manole LTDA, 1ª edição brasileira, São Paulo, 1997.

LASH, L.H. and ZALUPS, R.K. Alterations in renal cellular glutathione metabolism after in vivo administration of subtoxic dose of mercuric chloride. **J. Biochem. Toxicol.**, 11, 1–9, 1996.

LORSCHIEDER, F.L., MURRAY, J.V., SUMMERS, A.O., ZWIERS, H. The dental amalgam controversy inorganic mercury and the CNS: genetic linkage of mercury and antibiotic resistance in intestinal bacteria. **Toxicology**, 97, 19-22, 1995.

LUND, B.O., MILLER, M.D., WOODS, J.S. Mercury-induced H₂O₂ production and lipid peroxidation in vitro in rat kidney mitochondria. **Biochem. Pharmacol.**, 42, 181-187, 1991.

- LUND, B.O., MILLER, M.D., WOODS, J.S. Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. **Biochem. Pharmacol.**, 45, 2017-2024, 1993.
- MACIEL, E.N., BOLZAN, R.C., BRAGA, A.L., ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect δ -aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney and brain of mice. **J. Biochem. Molecular Toxicol.**, 14, 310-319, 2000.
- MARGOSHES, M., VALLEE, B.L. A cadmium protein from equine kidney cortex. **J. Am. Chem. Soc.**, 79, 4813-4814, 1957.
- McCORD, J.M. Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance. **Clin. Biochem.** 26, 351-357, 1993.
- MEOTTI, F.C.; STANGHERLIN, E. C.; ZENI, G; NOGUEIRA, C.W., ROCHA, J.B.T. (2004). Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. **Environ. Res.**, 94, 276-282, 2004.
- MILES, A.T., HAWKSWORTH, G.M., BEATTIE, J.H., RODILLA, V. Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, 35, 35-70, 2000.
- MILLER, A.L. Dimercaptosuccinic acid (DMSA), a non-toxic, water-soluble treatment for heavy metal toxicity. **Altern. Med. Rev.**, 3, 199-207, 1998.
- MILLER, D.M. and WOODS, J.S. Redox activities of mercurythiol complexes: implications for mercury-induced porphyria and toxicity. **Chem. Biol. Interact.**, 88, 23-35, 1993.
- MOLDEUS, P., COTGREAVE, I.A., BERGGREN, M. (1986). Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine. **Respiration**, 50, 31-42, 1986.
- MUCKTER, H.; LIEBL, B.; REICHL, F.X.; HUNTER, G.; WALTHER, U., FICHTL, B. Are we ready to replace dimercaprol (BAL) as an arsenic antidote? **Hum. Exp. Toxicol.**, 16(8), 460-465, 1997.

NADIG, J., KNUTTI, R., HANY, A. DMPS treatment in acute sublimate (mercury chloride) poisoning. **Schweiz. Med. Wochenschr.**, 115, 507-511, 1985.

NAVARRO-ALARCÓN, M. and LÓPEZ-MARTINEZ, M.C. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **Sci. Tot. Environ.**, v. 249, p. 347-371, 2000.

NOGUEIRA, C.W., ROTTA, L.N., PERRY, M.L., SOUZA, D.O., ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. **Brain Res.**, 906, 157-63, 2001.

NOGUEIRA, C.W., BORGES, V.C., ZENI, G., and ROCHA, J.B.T. Organochalcogens effects on aminolevulinate dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro. **Toxicology**, 191, 169-178, 2003a.

NOGUEIRA, C.W., SOARES, F.A., NASCIMENTO, P.C., MULLER, D., ROCHA, J.B.T. 2,3-dimercaptoprapane-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase mercury- and cadmium- induced inhibition of δ -aminolevulinate dehydratase. **Toxicology**, 184, 85-95, 2003b.

NOGUEIRA, C.W., QUINHONES, E.B., JUNG., E.A.C., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. **Inflamm. Res.**, v. 52, p. 56-63, 2003c.

NOGUEIRA, C.W., MEOTTI, F.C., CURTE, E., PILISSÃO, C., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. **Toxicology**, 183, 29-37, 2003d.

NOGUEIRA, C.W., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chem. Rev.**, 104, 6255–6286, 2004.

NORDBERG, M. and NORDBERG, G.F. Toxicological aspects of metallothionein. **Cell. Mol. Biol.**, 46, 451-463, 2000.

- OLDFIELD, J.E. The Two faces of selenium. **J. Nutr.**, 117, 2002-2008, 1987.
- PAPAS, A.M. Determination of antioxidant status in humans. **Lipids**, 31, 77-82, 1996.
- PARNHAM, M.J. and GRAF, E. Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. **Prog. Drug Res.**, v. 36, p. 10-47, 1991.
- PATRICK, L. Toxic metals and antioxidants. Part II. The role of antioxidants in arsenic and cadmium toxicity. **Altern. Med. Rev.**, 8, 106, 2003.
- PAULMIER, C. Selenium reagents and intermediates. In: **Organic Synthesis**. Oxford: Pergamon, 1986.
- PALMITER, R.D. The elusive function of metallothioneins. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 95, 8428, 1998.
- PEREIRA, B., CURI, R., KOKUBUN, E., BECHARA, J.H. 5-Aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. **J. Appl. Physiol.**, 72, 226-230, 1992.
- PEROTTONI, J., RODRIGUES, O. E. D., PAIXÃO, M. W., ZENI, G, LOBATO, L. P., BRAGA, A. L., ROCHA, J. B. T., EMANUELLI, T. Renal and hepatic ALA-D activity and selected oxidative stress parameters of rats exposed to inorganic mercury and organoselenium compounds. **Food Chem. Toxicol.**, 42, 17-28, 2004.
- PETRAGNANI, N., RODRIGUES, R., COMASSETO, J.V. **Organomet. Chem.**, p. 114-281, 1976.
- PINGREE, S.D., SIMMONDS, P.L., WOODS, J.S. Effects of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) on tissue and urine mercury levels following prolonged methylmercury exposure in rats. **Toxicol. Sci.**, 61, 224-233, 2001.

- PUTZER, R.R., ZHANG, Y., PRESTERA, T., HOLTZELAW, W.D., WADE, K.L., TALALAY, P. Mercurials and dimercaptans: synergism in the induction of chemoprotective enzymes. **Chem. Res. Toxicol.**, 8, 103-110, 1995.
- QUAIFE, C.J., FINDLEY, S.D., ERICKSON, J.C., FROELICK, G.J., KELLY, E.J., ZAMBROWICZ, B.P., et al. Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. **Biochemistry**, 337, 250– 9, 1994.
- QUIG, D. Cysteine metabolism and metal toxicity. **Altern. Méd. Rev.**, 3, 262-270, 1998.
- RANA, S.V.S., REKHA, S., SEEMA, V. Protective effects of few antioxidants on liver function in rats treated with cadmium and mercury. **Ind. J. Exp. Biol.**, 34, 177-179, 1996.
- RAO, M.V. and SHARMA, P.S.N. Protective effect of vitamin E against mercuric chloride reproductive toxicity in male mice. **Reprod. Toxicol.**, 15, 705-712, 2001.
- REPINE, J.E., BAST, B., LANKHORST, I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. **Am. J. Resp. Crit. Care Med.**, 156, 341–357, 1997.
- RITTER, C., ANDRADES, M.E., REINKE, A., MENNA-BARRETO, S., MOREIRA, J.C.F., DAL-PIZZOL, F. Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. **Crit. Care Med.** 32, 342–349, 2004.
- 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 delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. **Toxicology**, 100, 27-37, 1995.
- RODRIGUES, A.L.; BELLINASSO, M.L.; DICK, T. Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Pimelodus malacatus* Pisces, Pimelodidae. **Com. Biochem. Physiol.**, 94B, 65-69, 1989.

- SALGADO, P.E.T. Toxicologia dos Metais. *In*: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**, Editora Atheneu, São Paulo, 1996.
- SANTOS, F.W., ORO, T., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NASCIMENTO, P.C., NOGUEIRA, C.W. Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. **Toxicol. Lett.**, 152, 255–263, 2004.
- SANTOS, F.W., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NASCIMENTO, P.C., MARQUES, M.S., NOGUEIRA, C.W. Efficacy of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) and diphenyl diselenide on cadmium induced testicular damage in mice. **Food Chem. Toxicol.**, 43, 1723–1730, 2005.
- SASAKURA, C. and SUZUKI, K.T. Biological interaction between transition metals (Ag, Cd and Hg), selenide/sulfide and selenoprotein P. **J. Inorg. Biochem.**, 71, 159-162, 1998.
- SASSA, S., FUJITA, H., KAPPAS, A. Genetic and chemical influences on heme biosynthesis. *In*: Kotyk, A. Skoda, J. Paces, V., Kostka, V. (Eds.), **Highlights of Modern Biochemistry**, VSP, Utrecht, 1, 329-338, 1989.
- SAVEGNAGO, L., TREVISAN, M., ALVES, D., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, 21, 86–92, 2006.
- SCHAUMBURG, A., SCHNEIDER-POETSH, A.A.W., ECKERSKORN, C. Characterization of plastic 5-aminolevulinate dehydratase (ALA-D, EC 4.2.1.24) from spinach (*Spinacia oleracea* L.) by sequencing and comparison with non plant ALA-D enzymes. **Z. Naturforsch.**, 45C, 77-84, 1991.
- SCHWARTZ, K. and FOLTSZ, P. J. Selenium as a integral part of facto 3 against dietary necrotic liver degeneration. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 79, p. 200-214, 1957.
- SCHWARTZ, J.G.; SNIDER, T.E., MONTIEL, M.M. Toxicity of a family from vacuumed mercury. **Am. J. Emerg. Med.**, 10 (3), 258-261, 1992.

- SHARMA, G., NATH, R., GILL, K.D. Effect of ethanol on the distribution of cadmium between the cadmium metallothionein- and non-metallothionein-bound cadmium pools in cadmium-exposed rats. **Toxicology**, 72, 251–263, 1992.
- SHARMA, M.K., KUMAR, M., KUMAR, A. Protection against mercury-induced renal damage in Swiss albino mice by *Ocimum sanctum*. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, 19, 161-167, 2005.
- SHIBATA, H. and OCHIAI, H. Purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase from radish cotyledons. **Plant Cell Physiol.**, 18, 421-429, 1977.
- SHIMADA, H.; FUKUDOME, S.; KIYOZUMI, M.; FUNAKOSHI, T.; ADACHI, T.; YASUTAKE, A., KOJIMA, S. Further study of effects of chelating agents on excretion of inorganic mercury in rats. **Toxicology**, 77, 157-169, 1993.
- SMITH, D.R., CALACSAN, C., WOOLARD, D., LUCK, M.L., CREMIN, J., LAUGHLIN, N.K. Succimer and the urinary excretion of essential elements in a primate model of childhood lead exposure. **Toxicol. Sci.**, 54, 473-480, 2000.
- SOMMER, R. and BEYERSMANN, D. Zinc and cadmium in 5-aminolevulinic acid dehydratase. Equilibrium, kinetic, and ^{113}Cd -nmr-studies. **J. Inorg. Biochem.**, 20, 131-145, 1984.
- SPENCER, P. and JORDAN, P.M. Investigation of the nature of the two metal-binding sites in 5-aminolaevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*. **Biochem. J.**, 300, 373-381, 1994.
- SPENCER, P. and JORDAN, P.M. Characterization of the two 5-aminolevulinic acid binding sites, the A- and P-sites, of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*. **Biochem. J.**, 305, 151-158, 1995.
- STADTMAN, T. C. Selenium-dependent enzymes. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 49, p. 93-110, 1980.

- STENNARD, F.A., HOLLOWAY, A.F., HAMILTON, J., WEST, A.K. Characterisation of six additional human metallothionein genes. **Biochim. Biophys. Acta**, 1218, 357– 65, 1994.
- STOCKEN, L.A. and THOMPSON, R.S.H. British anti-Lewisite 3. Arsenic and thiol excretion in animals after treatment of Lewisite burns. **Biochem. J.**, 40, 548-554, 1946.
- SUZUKI, J.S., KODAMA, N., MOLOTKOV, A., AOKI, E., TOHYAMA, C. Isolation and identification of metallothionein isoforms (MT-1 and MT-2) in the rat testis. **Biochem. J.**, 334, 695, 1998.
- TAMAI, H., SHIOI, Y., SASSA, T. Purification and characterization of delta-aminolevulinic acid dehydratase from *Chlorella regularis*. **Plant Cell Physiol.**, 20 (2), 435-444, 1979.
- TIMBRELL, J.A. **Principles of biochemical toxicology**. Second edition. Washington DC: Taylor e Francis London, 1991.
- TOET, A.E., DIJK, A., SAVELKOUL, T.J.F., MEULENBELT, J. Mercury kinetics in a case of severe mercuric chloride poisoning treated with dimercapto-1-propane sulphonate (DMPS). **Hum. Exp. Toxicol.**, 13, 11-16, 1994.
- TSUKAMOTO, I., YOSHINAGA, T., SANO, S. The role of zinc with special reference to the essential thiol groups in delta-aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver. **Biochim. Biophys. Acta**, 12, 167-78, 1979.
- UNDERWOOD, E. J. Trace elements in human and animal nutrition. **New York: Academic Press**, 1977.
- URSINI, F., HEIM, S., KIESS, M., MAIORINO, M., ROVERI, A., WISSING, J., FLOHÉ, L. Dual function of the seleno-protein PHGPx during sperm maturation. **Science**, v. 285, p. 1393-1396, 1990.
- VIMY, M. J. and LORSCHIEDER, F. L. Intra-oral air mercury released from dental amalgam. **J. of Dent. Res.**, 64 (8), 1069-1071, 1985.

- WEBB, M. and CAIN, K. Function of metallothionein. **Biochem. Pharmacol.**, 31, 137-142, 1982.
- WHO. Environmental Health Criteria 101: Methylmercury, Geneva, **World Health Organization**, 25, 36 pp, 1990.
- WINGE, D.R. Limited proteolysis of metallothionein method. **Methods Enzymol.**, 205, 438-447, 1991.
- WINGLER, K., BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Gastrointestinal glutathione peroxidase. **Biofactors**, v. 10, p. 245-249, 1999.
- YONEDA, S. and SUZUKI, K.T. Detoxification of mercury by selenium by binding of equimolar Hg-Se complex to a specific plasma protein. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 143, 274-280, 1997.
- YOSHIDA, M., SATOH, M., YASUTAKE, A., SHIMADA, A., SUMI, Y., TOHYAMA, C. Distribution and retention of mercury in metallothionein-null mice after exposure to mercury vapor. **Toxicology**, 139, 129-136, 1999.
- YOSHIOKA, T. and ICHIKAWA, J. Glomerular dysfunction induced by polymorphonuclear leukocyte-derived reactive oxygen species. **Am. J. Physiol.**, 257, 53-59, 1989.
- ZALUPS, R.K., LASH, L.H. Advances in understanding the renal transport and toxicity of mercury. **J. Toxicol. Environ. Health**, 42, 1-44, 1994.
- ZALUPS, R.K., MINOR, K.H. Luminal and basolateral mechanisms involved in the renal tubular uptake of inorganic mercury. **J. Toxicol. Environ. Health**, 46, 73-100, 1995.
- ZALUPS, R.K., BARFUSS, D.W. Participation of mercuric conjugates of cysteine, homocysteine and N-acetylcysteine in mechanisms involved in the renal tubular uptake of inorganic mercury. **J. Am. Soc. Nephrol.**, 9, 551-561, 1998.

ZALUPS, R.K. Molecular interactions with mercury in the kidney. **Pharmacol. Rev.**, 52, 113-143, 2000.

ZENI, G., BRAGA, A.L., STEFANI, H.A. Palladium catalysed coupling of sp²-Hybridized tellurides. **Acc. Chem. Res.**, 36, 731-738, 2003.

ZIMENT, I. Acetylcysteine: a drug with an interesting past and a fascinating future. **Respiration**, 50, 26-30, 1986.

ZOLLA, L., LUPIDI, G., BELLELLI, A., AMICONI, G. Effect of mercury ions on human erythrocytes. Relationships between hypotonic swelling and cell aggregation. **Biochim. Biophys. Acta.**, 1328, 273-280, 1997.

9 – ANEXOS

9.1 – Demais trabalhos realizados durante o Curso de Mestrado

Brandão, R., Lara, F.S., Pagliosa, L.B., Soares, F.A., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., Farina, M. Hemolytic effects of sodium selenite and mercuric chloride in human blood. **Drug and Chemical Toxicology**, 28, 397-407, 2005.

Brandão, R., Santos, F.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W. DMPS and N-acetilcisteína induced renal toxicity in mice exposed to mercury. **Biometals**, *in press*, 2006.

Brandão, R., Santos, F.W., Oliveira, R., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W. Oral therapy with diphenyl diselenide protects against toxic effects induced by cadmium in mice testes. Artigo submetido à Revista **Biometals**.