

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

Mariana Mesquita Fonseca

**TOXICIDADE DO HgCl_2 EM RATAS WISTAR ANALISADAS 12 E 48
HORAS APÓS A EXPOSIÇÃO: POSSÍVEL EFEITO PREVENTIVO DO
ZINCO**

Santa Maria, RS
2016

Mariana Mesquita Fonseca

**TOXICIDADE DO HgCl₂ EM RATAS WISTAR ANALISADAS 12 E 48 HORAS
APÓS A EXPOSIÇÃO: POSSÍVEL EFEITO PREVENTIVO DO ZINCO**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Ester Pereira

Santa Maria, RS, Brasil
2016

Mariana Mesquita Fonseca

**TOXICIDADE DO HgCl₂ EM RATAS WISTAR ANALISADAS 12 E 48 HORAS
APÓS A EXPOSIÇÃO: POSSÍVEL EFEITO PREVENTIVO DO ZINCO**

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

Aprovado em xx de fevereiro de 2016

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

Prof 1

Prof 2

Santa Maria, RS
2016

Dedicatória

Esta dissertação é dedicada a meu irmão Pedro Mesquita Fonseca. Além de toda amizade compartilhada e inspiração, sabemos nós, que não fosse uma infância com muito detergente, “experiências” e plantas mortas, eu estaria no jornalismo. Obrigada Pedrinho. Te amo!

Agradecimentos

A minha vó Dulce, por toda liberdade, credibilidade e apoio concedido durante não só esse tempo, mas na vida toda.

Ao meu irmão Pedro, por toda a calma e compreensão com meus surtos mais difíceis e pela incrível parceria.

A toda minha família, gaúcha ou carioca, a qual eu tenho muito orgulho de pertencer e amo imensamente.

A minha orientadora, prof^a. Dr^a. Maria Ester Pereira, por todos os ensinamentos passados, por quem sinto uma enorme admiração.

“Azamiga do lab” Lidiane e Jamile, por todas as risadas, momentos de descontração, de estudos e força que demos uma para as outras durante essa jornada.

A minha grande amiga Taíse, com quem construí uma espécie de casamento acadêmico que transcendeu a graduação e dura até este momento, e sempre pude, e sei que posso, contar para tudo a todo momento.

Aos ex colegas de laboratório, Vitor, Tiago e Cláudia, por todo suporte me concedido com toda boa vontade durante esta dissertação.

A gurizada de Santiago, as amigas do Rehab, aos amigos longínquos e aqueles Unidos pela paz mundial, por entenderem minhas loucuras e me fazerem esquecer delas, sempre trazendo muita alegria e serenidade.

Ao Thiago, meu grande amigo e hoje namorado, por todo apoio, companheirismo, amor e imensa paciência.

A banca examinadora, Marcos e Diego, por disporem do seu tempo para a avaliação deste trabalho.

A todos, que de uma forma ou outra, passaram pela minha vida nesses cinco anos, e me deram apoio e força para seguir em frente.

Mais sorte que juízo
(Dito popular)

RESUMO

TOXICIDADE DO HgCl₂ EM RATAS WISTAR ANALISADAS 12 E 48 HORAS APÓS A EXPOSIÇÃO: POSSÍVEL EFEITO PREVENTIVO DO ZINCO

Autor: Mariana Mesquita Fonseca
Orientadora: Maria Ester Pereira

O mercúrio é um metal sem qualquer função biológica. A exposição ao mercúrio em qualquer uma de suas diferentes formas químicas pode induzir efeitos tóxicos aos organismos vivos. Esta toxicidade é comumente atribuída à alta afinidade que esse metal possui por grupamentos sulfidrílicos (-SH) e a indução de estresse oxidativo. O zinco é um metal essencial importante em muitas funções bioquímicas e celulares, e destaca-se dentre os compostos estudados, pela prevenção dos danos causados por metais tóxicos como o mercúrio. Recentemente verificamos a eficácia do pré-tratamento com zinco contra os efeitos causados pelo mercúrio em ratas sacrificadas 24 horas após a administração do metal tóxico. Contudo, apesar do zinco prevenir algumas alterações, muitas questões permanecem. Assim, buscamos avaliar os efeitos tóxicos do mercúrio em ratas analisados 12 e 48 horas após a exposição, e o possível efeito preventivo do zinco. Para isso, ratas Wistar foram injetadas (s.c.) com NaCl 0,9% (salina) ou ZnCl₂ (27 mg/kg) e 24 horas mais tarde, com salina ou HgCl₂ (5 mg/kg). Os animais foram mortos 12 ou 48 horas após a administração de mercúrio. Avaliamos a atividade das enzimas δ-aminolevulinato desidratase e alanina aminotransferase, assim como níveis de tióis totais e não proteicos, níveis de ácido ascórbico, ureia e creatinina, além de analisarmos o conteúdo de metal em fígado, rins e sangue. O peso corporal e de órgãos também foram avaliados. Nos animais mortos 12 horas após o tratamento com mercúrio verificou-se: diminuição dos níveis de ácido ascórbico e aumento do peso renal, assim como acúmulo dos metais mercúrio e zinco em rins e fígado. O pré-tratamento com zinco preveniu totalmente o efeito do mercúrio sobre o peso renal. Em 48 horas após a exposição ao mercúrio, os efeitos observados foram: diminuição do ganho de peso e aumento do peso renal, aumento nos níveis de ureia e creatinina, e diminuição da atividade da δ-ALA-D e dos níveis de tióis totais renal. Ainda, o tratamento com mercúrio aumentou os níveis desse metal em rins e fígado. O zinco preveniu parcialmente as alterações no ganho de peso e nos níveis de creatinina. Em conclusão, estes resultados mostram que o mercúrio provocou diferentes modificações nos dois períodos estudados e que o pré-tratamento com zinco preveniu alguns dos parâmetros alterados pela exposição ao mercúrio.

Palavras-chave: δ-aminolevulinato desidratase, mercúrio, zinco, fêmeas, nefrotoxicidade.

ABSTRACT

HgCl₂ TOXICITY IN FEMALE WISTAR RATS ANALYZED 12 AND 48 HOURS AFTER EXPOSURE: POSSIBLE ZINC PREVENTIVE EFFECT

Author: Mariana Mesquita Fonseca
Advisor: Maria Ester Pereira

Mercury is a metal without any biological function. The exposure to mercury in any of different chemical forms can induce toxic effects on living organisms. This toxicity is commonly attributed to the high affinity that this metal has for sulfhydryl groups (SH) and oxidative stress induction. Zinc is an essential metal important in many biochemical and cellular functions, and stands out among the compounds studied for preventing the damage caused by toxic metals such as mercury. Recently we verify the effectiveness of pre-treatment with zinc against the effects caused by mercury in rats sacrificed 24 hours after administration of the toxic metal. However, despite the zinc to prevent some alterations, many questions remain. Thus, we sought to evaluate the toxic effects of mercury in rats analyzed 12 and 48 hours after exposure, and the possible preventive effect of zinc. For this, Wistar rats were injected (s.c.) with 0.9% NaCl (saline) or ZnCl₂ (27 mg/kg) and 24 hours later, saline or HgCl₂ (5 mg/kg). The animals were sacrificed 12 or 48 hours after administration of mercury. We evaluated the activity of enzymes δ -aminolevulinic acid dehydratase and alanine aminotransferase, and levels of total and nonprotein thiols, ascorbic acid, urea and creatinine, besides analyze metal content in liver, kidney and blood. Body and organs weight were also evaluated. In animals sacrificed 12 hours after treatment with mercury was verified: decrease of ascorbic acid levels and increase of kidney weight, as well as accumulation of mercury and zinc in the kidneys and liver. The zinc pretreatment prevented completely the mercury effect on renal weight of these animals. In 48 hours after mercury exposure, these effects were observed: decrease of weight gain and increase of renal weight, increase of urea and creatinine levels, and reduction of the δ -ALA-D activity and kidney total thiols levels. Furthermore, the treatment with mercury increased levels of this metal in the kidneys and liver. Zinc partially prevented the changes in gain weight and creatinine levels. In conclusion, these results show that mercury caused different modifications in both periods studied and the zinc pretreatment prevented some of the parameters altered by mercury exposure.

Keywords: δ -aminolevulinic acid dehydratase, mercury, zinc, females, nephrotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

1 INTRODUÇÃO

Figura 1 - Ciclo biogeoquímico do mercúrio 15

2 ARTIGO

Figure 1 - Protocol of exposure: Metals were administered at doses of 5 mg/kg HgCl₂ (s.c.) and 27 mg/kg ZnCl₂ (s.c.). The animals were sacrificed 12h (n=6) or 48h (n=6) after HgCl₂ exposure for biochemical determinations.....26

Figure 2 - δ-ALA-D activity from the kidney (A), liver (B) and blood (C) of rats treated as described in the Table 1 legend. Results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's post-hoc test: groups followed by different letters are statistically different ($p \leq 0.05$) and groups followed by the same letters are statistically equal ($p \leq 0.05$). Data are presented as mean \pm S.E.M. (n=6)..... 28

Figure 3 - Ascorbic acid levels in the kidney (A) and liver (B) of female rats treated as described in the Table 1 legend. Results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's post-hoc test: groups followed by different letters are statistically different ($p \leq 0.05$) and groups followed by the same letters are statistically equal ($p \leq 0.05$). Data are presented as mean \pm S.E.M. (n=6)..... 30

Figure 4 - Total and non-protein SH levels in the kidney (A-C) and liver (B-D) of female rats treated as described in the Table 1 legend. Results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's post-hoc test: groups followed by different letters are statistically different ($p \leq 0.05$) and groups followed by the same letters are statistically equal ($p \leq 0.05$). Data are presented as mean \pm S.E.M. (n= 6)..... 30

LISTA DE TABELAS

1 ARTIGO

Table 1- Body weight gain and liver and kidney weights of female adult rats treated (s.c.) with one dose of saline or ZnCl ₂ (27 mg/kg) followed by one dose of saline or HgCl ₂ (5 mg/kg) 24h later, and killed 12 or 48h after HgCl ₂ administration	29
Table 2- Serum creatinine and urea levels, and serum and hepatic ALT activity of female rats treated as described in the Table 1 legend	29
Table 3 - Levels of mercury and zinc in the kidney, liver and blood of female rats treated as described in the Table 1 legend.....	31

2 APÊNDICE – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Tabela 1 - Efeito da administração de uma dose de ZnCl ₂ (27mg/Kg) ou salina, sucedida após 24 horas por uma dose de HgCl ₂ (5mg/kg) ou salina em ratas Wistar mortas 12, 24 ou 48 horas após a administração de Hg sobre diferentes parâmetros analisados	45
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: grau Celsius
μ: micro
ALT: alanina aminotransferase
ANOVA: análise de variância (analysis of variance)
b.w.: body weight (peso corporal)
Cis: cisteína
DNA: ácido desoxirribonucléico
EO: estresse oxidativo
ERs: espécies reativas
GSH: glutathiona reduzida
h: hora
Hg: mercúrio
Hg⁺/Hg₂⁺: mercúrio inorgânico, oxidado
Hg⁰: mercúrio metálico; mercúrio elementar
m: mili
M: molar
min: minuto
n: número de repetições
p: nível de significância
pH: potencial hidrogeniônico
rpm: rotações por minuto
s.c.: subcutânea; subcutaneamente
S.E.M.: standard error of mean (erro padrão da média)
Sal: salina
SH: grupos sulfidrílicos
TCA: ácido tricloroacético
TSH: tióis totais
U: unidades
v/v: volume/volume
w/v: weight/volume
Zn: zinco
δ-ALA: ácido-δ-aminolevulínico;
δ-ALA-D: δ-aminolevulinato desidratase.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 MERCÚRIO	13
1.2 O CLORETO DE MERCÚRIO E SUA TOXICIDADE	16
1.4 ZINCO	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 MANUSCRITO	23
4 CONCLUSÕES	36
5 REFERÊNCIAS	37
6 APÊNDICE - CONSIDERAÇÕES GERAIS	45

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está descrita na seguinte forma: primeiramente são apresentados a introdução e os objetivos. A seguir, os resultados e a discussão são apresentados na forma de artigo, o qual se encontra no item artigo 1. O item conclusão encontrado no final desta dissertação, apresenta interpretações gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho. As referências bibliográficas apresentadas no final da dissertação referem-se somente as citações que aparecem no item introdução. O item apêndice – conclusões gerais, apresenta uma análise geral relacionando os resultados deste trabalho com outros trabalhos.

1 INTRODUÇÃO

1.1 MERCÚRIO

O mercúrio é um metal bivalente pertencente a família 12 da tabela periódica. É conhecido pela peculiar característica de, no estado de oxidação 0, apresentar-se líquido em temperatura ambiente. Sem qualquer função biológica e sendo considerado um poluente ambiental, este metal é frequentemente mencionado por causar efeitos tóxicos aos organismos vivos (MERGLER et al., 2007; SCHEUHAMMER et al., 2007).

Desastres ambientais envolvendo grandes concentrações de mercúrio são comumente exemplificados por dois principais eventos: Baía de Minamata – Japão, entre as décadas de 50 e 70, e Iraque, nos anos de 1971 e 1972. No primeiro caso, resíduos industriais contendo mercúrio foram despejados na baía, e uma vez no ambiente, o metal acabou sendo incorporado na cadeia alimentar. Assim, através do consumo de peixes contaminados, a população foi exposta durante um longo período ao mercúrio (CLARKSON, 2002; EKINO et al., 2007). Diferentemente, no Iraque a exposição ocorreu de forma aguda, quando, motivados por um período de escassez de alimentos, a população recorreu a sementes previamente tratadas com fungicidas contendo mercúrio para fabricação de pão. O consumo foi suspenso logo após identificação da fonte do metal (AMIN-ZAKI et al., 1978; CLARKSON, 2002;).

Recentemente no Brasil, uma catástrofe ambiental chama a atenção para uma possível contaminação com altos níveis de mercúrio. No subdistrito de Bento Rodrigues no município de Mariana – MG, uma barragem de rejeitos de produção de minério de ferro pertencente a mineradora Samarco rompeu, lançando no ambiente aproximadamente 50 milhões de metros cúbicos de rejeitos em forma de lama. Além da devastação da região, o Rio Doce, principal fonte hídrica do estado, foi totalmente contaminado. Laudos preliminares realizados pelo Serviço Autônomo de Água e Esgoto (SAAE) de Baixo Guandu – ES, já confirmam a presença dentre outros metais, de mercúrio, arsênio, ferro e chumbo na água do Rio Doce após a contaminação.

A liberação do mercúrio ao ambiente também ocorre de forma espontânea através de atividades vulcânicas e erosões da crosta terrestre. Além da liberação natural e dos desastres ambientais com grandes despejos do metal, atividades antropogênicas como a queima de combustíveis fósseis, mineração, processos

industriais e descarte inadequado de materiais detentores de mercúrio, potencializam os níveis ambientais deste metal, tornando a exposição a ele quase impossível de ser evitada (MAGOS & CLARKSON, 2006; LI et al., 2009).

O mercúrio pode ser encontrado em duas formas químicas diferentes: a forma orgânica, ou seja, um átomo de mercúrio ligado a um ou mais átomos de carbono (R-C-Hg), e a forma inorgânica, englobando a forma elementar (metálica/valência 0/ Hg^0) e suas formas oxidadas (Hg_2^{2+} , Hg^{2+}) (KIM & ZOH 2012). Essas formas de apresentação do metal não são inertes, podendo sofrer no ambiente interconversão entre si, isto é, através de reações reversíveis de metilação/desmetilação e oxidação/redução, formas orgânicas do mercúrio podem ser transformadas em formas inorgânicas e vice e versa (BISINOTI & JARDIM, 2004; KIM & ZOH, 2012). Essas reações fazem parte do ciclo biogeoquímico do mercúrio (FIGURA 1), onde o Hg^0 emitido no ambiente pode precipitar inalterado ou ser oxidado a Hg_2^{2+} . Esse pode então retornar ao ambiente após uma volatilização (Hg^0) ou, pela ação de bactérias do solo ou água, ser convertido através de metilação a forma orgânica de metilmercúrio, sendo então incorporado à cadeia alimentar aquática (CLARKSON, 1997; RISHER et al., 2003; BISINOTI & JARDIM, 2004). Na cadeia alimentar ocorre um processo chamado de bioacumulação, isto é, quanto mais alto for o nível trófico do organismo, maior será a concentração de mercúrio nele acumulado. Como resultado disto, peixes normalmente consumidos pela população, por exemplo, apresentam uma maior concentração do metal (BOENING, 2000).

Figura 1 - Ciclo biogeoquímico do mercúrio

1

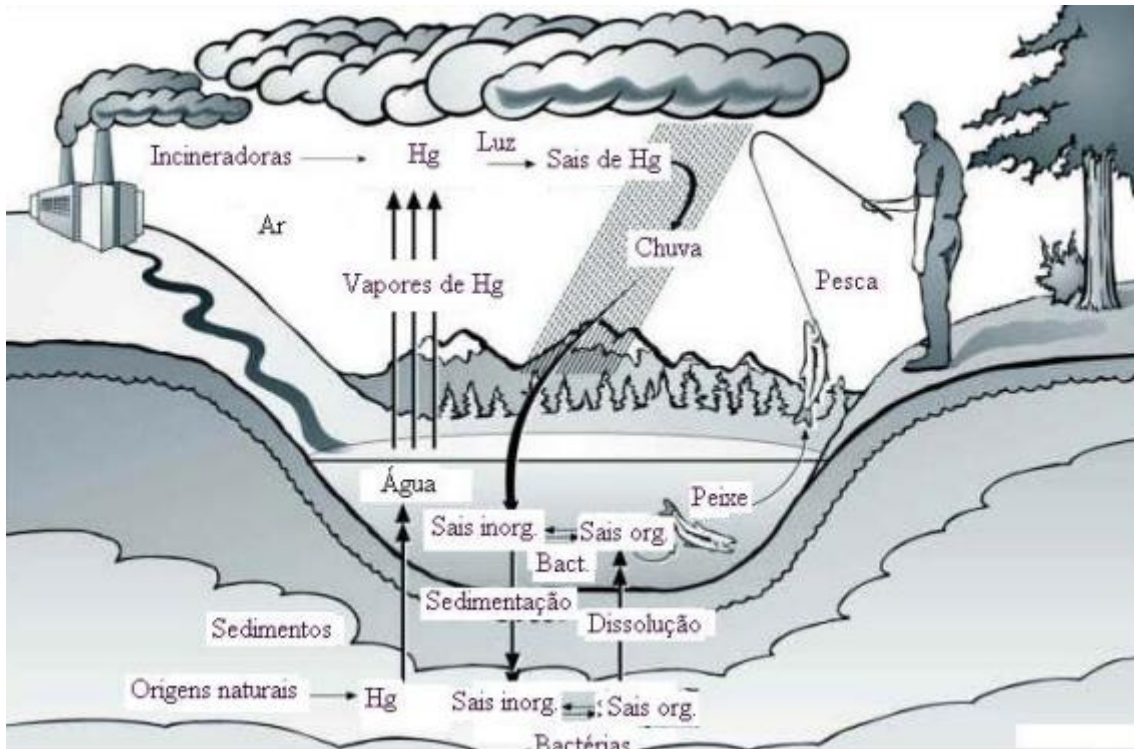


Figure 1

Fonte: (http://people.uwec.edu/piercech/Hg/mercury_water/cycling.htm)

Cada forma química possui características toxicocinéticas próprias, diferindo quanto a suas vias de exposição predominantes, assim como quanto aos órgãos alvos e efeitos tóxicos (SYVERSEN & KAUR, 2012). O mercúrio em forma orgânica, representado pelo metilmercúrio (MeHg), tem na via gastrointestinal, através da ingestão de alimentos contaminados, sua principal via de exposição. Altamente lipofílicos, estes compostos orgânicos conhecidos como compostos organomercuriais, atravessam facilmente a barreira hemato-encefálica (OZUAH, 2000), exercendo sua toxicidade principalmente no sistema nervoso central (FARINA et al., 2011; BISEN-HERSH et al., 2014). Também lipofílica, mas tendo sua exposição por meio da inalação, o mercúrio elementar (Hg^0) atinge predominantemente o sistema respiratório, sendo facilmente absorvidos pelos alvéolos, lesando especialmente os pulmões (PARK & ZHENG, 2012). Já as formas oxidadas do mercúrio inorgânico (Hg_2^{2+} e particularmente o Hg^{2+}), geralmente encontradas como sais provenientes da ligação do mercúrio a elementos como cloro, enxofre e oxigênio, atingem a população majoritariamente através do consumo de água contaminada. Hg_2^{2+} e Hg^{2+} caracterizam-se por serem altamente nefrotóxicos (ZALUPS, 2000; BRIDGES et al., 2014).

Quanto a toxicidade do mercúrio, ainda há muito a ser elucidado no que diz respeito aos mecanismos pelos quais esse metal interfere no organismo. Contudo, estudos indicam uma relação de sua toxicidade à alta afinidade que esse metal possui por grupamentos sulfidrílicos (-SH), o que leva a formação de complexos estáveis com esses, induzindo mudanças estruturais de enzimas sulfidrílicas e inativação dos sítios ativos das mesmas (ROONEY, 2007). Além disso, a ligação do Hg com o grupamento-SH de antioxidantes tem como efeito a diminuição da capacidade de neutralização das espécies reativas. Essa redução da capacidade antioxidante somada ao fato que a exposição ao Hg aumenta as espécies reativas resulta em um desequilíbrio no sistema pró-oxidante/antioxidante em favor do pró-oxidante, levando a uma condição de estresse oxidativo, condição esta que faz com que o organismo tenha sua homeostase prejudicada através da oxidação de proteínas, indução da peroxidação lipídica, disfunções mitocondriais e lesões ao DNA (FARINA et al., 2003; AGARWAL et al., 2010).

1.2 O CLORETO DE MERCÚRIO E SUA TOXICIDADE

O cloreto de mercúrio (HgCl_2) – objeto de estudo deste trabalho - é o principal representante das formas oxidadas do mercúrio inorgânico, que embora afetem a população em menores níveis, a exposição a ele ocorre extensivamente. Além disso, fora as transformações já citadas que este metal sofre no ambiente, conversões entre as formas do mercúrio também acontecem em contato com o organismo: a desmetilação de compostos organomercuriais e a oxidação do mercúrio metálico, leva a conversão desses à forma inorgânica Hg_2^+ (LORSCHIEDER et al., 1995; SHAPIRO & CHAN, 2008), aumentando ainda mais a importância de estudos sobre essa forma do metal.

Ao contrário do mercúrio em forma orgânica e do Hg^0 , o HgCl_2 é uma molécula pouco lipofílica (ZALUPS, 2000). Seu transporte e absorção são auxiliados por várias moléculas tiólicas, como a cisteína e a glutatona (ZALUPS & LASH, 2006). Estas facilitam sua entrada nas células via mimetismo molecular, fazendo com que se formem complexos estruturalmente homólogos à outras biomoléculas endógenas, conseguindo assim transpor mais facilmente as membranas celulares (BRIDGES et al. 2007). Altamente perfundidos, os rins são órgãos particularmente expostos a altos níveis de xenobióticos (AU, 2004), e uma vez que o mercúrio inorgânico é absorvido, são esses os alvos primários no que diz respeito ao acúmulo

e expressão da toxicidade do metal (CLARKSON et al., 2003; CARRANZA-ROSALES et al., 2005).

A ação do mercúrio inorgânico nos rins ocorre de forma rápida: momentos após a exposição, cerca de 50% do metal localiza-se nesse órgão (BERLIN et al., 2007) e em menos de 24 horas, já podem ser observados sintomas de nefrotoxicidade (ZALUPS, 2000). A falência renal observada caracteriza-se por variações na taxa de filtração glomerular, alterações funcionais no fluxo plasmático renal e lesões nos túbulos proximais que são associadas a peroxidação lipídica e ao estresse oxidativo (GIRARDI & ELÍAS, 1991). De fato, o acúmulo dos íons de mercúrio acontece em sua grande maioria nas células ao longo dos segmentos S1, S2 e S3 dos túbulos proximais. Os mecanismos de toxicidade desse metal são relacionados a sua capacidade de ligar-se aos grupamentos tiólicos na membrana plasmática ou no meio intracelular, causando inativação de enzimas e proteínas fundamentais para um funcionamento renal adequado. Além disso, a ligação do metal com grupamentos sulfidrílicos reflete em uma diminuição intracelular desse grupamento, predispondo o metabolismo celular a alterações e promovendo eventos como o estresse oxidativo, peroxidação lipídica, apoptose e necrose celular e disfunções mitocondriais (ZALUPS, 2000; DIEGUEZACUÑA et al., 2004; CARRANZA-ROSALES et al., 2005; STACCHIOTTI et al., 2006).

Em estudos de toxicidade renal causada pela exposição ao mercúrio, o aumento dos níveis séricos de ureia e creatinina são relacionados aos danos causados pelo metal, tanto em ratos jovens (PEIXOTO & PEREIRA, 2007; FRANSCISCATO et al., 2011) como em adultos (AGARWAL et al., 2010, OLIVEIRA et al., 2014). Sendo ambos metabólitos excretados pelos rins (a ureia produto do catabolismo proteico e mecanismo de excreção da amônia, e a creatinina formada pela degradação da fosfocreatina no metabolismo normal da musculatura), falhas renais estão diretamente ligadas ao aumento sanguíneo desses compostos (RAVEL, 1997). Estes marcadores são amplamente utilizados na clínica, importantes para o diagnóstico e avaliação do dano renal agudo (EDELSTEIN, 2008). Ainda sobre marcadores de efeito tóxico, a atividade da δ -ALA-D (também chamada de porfobilinogênio sintase), enzima catalizadora da condensação de dois δ -ALA para a formação do porfobilinogênio, tem sido muito utilizada (JAFFE, 1995). Vários estudos mostram alteração da atividade da enzima em ratos jovens e adultos quando

intoxicados com mercúrio inorgânico (PEIXOTO et al., 2003; FRANCISCATO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2014).

Apesar do fígado não ser o alvo primário do Hg_2^+ , alterações na atividade de enzimas hepáticas, como da ALT, tem sido relatadas em animais expostos ao metal (BRIDGES & ZALUPS, 2005; MORAES-SILVA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014). Esses estudos possibilitam o uso dessa enzima como marcador da toxicidade hepática. Somado a esses efeitos, modificações histopatológicas como vacuolização e degeneração citoplasmática, núcleo picnótico e necrose centrolobular também foram observadas (KUMAR et al., 2005; AGARWAL et al., 2010). O mecanismo da hepatotoxicidade causada pelo $HgCl_2$ ainda não é completamente elucidado.

A biodisponibilidade do mercúrio depende, além da forma química do metal, da forma e da duração da exposição. Em roedores, a absorção do mercúrio inorgânico via oral é aproximadamente de 15%, enquanto que em seres humanos próximo de 7% (GOLDWATER & NICOLAU, 1966). Uma vez no organismo, a excreção ocorre principalmente pela ação de substâncias quelantes como as metalotioneínas, tendo a eliminação efetiva na urina e nas fezes. Assim, a meia vida biológica do $HgCl_2$ chega a 90 dias em ratos e 40 dias em humanos (BERLIN et al., 2007). Entretanto, mesmo havendo a eliminação de boa parte do mercúrio, seus efeitos tóxicos podem ser observados em diferentes sistemas devido a sua acumulação via interação intracelular (CLARKSON, 1997).

A toxicidade do mercúrio inorgânico acontece em muitos outros órgãos e células. Alterações comportamentais (PEIXOTO et al., 2007; FRANCISCATO et al., 2009), no sistema reprodutor (HEATH et al., 2009), cardiovascular (ZHANG et al., 2013) e endócrino (ZHU et al., 2000) são relacionadas a exposição ao metal. Modificações em estruturas proteicas (SUTTON et al., 2002), danos a integridade das membranas celulares e ao DNA (SCHURZ et al., 2000; BASKIN et al., 2003), desencadeamento de processos apoptóticos (TCHOUNWOU, 2003), e interferências na atividade mitocondrial (SHENKER et al., 2000) são alguns dos efeitos relacionados a intoxicação pelo Hg_2^+ .

1.3 O SISTEMA ANTIOXIDANTE NO ESTRESSE OXIDATIVO

Radicais livres são átomos ou moléculas que apresentam um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). São instáveis, extremamente reativos quimicamente, e possuem uma meia vida muito curta. As espécies reativas produzidas em baixas concentrações são parte

integrante do metabolismo, e realizam um papel importante na regulação das funções celulares (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000; RAY et al., 2012); contudo, uma vez havendo superprodução, lesam lipídios, proteínas e DNA, além de estarem envolvidas no declínio do sistema imune e envelhecimento (ROSENFELDT et al., 2012)

A definição de antioxidante se dá a toda molécula que em baixas concentrações, quando comparada ao substrato oxidável, consegue prevenir ou retardar a oxidação do mesmo ou regenerá-lo (HALLIWELL et al., 1995; BIANCHI; ANTUNES, 1999). Nesse contexto, para combate dos efeitos oxidativos danosos, o organismo conta com um complexo sistema de defesa antioxidante atuante em duas linhas: enzimático e não enzimático (JORDÃO et al., 2004). O fato de o mercúrio aumentar a peroxidação lipídica (DE FREITAS et al., 2009) e provocar a depleção desses sistemas (FARINA et al., 2003; AGARWAL et al., 2010; PAL & GOSH, 2012), liga a toxicidade do metal a sua ação oxidativa.

O sistema antioxidante enzimático é composto basicamente pela catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase (FERREIRA & MATSUBARA, 1997) e atua de forma que o produto gerado por uma enzima é o substrato de outra. Assim, o sistema age interligado até que ocorra a neutralização do radical livre (YAO & KESHAVAN, 2011). No que se refere aos sistemas antioxidantes não enzimáticos, esses atuam neutralizando as espécies reativas através de interações diretas, bloqueando as reações prejudiciais por meio de uma troca de elétrons (Yao et al., 2011). Os principais representantes dessa linha são os tióis totais, o ácido ascórbico [antioxidante solúvel em água de rápida ação (JIRAUNGKOOSKUL & SAHAPHONG, 2007) e a glutathione reduzida (GSH) [tiol celular de baixa massa molecular possuidor de um importante papel na defesa contra danos oxidativos (CARSOL et al., 1997)]. Quando por algum motivo esses sistemas não são suficientes, a condição de estresse oxidativo é instaurada.

Além dos sistemas presentes no organismo, moléculas antioxidantes também podem ser consumidas na dieta alimentar normal ou através de suplementação (SOUSA et al., 2007). Compostos como carotenóides (GUTTERIDGE, 2000) e flavonóides (PROCHÁZKOVÁ et al., 2011), vitaminas C (ácido ascórbico) e E (α -tocoferol) (AKSOY et al., 2005; AGARWAL et al., 2010), o ácido graxo omega-3 (KARAPEHLIVAN et al., 2014) e minerais como o selênio (JIHEN et al., 2009) e o

zinco (JEMAI et al., 2007), demonstram efeitos relevantes na implementação da atividade antioxidante e proteção contra o dano oxidativo.

1.4 ZINCO

Assim como o mercúrio, o Zn também é um metal bivalente pertencente a família 12 da tabela periódica. É essencial em diversas funções bioquímicas e celulares (FANG et al., 2002), estando envolvido em funções regulatórias, estruturais e catalíticas (MARET, 2005; MATHIE et al., 2006). Este metal é fundamental para a proliferação e diferenciação celular, além de ser cofator e elemento estrutural de uma série de proteínas, de participar da estabilização de membranas biológicas, da replicação e transcrição do DNA e da sinalização intracelular (STEBENS, 2003; SANDSTEAD & AU, 2007; SHAH, 2011). Além disso, o Zn é um potente indutor da síntese de GSH (BHASIN et al., 2012) e da síntese de proteínas detoxificantes como as metalotioneínas (PEIXOTO et al., 2003; PEIXOTO et al., 2007b).

Apesar da grande importância do zinco para o metabolismo celular, e de sua deficiência causar reações danosas como a indução da peroxidação lipídica (YOUSEF et al., 2002), uma concentração excessiva deste metal pode desencadear efeitos citotóxicos (CHOI & KOH, 1998). Sendo assim, a manutenção de concentrações adequadas desse metal é de grande importância. Sua homeostase é feita através de proteínas transportadoras de membrana, que regulam a entrada e saída do zinco celular (CHIMIENTI et al., 2003), e de metaloproteínas, envolvidas no transporte do Zn entre as organelas, mantendo o metal disponível dentro de uma variação adequada (MARET, 2005). O Zn é absorvido majoritariamente no intestino delgado, e sua excreção ocorre principalmente pelas fezes (SAPER & RASH, 2009). Sua presença no organismo é bastante variada: o soro contém concentrações aproximadas de 15 μM e os tecidos – exemplo, fígado – pode conter de 168 a 442 $\mu\text{g/g}$ de tecido seco (MATHIE et al., 2006; RODRIGUEZ-MORENO et al., 1997).

Estudos demonstram uma efetividade considerável do Zn na prevenção de alterações bioquímicas induzidas pelo Hg inorgânico em ratos (PEIXOTO et al., 2007b; FRANCISCATO et al., 2009, 2011; MORAES-SILVA et al., 2012; FAVERO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014;). Recentemente, Oliveira et al. (2014) mostraram a eficiência do pré tratamento com Zn contra a intoxicação aguda ao cloreto de mercúrio em ratas fêmeas sacrificadas 24 horas após a administração de Hg. Contudo, apesar do zinco prevenir as alterações causadas pelo Hg em fígado e rins, muitas questões permanecem, como por exemplo, quando aparecem os efeitos do

mercúrio e se os efeitos protetores do zinco são notáveis poucas horas após a exposição ao mercúrio, assim como se este efeito prolonga-se a um período maior.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da exposição de ratas Wistar ao cloreto de mercúrio, assim como o possível efeito preventivo do Zn em parâmetros bioquímicos em dois diferentes períodos (12 e 48 horas) após a exposição ao HgCl₂.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este trabalho visou avaliar em ratas sacrificadas 12 e 48 horas após a exposição ao mercúrio:

- A atividade da enzima δ-aminolevulinato desidratase em rins, fígado e sangue, como marcador de exposição;
- Os níveis séricos de ureia e creatinina, como parâmetro de nefrotoxicidade;
- A atividade da enzima alanina aminotransferase (ALT) hepática e sérica, como parâmetro de hepatotoxicidade;
- Os níveis de tióis totais e não proteicos, e de ácidos ascórbico em rins e fígado, como parâmetros antioxidantes não enzimáticos;
- O conteúdo de Hg e Zn em rins, fígado e sangue, como indicativo de distribuição e deposição do metal;
- O possível efeito preventivo do zinco sobre alterações causadas pelo mercúrio nos itens anteriormente citados.

3 MANUSCRITO

Os materiais e métodos, resultados e discussão desta dissertação apresentam-se sob a forma de artigo científico publicados na revista EXCLI, como mostra a carta abaixo:

„Accepted Letter“

EXCLI Journal

Date: 10 March 2016
To: Maria Ester Pereira <pereirame@yahoo.com.br>
From: "Editorial Office EXCLI Journal" excli@ifado.de
Subject: Your manuscript entitled
Effects of zinc against mercury toxicity in female rats 12 and 48 hours after HgCl₂ exposure
Ref. EXCLI Journal Ms. No. 2015-709

Dear Dr. Pereira,

We are pleased to tell you that your work has now been accepted for publication in EXCLI Journal.

It was accepted on 10th March 2016.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

Prof. Dr. med. Jan G. Hengstler
Editor-in-Chief

EXCLI Journal
excli@ifado.de

Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund
Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors

IfADo - Ardeystr. 67 - D-44139 Dortmund - Germany

Tel.: [++49 \(0\)231 / 1084-0](tel:+49023110840)
Fax: [++49 \(0\)231 / 1084-308](tel:+4902311084308)

**Original
article:**

**EFFECTS OF ZINC AGAINST MERCURY TOXICITY IN
FEMALE RATS 12 AND 48 HOURS AFTER HgCl₂ EXPOSURE**

Mariana Mesquita¹, Taíse F. Pedroso¹, Cláudia S. Oliveira¹, Vitor A. Oliveira¹, Rafael Francisco do Santos³, Cezar Augusto Bizzi³, Maria E. Pereira^{1,2,*}

¹ Post-Graduate Course in Biological Science - Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

² Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

³ Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

* Corresponding author: Maria Ester Pereira, Department of Biochemistry and Molecular Biology, CCNE, UFSM, 97105-900 – Santa Maria, RS, Brazil. Phone: +55 55 3220 8799. E-mail: pereirame@yahoo.com.br

<http://dx.doi.org/10.17179/excli2015-709>

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ABSTRACT

This work investigated the toxicity of inorganic mercury and zinc preventive effects in female rats sacrificed 12 or 48 h after HgCl₂ exposure. Female Wistar rats were subcutaneously injected with ZnCl₂ (27 mg/kg) or saline (0.9 %), and 24 h later they were exposed to HgCl₂ (5 mg/kg) or saline (0.9 %). Rats sacrificed 12 hours after Hg administration presented an increase in kidney weight and a decrease in renal ascorbic acid levels. Zinc pre-treatment prevented the renal weight increase. Rats sacrificed 48 h after Hg exposure presented a decrease in body weight gain, an increase in renal weight, a decrease in renal δ-aminolevulinic acid dehydratase activity, an increase in serum creatinine and urea levels, and a decrease in kidney total thiol levels. Zinc pretreatment partly prevented the decrease in body weight gain and increase in creatinine levels, in addition to totally preventing renal δ-aminolevulinic acid dehydratase inhibition. Mercury accumulation in the kidney and liver in both periods was observed after Hg administration. These results show the different Hg effects along the time of intoxication, and a considerably preventive effect of zinc against Hg toxicity.

Key words: Females, nephrotoxicity, acute, mercury, zinc

INTRODUCTION

Mercury (Hg) is a metal without biological function and an environmental pollutant frequently mentioned for causing toxic effects in living organisms (Mergler et al., 2007; Scheuhammer et al., 2007). Its release can occur through natural sources such as volcanic activities or anthropogenic activities such as industrial processes, agriculture and mining (Li et al., 2009; Magos and Clarkson, 2006), consequently

making human exposure to Hg almost impossible to avoid. Mercury is the third most dangerous metal, right after arsenic and lead according to the Agency for Toxic Substance and Disease Registry (ATSDR) (Emsley, 2001). Mercury can be found in two different chemical forms: the organic form, which corresponds to a mercury atom bonded to a carbon atom, and the inorganic form, which includes the elemental form (valence 0) and its oxidized forms (Kim and

Zoh, 2012). Elemental mercury and the Hg organic form affect primarily the central nervous system (Farina et al., 2011).

Mercury chloride (inorganic form), which is the object of this study, is known as a nephrotoxic agent (Zalups, 2000). It has been reported to cause disorders in the liver (Berlin et al., 2007; Moraes-Silva et al., 2012) as well as in the reproductive and cardiovascular systems (Heath et al., 2009; Zhang et al., 2013), coupled with causing behavioral alterations (Peixoto et al., 2007a; Franciscato et al., 2009b). Mercury toxicity is associated to its high affinity for sulfhydryl groups (-SH), forming stable complexes and causing several alterations, such as structural changes of sulfhydryl enzymes and the inactivation of their active sites (Rooney, 2007). Thus, the binding of mercury to -SH groups of antioxidants, for instance glutathione (GSH), reduces the capacity of reactive species (RS) neutralization. The reduction in antioxidant defenses added to the fact that mercury exposure can increase RS levels results in an imbalance in the pro-oxidant/antioxidant system, generating a condition of oxidative stress (Farina et al., 2003; Agarwal et al., 2010). In addition, several studies have shown that inorganic mercury exposure causes changes in body and organ weight, decrease in renal δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) activity, increase in serum urea and creatinine levels, as well as renal histopathological damages (Favero et al., 2014; Franciscato et al., 2011; Oliveira et al., 2014b; Peixoto and Pereira, 2007). Furthermore, although the liver is not the preferential target organ, alterations in hepatic enzymes have been observed (Moraes-Silva et al., 2012; Oliveira et al., 2014b; Peixoto and Pereira, 2007).

Among the compounds researched to prevent the damage caused by mercury, natural substances such as vitamin E and omega-3 fat acid have shown beneficial effects (Al-Attar, 2011; Karapehliyan et al., 2014). Reports from our research group have revealed promising effects of ZnCl₂ in the prevention of biochemical changes induced by mercury chloride in the liver and kidneys of rats (Favero et al., 2014;

Franciscato et al., 2009b; Moraes-Silva et al., 2012; Oliveira et al., 2014b; Peixoto and Pereira, 2007). Zinc is an essential metal, which plays an important role in several biochemical and cellular functions (Fang et al., 2002), and it is a cofactor and structural element of several proteins, participating in the stabilization of biological membranes, replication and transcription of DNA and intercellular signaling. (Sandstead et al., 2007; Shah, 2011; Stehbens, 2003). Furthermore, zinc is an inducer of detoxificant proteins synthesis, such as metallothioneins (Peixoto et al., 2003; Peixoto et al., 2007b).

Most of the studies with experimental animals are conducted with male adult rats or pups exposed for short periods of time to mercury (Favero et al., 2014; Moraes-Silva et al., 2012; Oliveira et al., 2014a). However, few studies using acute treatments and females have been carried out. Female mercury intoxication is an important field of study, taking into consideration the possible hormonal influence (Ekstrand et al., 2010; Thomas et al., 1982). Recently, Oliveira et al. (2014b) showed the effectiveness of zinc pretreatment facing acute mercury chloride intoxication in female rats sacrificed 24 h after the administration of the toxic metal. However, in spite of the fact that zinc prevents Hg alterations in the liver and kidneys, some questions still remain. For example, can zinc pretreatment act as a protector few hours after mercury exposure? How long can the toxic effects be visualized? In this context, the purpose of this study was to investigate the toxic effects of mercury in two different intervals after exposure, 12 and 48 hours, as well as the possible zinc protective effect.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Reagents were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) and standard commercial suppliers. Commercial kits for biochemical dosages were obtained from Kovalent do Brasil Ltda (São Gonçalo/

RJ Brazil) or Labtest Diagnóstica S.A. (Lagoa Santa/ MG/ Brazil).

Animals

Adult female *Wistar* rats (200 ± 20 g) obtained from the Animal House of the Federal University of Santa Maria were transferred to our breeding colony and maintained at a 12 h light/dark cycle and controlled temperature (22 ± 2 °C). Animals had free access to water and commercial food (GUABI, RS, Brazil) and were handled according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, Federal University of Santa Maria, Brazil (096/2011).

Exposure to metals

Female *Wistar* rats were distributed on a random basis into four exposure groups (12 animals per group): Sal–Sal, Sal–Hg, Zn–Sal and Zn–Hg. Animals were weighed and subcutaneously (s.c.) injected with 0.9 % NaCl (saline solution) or ZnCl₂ (27 mg/kg). After 24 h, the animals received saline or HgCl₂ (5 mg/kg) (s.c.). Half of the animals per group (n = 6) were sacrificed 12 h after HgCl₂ exposure, and the other half 48 h later (Figure 1). Metals were dissolved in saline solution and injected at a volume of 1 mL/kg body weight (b.w.). The doses of ZnCl₂ and HgCl₂ were selected according to previous studies performed by Oliveira et al. (2014b). It has been reported that ZnCl₂ in the same dose used in this study caused no damage to the animals (Franciscato et al., 2009a).

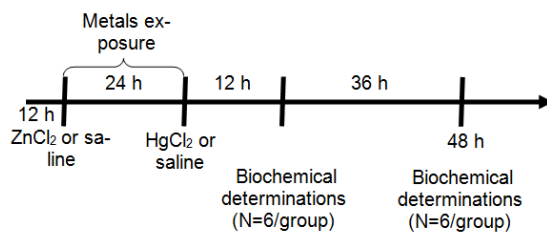


Figure 1: Protocol of exposure: Metals were administered at doses of 27 mg/kg ZnCl₂ (s.c.) and 5 mg/kg HgCl₂ (s.c.). Animals were sacrificed 12 h (N = 6) or 48 h (N = 6) after HgCl₂ exposure for biochemical determinations.

Tissue preparation

Twelve or forty-eight hours after the last administration of saline or HgCl₂, animals were weighed and sacrificed by decapitation. Blood samples were collected in tubes without anticoagulant and centrifuged at 1,050 g for 10 min to obtain the serum, which was used for determination of urea and creatinine levels and alanine aminotransferase (ALT) activity. A portion of the liver was removed and homogenized in a Tris-HCl buffer (10 mM, pH 7.4) containing 1 mM MgSO₄ for the determination of hepatic ALT activity. For the δ -ALA-D activity assay, blood was collected in tubes with heparin and hemolyzed in distilled water 1:4 (v/v) by agitation in ice bath for 10 min. For the δ -ALA-D activity of tissues and oxidative parameter determination, the kidneys and liver were quickly removed, placed in ice, and homogenized in 5 and 7 volumes of Tris-HCl buffer (10 mM, pH 7.4) with 10 up-and-down strokes at ~1,200 rpm in a Teflon-glass homogenizer, respectively. The homogenate was centrifuged at 3000 g for 20 min at 4 °C and the supernatant fraction (S1) was used for analysis. Furthermore, a portion of the kidney, liver and blood was used for determination of mercury and zinc levels.

Biochemical determinations

δ -ALA-D activity

The enzymatic activity was assayed according to the method of Sassa, (1982), by measuring the rate of product (porphobilinogen - PBG) formation, as previously described (Peixoto et al., 2003). Incubation was started by adding 200 μ L of S1 or hemolyzed blood and carried out for 30, 60 and 120 min for the kidney, liver and blood, respectively, at 39 °C. The reaction was stopped by the addition of trichloroacetic acid (TCA) 10 % containing HgCl₂ 0.05 M; PBG was measured with Ehrlich's reagent, using the molar absorption coefficient of 6.1×10^4 for Ehrlich-PBG salt. The specific enzymatic activity was expressed as nmol of PBG formed per hour per mg protein.

Determination of total thiol (TSH) and non-protein thiol (NPSH) levels

Thiol levels from the kidney and liver were determined as previously described by Ellman (1959). For non-protein thiol (NPSH) determination, the protein fraction of 200 μ L S1 was precipitated with 200 μ L of 4 % TCA (v/v) followed by centrifugation (1,050 g, 10 min) and the supernatant used for analysis. The colorimetric test was carried out in a 1M phosphate buffer, pH 7.4. A curve using glutathione as standard was constructed in order to calculate the SH in the tissue samples. TSH and NPSH levels were expressed as mmol SH per g tissue.

Ascorbic acid levels

Ascorbic acid (AA) determination was performed as described Roe (1954) with some modifications. S1 from the kidney and liver were precipitated in 10 volumes of cold 4 % TCA solution and centrifuged (1,050 g, 10 min). An aliquot of the sample in a final volume of 500 μ L of the solution was incubated for 3 h at 37 °C; afterwards, 500 μ L of H₂SO₄ 65 % (v/v) was added into the medium. The reaction product was determined using color reagent containing 4.5 mg/mL dini-trophenyl hydrazine and CuSO₄ (0.075 mg/mL). Ascorbic acid levels were expressed as μ g of AA per g tissue.

Alanine aminotransferase activity

Enzymatic activity was determined by the Thomas (1998) method, using a commercial kit in a medium containing Tris-HCl buffer 55.8 mM pH 7.15, L-alanine 500 mM, 2-Oxoglutarate 15 mM and NADH 0.18 mM, with 50 μ L of serum or tissue. The specific enzymatic activity was expressed in serum as U per L and in the liver as U per mg protein.

Creatinine

The estimation of serum creatinine levels was performed by measuring the formed product, creatinine picrate. Creatinine was used as standard, utilizing a Labtest commercial kit. The reaction was conducted in a medium containing picric acid 20.2 mM and NaOH 145.4 mM at 37 °C with 50 μ L of serum. Levels were

expressed as mg of creatinine per dL of serum.

Urea

Incubation at 37 °C for 5 min was started by adding 10 μ L of serum sample to a medium containing phosphate buffer 19.34 mM pH 6.9, sodium salicylate 58.84 mM, sodium nitroprusside 3.17 mM, and urease (\geq 12.63 UK/L), using a Labtest commercial kit. The reaction was stopped by adding oxidant solution (final concentrations: NaOH 0.07 M and sodium hypochlorite 3.01 mM), and the mixture was incubated for 5 min to achieve color development. Levels were expressed as mg of urea per dL of serum.

Protein determination

Protein concentrations were determined by the Coomassie blue method using bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976).

Determination of metal levels

Mercury and zinc levels were determined by ICP OES using an axial view configuration spectrometer (Spectro Ciros CCD, Spectro Analytical Instruments, Kleve, Germany). The samples of wet tissue (about 0.25 g of the kidney and liver and 0.5 mL of blood) were placed in vials and frozen at -18 °C until analysis. Samples were digested with concentrated HNO₃ in a water bath (100 °C) for 6 h. After digestion, samples were diluted with deionized water to 20 mL and metals were determined by ICP OES. The spectral lines monitored were 194.227 nm and 184.950 nm for Hg and Zn, respectively.

Statistical analysis

Results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's multiple range test when necessary. Results were considered significant when $p \leq 0.05$.

RESULTS

Body and tissue weight

Body weight gain and organ weights are shown in Table 1. One-way ANOVA revealed significant alterations in kidney weight [$F(3,20) = 4.854$; $p \leq 0.011$], but not in liver weight and body weight gain of rats sacrificed 12 h after the intoxication. Hg-exposed rats presented increase in kidney weight, which was prevented by

zinc pretreatment. For rats sacrificed 48 h after mercury exposure, one-way ANOVA revealed alterations in body weight gain [$F(3,20) = 3,213$; $p \leq 0.045$] and in kidney weight [$F(3,20) = 9.054$; $p \leq 0.001$]. Mercury administration decreased the body weight gain and increased the kidney weight. Zinc pre-treatment partially prevented alterations in body weight gain, but not in kidney weight.

δ -ALA-D activity

Figure 2 shows the δ -ALA-D activity from the kidney (A), liver (B) and blood (C). Only renal enzyme activity of rats sacrificed 48 h after intoxication was significantly altered by treatments [$F(3,20) = 4.624$; $p \leq 0.013$]; δ -ALA-D inhibition induced by Hg was prevented by zinc pre-treatment.

Creatinine and urea levels

Serum creatinine and urea levels are shown in Table 2. No alterations were observed in urea and creatinine levels when rats were sacrificed 12 h after mercury administration. However, after 48 h of Hg intoxication, a significant increase in creatinine [$F(3,20) = 15.659$; $p \leq 0.001$] and urea [$F(3,20) = 15.069$; $p \leq 0.001$] levels was observed. Zinc pre-treatment partially prevented the Hg effect on creatinine levels.

Alanine aminotransferase (ALT) activity

Serum and hepatic ALT activities are shown in Table 2. Only hepatic ALT activity was altered by treatment in rats sacrificed 48 h after intoxication [$F(3,20) = 6.375$; $p \leq 0.003$]. Although mercury *per se* did not cause any effects, hepatic ALT activity was significantly increased in both groups exposed to zinc.

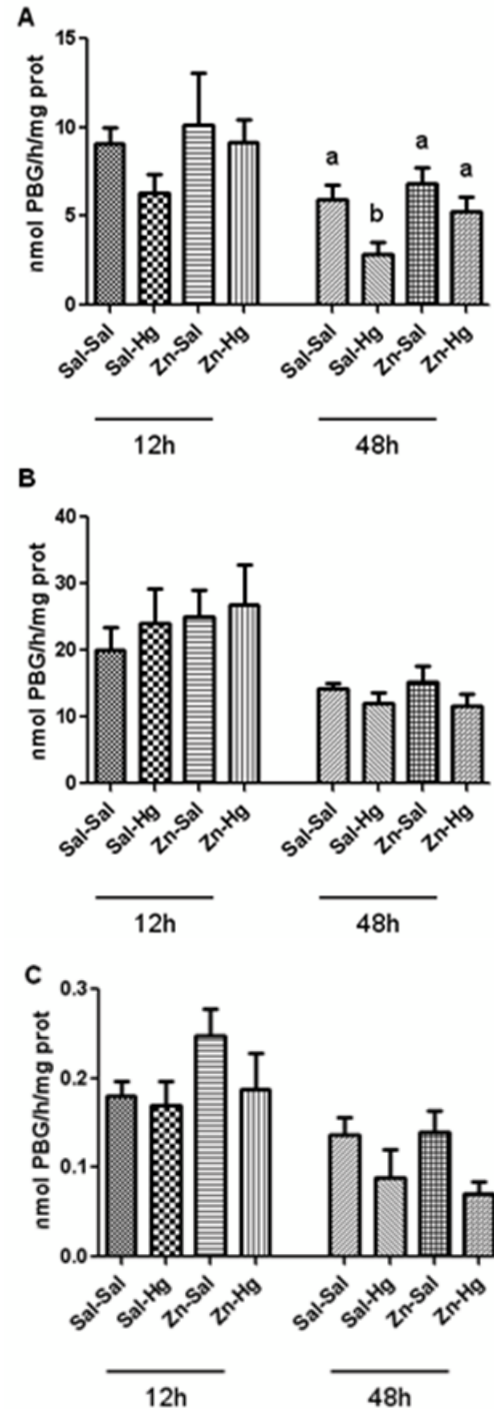


Figure 2: δ -ALA-D activity from the kidney (A), liver (B) and blood (C) of rats treated as described in the Table 1 legend. Results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's post-hoc test: groups followed by different letters are statistically different ($p \leq 0.05$) and groups followed by the same letters are statistically equal ($p \leq 0.05$). Data are presented as mean \pm S.E.M. (N = 6)

table 1: Body weight gain and liver and kidney weights of female adult rats treated (s.c.) with one dose of saline or ZnCl₂ (27 mg/kg) followed by one dose of saline or HgCl₂ (5 mg/kg) 24 h later, and killed 12 or 48 h after HgCl₂ administration

Groups	12h			48h		
	Weight gain (g)	Kidney (g)	Liver (g)	Weight gain (g)	Kidney (g)	Liver (g)
Sal-Sal	2.33 ± 3.80	1.45 ± 0.05 ^a	6.60 ± 0.30 ^a	5.16 ± 2.54 ^a	1.64 ± 0.08 ^a	8.39 ± 0.40
Sal-Hg	0.66 ± 2.52	1.73 ± 0.04 ^b	6.43 ± 0.22 ^a	- 13.16 ± 7.11 ^b	1.93 ± 0.05 ^b	7.71 ± 0.33
Zn-Sal	3.66 ± 2.70	1.45 ± 0.06 ^a	7.78 ± 0.28 ^b	0.00 ± 3.78 ^{ab}	1.50 ± 0.04 ^a	8.26 ± 0.55
Zn-Hg	4.50 ± 1.87	1.51 ± 0.07 ^a	7.72 ± 0.40 ^b	-1.83 ± 2.88 ^{ab}	1.83 ± 0.05 ^b	7.43 ± 0.28

Weight gain was calculated using the differences between the body weight in the time of death and in the moment of mercury treatment. Results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's post-hoc test: groups followed by different letters are statistically different ($p \leq 0.05$) and groups followed by the same letters are statistically equal ($p \leq 0.05$). Data are presented as mean ± S.E.M. (N = 6).

Table 2: Serum creatinine and urea levels, and serum and hepatic ALT activity of female rats treated as described in the Table 1 legend.

Groups	Creatinine (mg/dL)	Urea (mg/dL)	ALT Serum (U/L)	ALT Liver (U/mg protein)
12h				
Sal-Sal	0.77 ± 0.13	50.00 ± 6.31	30.65 ± 5.05	248.36 ± 36.29
Sal-Hg	1.03 ± 0.39	70.32 ± 8.33	31.56 ± 3.10	322.13 ± 39.48
Zn-Sal	1.16 ± 0.24	81.07 ± 12.64	42.23 ± 7.04	297.67 ± 18.48
Zn-Hg	1.32 ± 0.37	55.28 ± 4.70	56.62 ± 10.76	370.27 ± 47.37
48h				
Sal-Sal	0.51 ± 0.06 ^a	43.64 ± 4.76 ^a	37.87 ± 6.49	135.22 ± 18.45 ^a
Sal-Hg	3.90 ± 0.54 ^b	178.31 ± 23.54 ^b	28.41 ± 7.29	96.72 ± 18.36 ^a
Zn-Sal	0.40 ± 0.04 ^a	48.76 ± 4.45 ^a	61.79 ± 17.82	222.14 ± 34.87 ^b
Zn-Hg	2.34 ± 0.63 ^c	140.48 ± 24.56 ^b	53.86 ± 22.26	209.44 ± 19.01 ^b

Results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's post-hoc test: groups followed by different letters are statistically different ($p \leq 0.05$) and groups followed by the same letters are statistically equal ($p \leq 0.05$). Data are presented as mean ± S.E.M. (N = 6).

Ascorbic acid levels

Figure 3 shows the kidney (A) and liver (B) ascorbic acid levels. Only the renal ascorbic acid levels from rats sacrificed 12 h after intoxication presented significant treatment effect [F(3,20) = 3.230; $p \leq 0.044$]. Mercury exposure caused a decrease in renal ascorbic acid levels; however, zinc pretreatment did not protect this alteration caused by Hg.

Total thiol (TSH) and non-protein thiol (NPSH) levels

Total and non-protein SH levels from the kidney (A, C) and liver (B, D) are shown in Figure 4. One-way ANOVA exhibited a significant treatment effect in total thiol levels

in the kidney (A) [F(3,20) = 8.950; $p \leq 0.001$] of rats sacrificed 48 h after the end of HgCl₂ exposure. The treatment with mercury caused a decrease in kidney total thiol levels, and the zinc pre-treatment did not prevent this alteration. No alteration was verified 12 h after mercury exposure.

Kidney, liver and blood mercury and zinc levels

Mercury and zinc levels are presented in Table 3. One-way ANOVA revealed a significant treatment effect in Hg levels in the kidney [12 h F(3,8) = 6.812; $p \leq 0.014$; 48 h F(3,8) = 12.960; $p \leq 0.002$] and liver [12 h F(3,8) = 4.672; $p \leq 0.036$; 48 h F(3,8) = 27.394; $p \leq 0.001$]. Animals expo

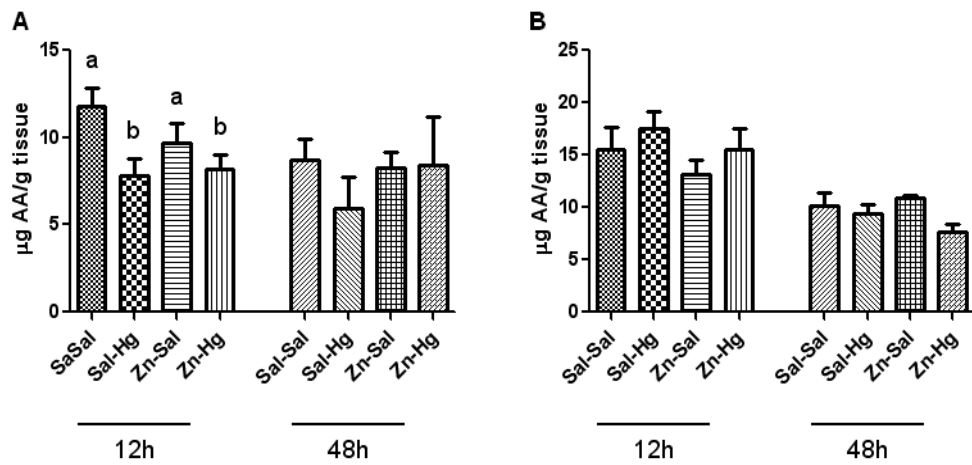


Figure 3: Ascorbic acid levels in the kidney (A) and liver (B) of female rats treated as described in the Table 1 legend. Results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dun- can's post-hoc test: groups followed by different letters are statistically different ($p \leq 0.05$) and groups followed by the same letters are statistically equal ($p \leq 0.05$). Data are presented as mean \pm S.E.M. (N = 6).

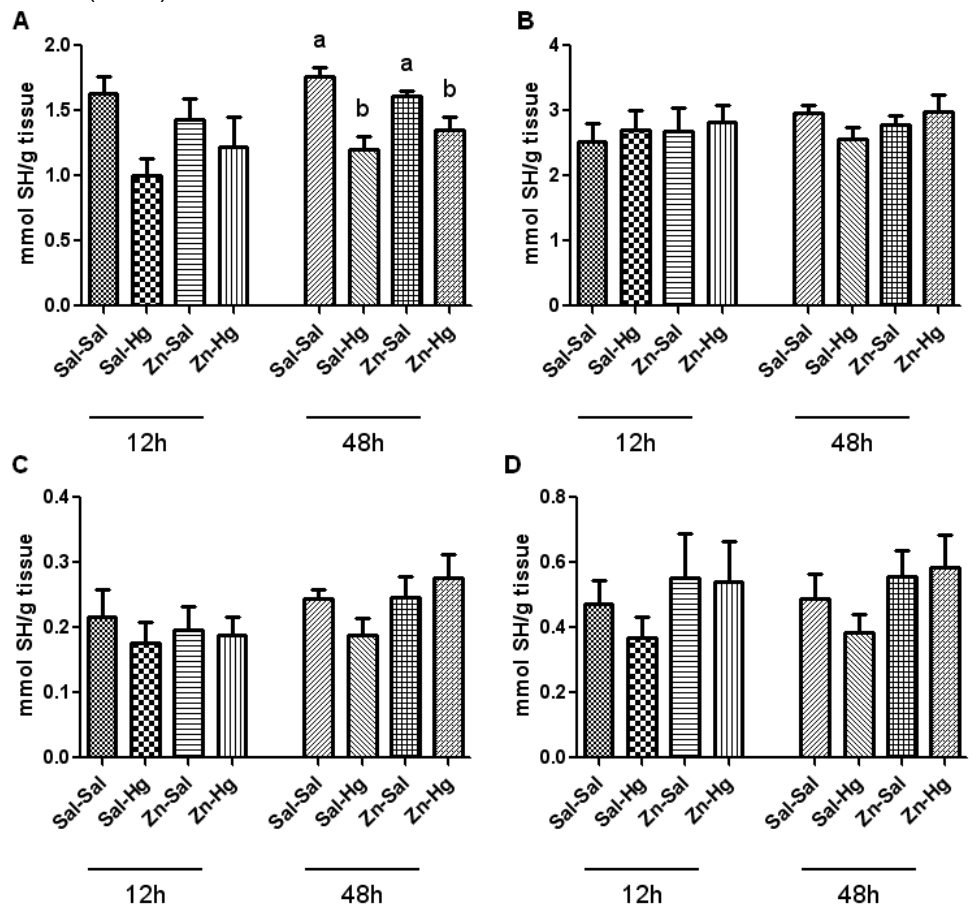


Figure 4: Total and non-protein SH levels in the kidney (A-C) and liver (B-D) of female rats treated as described in the Table 1 legend. Results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) fol- lowed by Duncan's post-hoc test: groups followed by different letters are statistically different ($p \leq 0.05$) and groups followed by the same letters are statistically equal ($p \leq 0.05$). Data are present- ed as mean \pm S.E.M. (N = 6)

Table 3: Levels of mercury and zinc in the kidney, liver and blood of female rats treated as described in the Table 1 legend

Groups	Mercury levels			Zinc levels		
	Kidney ($\mu\text{g/g}$)	Liver ($\mu\text{g/g}$)	Blood ($\mu\text{g/g}$)	Kidney ($\mu\text{g/g}$)	Liver ($\mu\text{g/g}$)	Blood ($\mu\text{g/g}$)
12h						
Sal-Sal	0.09 ± 0.06^a	0.11 ± 0.11^a	0.00 ± 0.00	17.55 ± 3.58	37.16 ± 3.60	5.12 ± 0.22
Sal-Hg	96.04 ± 18.33^b	3.04 ± 0.79^b	1.30 ± 0.20	21.48 ± 3.89	30.30 ± 1.01	5.65 ± 0.87
Zn-Sal	1.69 ± 0.54^a	0.02 ± 0.02^a	0.00 ± 0.00	29.02 ± 3.20	39.01 ± 3.37	6.33 ± 0.29
Zn-Hg	62.31 ± 31.21^b	4.94 ± 2.06^b	2.08 ± 1.21	17.24 ± 5.07	60.53 ± 13.48	7.14 ± 0.12
48h						
Sal-Sal	0.09 ± 0.06^a	0.11 ± 0.11^a	0.00 ± 0.00	17.55 ± 3.58	37.16 ± 3.60	5.12 ± 0.22
Sal-Hg	51.82 ± 10.35^b	12.31 ± 1.24^b	1.15 ± 0.29	29.68 ± 5.59	43.67 ± 0.27	4.45 ± 1.20
Zn-Sal	0.34 ± 0.15^a	0.00 ± 0.00^a	0.00 ± 0.00	25.29 ± 3.54	27.02 ± 3.39	4.85 ± 0.18
Zn-Hg	46.98 ± 11.94^b	9.29 ± 2.07^b	0.72 ± 0.07	31.32 ± 9.24	45.23 ± 4.91	3.72 ± 0.40

For the representation of the control group (Sal-Sal), the same analysis was used in both periods (12 and 48 h). Results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's post-hoc test: groups followed by different letters are statistically different ($p \leq 0.05$) and groups followed by the same letters are statistically equal ($p \leq 0.05$). Data are presented as mean \pm S.E.M. (N = 6).

mercury presented an increase in kidney and liver Hg levels when compared to the control group in both periods after exposure. Zinc pre-exposure did not alter Hg or zinc levels.

DISCUSSION

The purpose of this research was to investigate the appearance of the Hg toxic effect in two intervals (12 and 48 h) after mercury exposition. Moreover, we evaluated the preventive effect of zinc chloride against mercury intoxication.

Mercury treatment caused alterations in renal weight of female rats both times after Hg exposure. The precise mechanism involved in this effect is yet unclear. However, it is known that at a short period Hg can cause several modifications in the kidney, such as cellular pathologies in proximal straight tubules (Homma-Takeda et al., 1999; Zalups, 2000), which could be related to the increase of renal weight (Peixoto et al., 2003). Zinc pre-treatment prevented renal weight increase in rats sacrificed 12 h after Hg exposure; however, at 48 h, the zinc preventive effect was not statistically significant.

Mercury has high affinity to sulfhydryl groups, which is an important factor of its toxicity (Rooney, 2007). Among the Hg

targets, δ -ALA-D is an enzyme that has wide distribution in organisms (Jaffe, 1995). δ -ALA-D has sulfhydryl residues susceptible to binding with Hg (Peixoto et al., 2003; Roza et al., 2005), thereby, δ -ALA-D is an important bioindicator of heavy metal exposure (Oskarsson and Fowler, 1985). In fact, the renal enzyme was inhibited 48 h after exposure, probably because kidneys are the primary target of inorganic mercury accumulation (Zalups, 2000). Twelve hours after intoxication, we verified a light decrease in this enzyme activity induced by Hg. Although renal uptake and accumulation of Hg occurs quickly (Zalups, 2000) and 12 h after Hg exposure the renal levels are high, the action of Hg on kidneys was not sufficient to cause a significant inhibition in δ -ALA-D activity. However, this alteration caused by Hg becomes visible in 24 h (Oliveira et al., 2014b) along with this inhibition persisting for 48 h after exposure. Notably, zinc preexposure prevented δ -ALA-D activity inhibition. Previously, we had demonstrated the protection by zinc in young and adult rats exposed to mercury (Favero et al., 2014; Franciscato et al., 2011; Oliveira et al., 2014b; Peixoto and Pereira, 2007). The preventive effect of Zinc seems to be associated with its ability to induce metallothionein syntheses (Peixoto et al., 2003, 2007b), which are detoxification

proteins able to sequester toxic metals (Romero-Isart and Vasak, 2002).

Creatinine and urea are the main indicators of acute renal damage (Edelstein, 2008), revealing increased levels in the blood in circumstances of renal function damage (Ravel, 1997). Serum creatinine levels are commonly accepted to measure renal function in clinical practice, concerning the glomerular filtration rate (Stevens and Levey, 2005). In regards to these renal markers of toxicity, our study showed an increase in creatinine (around 7.6 times) and urea (4 times) levels in serum of rats sacrificed 48 h after Hg exposure. This result agrees with previous studies of our research group (Franciscato et al., 2011; Oliveira et al., 2014b; Peixoto and Pereira, 2007) reinforcing inorganic mercury as a nephrotoxic agent. Zinc pre-exposure prevented partially the increase in creatinine levels, appointing better renal condition when compared to the mercury group.

The determination of ALT activity is a biochemical parameter commonly used as a marker of hepatic damage (Liu et al., 2008). In this study, we verified that the activity of this enzyme in the serum and liver was not altered in either period analyzed after exposure. This result suggests the absence of hepatotoxicity and agrees with other studies that presented similar results using another model of Hg exposure (Oliveira et al., 2014b; Peixoto and Pereira, 2007). However, other parameters are required in order to discard this possibility. The pre-treatment with zinc caused an increase in hepatic ALT activity in rats sacrificed 48 h after Hg intoxication. Nonetheless, this alteration does not define a condition of hepatotoxicity, given that serum levels remain unchanged.

Considering the high affinity of Hg by sulfhydryl groups and the effects that it causes in several components of the antioxidant system (Clarkson, 1997; Farina et al., 2003), in addition to excessive formation of free radicals (Pal and Gosh, 2012), some studies have associated the toxic effects of this metal to stress oxidative (Boujbihaa et al., 2009; Agarwal et al., 2010). Regarding the endogenous non-enzymatic antioxidant system, it is important to highlight the ascorbic acid, which is a water-soluble antioxidant

of fast action (Jiraungkooskul and Saphong, 2007), as well as non-protein thiols (Apel and Hirt, 2004). In the present study, we verified a decrease in renal ascorbic acid levels caused by Hg exposure in rats sacrificed 12 h after intoxication. When these levels are analyzed in a longer period after Hg exposure, such as 24 h (Oliveira et al., 2014b) or 48 h, no alteration is found. On the other hand, kidney total thiol levels are decreased 48 h after intoxication in animals that received mercury. Thus, the decrease of ascorbic acid levels may be related with the consumption of this antioxidant in the first moment of intoxication, headlining a change in the antioxidant profile consumed afterwards.

As for mercury deposition, rats exposed to Hg presented an accumulation in the kidneys and liver, and zinc pre-exposure did not alter this accumulation. It is known that zinc induces metallothionein synthesis (Peixoto et al., 2003, 2007b), and this protein binds to mercury, reducing its availability and effects (Dabrio et al., 2002). Thus, we suggest that despite the high Hg levels found in the kidney, the metal may be partially in inactive forms, due to binding to metallothioneins. Furthermore, the level of Hg found in the liver was not enough to cause hepatic damage considering the parameters analyzed.

CONCLUSION

In conclusion, these results show that mercury causes different alterations in the two periods studied. Rats sacrificed 12 h after mercury exposure did not present significant alterations in most of the parameters analyzed. However, in a longer period after exposure, 48 h, mercury caused changes in almost all parameters analyzed. The zinc pre-treatment showed altered by mercury exposure

Acknowledgements

The authors would like to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Agarwal R, Goel SK, Chandra R, Behari JR. Role of vitamin E in preventing acute mercury toxicity in rat. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2010;29:70-8.
- Al-Attar AM. Vitamin E attenuates liver injury induced by exposure to lead, mercury, cadmium and copper in albino mice. *Saudi J Biol Sci*. 2011;18:395-401.
- Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*. 2004;55:373-99.
- Berlin M, Zalups RK, Fowler BA. Mercury. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT (eds): *Handbook on the toxicology of metals* (pp 675-729). 3rd ed. New York: Academic Press, 2007.
- Boujbihaa MA, Hamdena K, Guermazib F, Bouslamac A, Omezzinec A, Kammound A, et al. Testicular toxicity in mercuric chloride treated rats: Association with oxidative stress. *Reprod Toxicol*. 2009;28:81-9.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
- Clarkson TW. The toxicology of mercury. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1997;34:369-403.
- Dabrio M, Rodriguez AR, Bordin G, Bebianno MJ, Ley MD, Sestakova I, et al. Recent developments in quantification methods for metallothionein. *J Inorg Biochem*. 2002;88:123-34.
- Edelstein CL. Biomarkers of acute kidney injury. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2008;15:222-34.
- Ekstrand J, Nielsen JB, Havarinasab S, Zalups RK, Söderkvist P, Hultman P. Mercury toxicokinetics dependency on strain and gender. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010;243:283-90.
- Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 1959;82:70-7.
- Emsley J. *Nature's building blocks: an A-Z guide to the elements*. Oxford: Oxford Univ. Press, 2001.
- Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 2002;18:872-9.
- Farina M, Brandão R, De Lara FS, Soares FA, Souza DO, Rocha JBT. 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*. 2003;184:179-87.
- Farina M, Rocha JBT, Aschner M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. *Life Sci*. 2011;89:555-63.
- Favero AM, Oliveira CS, Franciscato C, Oliveira VA, Pereira JSF, Bertoncheli CM, et al. Lactating and non-lactating rats differ to renal toxicity induced by mercuric chloride: the preventive effect of zinc chloride. *Cell Biochem Funct*. 2014;32:420-8.
- Franciscato C, Bueno TM, Moraes-Silva L, Duarte FA, Flores E, Dressler VL, Pereira ME. High doses of zinc and copper alter neither cerebral metal levels nor acetylcholinesterase activity of suckling rats. *EXCLI J*. 2009a;8:138-47.
- Franciscato C, Goulart FR, Lovatto NM, Duarte FA, Flores EM, Dressler VL, et al. ZnCl₂ exposure protects against behavioral and acetylcholinesterase changes induced by HgCl₂. *Int J Dev Neurosci*. 2009b;27:459-68.
- Franciscato C, Moraes-Silva L, Duarte FA, Oliveira CS, Ineu RP, Flores EM, et al. Delayed biochemical changes induced by mercury intoxication are prevented by zinc pre-exposure. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2011;74:48.
- Heath JC, Abdelmageed Y, Braden TD, Nichols AC, Steffy DA. The effects of chronic mercuric chloride ingestion in female Sprague-Dawley rats on fertility and reproduction. *Food Chem Toxicol*. 2009;47:1600-5.
- Homma-Takeda S, Takenaka Y, Kumagai Y, Shimojo N. Selective induction of apoptosis of renal proximal tubular cells caused by inorganic mercury in vivo. *Environ Toxicol Pharmacol*. 1999;7:179-87.
- Jaffe EK. Porphobilinogen synthase, the first source of heme's asymmetry. *J Bioenerg Biomembr*. 1995;27:169-79.
- Jiraungkoorskul W, Sahaphong S. Efficacy of ascorbic acid reducing waterborne copper toxicity in buterfish (*Poronotus triacanthus*). *J Biol Sci*. 2007;7: 620-5.
- Karapehlivan M, Ogun M, Kaya I, Ozen H, Deveci HA, Karaman M. Protective effect of omega-3 fatty acid against mercury chloride intoxication in mice. *J Trace Elem Med Biol*. 2014;28:94-9.

- Kim MK, Zoh KD. Fate and transport of mercury in environmental media and human exposure. *J Prev Med Public Health*. 2012;45:335-43.
- Li P, Feng XB, Qiu GL, Shang LH, Li ZG. Mercury pollution in Asia: a review of the contaminated sites. *J Hazard Mater*. 2009;168:591-601.
- Liu L, Zhong S, Yang R, Hu H, Yu D, Zhu D, et al. Expression, purification, and initial characterization of human alanine aminotransferase (ALT) isoenzyme 1 and 2 in high-five insect cells. *Protein Expr Purif*. 2008;60:225-31.
- Magos L, Clarkson TW. Over view of the clinical toxicity of mercury. *Ann Clin Biochem*. 2006;43:257-68.
- Mergler D, Anderson HA, Chan LH, Mahaffey KR, Murray M, Sakamoto M, et al. Methylmercury exposure and health effects in humans: a worldwide concern. *Ambio*. 2007;36:3-11.
- Moraes-Silva L, Bueno TM, Franciscato C, Oliveira CS, Peixoto NC, Pereira ME. Mercury chloride increases hepatic alanine aminotransferase and glucose 6-phosphatase activities in newborn rats in vivo. *Cell Biol Int*. 2012;36:561-6.
- Oliveira CS, Favero AM, Franciscato C, Luz SCA, Pereira ME. Distinct response of lactating and nonlactating rats exposed to inorganic mercury on hepatic δ -aminolevulinic acid dehydratase activity. *Biol Trace Elem Res*. 2014a;158:230-7.
- Oliveira VA, Oliveira CS, Ineu RP, Moraes-Silva L, Siqueira LF, Pereira ME. Lactating and nonlactating rats differ in sensitivity to HgCl₂: Protective effect of ZnCl₂. *J Trace Elem Med Biol*. 2014b;28:240-6.
- Oskarsson A, Fowler BA. Effects of lead on the heme biosynthetic pathway in rat kidney. *Exp Mol Pathol*. 1985;43:409-17.
- Pal M, Ghosh M. Studies on comparative efficacy of α -linolenic acid and α -eleostearic acid on prevention of organic mercury-induced oxidative stress in kidney and liver of rat. *Food Chem Toxicol*. 2012;50:1066-72.
- Peixoto NC, Pereira ME. Effectiveness of ZnCl₂ in protecting against nephrotoxicity induced by HgCl₂ in newborn rats. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2007;66:441-6.
- Peixoto NC, Roza T, Flores EM, Pereira ME. Effects of zinc and cadmium on HgCl₂-delta-ALA-D inhibition and Hg levels in tissues of suckling rats. *Toxicol Lett*. 2003;46:17-25.
- Peixoto NC, Roza T, Morsch VM, Pereira ME. Behavioral alterations induced by HgCl₂ depend on the postnatal period of exposure *Int J Dev Neurosci*. 2007a;25:39-46.
- Peixoto NC, Serafim MA, Flores EMM, Bebianno MJ, Pereira ME. Metallothionein, zinc, and mercury levels in tissues of young rats exposed to zinc and subsequently to mercury. *Life Sci*. 2007b;81:1264-71.
- Ravel R. Laboratório clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais. 6ª ed. Guanabara Koogan, 1997.
- Roe JH. Chemical determination of ascorbic, dehydroascorbic, and diketogulonic acids. *Methods Biochem Anal*. 1954;1:115-39.
- Romero-Isart N, Vasak M. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *J Inorg Biochem*. 2002;88:388-96.
- Rooney JP. The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. *Toxicology*. 2007;234:145-56.
- Roza T, Peixoto NC, Welter A, Flores EM, Pereira ME. 2,3-Dimercapto-1-propanol does not alter the porphobilinogen synthase inhibition but decreases the mercury content in liver and kidney of suckling rats exposed to HgCl₂. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2005;96:302-8.
- Sandstead HH, Au W. Zinc. In: Nordberg GF, Fowler BA, Norberg M, Friberg LT (eds): *Handbook on the toxicology of metals* (pp 925-47). 3rd ed. New York: Academic Press, 2007.
- Sassa S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme*. 1982;28:133-45.
- Scheuhammer AM, Meyer MW, Sandheinrich MB, Murray MW. Effects of environmental methylmercury on the health of wild birds, mammals, and fish. *Ambio*. 2007;36:12-8.
- Shah D. Magnitude of zinc deficiency and efficacy of zinc. *Indian J Pediatr*. 2011;78:1140-1.
- Stebens WE. Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc. *Exp Mol Pathol*. 2003;75:265-76.
- Stevens LA, Levey AS. Measurement of kidney function. *Med Clin North Am*. 2005;89:457-76.
- Thomas DJ, Fisher HL, Hall LL, Mushak P. Effects of age and sex on retention of mercury by methylmercury-treated rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1982;62:445-54.

Thomas L. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotranferase (AST). In: Thomas L (ed): Clinical laboratory diagnostics (pp 55-65). Frankfurt: TH- Books Verlagsges., 1998.

Zalups RK. Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol Rev.* 2000;52:113-43.

Zhang J, Shaoping L, Wang H, Zheng Q. Protective role of *Aralia elata* polysaccharide on mercury(II)- induced cardiovascular oxidative injury in rats. *Int J Biol Macromol.* 2013;59:301-4.

CONCLUSÕES

Podemos concluir que após a exposição ao mercúrio alterações mais brandas são vistas 12 horas após a exposição e alterações mais acentuadas período maior, 48 horas; e o pré-tratamento com Zn evitou vários dos danos causados:

- O aumento do peso renal foi verificado em ambos os períodos analisados e o ganho de peso foi diminuído apenas 48 horas após a exposição ao Hg. A prevenção pelo zinco foi total sobre o efeito causado nos rins 12 horas, e parcialmente sobre o ganho de peso 48 após a exposição ao Hg.
- Inibição da atividade da δ -ALA-D renal foi verificada apenas 48 horas após a exposição ao Hg;
- Aumentos dos níveis séricos de ureia e creatinina foram verificados apenas 48 horas após a exposição ao Hg. O zinco preveniu parcialmente a alteração sobre os níveis de creatinina;
- Os níveis de ácido ascórbico renal foram diminuídos pela exposição ao mercúrio apenas nas ratas analisadas após 12 horas, e os níveis de tióis totais diminuíram após 48 horas;
- Os níveis de mercúrio ficaram aumentados no fígado e rins dos animais analisados em ambos os períodos após a exposição ao Hg. O zinco não alterou esses níveis nem os níveis de zinco dos tecidos.

5 REFERÊNCIAS

AGARWAL R, GOEL SK, CHANDRA R, BEHARI JR. Role of vitamin E in preventing acute mercury toxicity in rat. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v.29, p. 70-78. 2010.

AKSOY N, VURAL H, SABUNCU T, ARSLAN O, AKSOY S . Beneficial effects of vitamins C and E against oxidative stress in diabetic rats. **Nutrition Research**, v.25, p.625-630. 2005.

AL-ATTAR AM. Vitamin E attenuates liver injury induced by exposure to lead, mercury, cadmium and copper in albino mice. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.18, p. 395-401. 2011.

AMIN-ZAKI L, MAJEED MA, CLARKSON TW, GREENWOOD MR. Methylmercury poisoning in Iraqi children: clinical observations over two years. **British Medical Journal**, v.1, p.613-616. 1978.

AU DWT. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. **Marine Pollution Bulletin**, v.48, p.817-834. 2004.

BASKIN DS, NGO H, DIDENKO V. Thimerosal induces DNA breaks, Caspase-3 activation, membrane damage, and cell death in cultured human neurons and fibroblasts. **Toxicological Sciences**, v.74, p.361-368. 2003.

BERLIN M, ZALUPS RK, FOWLER BA. Mercury. In Nordberg, G.F.; Fowler, B.A.; Nordberg, M; Friberg, L.T. editors. **Handbook on the toxicology of metals**, 3rd edit, p. 675-729. 2007.

BHASIN P, SINGLA N, DHAWAN DK. Protective role of zinc during aluminum-induced hepatotoxicity. **Environmental Toxicology**, v.29, p.320-329. 2012.

BIANCHI MLP, ANTUNES LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, p. 123-130. 1999.

JORDÃO AA JR, CHIARELLO PG, ARANTES MR, MEIRELLES MS, VANNUCCHI H.. Effect of an acute dose of ethanol on lipid peroxidation in rats: action of vitamin E. **Food Chemical Toxicology**, v.42, p.459-464. 2004.

BISEN-HERSH EB, FARINA M, JR FB, ROCHA JBT, ASCHNER M. Behavioral effects of developmental methylmercury drinking water exposure in rodents. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.28, p.117-124, 2014.

BISINOTI MC, JARDIM WF. O comportamento do metilmercúrio (MetilHg) no

ambiente. **Química Nova**, v.27, p. 593-600. 2004.

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

BRIDGES CC, BATTLE JR, ZALUPS RK. Transport of thiol-conjugates of inorganic mercury in human retinal pigment epithelial cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.221, p.251-260. 2007.

BRIDGES CC, JOSHEE L, ZALUPS RK. Aging and the disposition and toxicity of mercury in rats. **Experimental Gerontology**, v.53, p.31-39, 2014.

CARRANZA-ROSALES P, SAID-FERNÁNDEZ S, SEPÚLVEDA-SAAVEDRA J, CRUZ-VEGA DE, GANDOLFI AJ. Morphologic and functional alterations induced by low doses of mercuric chloride in the kidney OK cell line: ultrastructural evidence for an apoptotic mechanism of damage. **Toxicology**, v.210, p.111-121. 2005.

CHIMIANTI F, AOUFFEN M, FAVIER A, SEVE M. Zinc homeostasis-regulating proteins: new drug targets for triggering cell fate. **Current Drug Targets**, v.4, p.323-338. 2003.

CHOI DW, KOH JY. Zinc and brain injury. **The Annual Review of Neuroscience**, v.21, p.347-375. 1998.

CLARKSON TW, MAGOS L, MYERS GJ. The toxicology of mercury – current exposures and clinical manifestations. **The New England Journal of Medicine**, v.349, p.1731-1737. 2003.

CLARKSON TW. The three modern faces of mercury. **Environmental Health Perspectives**, v.110, p.11-23, 2002.

CLARKSON TW. The toxicology of mercury. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v.34, p.369-403. 1997.

DE FREITAS AS, FUNCK VR, ROTTA MDOS S, BOHRER D, MÖRSCHBÄCHER V, PUNTEL RL, NOGUEIRA CW, FARINA M, ASCHNER M, ROCHA JB. Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury-induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. **Brain Research Bulletin**, v.79, p.77-84. 2009.

DIEGUEZ-ACUÑA FJ, POLK WW, ELLIS ME, SIMMONDS PL, KUSHLEIKA JV, WOODS JS. Nuclear factor kappaB activity determines the sensitivity of kidney epithelial cells to apoptosis: implications for mercury-induced renal failure. **Toxicological Sciences**, v.82, p.114-132. 2004.

EDELSTEIN CL. Biomarkers of acute kidney injury. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v.15, p.222-234. 2008.

EKINO S, SUSAKI M, NINOMIYA T, IMAMURA K, KITAMURA T. Minamata disease revisited: an update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. **Journal of Neurological Sciences**, v.262, p.131-144, 2007.

FANG YZ, YANG S, WU G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v. 18, p. 872-879. 2002.

FARINA M, BRANDÃO R, DE LARA FS, PAGLIOSA LB, SOARES FA, SOUZA DO, ROCHA JB. 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**, v.184, p. 179-187. 2003.

FARINA M, ROCHA JBT, ASCHNER M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. **Life Science**, v.89, p. 555-563. 2011.

FERREIRA ALA, MATSUBARA LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.1, p.56-65. 1997.

FRANCISCATO C, GOULART FR, LOVATTO NM, DUARTE FA, FLORES EM, DRESSLER VL, PEIXOTO NC, PEREIRA ME. ZnCl₂ exposure protects against behavioral and acetylcholinesterase changes induced by HgCl₂. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.27, p. 459-468. 2009.

FRANCISCATO C, MORAES-SILVA L, DUARTE FA, OLIVEIRA CS, INEUP R, FLORES EM, DRESSLER VL, PEIXOTO NC, PEREIRA ME. Delayed biochemical changes induced by mercury intoxication are prevented by zinc pre-exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p. 480-486. 2011.

GIRARDI G, ELIAS MM. effectiveness of n-acetylcysteine in protecting against mercuric chloride-induced nephrotoxicity. **Toxicology**. v.67, p.155-164. 1991.

GOLDWATER, L. J. & NICOLAU, A. Absorption and Excretion of Mercury in Man: IX Persistence of Mercury in Blood and Urine following Cessation of Exposure. *Arch. Environ. Health*, v. 12, p. 196-198, 1966.

HALLIWELL B, AESCHBACH R, LÖLIGER J, ARUOMA OI. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, p. 601-617. 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3 ed. Clarendon, Oxford, 2000. 936 pB

HEATH JC, ABDELMAGEED Y, BRADEN TD, NICHOLS AC, STEFFY DA. The effects of chronic mercuric chloride ingestion in female Sprague–Dawley rats on fertility and reproduction. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p. 1600-1605. 2009.

JAFFE EK. Porphobilinogen synthase, the first source of heme's asymmetry. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v.27, p. 169-179, 1995.

JEMAI H, MESSAOUDI I, CHAOUCH A, KERKENI A. Protective effect of zinc supplementatio on blood antioxidant defense system in rats exposed to cadmium. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.21, p.269-273. 2007.

JIHEN EL H, IMED M, FATIMA H, ABDELHAMID K. Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver of the rat: effects on the oxidative stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.1559-1564. 2009.

JIRAUNGKOORSKUL W, SAHAPHONG S. Efficacy of ascorbic acid reducing waterborne coppertoxicity in butterflyfish (*Poronotus triacanthus*). **Journal of Biological Sciences**, v.7, p.620-625. 2007.

KARAPEHLIVAN M, OGUN M, KAYA I, OZEN H, DEVECI HA, KARAMAN M. Protective effect of omega-3 fatty acid against mercury chloride intoxication in mice. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v,28, p.94-99. 2014.

KIM MK, ZOH KD. Fate and Transport of Mercury in Environmental Media and Human Exposure. **Journal of Preventive Medicine and Public Health**, v.45, p. 335-343. 2012.

KUMAR M, SHARMA MK, KUMAR A. Spirulina fusiformis: a food supplement against mercury induced hepatic toxicity. **Journal of the Health Science**, v.51, p.424–430. 2005.

LI P, FENG XB, QIU GL, SHANG LH, LI ZG. Mercury pollution in Asia: a review of the contaminated sites. **Journal of Hazardous Materials**, v.168, p. 591-601. 2009.

LORSCHIEDER FL, VIMY MJ, SUMMERS AO. Mercury exposure from "silver" tooth fillings: emerging evidence questions a traditional dental paradigm. **FASEB Journal**, v.9, p.504-508. 1995.

MAGOS L, CLARKSON TW. Over view of the clinical toxicity of mercury.

Annals of Clinical Biochemistry, v.43, p. 257–268. 2006.

MARET, W. Zinc coordination environments in proteins determine zinc functions. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 19, p. 7-12. 2005.

MATHIE A, SUTTON GL, CLARKE CE, VEALE EL. Zinc and copper: pharmacological probes and endogenous modulators of neuronal excitability. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, p. 567-583. 2006.

MERGLER D, ANDERSON HA, CHAN LH, MAHAFFEY KR, MURRAY M, SAKAMOTO M, STERN AH. Methylmercury exposure and health effects in humans: a worldwide concern. **Ambio**, v.36, p. 3–11. 2007.

MORAES-SILVA L, BUENO TM, FRANCISCATO C, OLIVEIRA CS, PEIXOTO NC, PEREIRA ME. Mercury chloride increases hepatic alanine aminotransferase and glucose 6-phosphatase activities in newborn rats in vivo. **Cell Biology International**, v.36, p. 561-566. 2012.

OLIVEIRA VA, OLIVEIRA CS, INEU RP, MORAES-SILVA L, SIQUEIRA LF, PEREIRA ME. Lactating and non-lactating rats differ in sensitivity to HgCl₂: Protective effect of ZnCl₂. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.28, p. 240-246. 2014.

OZUAH PO. Mercury Poisoning. **Current Problems in Pediatrics**, v.30, p.91-99. 2000.

PAL M, GHOSH M. Studies on comparative efficacy of α -linolenic acid and α -eleostearic acid on prevention of organic mercury-induced oxidative stress in kidney and liver of rat. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p. 1066-1072. 2012.

PARK J-D, ZHENG W. Human exposure and health effects of inorganic and elemental mercury. **Journal of Preventive Medicine and Public Health**, v.45, p.344-352, 2012.

PEIXOTO NC, PEREIRA ME. Effectiveness of ZnCl₂ in protecting against nephrotoxicity induced by HgCl₂ in newborn rats. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.66, p. 441-446. 2007.

PEIXOTO NC, ROZA T, FLORES EMM, PEREIRA ME. Effects of zinc and cadmium on HgCl₂-delta-ALA-D inhibition and Hg levels in tissues of suckling rats. **Toxicology Letters**, v.146, p. 17-25. 2003.

PEIXOTO NC, ROZA T, MORSCH VM, PEREIRA ME. Behavioral alterations induced by HgCl₂ depend on the postnatal period of exposure. **International Journal**

of **Developmental Neuroscience**, v.25, p. 39-46. 2007.

PROCHÁZKOVÁ D, BOUŠOVÁ I, WILHELMOVÁ N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v.82, p.513-523. 2011.

RAVEL, R. **Laboratório clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais**. 6th ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

RISHER JF, NICKLE RA, AMLER SN. Elemental mercury poisoning in occupational and residential settings. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v.206, p.371-379, 2003.

RODRIGUEZ-MORENO F, GONZÁLEZ-REIMERS E, SANTOLARIA-FERNANDEZ F, GALINDO-MARTIN L, HERNANDEZ-TORRES O, BATISTA-LOPES N, MOLINA-PEREZ M. Zinc, copper, manganese, and iron in chronic alcoholic liver disease. **Alcohol**, v.14, p.39-44. 1997.

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

ROSENFELDT F, WILSON M, LEE G, KURE C, OU R, BRAUN L, DE HAAN J. Oxidative stress in surgery in an ageing population: Pathophysiology and therapy. **Experimental Gerontology**, v.48, p.45-54. 2012.

SANDSTEAD HH, AU W. Zinc. In: Nordberg, G.F.; Fowler, B.A.; Norberg, M.; Friberg, L.T. editors, Handbook on the toxicology of Metals. 3rd edit, p. 925-47. 2007.

SAPER RB, RASH R. Zinc: an essential micronutrient. **American Family Physician**, v.79, p.768-772. 2009.

SCHEUHAMER AM, MEYER MW, SANDHEINRICH MB, MURRAY MW. Effects of environmental methylmercury on the health of wild birds, mammals, and fish. **Ambio**, v.36, p.12-19. 2007.

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

SHAH D. Magnitude of zinc deficiency and efficacy of zinc. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 78, p. 1140-1141. 2011.

SHAPIRO AM, CHAN HM. Characterization of demethylation of methylmercury in cultured astrocytes. **Chemosphere**, v.74, p.112-118, 2008.

SHENKER BJ, GUO TL, SHAPIRO IM. Mercury-induced apoptosis in human lymphoid cells: evidence that the apoptotic pathway is mercurial species dependent. **Environmental Research**, v.84, p.89-99. 2000.

SOUSA CMM, SILVA HR, VIEIRA-JR GM, AYRES MCC, COSTA CLS, ARAÚJO DS, CAVALCANTE LCD, BARROS EDS, ARAÚJO PBM, BRANDÃO M, CHAVES MH. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355. 2007.

STACCHIOTTI A, RICCI F, REZZANI R, LI VOLTI G, BORSANI E, LAVAZZA A, BIANCHI R, RODELLA LF. Tubular stress proteins and nitric oxide synthase expression in rat kidney exposed to mercuric chloride and melatonin. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.54, p.1149-1157. 2006.

STEBBENS WE. Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 75, p. 265-276. 2003.

SUTTON DJ, TCHOUNWOU PB, NINASHVILI N, SHEN E. Mercury induces cytotoxicity and transcriptionally activates stress genes in human liver carcinoma (HepG2) cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v.3, p.965-984. 2002.

SYVERSEN T, KAUR P. The toxicology of mercury and its compounds. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.26, p.215-226, 2012.

TCHOUNWOU PB, AYENSU WK, NINASHVILI N, SUTTON DJ. Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. **Environmental Toxicology**, v.18, p.149-175. 2003.

VEDAVATHI M, GIRISH KS, KUMAR MK. Isolation and characterization of cytosolic alanine aminotransferase isoforms from starved rat liver. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.267, p.13-23. 2004.

YAO JK, KESHAVAN MS. Antioxidants, Redox Signaling, and Pathophysiology in Schizophrenia: An Integrative View. **Antioxidants Redox Signaling**, v.15, p.2011–2035. 2011.

YOUSEF MI, HENDY HA, EL-DEMERDASH FM, ELAGAMY EI. Dietary zinc deficiency induced-changes in the activity of enzymes and the levels of free radicals, lipids and protein electrophoretic behavior in growing rats. **Toxicology**, v.175, p.223-234. 2002.

ZALUPS RK. Molecular interactions with mercury in the kidney. **Pharmacological Reviews**, v.52, p. 113-143. 2000.

ZHANG H, FENG X, LARSSSEN T, QIU G, VOGT RD. In Inland China, rice, rather than fish, is the major pathway for methylmercury exposure. **Environmental Health Perspectives**, v.118, p.1183-1188, 2010.

ZHU X, KUSAKA Y, SATO K, ZHANG Q. The endocrine disruptive effects of mercury. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v.4, p.174-183, 2000.

6. APÊNDICE – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Para melhor visualização da discussão, estão reunidos nessa tabela os resultados do presente trabalho juntamente com os relatados anteriormente por Oliveira et al. (2014).

Tabela 1: Efeito da administração de uma dose de $ZnCl_2$ (27mg/Kg) ou salina, sucedida após 24 horas por uma dose de $HgCl_2$ (5mg/kg) ou salina em ratas Wistar mortas 12, 24 ou 48 horas após a administração de Hg sobre diferentes parâmetros analisados.

Parâmetro	12 horas			24 horas			48 horas		
	Hg	Zn	Zn/Hg	Hg	Zn	Zn/Hg	Hg	Zn	Zn/Hg
Pesos									
Ganho de peso	-	-	-	-	-	-	↓	↓ p	↓ p
Rim	↑	-	-	-	-	-	↑	-	↑
Fígado	-	↑	↑	-	-	-	-	-	-
Atividade da δ-ALA-D									
Rim	-	-	-	↓	-	↓ p	↓	-	-
Fígado	-	-	-	↓	-	-	-	-	-
Sangue	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Creatinina									
Sérica	-	-	-	↑	-	↑	↑	-	↑ p
Ureia									
Sérica	-	-	-	↑	-	↑	↑	-	↑
ALT									
Sérica	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hepática	-	-	-	-	-	-	-	↑	↑
Ácido Ascórbico									
Rim	↓	-	↓	-	-	-	-	-	-
Fígado	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tióis Totais									
Rim	-	-	-	-	-	-	↓	-	↓
Fígado	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tióis não Proteicos									
Rim	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fígado	-	-	-	-	↑	-	-	-	-
Níveis de metal									
Hg									
Rim	↑	-	↑	nd	nd	nd	↑	-	↑
Fígado	↑	-	↑	nd	nd	nd	↑	-	↑
Sangue	-	-	-	nd	nd	nd	-	-	-
Zn									
Rim	-	-	-	nd	nd	nd	-	-	-
Fígado	-	-	-	nd	nd	nd	-	-	-
Sangue	-	-	-	nd	nd	nd	-	-	-

Simbologias: - não houve alteração, ↑ aumento da atividade/níveis comparado aos níveis do controle, ↓ redução da atividade/níveis comparado aos níveis do controle, **p** alteração parcial comparado aos níveis do controle, **nd** não dosado.

Tomando os resultados em conjunto como mostrados na tabela 1 temos uma espécie de curva de tempo, onde podemos analisar os efeitos da exposição de ratas Wistar ao cloreto de mercúrio, assim como o possível efeito preventivo do zinco em parâmetros analisados nos períodos de 12, 24 e 48 horas após a exposição ao HgCl_2 .

O tratamento com mercúrio induz no ganho de peso, ainda que não significativo. Observa-se uma ligeira queda a 12 horas, a qual aumenta a 24 horas após a exposição ao Hg e apresenta-se acentuada no maior período (48 horas). Essa diminuição do ganho de peso pode indicar uma debilidade dos animais já em um primeiro momento após a intoxicação. Nesse parâmetro, o pré-tratamento com zinco previne parcialmente essa diminuição no ganho de peso, especialmente quando analisado 48 horas após a intoxicação com Hg, podendo ser relacionado a uma melhora na condição geral do animal. Quanto às alterações referentes aos pesos teciduais, há um aumento efetivo do peso renal quando analisado 12 horas após a exposição ao Hg, seguindo tendência no período intermediário, mantendo-se até 48 horas. O rim é o alvo primário da intoxicação por este metal. Além de ser um órgão altamente perfundido e exposto a xenobióticos (AU, 2004), a nefrotoxicidade causada pelo mercúrio deve-se, em parte, ao fato de que sua excreção é realizada principalmente via urina (FOWLER, 1992). Mesmo em um curto período de tempo, sabe-se que o mercúrio pode induzir várias modificações danosas aos rins, como patologias celulares nos túbulos proximais (ZALUPS, 2000), as quais podem levar a infiltrações no tecido, elevando assim o peso do órgão. Provavelmente por uma ação mais curta do Hg, conseqüentemente com danos mais leves, somente no período de 12 horas a administração prévia de zinco previne esse efeito. Apesar do mercúrio não ter alterado o peso do fígado dos animais, a administração de zinco, *per se* ou seguida de Hg, eleva o peso do órgão nos animais mortos no período de 12 horas.

Mesmo em um rápido intervalo de ação do mercúrio, provavelmente por serem os alvos primários no que diz respeito ao acúmulo e expressão da toxicidade, os rins já indicam uma inibição da atividade da δ -ALA-D quando analisada 12 horas após a intoxicação por esse metal, vindo a ser significativa em ambos períodos posteriores (24 e 48 horas). O zinco previne esta alteração já no tempo de 24 horas, chegando aos níveis do controle quando observado 48 horas após a exposição ao Hg. A enzima δ -ALA-D é uma proteína octamérica quem contém em sua estrutura oito grupamentos sulfidrílicos (DESSYPRIS, 1998; TSUKAMOTO, et al., 1980). Esta

composição confere a enzima uma alta afinidade com metais divalentes (SCHEUHAMMER, 1987), sendo amplamente utilizada como marcador de exposição a estes. Tais metais quando ligados aos grupos –SH enzimáticos, influenciam diretamente a ativação [a exemplo do zinco (BERNARD & LAUWERYS, 1987; NELSON, 1981)] ou inibição [chumbo, cobre, cádmio, mercúrio (RENDON-RAMIREZ et al., 2007; GIODA et al., 2007; PEIXOTO et al., 2004; FRANCISCATO et al., 2011; PEIXOTO et al., 2003; 2007) da atividade catalítica. Apesar do papel do zinco na estabilidade da enzima não ser totalmente entendido, sabe-se que esta possui um sítio de ligação para o zinco de fundamental importância para a manutenção de sua estrutura (DENT et al., 1990). Uma vez que o mercúrio é administrado e encontra-se nos rins, este pode deslocar os átomos de zinco desses sítios, ligando-se então a eles, conseqüentemente modificando sua estrutura e inativando a enzima. Uma suplementação de zinco via administração prévia de $ZnCl_2$, aumentaria a disponibilidade deste metal, competindo com o Hg e evitando este deslocamento, justificando assim a prevenção apresentada pelos animais pré-tratados.

O $HgCl_2$ é conhecido como um potente agente nefrotóxico que induz variações na taxa de filtração glomerular, alterações funcionais no fluxo plasmático renal e lesões nos túbulos proximais (GIRARDI & ELÍAS, 1991). Seu efeito no aumento dos níveis séricos de ureia e creatinina verificados anteriormente em diversos trabalhos do nosso grupo de pesquisa (PEIXOTO & PEREIRA, 2007; FRANCISCATO et al., 2011) se confirmam nos resultados aqui apresentados, afirmando a ação tóxica deste metal sobre os rins também para este modelo experimental. De fato, a exposição ao mercúrio eleva os níveis séricos de ureia e creatinina quando analisados 24 e 48 horas após a exposição, confirmando uma tendência mostrada desde o primeiro momento. Tanto a ureia quanto a creatinina são metabólitos naturalmente excretados pelos rins. Assim, o aumento desses marcadores no sangue dos animais está diretamente relacionado a falhas renais (RAVEL, 1997), provocadas aqui pela exposição ao Hg. O pré-tratamento com zinco previne parcialmente apenas o aumento dos níveis de creatinina verificados nos animais analisados no período de 48 horas, indicando uma amenização da condição renal.

Em relação à possível hepatotoxicidade do mercúrio, avaliada neste trabalho através da dosagem da atividade sérica e hepática da enzima ALT, esta não é

confirmada, uma vez que a administração do metal não provoca alterações em nenhum dos períodos analisados. Por outro lado, quando analisado 48 horas após a exposição ao Hg, o tratamento com zinco, *per se* ou seguido de Hg, mostra uma elevação da atividade hepática desta enzima. Este resultado não era esperado, uma vez que trabalhos anteriores do grupo não mostram uma inibição da enzima por esse metal (OLIVEIRA et al., 2014; PEIXOTO & PEREIRA, 2007). Além disso, testes *in vitro* revelam que mesmo altas concentrações do metal (100µM) levam a uma inibição enzimática (MORAES SILVA et al., 2012), conflitando ainda mais com o resultado deste estudo. Apesar deste comportamento, esta alteração não define uma condição de hepatotoxicidade, dado que os níveis séricos permanecem inalterados.

Ácido ascórbico, tióis totais e não proteicos fazem parte do sistema antioxidante endógeno não enzimático. Estes atuam na tentativa de neutralizar as espécies reativas através de interações diretas, bloqueando reações prejudiciais (YAO et al., 2011). Nos presentes resultados, o mercúrio provoca uma inibição apenas nos níveis de ácido ascórbico dos rins dos animais analisados 12 horas após a exposição ao Hg. Por outro lado, os níveis de tióis totais apresentam-se diminuídos por este metal somente no maior período de ação do Hg (48 horas), apesar de já se mostrar ligeiramente menores nos tempos mais curtos. Sabe-se que o ácido ascórbico é um antioxidante amplamente distribuído, solúvel em água, e de rápida ação (JIRAUNGKOOSKUL & SAHAPHONG, 2007). Os níveis diminuídos de ácido ascórbico apresentados no tempo de 12 horas podem ser justificados com um primeiro consumo deste. Em um período mais longo, o retorno aos níveis normais pode estar relacionado a um mecanismo de compensação. Quanto aos tióis totais, esse resultado, além de confirmar a alta afinidade do Hg com os grupamentos -SH, pode-se supor uma mudança de perfil antioxidante, onde em um primeiro momento (12 horas) a inibição pelo mercúrio ocorre nos níveis de ácidos ascórbico enquanto que num período mais longo a inibição ocorre no conteúdo de tióis, com consequente recuperação do primeiro parâmetro.

Quanto aos níveis de mercúrio e zinco, apenas os níveis de Hg mostraram-se elevados após a exposição ao mesmo. Em ambos os períodos analisados (apenas 12 e 48 horas após a exposição ao Hg) verificou-se um acúmulo de mercúrio nos rins e fígado. Além disso, apesar de não significativo estatisticamente, todos os animais que receberam mercúrio mostraram níveis do metal no sangue, indicando

uma quantidade circulante de Hg. O pré-tratamento com zinco não alterou o acúmulo de mercúrio em ambos os tecidos. Apesar disso, sabe-se que o zinco é um potente indutor da síntese de metalotioneínas (PEIXOTO et al., 2003; PEIXOTO et al., 2007). Estas são proteínas detoxificantes, que agem na eliminação e neutralização de metais, ligando-se a eles, reduzindo a disponibilidade e assim seus efeitos tóxicos (CHAN et al., 2002; DABRIO et al., 2002). Quando realizamos a dosagem dos níveis de metal, analisa-se num todo, não levando em conta a forma em que este se encontra. Assim, sugere-se que, apesar dos níveis elevados de Hg encontrados nos rins e fígado, o metal pode estar parcialmente em formas inativas devido a ação quelante das metalotioneínas. Estas são proteínas detoxificantes, que agem na eliminação e neutralização de metais, ligando-se a eles, reduzindo a disponibilidade e assim seus efeitos tóxicos (CHAN et al., 2002; DABRIO et al., 2002). E, além disso, o zinco é um potente indutor da síntese de metalotioneínas (PEIXOTO et al., 2003; PEIXOTO et al., 2007). Isso pode ser relacionado ao fato de que mesmo em níveis semelhantes, os animais que receberam mercúrio, mas foram pré tratados com zinco, apresentam menores alterações nos parâmetros analisados do que aqueles que receberam apenas mercúrio.

6.1 REFERÊNCIAS

AU DWT. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. **Marine Pollution Bulletin**, v.48, p.817-834. 2004.

BERNARD A, LAUWERYS R. Metal-induced alterations of d-aminolevulinic acid dehydratase. **Annals of the New York Academy of Science**, v.514, p.41-47. 1987.

CHAN J, HUANG Z, MERRIFIELD ME, SALGADO MT, STILLMAN MJ. Studies of metal binding reactions in metallothioneins by spectroscopic, molecular biology, and molecular modelling techniques. **Coordination Chemistry Reviews**, v.23, p. 319-339. 2002.

DABRIO M, RODRÍGUEZ AR, BORDIN G, BEBIANNO MJ, DE LEY M, SESTÁKOVÁ I, VASÁK M, NORDBERG M. Recent developments in quantification methods for metallothionein. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.88, p.123-134. 2002.

DENT AJ, BEYERSMANN CB, HASNAIN SS. Two different zinc sites in bovine 5-aminolevulinatase dehydratase distinguished by extended X-ray absorption fine structure. **Biochemistry**, v.29, p.7822-7828. 1990.

DESSYPRIS EN, LEE GR, FOERSTER J, LUKENS J, PARASKAVAS F, GREER JP, RODGERS GM. Erythropoiesis. **Wintrobe's Clinical Hematology**, v.1, p.169-192. 1998.

FOWLER BA. Mechanisms of kidney cell injury from metals. **Environmental Health Perspectives**, v.100, p.57-63. 1992.

FRANCISCATO C, MORAES-SILVA L, DUARTE FA, OLIVEIRA CS, INEU RP, FLORES EM, DRESSLER VL, PEIXOTO NC, PEREIRA ME. Delayed biochemical changes induced by mercury intoxication are prevented by zinc pre-exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p. 480-486. 2011.

GIODA CR, LISSNERA LA, PRETTOA A, ROCHA JBT, SCHETINGERA MRC, NETOB JR, MORSCHA VM, LOROIA VL. Exposure to sublethal concentrations of Zn(II) and Cu(II) changes biochemical parameters in *Leporinus obtusidens*. **Chemosphere**, v.69, p.170-175. 2007.

GIRARDI G, ELIAS MM. effectiveness of n-acetylcysteine in protecting against mercuric chloride-induced nephrotoxicity. **Toxicology**, v.67, p.155-164. 1991.

JIRAUNGKOORSKUL W, SAHAPHONG S. Efficacy of ascorbic acid reducing waterborne copper toxicity in butterflyfish (*Poronotus triacanthus*). **Journal of Biological Sciences**, v.7, p.620-625. 2007.

MORAES-SILVA L, BUENO TM, FRANCISCATO C, DE OLIVEIRA CS, PEIXOTO NC, PEREIRA ME. Mercury chloride increases hepatic alanine aminotransferase and glucose 6-phosphatase activities in newborn rats in vivo. **Cell Biology International**, v.36, p.561-566. 2012.

NELSON HM, HUGHES MA, MEREDITH PA. Zinc, copper and delta-aminolaevulinic acid dehydratase in vitro and in vivo. **Toxicology**, v. 21, p.261-266. 1981.

OLIVEIRA VA, OLIVEIRA CS, INEU RP, MORAES-SILVA L, SIQUEIRA LF, PEREIRA ME. Lactating and non-lactating rats differ in sensitivity to HgCl₂: Protective effect of ZnCl₂. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.28, p. 240-246. 2014.

PEIXOTO NC, KRATZ CP, ROZA T, MORSCH VM, PEREIRA ME. Effects of HgCl₂ on porphobilinogen-synthase (E.C. 1.2.1.24) activity and on mercury levels in

rats exposed during different precocious periods of postnatal life. **Cell Biology International**, v.31, p.1057-1062. 2007.

PEIXOTO NC, PEREIRA ME. Effectiveness of ZnCl₂ in protecting against nephrotoxicity induced by HgCl₂ in newborn rats. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.66, p. 441-446. 2007.

PEIXOTO NC, ROZA T, FLORES EMM, PEREIRA ME. Effects of zinc and cadmium on HgCl₂- δ -ALA-D inhibition and Hg levels in tissues of suckling rats. **Toxicology Letters**, v.146, p.17-25. 2003.

PEIXOTO NC, ROZA T, FLORES EMM, PEREIRA ME. Sensitivity of δ -ALA-D (E.C. 4.2.1.24) of rats to metals in vitro depends on the stage of postnatal growth and tissue. **Toxicology In Vitro**, v.18, p.805-809. 2004.

RAVEL, R. **Laboratório clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais**, 6th ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

RENDON-RAMIREZ A, CERBÓN-SOLÓRZANO J, MALDONADO-VEGA M, QUINTANAR-ESCORZA MA, CALDERÓN-SALINAS JV. Vitamin-E reduces the oxidative damage on delta-aminolevulinic dehydratase induced by lead intoxication in rat erythrocytes. **Toxicology In Vitro**, v.21, p.1121-1126. 2007.

SCHEUHAMMER AM. Erythrocyte δ -aminolevulinic acid dehydratase in birds. The effects of lead and other metals in vitro. **Toxicology**, v.45, p.155-163. 1987.

TSUKAMOTO I, YOSHINAGA T, SANO S. Zinc and cysteine residues in the active site of bovine liver δ -aminolevulinic acid dehydratase. **International Journal of Biochemistry**, v.12, p.751-756. 1980.

YAO JK, KESHAVAN MS. Antioxidants, Redox Signaling, and Pathophysiology in Schizophrenia: An Integrative View. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.15, p.2011–2035. 2011.

ZALUPS RK. Molecular interactions with mercury in the kidney. **Pharmacological Reviews**, v.52, p. 113-143. 2000.