

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

**EFEITO DOS CAROTENÓIDES LICOPENO E  
ASTAXANTINA SOBRE DANOS RENAIIS INDUZIDOS  
POR CLORETO DE MERCÚRIO.**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Paula Rossini Augusti**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2007**

**EFEITO DOS CAROTENÓIDES LICOPENO E ASTAXANTINA  
SOBRE DANOS RENAIIS INDUZIDOS POR CLORETO DE  
MERCÚRIO.**

**por**

**Paula Rossini Augusti**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em bioquímica toxicológica, área de concentração em bioquímica toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica.**

**Orientador: Profa. Dra. Tatiana Emanuelli**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2007**

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO DOS CAROTENÓIDES LICOPENO E ASTAXANTINA  
SOBRE DANOS RENAIIS INDUZIDOS POR CLORETO DE  
MERCÚRIO.**

elaborada por  
**Paula Rossini Augusti**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Bioquímica Toxicológica**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Tatiana Emanuelli, Dra.**  
(Presidente/Orientador)

---

**Vanderlei Folmer, Dr. (UNIPAMPA)**

---

**Ijoni Hilda Costabeber, Dra. (UFSM)**

Santa Maria, 28 de fevereiro de 2007.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais e irmãos, pelos valores, ensinamentos e apoio sempre incondicional a todas as minhas decisões!

Ao meu namorado Paulo, por me amar, apoiar, compreender, compartilhar e tornar sempre tudo mais fácil! Obrigada por sempre ter uma palavra carinhosa quando precisei!

À minha orientadora Tatiana Emanuelli, pelos teus ensinamentos nestes quase 6 anos de convivência... pelo carinho, amizade, compreensão e paciência...por acreditar que eu era capaz, mesmo quando nem eu acreditava! Não teria palavras para descrever quanto me influenciastes como profissional e como pessoa...Muito obrigada!!!

À minha colega de faculdade que virou amiga, que virou colega de mestrado e continuou amiga, minha co-orientadora e irmã Greicy... Obrigada por tratar minha dissertação como se fosse tua, por revisar meus artigos, discutir resultados, e o mais importante: por ser essa pessoa especial e amiga maravilhosa que és!! Essa conquista também é tua!! Obrigada de coração!!

Aos meus amigos Valéria e Alexandre, que mesmo sem o contato do dia-a dia estiveram presentes sempre que precisei, sendo por e-mail ou um simples telefonema... Amigos como vocês fazem a diferença na minha vida!

Aos amigos do NIDAL, inclusive os que já seguiram seus caminhos, por terem contribuído de alguma maneira para minha formação profissional. Obrigada pela convivência e amizade...

Aos professores do curso pelos ensinamentos que me foram passados e a Angélica, secretária do curso, pelo atendimento e auxílio sempre prestados com boa vontade e simpatia.

Às estagiárias, Lídia, Sabrina, Rocheli, Patrícia e Juliana, que tornaram possível a realização desse trabalho. Não teria conseguido sem vocês!! Muito obrigada!

Aos professores Vanderlei Folmer, Maria Rosa Schetinger e Ijoni Costabeber, por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

Às professoras Marta Rocha e Dominguita Graça pelo auxílio nas análises histopatológicas.

À professora Maribel Antonello Rubin, pela orientação durante a docência orientada.

Aos funcionários do Biotério central, pelo fornecimento dos animais e auxílios prestados.

A CAPES, pela bolsa concedida e a UFSM, por tornar possível o sonho da graduação e pós-graduação em uma universidade pública e de qualidade.

## RESUMO

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

### **Efeito dos carotenóides licopeno e astaxantina sobre danos renais induzidos por cloreto de mercúrio.**

Autora: Paula Rossini Augusti

Orientadora: Tatiana Emanuelli

Data e Local de Defesa: Santa Maria, 28 de fevereiro de 2007

O mercúrio é um metal pesado com toxicidade comprovada, capaz de causar danos em qualquer tecido com o qual tenha contato, sendo o rim o principal alvo para sua forma inorgânica. O estresse oxidativo tem sido apontado como um importante mecanismo molecular para a injúria renal induzida por mercúrio inorgânico e a interação desse metal com moléculas contendo grupos sulfidrílicos, tais como a enzima  $\delta$ -aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-D), parece contribuir para esse processo. Licopeno e astaxantina são carotenóides abundantes em tomates e em algas e frutos do mar, respectivamente. Ambos têm sido amplamente estudados por suas propriedades antioxidantes. No presente estudo foi avaliado o efeito do licopeno e da astaxantina sobre a toxicidade do  $\text{HgCl}_2$  em rins de ratos, utilizando-se como parâmetros a atividade das enzimas  $\delta$ -ALA-D e glutathione S-transferase (GST), quantidade de grupos sulfidrílicos não protéicos (NPSH), produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT), além dos níveis plasmáticos de creatinina e ácido úrico e análise histopatológica. Ratos Wistar adultos receberam, por gavagem, licopeno ou astaxantina nas doses de 0, 10, 25 ou 50 mg/kg, seis horas antes de receberem uma injeção subcutânea de  $\text{HgCl}_2$  (0 ou 5 mg/kg), resultando assim, em 8 grupos experimentais. Após doze horas da exposição ao  $\text{HgCl}_2$ , os animais foram sacrificados. O  $\text{HgCl}_2$  inibiu a  $\delta$ -ALA-D renal, aumentou a produção de TBARS e níveis plasmáticos de creatinina, além de causar necrose tubular. O licopeno preveniu a inibição da  $\delta$ -ALA-D e a peroxidação lipídica, mas não preveniu o aumento de creatinina no plasma nem a ocorrência de necrose tubular induzidos pelo  $\text{HgCl}_2$ . Embora a astaxantina não tenha prevenido a inibição da  $\delta$ -ALA-D e o aumento nos níveis plasmáticos de creatinina, este carotenóide preveniu a ocorrência da peroxidação lipídica e atenuou a necrose tubular causada pelo  $\text{HgCl}_2$ . As atividades das enzimas GSH-Px e CAT aumentaram, enquanto a atividade da SOD diminuiu nos animais tratados com  $\text{HgCl}_2$  e esses efeitos foram prevenidos por algumas doses de licopeno e por todas as doses de astaxantina avaliadas. Algumas doses de licopeno tiveram efeito negativo sobre as enzimas antioxidantes *per se* e o mecanismo envolvido nessa resposta ainda não foi elucidado. O tratamento com  $\text{HgCl}_2$  ou carotenóides não alterou o conteúdo de NPSH ou a atividade da GST no tecido renal, nem os níveis plasmáticos de ácido úrico. Os resultados indicam que embora licopeno e astaxantina não tenham prevenido o aumento nos níveis plasmáticos de creatinina induzido por  $\text{HgCl}_2$ , as alterações nas enzimas antioxidantes podem ser limitadas pelo uso destes carotenóides.

*Palavras-chave:*  $\delta$ -aminolevulinato desidratase; enzimas antioxidantes; necrose tubular; ratos; substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

## ABSTRACT

Master Dissertation  
Post Graduate Course on Toxicological Biochemistry  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **Effect of lycopene and astaxanthin carotenoids on renal damage induced by mercuric chloride.**

Author: Paula Rossini Augusti

Adviser: Tatiana Emanuelli

Date and Place of the Defense: Santa Maria, February 28, 2007

Mercury is a heavy metal toxic for any living tissue, being kidneys the first target for the inorganic form. Oxidative stress has been pointed as an important molecular mechanism for kidney injury in inorganic mercury poisoning and the interaction of the metal with endogenous thiol-containing molecules, such as  $\delta$ -aminolevulinic acid deshydratase ( $\delta$ -ALA-D), seems to contribute to this process. Lycopene and astaxanthin are plentiful carotenoids in tomatoes and algae and seafoods, respectively. They have been widely studied because of their large antioxidant properties. This work evaluated the ability of lycopene and astaxanthin to prevent  $\text{HgCl}_2$  toxicity, assessing parameters like  $\delta$ -ALA-D and glutathione S-transferase (GST) activities, non-protein sulfhydrylic groups content (NPSH), production of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and activities of antioxidant enzymes like superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), and catalase (CAT), besides creatinine and uric acid plasma levels and histopathological analyses. Adult Wistar rats received lycopene or astaxanthin, by gavage, on doses of 0, 10, 25, or 50 mg/kg, six hours prior to the administration of 0 or 5 mg/kg  $\text{HgCl}_2$ , yielding 8 experimental groups. After twelve hours of exposure to  $\text{HgCl}_2$  animals were killed.  $\text{HgCl}_2$  inhibited renal  $\delta$ -ALA-D activity and increased TBARS levels in kidney and creatinine levels in plasma along with renal tubular necrosis. Lycopene prevented  $\text{HgCl}_2$ -induced inhibition of  $\delta$ -ALA-D activity and increase of lipid peroxidation in kidney, but not the increase in plasma creatinine levels or renal tubular necrosis caused by  $\text{HgCl}_2$ . Although astaxanthin have not prevented  $\text{HgCl}_2$ -induced inhibition of  $\delta$ -ALA-D and increase in plasma creatinine levels, this carotenoid prevented lipid peroxidation and attenuated renal tubular necrosis caused by  $\text{HgCl}_2$ . GPx and CAT activities were enhanced, while SOD activity was depressed, in mercury-treated rats when compared to control and these effects were prevented by some lycopene doses and by all astaxanthin doses evaluated. Some doses of lycopene negatively affected antioxidant enzymes activities *per se* and the mechanism involved in this response has not been elucidated yet. Neither  $\text{HgCl}_2$  nor carotenoids treatment changed the content of NPSH groups or GST activity in kidney or uric acid levels in plasma. Our results indicate that although lycopene and astaxanthin did not prevent  $\text{HgCl}_2$ -induced creatinine increase in plasma, changes in the activity of antioxidant enzymes might be limited by the use of these carotenoids.

*Keywords:*  $\delta$ -aminolevulinic acid deshydratase; antioxidant enzymes; tubular necrosis; rats; thiobarbituric acid reactive substances.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Formação das espécies reativas de oxigênio, a partir do oxigênio molecular, com sucessivas transferências de elétrons (Nordberg & Arnér, 2001).....21
- FIGURA 2** - Esquema simplificado não estequiométrico dos sistemas oxidante e antioxidante nas células (Nordberg & Arnér, 2001). ..... 22
- FIGURA 3** - Estrutura química do licopeno (Agarwal & Rao, 2000) ..... 25
- FIGURA 4** - Estrutura química da astaxantina (Goto *et al.*, 2006) ..... 28



## LISTA DE ANEXOS

**ANEXO A** – Comprovante de aceite do manuscrito “**Effect of lycopene on nephrotoxicity induced by mercuric chloride**” pela revista Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology..... 95

**ANEXO B** – Comprovante de submissão do manuscrito “**Effect of astaxanthin on kidney function changes and oxidative stress induced by mercuric chloride in rats**” à Revista Food and Chemical Toxicology.....97

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ALA – Ácido  $\delta$ -aminolevulínico
- $\delta$ -ALA-D –  $\delta$ -Aminolevulinato desidratase
- ANOVA – Análise de Variância
- ASX – Astaxantina
- CAT – Catalase
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- DTNB – Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
- EDTA – Sal dissódico do ácido etilenodiamonotetraacético
- EROs – Espécies reativas de oxigênio
- GR – Glutaciona redutase
- GSH – Glutaciona
- GSH-Px – Glutaciona peroxidase
- GST- Glutaciona S-transferase
- Hg – Mercúrio
- HgCl<sub>2</sub> – Cloreto de mercúrio
- LD<sub>50</sub> – Dose letal 50
- MDA – Malondialdeído
- MeHg – Metilmercúrio
- NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
- PBG – Porfobilinogênio
- s. c. – Subcutânea; subcutaneamente
- SEM – Erro padrão da média
- SH – Grupo sulfidril
- SHNP – Grupos tiólicos não-protéicos

SOD – Superóxido dismutase

w.b. – Peso corporal

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

UVA – Ultravioleta A

## SUMÁRIO

|  |            |
|--|------------|
| <b>AGRADECIMENTOS .....</b>                              | <b>3</b>   |
| <b>RESUMO .....</b>                                      | <b>14</b>  |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                    | <b>15</b>  |
| <b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>                         | <b>16</b>  |
| <b>LISTA DE ANEXOS .....</b>                             | <b>8</b>   |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>                       | <b>9</b>   |
| <b>APRESENTAÇÃO.....</b>                                 | <b>13</b>  |
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                | <b>14</b>  |
| <b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>                     | <b>177</b> |
| <b>2.1 Mercúrio .....</b>                                | <b>177</b> |
| 2.1.1 Aspecto e forma.....                               | 17         |
| 2.1.2 Ocorrência, uso e fontes de exposição.....         | 17         |
| 2.1.3 Absorção e distribuição.....                       | 19         |
| 2.1.4 Alterações bioquímicas.....                        | 19         |
| 2.1.5 Nefrotoxicidade.....                               | 20         |
| <b>2.2 Estresse oxidativo e mercúrio .....</b>           | <b>21</b>  |
| <b>2.3 Carotenóides .....</b>                            | <b>23</b>  |
| <b>2.3.1 Licopeno .....</b>                              | <b>24</b>  |
| 2.3.1.1 Ocorrência, estrutura química e metabolismo..... | 24         |
| 2.3.1.2 Mecanismo de ação .....                          | 25         |
| 2.3.1.3 Efeitos protetores .....                         | 27         |
| <b>2.3.2 Astaxantina.....</b>                            | <b>28</b>  |
| 2.3.2.1 Ocorrência e usos .....                          | 29         |
| 2.3.2.2 Estrutura química e metabolismo .....            | 28         |
| 2.3.2.3 Propriedades .....                               | 29         |
| 2.3.2.4 Efeitos protetores .....                         | 30         |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3 RESULTADOS .....</b>                 | <b>31</b> |
| 3.1 Manuscrito 1 .....                    | 32        |
| 3.1 Manuscrito 2 .....                    | 54        |
| <b>4 DISCUSSÃO .....</b>                  | <b>79</b> |
| <b>5 CONCLUSÕES.....</b>                  | <b>85</b> |
| <b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b> | <b>86</b> |
| <b>7 ANEXOS.....</b>                      | <b>95</b> |

## **APRESENTAÇÃO**

Os resultados que fazem parte desta dissertação são apresentados sob a forma de manuscritos, os quais se encontram no item RESULTADOS. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios manuscritos e representam na íntegra este estudo.

Os itens DISCUSSÃO E CONCLUSÃO, dispostos após os manuscritos, contêm interpretações e comentários gerais referentes ao presente estudo e relacionados aos manuscritos deste trabalho.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS são relacionadas às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e DISCUSSÃO desta dissertação.

## 1 INTRODUÇÃO

O mercúrio (Hg) é um metal pesado que tem sido reconhecido como um perigoso poluente ambiental. A principal origem natural do mercúrio é o desgaste da crosta terrestre, emissão por vulcões e evaporação oriunda do metabolismo de organismos aquáticos (WHO, 1991). O mercúrio inorgânico é amplamente utilizado em certos tipos de baterias e em termômetros, e continua sendo um componente essencial de lâmpadas fluorescentes (Clarkson, 1997). A população em geral pode ser exposta a esta forma de mercúrio através da água e alimentos contaminados, bem como por amálgamas dentárias. Ainda, a presença dessa forma do metal em conjunto com as demais, tem sido associada com a intoxicação humana em áreas de mineração (Drasch *et al.*, 2001). A forma mercúrica, cujo principal representante é o cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ), é alvo de inúmeras investigações porque, além de sua toxicidade intrínseca, é atribuída a ela a toxicidade do mercúrio elementar e, parcialmente, a do metilmercúrio, uma vez que, por oxidação e desmetilação, respectivamente, ambas as formas são convertidas em  $\text{Hg}^{+2}$  (Patrick *et al.*, 2002).

Todas as formas de mercúrio são tóxicas, sendo que o mercúrio inorgânico afeta primeiramente os rins, devido à alta afinidade entre mercúrio e enxofre, o que leva a ligação desse metal a grupos tiólicos de proteínas, peptídeos e aminoácidos, sendo observada necrose do epitélio renal, acompanhada de proteinúria e glomerulonefrite (Goyer, 1996). Esta interação com grupos sulfidrílicos está diretamente envolvida na captação, acúmulo, transporte e, conseqüentemente, toxicidade do mercúrio (Zalups, 2000), o que resulta em alteração de atividades enzimáticas como, por exemplo, da enzima delta-aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-D), envolvida na via de formação do grupo heme da hemoglobina (Emanuelli *et al.*, 1996).

Além da inativação de enzimas sulfidrílicas, o mercúrio exerce efeitos tóxicos nos rins por desencadear reações auto-imunes (Nielsen & Hultman, 2002), afetar a comunicação celular mediada por junções do tipo GAP (Aleo *et al.*, 2002) além de causar danos oxidativos (Stohs & Bagchi, 1995; Zalups, 2000). Ao se ligar aos grupos sulfidrílicos de proteínas, o Hg diminui os níveis de glutatona, o que pode contribuir para o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, como ânion

superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil. Esses, por sua vez, podem aumentar a lipoperoxidação (Stohs & Bagchi, 1995).

O tratamento utilizado em intoxicações com mercúrio consiste na remoção da fonte de exposição e utilização de agentes quelantes, tais como dimercaprol, ácido etilenodiaminotetra acético, D-penicilamina, ácido meso 2,3-dimercaptosuccínico e 2,3-dimercapto-1-propanosulfonato de sódio (Risher & Amler, 2005). No entanto, existem relatos de alguns desses agentes podem promover redistribuição do metal no organismo aumentando a sua concentração no sistema nervoso (Emanuelli *et al.*, 1996). Também tem sido relatado que o tratamento com quelantes pode eliminar minerais essenciais e provocar outros efeitos adversos (Risher & Amler, 2005). Considerando que muitos dos efeitos tóxicos induzidos pelo mercúrio estão relacionados a danos oxidativos e complexação com tióis endógenos, tem sido sugerido que antioxidantes poderiam auxiliar no tratamento de intoxicações com mercúrio (Patrick, 2002).

Os carotenóides são pigmentos naturais, sintetizados por plantas e microrganismos, conhecidos por suas propriedades antioxidantes. Muitos estudos têm demonstrado o papel dos carotenóides na prevenção de doenças cardiovasculares e câncer (Davison *et al.*, 1993; Agarwal & Rao, 2000), mas poucos estudos revelam o papel protetor destes frente a injúrias causadas por metais. El-Missiry & Shalaby (2000) relataram efeito protetor do  $\beta$ -caroteno sobre danos oxidativos induzidos por cádmio no cérebro e testículos, enquanto que os resultados de Andersen & Andersen (1993) sugerem que esse mesmo carotenóide não foi capaz de proteger danos causados por metilmercúrio em vários órgãos.

O licopeno, um carotenóide abundante no tomate e em produtos derivados, tem sido apontado como importante na prevenção do câncer de próstata e outros cânceres, doenças coronárias como aterosclerose, degeneração da mácula associada à idade e esclerose múltipla. Tais ações preventivas são relacionadas à proteção contra danos oxidativos (Mortensen *et al.*, 2001) e ao estímulo da comunicação celular mediada por junções do tipo GAP (Zhang *et al.*, 1991). Entre as várias estratégias de defesa, o licopeno está envolvido na detoxificação de duas das principais espécies reativas de oxigênio: o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e o radical peróxil (Stahl & Sies, 2003). Foi relatado o efeito protetor desse carotenóide contra danos oxidativos induzidos por cisplatina em rim e em testículos, além de proteger contra



alterações nas características do esperma de ratos (Atessahin *et al.*, 2005; Atessahin *et al.*, 2006a, b), e ainda contra danos oxidativos induzidos por ferro em intestino de ratos (Reifen *et al.*, 2004).

A astaxantina é um carotenóide de ocorrência natural em várias plantas, algas e frutos do mar e, assim como o licopeno, apresenta atividade antioxidante. Devido a sua estrutura lipofílica, a astaxantina exerce suas propriedades antioxidantes em membranas celulares ricas em lipídios (Kurashige *et al.*, 1990). De acordo com Miki (1991), ratos privados de vitamina E na dieta, apresentaram redução da resistência à oxidação lipídica, a qual foi restaurada por uma dieta rica em astaxantina. Além disso, a astaxantina apresentou efeito protetor contra danos induzidos por íons cálcio (Wu *et al.*, 2006), além de atividade antidiabetes, antihipertensiva, neuroprotetora e antiapoptótica (Naito *et al.*, 2004; Hussein *et al.*, 2005; Gross *et al.*, 2006). De acordo com Barros *et al.* (2001), a astaxantina foi eficiente em inibir peroxidação de lipossomas induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ferro, apresentando poder antioxidante superior ao β-caroteno, porém inferior ao licopeno. Naguib *et al.* (2000) relataram que esse carotenóide possui atividade antioxidante 100-500 vezes maior que o α-tocoferol.

O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito do pré-tratamento com os carotenóides licopeno e astaxantina sobre danos renais induzidos pela administração de cloreto de mercúrio em ratos. Os danos renais foram avaliados através da determinação da atividade das enzimas δ-ALA-D e GST, níveis de grupos sulfidrílicos não-protéicos e análise histológica, além dos níveis plasmáticos de creatinina e ácido úrico. Também foram avaliados, como indicadores de estresse oxidativo no tecido renal, níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e atividade das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase, superóxido dismutase e catalase

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Mercúrio

O mercúrio é um elemento químico que não possui função biológica no organismo e causa efeitos deletérios sendo, por essa razão, classificado como metal tóxico (Klaassen, 1996). Por tratar-se de um agente potencialmente tóxico, é preciso minimizar ao máximo seu emprego em qualquer tipo de atividade.

#### 3.1.1 Aspecto e forma

O mercúrio (Hg) é um metal pesado de aspecto inodoro, argênteo, pertencente à família química dos metais do grupo IIb da tabela periódica, juntamente com cádmio e zinco. Normalmente é encontrado nas seguintes formas: mercúrio metálico ( $\text{Hg}^0$ ), mercúrio (I) e mercúrio (II), nas quais os átomos perdem um ou dois elétrons, respectivamente, formando o mercúrio mercurioso ( $\text{Hg}_2^{++}$ ) e o mercúrio mercúrico ( $\text{Hg}^{++}$ ). Estes dois últimos formam diversos compostos orgânicos e inorgânicos (Nascimento & Chasin, 2001). Os compostos mais importantes formados são os sais cloreto de mercúrio  $\text{HgCl}_2$ , um sublimado corrosivo muito tóxico, cloreto mercurioso  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ , ocasionalmente ainda usado na medicina e sulfeto de mercúrio  $\text{HgS}$  utilizado como pigmento em tintas (HSDB, 2000). Os compostos orgânicos de mercúrio são muito considerados sob o ponto de vista toxicológico. Os que causam maior preocupação são os ligados aos radicais alquila de cadeia curta, onde o mercúrio se liga aos grupos metila, etila e propila (WHO, 1989). Esses compostos têm aparências e odores distintos, que variam de acordo com os radicais alquilas aos quais estão ligados (Nascimento & Chasin, 2001).

#### 2.1.2 Ocorrência, uso e fontes de exposição

O Hg raramente é encontrado como elemento livre na natureza. Encontra-se amplamente distribuído por toda a crosta terrestre, porém em baixas concentrações (Nascimento & Chasin, 2001). As fontes naturais mais significativas de mercúrio são

a desgaste da crosta terrestre, as emissões de vulcões e a evaporação oriunda do metabolismo de organismos aquáticos (WHO, 1991). Estas emissões são responsáveis por 25.000 a 125.000 toneladas por ano, enquanto que a mineração extrai cerca de 10.000 toneladas por ano. Indústrias de equipamentos elétricos, de pinturas a base de mercuriais, além da queima de combustíveis fósseis, extração e refino de ouro e fundição de minérios respondem por mais de 50% da emissão de mercúrio na atmosfera (WHO, 1989; WHO, 1991). No Brasil, uma portaria da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2001) proibiu a adição de substâncias mercuriais a formulações farmacêuticas conhecidas, como o Merthiolate e Mercúrio Cromo, utilizadas como desinfetantes tópicos.

O mercúrio é usado principalmente como catalisador na produção do cloro e da soda cáustica. Este metal também é usado em baterias domésticas, lâmpadas elétricas, incluindo lâmpadas fluorescentes, interruptores, explosivos, no tratamento de minérios de ouro e prata e para refino de metais (Clarkson, 1997). Cerca de 200 formulações farmacêuticas contendo Hg estão aprovadas nos EUA, tendo como usos principais, conservantes em soluções nasais, oftálmicas, vacinas e produtos injetáveis. Entretanto, esse uso tende a diminuir com a substituição por outros conservantes (FDA, 1997).

Devido aos inúmeros usos do mercúrio, as maiores fontes de exposição da população em geral, a este metal são a dieta (Klaassen, 1996) e as amálgamas dentárias (Lorscheider *et al.*, 1995). A contaminação da água é de fundamental importância, uma vez que o mercúrio inorgânico pode ser metilado por microorganismos, originando o metilmercúrio. Essa forma orgânica de mercúrio é absorvida rapidamente e é lentamente excretada pelos organismos, sendo encontrada em altos níveis em organismos de origem aquática (WHO, 1991). Uma vez dentro do organismo, o metilmercúrio é desmetilado até mercúrio inorgânico (Patrick *et al.*, 2002). Estes mesmos autores apontam o mercúrio inorgânico não apenas como produto do metabolismo do metilmercúrio, mas também do mercúrio elementar, sendo apontado como a forma de mercúrio que causa toxicidade em organismos expostos ao metilmercúrio e ao mercúrio elementar.

### 2.1.3 Absorção e distribuição

O mercúrio metálico, devido a sua volatilidade e lipossolubilidade, é preferencialmente absorvido pelos pulmões. A absorção do cloreto mercurioso e mercúrico é baixa (Klaassen, 1996), porém o metilmercúrio é quase completamente absorvido pelo trato gastrointestinal ou pela via pulmonar (WHO, 1991)

O transporte de mercúrio iônico é realizado pelo plasma, enquanto o mercúrio elementar é transportado pelas hemáceas (Haeys, 1982). Nos eritrócitos e tecidos, o mercúrio metálico é rapidamente oxidado ao íon  $Hg^{+2}$  por ação da enzima catalase e se fixa às proteínas (Magos *et al.*, 1978). O mercúrio inorgânico, menos lipossolúvel, concentra-se mais no plasma do que nos eritrócitos. O metilmercúrio também é transportado pelas células vermelhas (95%) e, o restante, ligado às proteínas plasmáticas (Nascimento & Chasin, 2001).

A distribuição do mercúrio nos tecidos depende da forma do metal a qual o organismo foi exposto, além da espécie e idade do animal (Jugo, 1976). O mercúrio inorgânico se acumula principalmente nos rins e fígado (Emanuelli *et al.*, 1996; Zalups, 2000), enquanto compostos organomercuriais atingem inicialmente o cérebro, devido a sua lipossolubilidade e capacidade de cruzar a barreira hematoencefálica (WHO, 1990).

### 2.1.4 Alterações bioquímicas

Todas as formas de mercúrio são tóxicas, devido à alta afinidade entre mercúrio e enxofre, ocorrendo ligação entre o mercúrio e grupos tiólicos de proteínas, peptídeos e aminoácidos. Essa interação com grupos sulfidrílicos de proteínas, metalotioneínas, glutatona e cisteína está diretamente envolvida na captação, acúmulo, transporte e conseqüentemente, toxicidade do mercúrio (Zalups, 2000). A indução de metalotioneína é o principal efeito intracelular do mercúrio inorgânico divalente (Zalups, 2000). A interação com os grupos sulfidrílicos resulta em alteração de atividades enzimáticas como, por exemplo, da enzima  $\delta$ -ALA-D, envolvida na via de formação do grupo heme da hemoglobina (Emanuelli, 1996), além das enzimas sulfidrílicas aspartato aminotransferase e lactato desidrogenase (Hill & Soares, 1984). As formas orgânicas e inorgânicas de mercúrio também

exercem grande influência no metabolismo intracelular da glutathione (Zalups, 2000). Muitos estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram aumento intracelular nos níveis de glutathione nas células tubulares renais após administração de doses baixas ou não tóxicas de metilmercúrio (Woods *et al.*, 1992) ou mercúrio inorgânico (Zalups, 1993). Por outro lado, doses altas de mercúrio inorgânico diminuem o conteúdo de glutathione nos rins (Zalups, 1993).

Além da inativação de enzimas sulfidrílicas, o mercúrio exerce efeitos tóxicos nos rins por desencadear reações auto-imunes (Nielsen & Hultman, 2002), afetar a comunicação celular mediada por junções do tipo GAP (Aleo *et al.*, 2002) além de causar danos oxidativos (Lund *et al.*, 1993). Também tem sido observada necrose do epitélio renal acompanhada de proteinúria e glomerulonefrite (WHO, 1991). A exposição ao mercúrio pode afetar a reprodução, além de provocar efeitos teratogênicos (Leonard *et al.*, 1983) e embriotóxicos (Gale *et al.*, 1984).

#### 2.1.5 Nefrotoxicidade

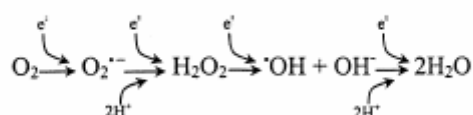
Todas as formas de mercúrio são nefrotóxicas. Entretanto, o mercúrio inorgânico é preferencialmente acumulado nos rins, causando falência renal (Tanaka-Kagawa *et al.*, 1998). Essa forma de mercúrio causa toxicidade aos rins mais pronunciadamente em uma exposição aguda, enquanto compostos orgânicos de mercúrio requerem múltiplas exposições e doses relativamente altas para causar toxicidade aos rins (Zalups *et al.*, 2000). A injúria renal induzida pelo mercúrio inorgânico é completamente expressada durante as primeiras 24h de exposição ao composto e pode ser induzida em ratos por uma única dose de 1,5  $\mu\text{mol/kg}$  (Zalups *et al.*, 2000). A  $DL_{50}$  para exposições humanas ao  $\text{HgCl}_2$  foi estimada em 29 - 50  $\text{mg/kg}$  (Clarkson, 1997).

Morfologicamente, o túbulo proximal é o segmento do néfron mais vulnerável aos efeitos tóxicos das formas inorgânica e orgânica de mercúrio. Danos às células epiteliais do túbulo próximo culminam com o cessamento da reabsorção de água e solutos (Clarkson, 1997). Danos a essa porção do néfron podem ser observados 1 hora após exposição de ratos a uma dose muito alta de  $\text{HgCl}_2$ . Exposição a doses menores (1-5  $\text{mg/kg}$ ) de  $\text{HgCl}_2$ , causa necrose celular ao longo do túbulo proximal,

visível ao microscópio ótico após, no mínimo, 12 horas de exposição (Zalups *et al.*, 2000).

## 2.2 Estresse oxidativo e mercúrio

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre fatores oxidantes e antioxidantes, a favor dos oxidantes, prejudicando a integridade celular (Sies, 2000). A utilização do oxigênio pelos organismos aeróbios gera metabólitos reativos, mesmo em condições fisiológicas normais. Espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas e degradadas por organismos aeróbicos, sendo sua formação conduzida a concentrações fisiológicas, requeridas para a função celular normal, ou quantidades excessivas que levam ao aumento do estresse oxidativo (Nordberg & Arnér, 2001). As EROs incluem um grande número de moléculas quimicamente reativas e derivadas do oxigênio, como exemplo o ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $\cdot OH$ ). As moléculas anteriormente citadas e seu mecanismo de formação estão ilustrados na Figura 1

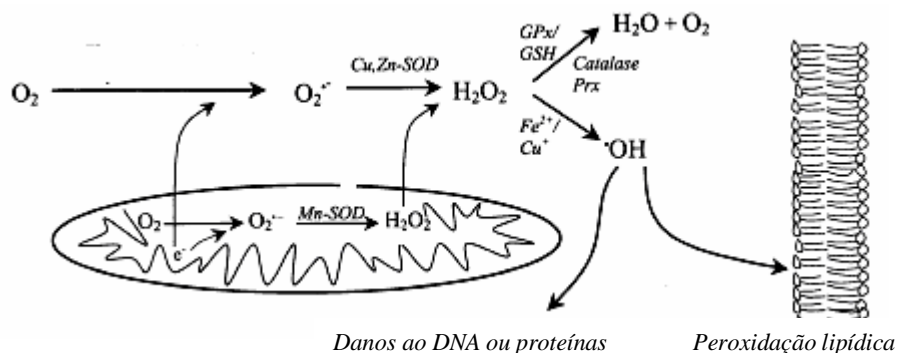


**Figura 1** - Formação das espécies reativas de oxigênio, a partir do oxigênio molecular, com sucessivas transferências de elétrons (Nordberg & Arnér, 2001).

A produção das estruturas químicas intermediárias no metabolismo do oxigênio ameaça a integridade de várias biomoléculas como proteínas (Stadtman & Levine, 2000), lipídios e lipoproteínas (Ames *et al.*, 1993), e ácido desoxirribonucléico (DNA) (Ames *et al.*, 1993).

As enzimas antioxidantes protegem as células aeróbicas e demais estruturas corporais de injúrias oxidativas causadas por EROs, geradas durante o metabolismo normal (Fridovich, 1978). Dentre elas estão superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx). A SOD exerce efeito protetor por detoxificar o ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), num processo de dismutação, produzindo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que pode ser reduzido por ação das enzimas CAT e GPx,

formando água e liberando oxigênio (Ames *et al.*, 1993; Nordberg & Arner, 2001) (Figura 2).



**Figura 2** - Esquema simplificado não estequiométrico dos sistemas oxidante e antioxidante nas células (Nordberg & Arnér, 2001).

A produção de radicais livres e o estresse oxidativo têm sido apontados como causa da injúria renal causada por mercúrio (Stohs & Bagchi, 1995; Zalups, 2000). Ao se ligar aos grupos sulfidrílicos, o Hg diminui os níveis de glutatona, o que pode contribuir para o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil (Stohs & Bagchi, 1995). Conseqüentemente, há um aumento na peroxidação lipídica, danos ao DNA e alteração da homeostase de cálcio e de grupos sulfidrílicos. (Elia *et al.*, 2003).

De acordo com El Demerdash (2001), a exposição ao mercúrio induziu peroxidação lipídica renal e hepática, enquanto Girardi & Elias (1995) observaram alteração na atividade das enzimas glutatona peroxidase (GSH-Px) e catalase em animais com conteúdo reduzido de NPSH uma hora após a exposição dos animais a 5mg/kg de cloreto de mercúrio ( $HgCl_2$ ). Gutierrez *et al.* (2006) relataram que, após duas semanas de exposição diária ao  $HgCl_2$  (0,16 mg/kg), a atividade da CuZn-SOD foi diminuída. Entretanto, após 4 semanas, houve uma resposta adaptativa da enzima, ocorrendo um aumento de 43% da atividade em relação ao controle. Shimojo *et al.* (2002) demonstraram que  $HgCl_2$  foi capaz de diminuir a atividade da Mn-SOD do cérebro de uma maneira dose-dependente. De acordo com Perottoni *et al.* (2004), o  $HgCl_2$  inibiu a atividade da  $\delta$ -ALA-D, elevou os níveis de TBARS e reduziu o conteúdo de ácido ascórbico no rim dos animais expostos.

De maneira semelhante, o metilmercúrio foi capaz de diminuir a atividade das enzimas glutatona peroxidase e glutatona redutase, bem como aumentar os

níveis de TBARS no cerebelo de animais expostos (Stringari *et al.*, 2006). Cheng *et al.* (2005) demonstraram níveis elevados de MDA e menor conteúdo de glutathione e das enzimas superóxido dismutase e glutathione peroxidase em cérebro, rins, fígado e no soro de animais expostos ao metilmercúrio durante 7 dias. Farina *et al.* (2004) demonstraram elevação nos níveis de TBARS, bem como redução dos níveis de grupos tióis não protéicos e da atividade da glutathione peroxidase em fígado de animais recém-nascidos expostos ao cloreto de metilmercúrio durante 21 dias.

### 2.3 Carotenóides

Os carotenóides são pigmentos naturais sintetizados por plantas e microrganismos, sendo componentes essenciais dos alimentos (Sthal & Sies, 2003). Essas substâncias têm como função primária absorver luz durante a fotossíntese em plantas ou fotoproteção de microrganismos. Sua estrutura química é composta por ligações duplas conjugadas, que são responsáveis por sua cor e por algumas de suas funções biológicas (Moreira & Shami, 2004). Juntamente com as vitaminas, são as substâncias mais investigadas como agentes quimiopreventivos, funcionando como antioxidantes em sistemas biológicos (Moreira & Shami, 2004). Algumas das principais fontes de carotenóides são cenouras e abóboras ( $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno), tomates e produtos derivados, como extrato, polpa e molhos (licopeno), espinafre (luteína), laranja ( $\beta$ -criptoxantina) (Silva & Naves, 2001) e algumas espécies de salmão e crustáceos, que bioacumulam astaxantina produzida por algas.

Muitas atividades têm sido atribuídas aos diferentes componentes dessa classe como prevenção de doenças cardiovasculares e câncer, sendo o papel preventivo contra câncer associado às propriedades antioxidantes e antimutagênicas (Davison *et al.*, 1993). Testes *in vitro* e *in vivo* sugerem que os carotenóides são excelentes antioxidantes, seqüestrando e inativando os radicais livres (Erdman, 1999). Eles seqüestram o oxigênio singlete, removem radicais peroxil, modulam o metabolismo carcinogênico, inibem a proliferação celular estimulando a comunicação celular, além de elevar a resposta imune (Olson, 1999). O mecanismo pelo qual os carotenóides protegem os sistemas biológicos dos radicais depende da transferência de energia do radical para a molécula do carotenóide, em que a



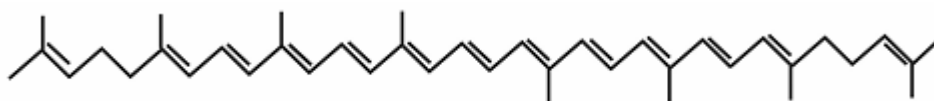
energia é dissipada por meio de rotações e vibrações do carotenóide no meio solvente (Packer *et al*, 1999).

### 2.3.1. Licopeno

#### 2.3.1.1. Ocorrência, estrutura química e metabolismo

O licopeno é um carotenóide que contém 40 átomos de carbono, lipossolúvel, altamente insaturado, composto por ligações duplas conjugadas e não conjugadas (Figura 3). É encontrado em alguns alimentos de cor vermelha como tomates e seus produtos derivados, goiaba, melancia, mamão e pitanga (Moreira & Shami, 2004). De acordo com Giovannucci (1999), o tomate vermelho maduro contém maior quantidade de licopeno que de  $\beta$ -caroteno, por isso a cor vermelha predomina. A razão licopeno/ $\beta$ -caroteno é responsável pela diferença de coloração, que também está associada à enzima  $\beta$ -ciclase, enzima que participa da transformação do licopeno em  $\beta$ -caroteno.

O licopeno ingerido na forma natural (*trans*-licopeno), é pouco absorvido, mas estudos demonstram que o processamento térmico melhora a biodisponibilidade por ajudar no rompimento da parede celular e extração (Willcox *et al.*, 2003). O aumento de gordura na dieta facilita a absorção e biodisponibilidade do licopeno (Moreira & Shami, 2004). O licopeno ingerido é incorporado em micelas, e absorvido na mucosa intestinal por difusão passiva, sendo incorporado aos quilomícrons e transportado pelo sistema linfático até o fígado, principal órgão de reserva (Agarwal & Rao, 2000). De acordo com Boileau *et al* (1999) o *cis*-licopeno é mais biodisponível que a forma *trans*, por ser mais solúvel nas micelas, sendo mais facilmente incorporado aos quilomícrons. Isso pode ser explicado pelo fato de que, após absorção e digestão, o licopeno é separado de lipídios proteínas e fibras do fruto, responsáveis por manter estável a configuração *trans*, sendo incorporado a micelas. É possível que o licopeno sofra isomerização nessa separação (Wilcox *et al.*, 2003). De acordo com Clinton *et al.* (1996) mais de 50% do licopeno no soro e tecidos encontra-se na forma de *cis*-licopeno.



**Figura 3** - Estrutura química do licopeno (Omoni & Aluko, 2005)

De acordo com Khachik *et al* (2002), oxidação do licopeno é um processo complexo. O processo oxidativo ocorre naturalmente no fruto cru ou durante o processamento térmico, além de ocorrer *in vivo* como parte do metabolismo normal do carotenóide. Inicialmente, o licopeno é oxidado nas posições 1 e 5, originando licopeno 1,2-epóxido e licopeno 5,6-epóxido, respectivamente. Embora o primeiro composto seja bastante estável, o licopeno 5,6-epóxido é instável e ambos sofrem ciclização, originando uma mistura de 2,6-ciclicolicopeno-1,5-epóxido A e B. Embora os epóxidos de licopeno e produtos de rearranjo não sejam encontrados no soro humano, os correspondentes dióis cíclicos 2,6-ciclicolicopeno 1,5-dióis A e B estão presentes. Produtos metabólicos do licopeno como o 2,6-ciclicolicopeno diol (A e B) têm sido identificados em leite, soro e próstata de humanos (Kucuk *et al.*, 2001). De acordo com Zheripheh *et al.* (2003) o potencial benéfico do licopeno pode ser mediado por seus metabólitos, como já demonstrado para metabólitos do ácido retinóico.

### 2.3.1.2 Mecanismos de ação

O licopeno aparece atualmente como um dos mais potentes antioxidantes, sendo sugerido na prevenção de carcinogênese e aterogênese por proteger moléculas como lipídios, lipoproteínas de baixa densidade (LDL), proteínas e DNA (Agarwal & Rao, 2000).

A ação antioxidante do licopeno está associada à presença das ligações duplas conjugadas, sendo mais efetivo na remoção do oxigênio singlete e radicais peróxil. Essa capacidade de remover o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) é 2 vezes maior que a do  $\beta$ -caroteno e 10 vezes maior que a do  $\alpha$ -tocoferol (Agarwal & Rao, 2000). O licopeno proveniente da dieta aumenta as concentrações séricas e teciduais do carotenóide, que age como antioxidante, removendo radicais livres e evitando dano a lipídios (lipoproteínas e lipídios de membrana), proteínas (incluindo importantes enzimas) e DNA, evitando assim o estresse oxidativo (Omoni & Aluko, 2005). O

reduzido estresse oxidativo diminui o risco de ocorrência de doenças como câncer e aterosclerose (Agarwal & Rao, 2000). O licopeno é capaz de remover dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ), radicais tiil (RS) e sulfonil ( $\text{RSO}_2$ ) e peróxido de hidrogênio, bem como proteger do dano celular induzido por peroxinitrito (Mortensen *et al.* 1997; Musandu *et al.*; 2006). Durante a remoção do oxigênio singlete, a energia é transferida do  $^1\text{O}_2$  para a molécula de licopeno, deixando essa espécie reativa em um estágio triplete de energia. A remoção de outras espécies reativas, como  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{NO}_2$  ou peroxinitrito, leva a uma ruptura da molécula de licopeno (Stahl & Sies, 2003). Assim, o licopeno impede o dano oxidativo causado por essas espécies aos constituintes celulares.

Alternativamente, alguns mecanismos não-antioxidantes podem ser responsáveis pelos efeitos benéficos do licopeno. O aumento da concentração de licopeno no corpo pode regular funções de genes, melhorar a comunicação celular, modular resposta hormonal e imune ou regular o metabolismo, diminuindo assim o risco para doenças crônicas (Agarwal & Rao, 2000). Um possível mecanismo para o efeito protetor do licopeno contra doenças cardíacas é a inibição da enzima HMGCoA redutase, enzima importante na síntese do colesterol (Fuhrman *et al.*, 1997).

### 2.3.1.3 Efeitos protetores

Poucos estudos foram realizados avaliando o efeito protetor dos carotenóides contra injúrias causadas por metais pesados. De acordo com El-Missiry & Shalaby (2000) e El-Demerdash *et al.* (2004), o  $\beta$ -caroteno foi capaz reverter alterações bioquímicas, danos ao cérebro e testículos de ratos induzidos por cádmio. Entretanto, esse mesmo carotenóide não foi capaz de proteger tecidos contra a peroxidação lipídica induzida por metilmercúrio (Andersen & Andersen, 1993). O licopeno foi capaz de proteger contra danos oxidativos induzidos por cisplatina, em rim e em testículos, além de proteger alterações nas características do esperma de ratos (Atessahin *et al.*, 2005; Ateşahin *et al.*, 2006b),

Muitos estudos têm sido conduzidos a fim de utilizar o potencial benéfico do licopeno e a maioria relaciona o efeito protetor do carotenóide à sua atividade antioxidante. O licopeno protegeu contra danos oxidativos induzidos por ferro no

intestino e próstata de ratos (Reifen *et al.*, 2004; Matos *et al.*, 2006). O licopeno foi capaz de proteger contra nefrotoxicidade, cardiotoxicidade e danos testiculares induzidos por adriamicina (Yilmaz *et al.*, 2006; Atessahin *et al.*, 2006a). Em combinação com S-alilcisteína, esse carotenóide foi capaz de proteger a genotoxicidade causada por n-metil-n-nitro-n-nitrosoguanidina (Velmurugan *et al.*, 2004).

Estudos epidemiológicos relatam uma correlação positiva entre a ingestão de derivados de tomate e a diminuição da incidência de câncer de próstata e aterosclerose (Omoni & Aluko, 2005). Estudos *in vitro* e em modelos experimentais também relatam o efeito desse carotenóide em suprimir o crescimento de células tumorais e reduzir a oxidação do colesterol LDL (Fuhrman *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2002).

### 2.3.2. Astaxantina

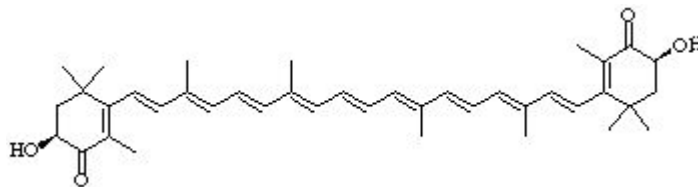
#### 2.3.2.1. Ocorrência e usos

A astaxantina (ASX) é um pigmento produzido por plantas, algas e fungos, pertencente à família das xantofilas. Está presente em pássaros e animais marinhos. É o principal pigmento presente em peixes e frutos-do-mar, que acumulam este carotenóide após o consumo de algas sintetizadoras de astaxantina. Assim, esse carotenóide é amplamente utilizado nas criações de salmão e crustáceos, a fim de conferir a coloração laranja desejável. Em animais aquáticos, possui muitas funções, tais como proteção de ácidos graxos poliinsaturados contra oxidação, proteção contra radiação UV-A, entre outros (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006).

#### 2.3.2.2. Estrutura química e metabolismo

A ASX é um cetocarotenóide que contém 40 átomos de carbono. Sua estrutura química é caracterizada por uma longa cadeia hidrocarbonada, com duplas ligações conjugadas (cadeia poliênica) com um anel aromático em cada extremidade da cadeia. A presença de hidroxila (-OH) e oxigênio nos anéis terminais da estrutura química da ASX confere uma maior polaridade a este carotenóide quando comparado aos demais. Assim, sua estrutura se orienta de maneira que os

dois anéis se localizem na superfície e a cadeia carbonada no interior da membrana (Goto *et al.*, 2001).



**Figura 4** - Estrutura química da astaxantina (Goto *et al.*, 2001).

Assim como os demais carotenóides, a ASX possui diferentes estereoisômeros, que diferem entre si na configuração dos dois grupos hidroxila presente em cada anel terminal da estrutura da ASX (Guerin *et al.*, 2003). Dependendo da origem, a ASX pode ser encontrada esterificada com diferentes ácidos graxos, o que confere estabilidade à molécula, uma vez que a ASX livre é muito sensível à oxidação. Além disso, a ASX pode formar complexos com proteínas e lipoproteínas (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006).

Após ingestão, devido a sua lipossolubilidade, a ASX é incorporada em micelas no intestino delgado, se difundindo passivamente na luz intestinal junto com os ácidos graxos. A ASX é incorporada em quilomícrons e estes, após perder sua fração lipídica, tornam-se suficientemente pequenos para passar através dos capilares sanguíneos, chegando ao fígado, principal órgão para metabolismo e excreção de carotenóides. Neste órgão, a ASX é catabolizada até seus metabólitos. O mecanismo exato pelo qual a ASX é metabolizada no fígado é desconhecido, mas sabe-se que a porção deste carotenóide não metabolizada é incorporada as VLDL antes de chegar a corrente sanguínea novamente (Rajasingh *et al.*, 2006).

### 2.3.2.3. Propriedades

Apesar da ausência da atividade pró-vitamina A, a ASX possui inúmeras propriedades farmacológicas incluindo atividades antioxidante, antiinflamatória (Kurashige *et al.*, 1990), imunomoduladora, anticâncer (Chew *et al.*, 1999) e antidiabetes (Uchiyama *et al.*, 2002). Entre tais propriedades, sua atividade antioxidante parece ser responsável pelas demais. A ASX apresentou potencial antioxidante superior a outros carotenóides como zeaxantina, luteína, cantaxantina,

e  $\beta$ -caroteno e 100 vezes maior que o  $\alpha$ -tocoferol (Naguib, 2000). Essa superioridade estaria relacionada à estrutura química, onde os anéis polares da ASX removeriam espécies reativas de oxigênio na superfície, enquanto a cadeia carbonada agiria no interior da membrana (Goto *et al.*, 2001). No anel polar da ASX, o grupo hidroxila no átomo de carbono 3 é apontado como principal sítio de remoção de radicais livres.

Alguns autores têm descrito o efeito protetor da ASX contra danos oxidativos induzidos por radicais hidroxil e oxigênio singlete (Wu *et al.*, 2006). Além disso, tem sido demonstrado que peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete e radical superóxido estimulam a biossíntese da ASX em fungos, provavelmente como uma resposta de defesa antioxidante (Schroeder & Johnson, 1993; Schroeder & Johnson, 1995; Liu & Wu, 2006).

#### 2.3.2.4. Efeitos protetores

De acordo com Barros *et al.* (2001), a ASX foi o único carotenóide capaz de inibir a propagação da peroxidação lipídica causada por  $H_2O_2$  em lipossomas contendo  $Fe^{+2}$ , provavelmente devido a duas propriedades combinadas: o efeito impermeabilizador da membrana, responsável por limitar a entrada de agentes que promovam a lipoperoxidação no interior da membrana, além da ação antioxidante deste carotenóide. De acordo com Goto *et al.* (2001), a ASX protegeu tanto o interior quanto a superfície de membranas fosfolipídicas contra peroxidação de lipídios *in vitro*.

Efeitos neuroprotetores desse carotenóide também têm sido descritos (Hussein *et al.*, 2005a), relacionados à propriedade antioxidante da ASX contra radicais livres induzidos pelo processo isquêmico. Recentemente, Li *et al.* (2004) mostraram que ASX também apresenta atividade antiapoptótica. Em um estudo de Hussein *et al.* (2006), a ASX reduziu os níveis plasmáticos de  $NO_2^-/NO_3^-$  em ratos hipertensivos, o que evitaria a formação de espécies reativas de nitrogênio. Hussein *et al.* (2005a, 2005b, 2006) descreveram o efeito antihipertensivo da ASX, ligado a sua atividade antioxidante, principalmente contra o radical superóxido, prevenindo a degradação do óxido nítrico mediada por essa espécie, resultando em vasorelaxamento. Este carotenóide apresentou melhor potencial protetor que a

glutathiona contra degradação protéica induzida por cálcio em cristalino suíno e o possível mecanismo para esse efeito antiproteolítico parece ser a capacidade da ASX de formar complexos com cálcio, diminuindo a disponibilidade deste mineral para as reações de proteólise (Wu *et al.*, 2006).

Estudos anteriores têm mostrado que a ASX restaurou a atividade da SOD, GSH-Px e CAT alteradas por etanol e naproxeno em estômago e por CCl<sub>4</sub> em fígado de ratos, impedindo a peroxidação lipídica e danos a esses tecidos (Kang *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005a; Kim *et al.*, 2005b). A ASX tem sido apontada como sendo mais efetiva que luteína e  $\beta$ -caroteno em restaurar as atividades de SOD e CAT alteradas por radiação UVA e peroxidação lipídica em fibroblastos de ratos (O'Connor & O'Brien, 1998). Ainda, a ASX restaurou as atividades da SOD, CAT e GSH-Px alteradas pela exposição de fibroblastos de frangos ao Paraquat (Lawlor & O'Brien, 1995), além de prevenir peroxidação lipídica em microssomas hepáticos de ratos (Palozza & Krinsky, 1992).

### **3 RESULTADOS**

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de dois manuscritos, apresentados a seguir. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios manuscritos. O manuscrito 1 está disposto na versão aceita pela revista Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. O manuscrito 2 está disposto na versão a ser submetida à revista Food and Chemical Toxicology.



### 3.1 Manuscrito 1

## **EFFECT OF LYCOPENE ON NEPHROTOXICITY INDUCED BY MERCURIC CHLORIDE**

Manuscrito aceito pela Revista *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*

**Effect of lycopene on nephrotoxicity induced by mercuric chloride in rats**

Paula R. Augusti<sup>1</sup>, Greicy M. M. Conterato<sup>1</sup>, Sabrina Somacal<sup>2</sup>, Lídia Einsfeld<sup>2</sup>,  
Adriano T. Ramos<sup>3</sup>, Fernando Y. M. Hosomi<sup>3</sup>, Dominguita L. Graça<sup>3</sup> and Tatiana  
Emanuelli<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Post-graduate Program on Biochemical Toxicology, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil;

<sup>2</sup>Integrated Center for Laboratory Analysis Development (NIDAL), Department of Alimentary Technology and Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Veterinary Pathology Laboratory, Department of Human Pathology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

**Author for correspondence:**

Tatiana Emanuelli  
Integrated Center for Laboratory Analysis Development (NIDAL)  
Department of Alimentary Technology and Science  
Center of Rural Sciences  
Federal University of Santa Maria  
Campus – Camobi, 97105-900  
Santa Maria, RS - Brazil  
Telephone: +55 55 3220 8547  
Fax: +55 55 3220 8353  
E-mail: [tatiemanuelli@smail.ufsm.br](mailto:tatiemanuelli@smail.ufsm.br)

**Running title:** Lycopene and HgCl<sub>2</sub> in adult rats

*Abstract:* Oxidative stress has been pointed as an important molecular mechanism for kidney injury in mercury poisoning. Lycopene, a plentiful carotenoid in tomatoes, has been studied because of its large antioxidant properties. This paper evaluated the ability of lycopene to prevent HgCl<sub>2</sub> nephrotoxicity. Rats were injected with HgCl<sub>2</sub> (0 or 5 mg/kg body weight, subcutaneously) 6 h after lycopene had been administered (0, 10, 25, or 50 mg/kg, by gavage) and were killed twelve hours after HgCl<sub>2</sub> exposure. HgCl<sub>2</sub>-induced inhibition of  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase activity (~35%) and increase of lipid peroxidation in kidney (~37%) were prevented by lycopene. However, lycopene did not prevent the increase of plasma creatinine levels (~123%) and renal tubular necrosis induced by HgCl<sub>2</sub>. Glutathione peroxidase and catalase activities were enhanced (~71% and ~41%), while superoxide dismutase activity was depressed (~44%) in HgCl<sub>2</sub>-treated rats when compared to control and these effects were prevented by lycopene. Our results indicate that although lycopene did not prevent HgCl<sub>2</sub>-induced renal failure, it could have a beneficial role against HgCl<sub>2</sub> toxicity by preventing lipid peroxidation and changes in the activity of  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase and antioxidant enzymes.

Although it has been recognized as a hazardous environmental pollutant, inorganic mercury is widely used in certain types of batteries and continues to be an essential component of fluorescent lightbulbs [1]. Most cases of human exposure to inorganic mercury have been related to working activities like spillage of mercury compounds on work clothes or in the working environment and handling of mercury salts in the chemical industry and laboratories [2, 3]. Besides, a mixed burden of mercury species, including inorganic mercury, has been associated with human poisoning in gold mining areas [4]. There are also some reports of accidental and intentional cases of human exposure to inorganic mercury [5, 6].

Inorganic mercury accumulates preferentially in kidneys and causes acute renal failure [7]. Uptake, accumulation, and toxicity of inorganic mercury in the kidney have been related to its binding to endogenous thiol-containing molecules [8]. The thiol-containing enzyme  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase has been pointed to be a target for inorganic mercury [9, 10]. Additionally, binding of mercuric ions to sulfhydryl groups may result in decreased glutathione levels, leading to an increase of reactive oxygen species, like superoxide anion radical, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical [11]. Free radical formation and subsequent lipid peroxidation was reported as a cause of cell death in mercuric chloride-induced nephrotoxicity [12].

Taking into account that oxidative stress and endogenous thiols depletion are involved in inorganic mercury toxicity, it has been suggested that antioxidants could help in the treatment of mercury poisoning [13]. In fact, superoxide dismutase treatment protected from renal failure and morphological changes induced by mercuric chloride [12]. Besides, recent studies demonstrated that the non-enzymatic antioxidant melatonin could prevent mercuric chloride-induced changes [14], whereas

another non-enzymatic antioxidant, trolox, was able to prevent changes induced by methylmercury [15].

Lycopene is one of the most potent carotenoid antioxidants [16]. It is naturally found in many plant foods, being especially abundant in tomatoes [16]. It is not synthesized by humans, but is obtained through dietary consumption. According to recent reports, lycopene is associated with decreased incidence of many important diseases including cancer, atherosclerosis, age-related macular degeneration, and multiple sclerosis, probably via prevention of lipid peroxidation [17]. Lycopene is most likely involved in the scavenging of two reactive oxygen species, singlet molecular oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) and peroxy radicals, contributing to the defence against lipid peroxidation [18]. Recent data have shown that this carotenoid is able to protect against cisplatin-induced oxidative damage in kidney of rats [19], and iron-induced oxidative damage in bowel and prostate of rats [20, 21].

In the present study we characterized renal changes induced by acute exposure to mercuric chloride (thiol containing biomolecules, antioxidant enzymes, plasma creatinine levels, and histological changes) and evaluated the possible protective effect of lycopene pre-treatment in rats.

### **Materials and Methods**

*Animals.* This study was approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of Universidade Federal de Santa Maria (23081.008726/2006-37). 8 Weeks-old male Wistar rats from our breeding colony ( $191.8 \pm 22.3$  g) were maintained in an air-conditioned room (22-25°C) under natural lighting conditions, with free access to water and food.

*Exposure and sample collection.* Animals received vehicle (Milli-Q water) or lycopene (10, 25, or 50 mg/kg) by oral gavage (1mL/kg body weight). After 6h, they were subcutaneously injected (1 mL/kg body weight) with vehicle (120 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer, pH 7.4) or HgCl<sub>2</sub> (5 mg/kg). The mercury dose was based on the study of Perottoni et al. [22], where acute exposure to a similar dose of mercuric chloride increased lipid peroxidation and decreased  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase activity in renal tissue *in vivo*. According to Lund et al. [23] the dose of 5 mg/kg is sufficient to elicit mild or moderate oxidative stress in kidney cells. The doses of lycopene were based on the study of Matos et al. [21] where similar doses were effective in protecting against iron-induced oxidative damage. HgCl<sub>2</sub> solution was prepared in 120 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer, pH 7.4. Lycopene (10% powder, Deg Chemical Products Importation Ltda, São Paulo, Brazil) was suspended in Milli-Q purified water (35-40°C).

Twelve hours after HgCl<sub>2</sub> injection, rats were anaesthetized with ether for cardiac puncture. Blood samples were collected into heparinized tubes and centrifuged at 3000 x g for 10 minutes. Plasma was removed immediately and stored at -20°C until analyzed. Animals were killed by decapitation and left kidney was removed and homogenized in 3 volumes of 150 mM NaCl. The homogenate was centrifuged at 3000 x g at 4°C for 10 minutes to yield a low-speed supernatant that was used to determine delta-aminolevulinate dehydratase activity (ALA-D), thiobarbituric acid reactive substances, non-protein thiol groups, and antioxidant enzymes activity. Right kidney was removed and used for histopathological examinations.

*d-Aminolevulinate dehydratase activity.* Activity was assayed as described by Sassa [24]. The reaction was started after the addition of sample to the incubation medium and carried out for 180 minutes at 39°C. The reaction product was determined using Ehrlich's reagent at 555 nm with a molar absorption coefficient of  $6.1 \times 10^4$  for the Ehrlich-porphobilinogen salt. Results were expressed as nmol porphobilinogen/h/mg protein.

*Lipid peroxidation.* After addition of 7.2 mM of butylated hydroxytoluene to prevent further oxidation, the supernatant was used for determination of thiobarbituric acid reactive substances as described by Ohkawa et al. [25]. Following incubation samples were extracted with *n*-butanol and the reaction product was determined at 535 nm using a standard curve of 1,1,3,3-tetraethoxypropane.

*Non-protein thiol groups.* One volume of the low-speed supernatant fraction was mixed with 1 volume of 10% trichloroacetic acid, followed by centrifugation and neutralization of the supernatant (to pH 7.5) with 1 M Tris as described by Jacques-Silva et al. [26]. Non-protein thiol groups were immediately determined as described by Ellman [27] at 412 nm after reaction with 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid). A standard curve using cysteine was used to calculate the content of non-protein thiol groups in tissue samples.

*Plasma creatinine levels.* Plasma creatinine concentration was determined at 520 nm, after reaction with picric acid in alkaline medium (final point method), using a commercial Kit (Doles reagents, Goiânia, GO, Brazil).

*Antioxidant enzymes.* Superoxide dismutase activity was determined spectrophotometrically, using 50 mM glycine buffer, pH 10.2, and 1 mM epinephrine as substrate, at 30°C [28]. Superoxide dismutase activity was expressed as the amount of enzyme that inhibits the auto-oxidation of epinephrine to adrenochrome by 50% which is equal to 1 unit.

Catalase activity was measured spectrophotometrically, as described by Aebi [29] using 50 mM phosphate buffer, pH 7.0 and 17 mM hydrogen peroxide as substrate. The pseudo-first order reaction constant ( $k$ ) of the decrease in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> absorption/s at 25°C was determined and enzyme specific activity was expressed as  $k/g$  protein.

Glutathione peroxidase activity was determined in a medium containing 25 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, 2.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 0.24 U/mL glutathione reductase, 1 mM reduced glutathione, 1 mM sodium azide, 0.15 mM NADPH, and 0.4 mM hydrogen peroxide. The method is based on the oxidation of NADPH at 25°C, which is indicated by the decrease in absorbance at 340 nm, according by Paglia and Valentine [30].

*Protein quantification.* Protein was measured according to Lowry [31] using bovine serum albumin as the standard.

Histopathological examinations. Renal tissue was fixed in 10% formalin, dehydrated in an ascending graded series of ethanol, cleared in xylene and embedded in paraffin. Sections of 5  $\mu$ m were obtained with a standard microtome and were mounted on glass slides. The sections were later stained with hematoxylin and eosin for histological analyses. Slides were examined by observers blinded to the



treatment, using light microscopy. Five fields covering the deep cortex and upper medulla were examined for each kidney slide. At least one hundred tubules were counted and the severity of tubular necrosis was expressed as percent of necrotic tubules.

Statistical analysis. The data were analyzed using two-way analysis of variance (2 Hg doses x 4 lycopene doses) followed by post hoc Duncan's multiple range test when necessary. Results were expressed as the mean  $\pm$  standard error of means and differences were considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

## Results

Two-way analysis of variance (2 HgCl<sub>2</sub> doses x 4 lycopene doses) revealed a significant main effect of HgCl<sub>2</sub> on renal  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase activity and thiobarbituric acid reactive substances levels, indicating that mercury inhibited the activity of this sulfhydryl-containing enzyme ( $\sim 35\%$ ;  $P < 0.05$ , fig. 1A) and increased lipid peroxidation ( $\sim 37\%$ ;  $P < 0.05$ ; fig. 1B). Although analysis of variance did not reveal a significant main effect of lycopene or HgCl<sub>2</sub> x lycopene interaction, post-hoc analysis revealed that  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase activity of animals treated with 10 or 50 mg/kg lycopene + HgCl<sub>2</sub> were not significantly different from that of control animals. Similarly, thiobarbituric acid reactive substances levels of all animals treated with lycopene + HgCl<sub>2</sub> were not significantly different from those of control animals. These results suggest that pretreatment with lycopene could ameliorate  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase inhibition and lipid peroxidation induced by mercury (fig. 1A and B). HgCl<sub>2</sub> increased plasma creatinine levels ( $\sim 123\%$ ;  $P < 0.05$ ; fig. 1C). However, pre-treatment with lycopene did not prevent this effect (fig. 1C). Neither

HgCl<sub>2</sub> nor lycopene treatment changed the content of non-protein thiol groups in kidney (data not shown).

Analysis of variance revealed a significant HgCl<sub>2</sub> x lycopene interaction on the activity of antioxidant enzymes (fig. 2). Post-hoc comparisons demonstrated that superoxide dismutase activity decreased (~ 44%) in kidney tissue of the animals treated with HgCl<sub>2</sub> when compared to no-lycopene control group ( $P < 0.05$ ; fig. 2A). Besides, treatment with lycopene alone at 10 mg/kg reduced superoxide dismutase activity, but this effect was not observed at higher lycopene doses. The decrease of superoxide dismutase activity induced by HgCl<sub>2</sub> was prevented by 10 and 25 mg/kg lycopene ( $P < 0.05$ ), but not by 50 mg/kg lycopene. Post-hoc comparisons also demonstrated that catalase activity increased (~ 41%;  $P < 0.05$ ) in renal tissue of the animals treated with HgCl<sub>2</sub>, when compared to control group (fig. 2B) and that lycopene alone did not change catalase activity. While 25 and 50 mg/kg of lycopene prevented HgCl<sub>2</sub>-induced changes in catalase activity, 10 mg/kg lycopene decreased catalase activity under control values ( $P < 0.05$ ). Glutathione peroxidase activity is presented in Fig. 2C. HgCl<sub>2</sub> alone increased renal glutathione peroxidase activity (~ 71%;  $P < 0.05$ ) and lycopene, which did not affect this enzyme *per se*, prevented HgCl<sub>2</sub> effect at doses of 10 and 50 mg/kg, but not at 25mg/kg ( $P < 0.05$ ), as it could be demonstrated by post-hoc test.

Histological changes in kidneys are presented in Fig. 3. Analysis of variance revealed a significant main effect of HgCl<sub>2</sub>, indicating that significant renal tubular necrosis was observed 12 hours after HgCl<sub>2</sub> exposure (61%,  $P < 0.05$ ). Treatment with lycopene was not able to prevent such damage. Lycopene alone did not cause histological changes in kidney (data not shown).

## Discussion

Some previous reports showed protective effect of carotenoids against oxidative damage induced by metals [19, 21, 32, 33]. Lycopene prevented cisplatin-induced oxidative damage and nephrotoxicity [19] and iron-induced oxidative damage in rat prostate [21], while  $\beta$ -carotene prevented oxidative damage and toxicity induced by cadmium [32, 33]. However, dietary levels of  $\beta$ -carotene did not prevent the increase of glutathione peroxidase activity or lipid peroxidation induced by methylmercuric chloride in kidney, while an excess  $\beta$ -carotene further enhanced lipid peroxidation [34]. Hence, there is still some controversy about the protective potential of carotenoids against mercury toxicity, and lycopene had not been previously evaluated to protect against mercuric chloride toxicity.

In the present study we evaluated the effects of pretreatment with lycopene against mercuric chloride nephrotoxicity. Lycopene is readily absorbed in rats and serum levels are maintained high between 3 and 24 hours [35]. Although kidney is not the preferential organ for lycopene deposition, lycopene levels readily increase in kidney, being decreased between 3 and 24 hours after exposure [35].

Our results revealed that pretreatment with lycopene (6 hours before) prevented  $\text{HgCl}_2$ -induced lipid peroxidation, suggesting that  $\text{HgCl}_2$ -generated reactive species are scavenged by lycopene. There is a number of evidence linking  $\text{HgCl}_2$ -induced renal failure to oxidative stress [8, 11]. However, lycopene treatment did not prevent renal damage induced by  $\text{HgCl}_2$  (creatinine levels and tubular necrosis). This is the first study evaluating the protective effect of lycopene against  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase inhibition by metals. Lycopene was previously demonstrated to prevent reduction of glutathione levels induced by cisplatin [19]. Hence, it could be expected

to protect other endogenous thiols. Accordingly, we observed that lycopene (10 and 50 mg/kg) prevented  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase inhibition by  $\text{HgCl}_2$ .

$\text{HgCl}_2$  exposure increased the activities of catalase and glutathione peroxidase in kidney probably as a defense response against free radicals. This proposal is supported by the  $\text{HgCl}_2$ -induced increase of thiobarbituric acid reactive substances, which additionally indicates that free radicals generated by  $\text{HgCl}_2$  exceeded endogenous antioxidant activity and induced renal oxidative damage. Interestingly, we found depressed superoxide dismutase activity in animals treated with  $\text{HgCl}_2$ , which could contribute to the enhanced lipid peroxidation in these animals. Superoxide dismutase catalyzes superoxide anion radical dismutation to hydrogen peroxide, and lipid peroxidation induced by  $\text{HgCl}_2$  seems to be related to increase in superoxide anion radical production [12].

Some lycopene doses did prevent mercury-induced changes in antioxidant enzymes. This contrasts with the absence of  $\beta$ -carotene effect against methylmercury toxicity [34] and suggests that different carotenoids may have different mechanisms of action and effects. Lycopene has been demonstrated to protect *in vivo* against oxidation of lipids, proteins, and DNA [18, 36]. It is the most efficient biological carotenoid as singlet oxygen quencher [37, 38]. This higher antioxidant activity when compared to  $\beta$ -carotene may have contributed to the lycopene protective efficiency. After  $^1\text{O}_2$  quenching lycopene molecule is regenerated and may participate in further quenching events. However,  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{NO}_2^\cdot$ , and peroxynitrite trapping by lycopene leads to oxidative breakdown of the antioxidant molecule [18, 36].

The three doses of lycopene evaluated ameliorated the  $\text{HgCl}_2$ -induced increase in catalase activity. Lycopene protection against  $\text{HgCl}_2$ -induced decrease of glutathione peroxidase activity was observed at 10 and 50 mg/kg. Although lycopene

also prevented HgCl<sub>2</sub>-induced decrease of superoxide dismutase activity, this effect was only observed at the lower doses (10-25 mg/kg). This result may be related to the u-shaped dose-response curve for the effect of lycopene alone on antioxidant enzymes described by Breinholt et al. [39]. They observed a general trend: at lower doses lycopene increased the activities of antioxidant enzymes, whereas at the higher doses, activities decreased to control levels.

Lycopene protection against HgCl<sub>2</sub> induced-changes in antioxidant enzymes activities could be linked to changes in the antioxidant/prooxidant homeostasis due to the antioxidant effect of lycopene. Accordingly, lycopene treatment has been previously demonstrated to modulate the activity of antioxidant enzymes *in vivo* (decrease catalase activity and increase superoxide dismutase activity) even in the absence of a prooxidant treatment [40].

In conclusion, we demonstrated that although lycopene did not prevent HgCl<sub>2</sub>-induced renal failure, protection against oxidative damage,  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase inhibition and changes in the activity of antioxidant enzymes might be achieved by the use of lycopene. These results suggest that lycopene could have a beneficial role against HgCl<sub>2</sub> toxicity. However, there is a need for further studies before a conclusive statement may be made on the potential usefulness of lycopene as an adjunct to therapy in HgCl<sub>2</sub> poisoning.

### **Acknowledgements**

Work supported by CNPq (grant 470582/2004-9 to T. Emanuelli) and FAPERGS (grant 0410265 to T. Emanuelli). T. Emanuelli is the recipient of CNPq research Fellowship (proc. 304257/2004-4). S. Somacal is the recipient of a PIBIC/CNPq-UFSM fellowship. P.R. Augusti and G.M.M. Conterato are the recipients of CAPES Master degree fellowships.

## References

- 1 Clarkson TW. The toxicology of mercury. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1997;**34**:369-403.
- 2 Wide C, Mercury hazards arising from the repair of sphygmomanometers. *Br Med J* 1986;**293**:1409-10.
- 3 Bluhm RE, Bobbitt, RG, Welch LW, Wood AJJ, Bonfiglio JF, Sarzen C et al. Elemental mercury vapor toxicity, treatment and prognosis after acute, intensive exposure in chloralkali plant works. Part I: history, neuropsychological findings and chelator effects. *Hum Exp Toxicol* 1992;**11**:201-10.
- 4 Drasch G, Bose O', Reilly S, Beinhoff C, Roider G, Maydl S. The Mt. Diwata study on the Philippines 1999 – assessing mercury intoxication of the population by small scale gold mining. *Sci Total Environ* 2001;**267**:151-8.
- 5 Winship KA. Toxicity of mercury and its inorganic salts. *Adv Drug React Ac Pois Rev* 1985;**3**:129-60.
- 6 Shamley DJ, Sack JS. Mercury poisoning. A case report and comment on 6 other cases. *SAMT* 1989;**76**:114-6.
- 7 Tanaka-Kagawa T, Suzuki M, Naganuma A, Yamanaka N, Imura N. Strain difference in sensitivity of mice to renal toxicity of inorganic mercury. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;**285**:335-41.
- 8 Zalups RK. Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol Rev* 2000;**52**:113-43.
- 9 Emanuelli T, Rocha JBT, Pereira ME, Porciúncula LO, Morsch VM, Martins AF et al. Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on delta-aminolevulinate desidratase from brain, liver and kidney of adult mice. *Pharmacol Toxicol* 1996;**79**:136-43.

- 10 Nogueira CW, Soares FA, Nascimento PC, Muller DA, Rocha JBT. 2,3 – Dimercaptopropane - 1 - sulfonic acid and meso - 2,3 – dimercaptosuccinic acid increase mercury and cadmium –induced inhibition of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase. *Toxicology* 2003;**184**:85-95.
- 11 Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal-ions. *Free Radic Biol Med* 1995;**18**:321-36.
- 12 Girardi G, Elías MM. Mercuric chloride effects on rat renal redox enzymes activities: SOD protection. *Free Radic Biol Med* 1995;**18**:61-6.
- 13 Patrick L. Mercury toxicity and antioxidants: Part I: Role of glutathione and alpha-lipoic acid in the treatment of mercury toxicity. *Altern Med Rev* 2002;**7**:456-71.
- 14 Sener G, Sehidi AO, Ayanoglu-Dulger G. Melatonin protects against mercury (II)-induced oxidative tissue damage in rats. *Pharmacol Toxicol* 2003;**93**:290-6.
- 15 Usuki F, Yasutake A, Umehara F, Tokunaga H, Matsumoto M, Eto K et al. In vivo protection of a water-soluble derivative of vitamin E, trolox, against methylmercury-intoxication in the rat. *Neurosci Lett* 2001;**304**:199-203.
- 16 Agarwal A, Shen H, Agarwal S, Rao AV. Lycopene content of tomato products: Its stability, bioavailability and *in vivo* antioxidant properties. *J Med Food* 2001;**4**:9-15.
- 17 Mortensen A, Skibsted LH, Truscott TG. The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Arch Biochem Biophys* 2001;**385**:13-9.
- 18 Stahl W, Sies H. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med* 2003;**24**:345-51.
- 19 Atessahin A, Yilmaz S, Karahan I, Ceribarsi AO, Karaoglu A. Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology* 2005;**212**:116-23.

- 20 Reifen R, Nissenkom A, Matas Z, Bujanover Y. 5-ASA and lycopene decrease the oxidative stress and inflammation induced by iron in rats with colitis. *J Gastroenterol* 2004;**39**:514-9.
- 21 Matos HR, Marques SA, Gomes OF, Silva AA, Heimann JC, Di Mascio P et al. Lycopene and beta-carotene protect in vivo iron-induced oxidative stress damage in rat prostate. *Braz J Med Biol Res* 2006;**39**:203-10.
- 22 Perottoni J, Rodrigues OED, Paixão MW, Zeni G, Lobato LP, Braga AL et al. Renal and hepatic ALA-D activity and selected oxidative stress parameters of rats exposed to inorganic mercury and organoselenium compounds. *Food Chem Toxicol* 2004;**42**:17-28.
- 23 Lund B-O, Miller DM, Woods JS. Studies on Hg(II)-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation and oxidative stress *in vivo* and *in vitro* in rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol* 1993;**45**:2017-24.
- 24 Sassa S. Delta aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 1982;**28**:133-45.
- 25 Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipide peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;**95**:351-8.
- 26 Jacques-Silva MC, Nogueira CW, Broch LC, Flores EMM, Rocha JBT. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol Toxicol* 2001;**88**:119-25.
- 27 Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;**82**:70-7.
- 28 Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide-dismutase. *J Biol Chem* 1972;**247**:3170-5.
- 29 Aebi H. Catalase in vitro. *Method Enzymol* 1984;**105**:121-6.



- 30 Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;**70**:158-69.
- 31 Lowry DH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RF. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;**93**:265-75.
- 32 El-Missiry MA, Shalaby F. Role of beta-carotene in ameliorating the cadmium-induced oxidative stress in rat brain and testis. *J Biochem Mol Toxicol* 2000;**14**:238-43.
- 33 El-Demerdash FM, Yousef MI, Kedwany FS, Baghdadi HH. Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and  $\beta$ -carotene. *Food Chem Toxicol* 2004;**42**:1563-71.
- 34 Andersen HR, Andersen O. Effects of dietary  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene on lipid peroxidation induced by methyl mercuric chloride in mice. *Pharmacol Toxicol* 1993;**73**:192-201.
- 35 Zharipheh S, Boileau TW, Lila MA, Erdman JW Jr. [ $^{14}$ C]-lycopene and [ $^{14}$ C]-labeled polar products are differentially distributed in tissues of F344 rats prefed lycopene. *J Nutr* 2003;**133**:4189-95.
- 36 Wertz K, Siler U, Goralczyk R. Lycopene: modes of action to promote prostate health. *Arch Biochem Biophys* 2004;**430**:127-34.
- 37 Zhang LX, Cooney RV, Bertram JS. Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. *Carcinogenesis* 1991;**12**:2109-14.

- 38 Stahl W, Sies H. Carotenoids and protection against solar UV radiation. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2002;**15**:291-6.
- 39 Breinholt V, Lauridsen ST, Daneshvar B, Jacobsen J. Dose response effects of lycopene on selected drug-metabolizing and antioxidant enzymes in the rat. *Cancer Lett* 2000;**154**:201-10.
- 40 Moreira EAM, Fadundes RLM, Filho DW, Neves D, Sell F, Bellisle F et al. Effects of diet energy level and tomato powder consumption on antioxidant status in rats. *Clin Nutr* 2005;**24**:1038-46.

### Legends

**Fig. 1. d-Aminolevulinatase activity (ALA-D; A), thiobarbituric acid reactive substances levels (B), and creatinine levels (C) in kidneys of rats treated with lycopene (oral) followed by mercuric chloride (subcutaneous).** Data are expressed as means  $\pm$  standard error of means (n = 5-8). \*Different from the respective control group ( $P < 0.05$ ). PBG = porphobilinogen. MDA = malondialdehyde.

**Fig. 2. Antioxidant enzymes activity in kidneys of rats treated with lycopene (oral) followed by mercuric chloride (subcutaneous).** (A) Superoxide dismutase (SOD), (B) catalase (CAT) and (C) glutathione peroxidase (GSH-Px). Data are expressed as means  $\pm$  standard error of means (n = 5-7). \*Different from no-lycopene control group ( $P < 0.05$ ). #Different from no-lycopene mercury group ( $P < 0.05$ ). \*\*Different from no-lycopene control and from 50 mg/kg lycopene-control groups ( $P < 0.05$ ). &Different from all groups ( $P < 0.05$ ).

**Fig. 3. Representative histology (200x) of kidney tissue of rats treated with lycopene (oral) followed by mercuric chloride (subcutaneous) (n=6 per group).** (A) control; (B) HgCl<sub>2</sub>; (C) HgCl<sub>2</sub> + 50 mg/kg lycopene. Observe that necrotic tubular cells form bright red casts within the tubular lumen in rats treated with HgCl<sub>2</sub> (B). In rats treated with HgCl<sub>2</sub> + lycopene (C) tubules have red casts as much as in B.

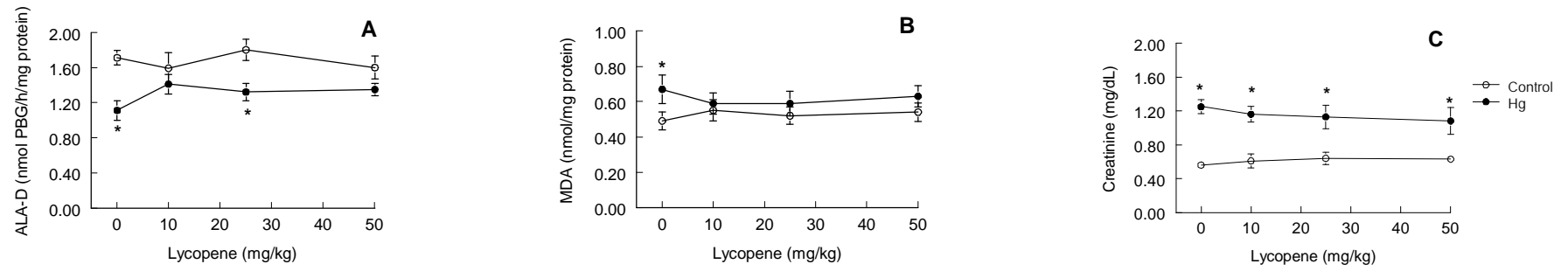


Fig. 1

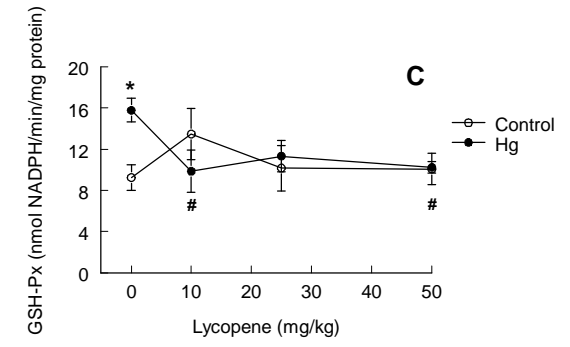
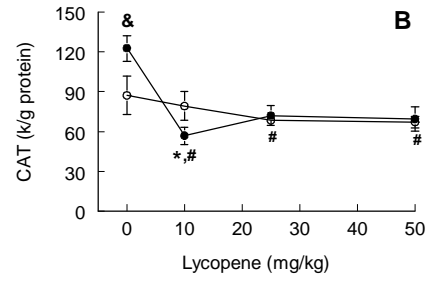
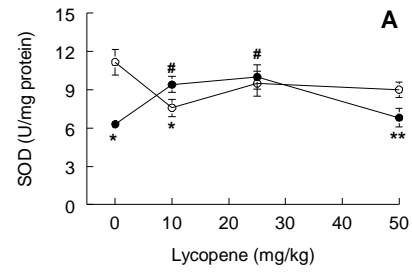
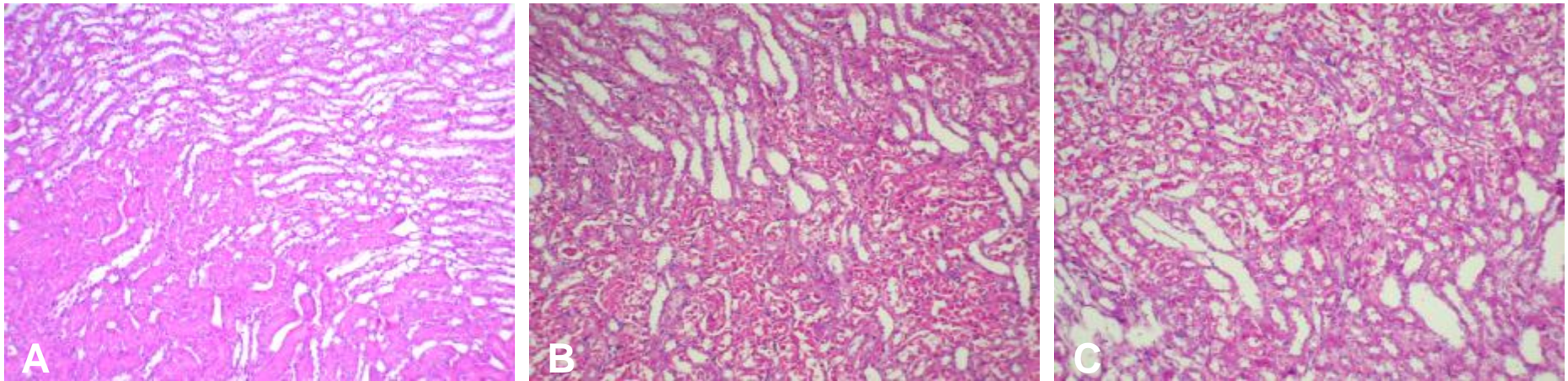


Fig. 2



**Fig. 3**

**3.2 Manuscrito 2**

**EFFECT OF ASTAXANTHIN ON KIDNEY FUNCTION CHANGES AND  
OXIDATIVE STRESS INDUCED BY MERCURIC CHLORIDE IN RATS**

Manuscrito submetido à revista *Food and Chemical Toxicology*

**Effect of astaxanthin on changes in kidney function and oxidative stress  
induced by mercuric chloride in rats**

P.R. Augusti<sup>1</sup>; G.M.M. Conterato<sup>1</sup>; S. Somacal<sup>2</sup>; R. Sobieski<sup>2</sup>; P.R. Spohr<sup>2</sup>; J.V.  
Torres<sup>2</sup>; M.P. Rocha<sup>3</sup>; T. Emanuelli<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Post-graduate Program on Toxicological Biochemistry, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil;

<sup>2</sup>Integrated Center for Laboratory Analysis Development (NIDAL), Department of Alimentary Technology and Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Pathology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

\*Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 8547; fax: +55 55 3220 8353.

E-mail address: [tatiemanuelli@smail.ufsm.br](mailto:tatiemanuelli@smail.ufsm.br) (Tatiana Emanuelli).

Running title: Astaxanthin and inorganic mercury in rats

*Keywords:* Antioxidant enzymes;  $\delta$ -Aminolevulinate dehydratase; Creatinine; Kidney tubular necrosis; Thiobarbituric acid reactive substances.



**Abstract**

Reactive oxygen species are implicated as mediators of tissue damage in acute renal failure induced by inorganic mercury. Astaxanthin (ASX), a carotenoid with potent antioxidant properties, exists naturally in various plants, algae, and seafoods. This paper evaluated the ability of ASX to prevent HgCl<sub>2</sub> nephrotoxicity. Rats were injected with HgCl<sub>2</sub> (0 or 5 mg/kg b.w., sc) 6 h after ASX had been administered (0, 10, 25, or 50 mg/kg, by gavage) and were killed twelve hours after HgCl<sub>2</sub> exposure. Although ASX prevented the increase of lipid peroxidation and attenuated histopathological changes caused by HgCl<sub>2</sub> in kidney, it did not prevent creatinine increase in plasma and δ-aminolevulinic acid dehydratase inhibition induced by HgCl<sub>2</sub>. Glutathione peroxidase and catalase activities were enhanced, while superoxide dismutase activity was depressed in HgCl<sub>2</sub>-treated rats when compared to control and these effects were prevented by ASX. Our results indicate that ASX could have a beneficial role against HgCl<sub>2</sub> toxicity by preventing lipid peroxidation, changes in the activity of antioxidant enzymes and histopathological changes.

## 1. Introduction

Although inorganic mercury has been recognized as a hazardous environmental pollutant, it is widely used in certain types of batteries and continues to be an essential component of fluorescent light bulbs (Clarkson, 1997). People can be exposed to mercury through contaminated water and food (Magos and Clarkson, 2006). Also, a mixed burden of mercury species (vapour, inorganic mercury, and methyl mercury) has been associated with human poisoning in gold mining areas (Drasch et al., 2001).

Inorganic mercury has a non-uniform distribution after absorption, being accumulated mainly in kidneys (Emanuelli et al., 1996), causing acute renal failure (Tanaka-Kagawa et al., 1998). This mercury form has great affinity for SH groups of endogenous biomolecules, such as the enzyme  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D), which may contribute to its toxicity (Clarkson, 1997). Thus, it is invariably found in cells and tissues bound to endogenous thiol-containing molecules such as glutathione, cysteine, homocysteine, metallothionein, and albumin (Zalups, 2000).

Mercury bound to SH groups may result in decreased glutathione levels, leading to an increase of reactive oxygen species, like superoxide anion radical, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical (Stohs and Bagchi, 1995), which induce lipid, protein, and DNA oxidation (Clarkson, 1997). Besides, it has been shown that in vitro  $Hg^{+2}$  both hinders the antioxidant potential of glutathione and yields reactive species via thiol complexation (Woods et al., 1990). In fact, free radical formation and subsequent lipid peroxidation was reported as a cause of cell death in mercury-induced nephrotoxicity (Girardi and Elías, 1995). Accordingly, mercury exposure has been demonstrated to induce lipid peroxidation detected by increased thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) in kidney and other tissues (Huang et al., 1996).

Thus, it is believed that antioxidants should be one of the important components of effective treatment for mercury poisoning. Indeed, HgCl<sub>2</sub>-induced injury can be ameliorated by superoxide dismutase (Girardi and Elías, 1995) and non-enzymatic antioxidants like dimethylthiourea, melatonin, and dimethylsulfoxide (Paller, 1985; Senner et al., 2003; Jo et al., 2004). Also, another antioxidant, trolox, was able to prevent changes induced by methyl mercury (Usuki et al., 2001).

Astaxanthin (ASX), a red carotenoid pigment, with no pro-vitamin A activity, is a biological antioxidant that occurs naturally in a wide variety of plants, algae, and seafoods. ASX has some pharmacological activities, including antioxidant, anti-inflammatory (Kurashige et al., 1990), immunomodulatory, anti-cancer (Chew et al., 1999), and anti-diabetic activities (Uchiyama et al., 2002). Within the cell, astaxanthin can effectively scavenge lipid radicals and destroy peroxides, thereby protecting fatty acids and biological membranes from oxidative damage (Kurashige et al., 1990). It was reported to be more effective than *b*-carotene in preventing lipid peroxidation in solution and in various biomembrane systems (Goto et al., 2001). Recent studies suggest that ASX exhibits about 100-500 times higher antioxidant activity than  $\alpha$ -tocopherol (Naguib, 2000). Studies from our laboratory showed that lycopene prevented lipid peroxidation and changes in antioxidant enzymes, but not tubular necrosis induced by mercuric chloride (Augusti et al., 2007). However, Andersen and Andersen (1993) demonstrated that  $\beta$ -carotene was not able to prevent oxidative damage caused by methylmercury in kidneys of rats. Hence, there is still some controversy about the protective potential of carotenoids against mercury toxicity, and ASX has not been previously evaluated to protect against inorganic mercury toxicity.

In the present study we investigated the possible protective effect of ASX against nephrotoxicity induced by mercuric chloride. Kidney function changes (creatinine and uric acid plasma levels and histopathological changes), oxidative stress (thiol containing biomolecules, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes) and glutathione S-transferase activity were evaluated as indicators of mercury exposure.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Animals*

This study was approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of Universidade Federal de Santa Maria (23081.008726/2006-37). 8 Weeks-old male Wistar rats from our breeding colony ( $183.2 \pm 24.7$  g) were maintained in an air-conditioned room (22-25°C) under natural lighting conditions, with free access to water and food.

### *2.2 Exposure and sample collection*

Animals received vehicle (Milli-Q water) or ASX (10, 25, or 50 mg/kg) by oral gavage (1mL/kg body weight). After 6h, they were subcutaneously injected (1 mL/kg body weight) with vehicle (120 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer, pH 7.4) or HgCl<sub>2</sub> (5 mg/kg). The mercury dose was based on the study of Perottoni et al. (2004), where an acute exposure to a similar dose of mercuric chloride increased lipid peroxidation and decreased ALA-D activity in renal tissue *in vivo*. According to Lund et al. (1993) the dose of 5 mg/kg is sufficient to elicit mild or moderate oxidative stress in kidney cells. ASX doses were based on the study of Hussein et al. (2005) and Icheuchi et al. (2006), where similar doses were effective in protecting against

oxidative damage in several animal models.  $\text{HgCl}_2$  solution was prepared in 120 mM NaCl, 10 mM phosphate buffer, pH 7.4. ASX (2% powder, Fuji Chemical Industry Co. Ltd, Toyama, Japan) was suspended in Milli-Q purified water (25°C).

Twelve hours after  $\text{HgCl}_2$  injection, rats were anaesthetized with ether for cardiac puncture. Blood samples were collected into heparinized tubes and centrifuged at 3000 x *g* for 10 minutes. Plasma was removed immediately and stored at -20°C until analyzed. Animals were killed by decapitation and left kidney was removed and homogenized in 3 volumes of 150 mM NaCl. The homogenate was centrifuged at 3000 x *g* at 4°C for 10 minutes to yield a low-speed supernatant that was used to determine delta-aminolevulinic acid dehydratase activity ( $\delta$ -ALA-D), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), non-protein thiol groups, and antioxidant enzymes activity. Right kidney was removed and used for histopathological examinations.

### 2.3. ALA-D activity

ALA-D was assayed as described by Sassa (1962). The reaction was started after the addition of sample to the incubation medium and carried out for 180 minutes at 39°C. The reaction product was determined using Ehrlich's reagent at 555 nm with a molar absorption coefficient of  $6.1 \times 10^4$  for the Ehrlich-porphobilinogen salt. Results were expressed as nmol porphobilinogen/h/mg protein.

### 2.4. Lipid peroxidation

After addition of 7.2 mM of butylated hydroxytoluene to prevent further oxidation, the supernatant was used for TBARS determination as described by Ohkawa et al. (1979). Following incubation, samples were extracted with *n*-butanol

and the reaction product was determined at 535 nm using a standard curve of 1,1,3,3-tetraethoxypropane.

### *2.5. Non-protein thiol groups*

One volume of the low-speed supernatant fraction was mixed with 1 volume of 10% trichloroacetic acid, followed by centrifugation and neutralization of the supernatant (to pH 7.5) with 1 M Tris as described by Jacques-Silva et al. (2001). Non-protein thiol groups were immediately determined as described by Ellman (1959) at 412 nm after reaction with 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid). A standard curve using cysteine was used to calculate the content of non-protein thiol groups in tissue samples.

### *2.6. Glutathione S-transferase*

Glutathione S-transferase activity was determined by measuring the increase in absorbance at 340 nm using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene as the substrate, according Habig and Jakoby (1981).

### *2.7. Plasma creatinine and uric acid levels*

Plasma creatinine and uric acid levels were determined using routine laboratory kits (Dole's reagents, Goiânia, GO, Brazil).

### *2.8. Antioxidant enzymes*

Superoxide dismutase (SOD) activity was determined spectrophotometrically based on its ability to inhibit the autooxidation of adrenalin to adrenochrome at alkaline pH, according by Misra and Fridovich (1972). SOD activity was expressed as

the amount of enzyme that inhibits the oxidation of epinephrine by 50%, which is equal to 1 unit.

Catalase (CAT) activity was measured spectrophotometrically, as described by Aebi (1984) using hydrogen peroxide as substrate. The pseudo-first order reaction constant ( $k$ ) of the decrease in  $H_2O_2$  absorption/s at  $25^\circ C$  was determined and enzyme specific activity was expressed as  $k/g$  protein.

Glutathione peroxidase (GSH-Px) activity was determined using glutathione reductase and NADPH. The method is based on the oxidation of NADPH at  $25^\circ C$ , which is indicated by the decrease in absorbance at 340 nm, according to Paglia and Valentine (1967).

### *2.9. Protein quantification*

Protein was measured according to Lowry (1951) using bovine serum albumin as the standard.

### *2.10. Histopathological examinations.*

For histopathology, 10% formalin-fixed kidney was dehydrated in an ascending graded series of ethanol, cleared in xylene and embedded in paraffin. Sections of 5  $\mu m$  were obtained with a standard microtome and were stained with hematoxylin and eosin. The sections were examined and graded by a pathologist without knowledge of the experimental groups, according to a predetermined scoring system (Rumbeiha et al., 2000). Normal kidneys were given a score of 0. Kidneys with mild tubular necrosis were given a score of +1. Those with moderate tubular necrosis were given a score of +2. Kidneys with severe tubular necrosis were given a score of +3. Results were expressed as a tubular necrosis score.

### 2.11. Statistical analysis

Data were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) (2 HgCl<sub>2</sub> doses x 4 ASX doses) followed by *post hoc* Duncan's multiple range test when necessary. Results were expressed as the mean  $\pm$  SEM and differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

## 2. Results

Two-way analysis of variance (2 HgCl<sub>2</sub> doses x 4 ASX doses) revealed a significant main effect of HgCl<sub>2</sub> on renal  $\delta$ -ALA-D and TBARS levels, indicating that mercury inhibited the activity of this sulfhydryl-containing enzyme ( $p < 0.05$ , Fig. 1A) and increased lipid peroxidation ( $p < 0.05$ ; Fig. 1B). Although inhibition of  $\delta$ -ALA-D activity has not been prevented by ASX, it prevented the increase of TBARS levels caused by HgCl<sub>2</sub> at all evaluated doses. HgCl<sub>2</sub> increased plasma creatinine levels ( $p < 0.05$ ; Fig. 1C). However, pre-treatment with ASX did not prevent this effect (Fig. 1C). Neither HgCl<sub>2</sub> nor ASX treatment changed the content of non-protein thiol groups, glutathione S-transferase activity in kidney or uric acid levels in plasma (data not shown).

**<Insert figure 1 here>**

ANOVA revealed significant HgCl<sub>2</sub> x ASX interaction on antioxidant enzymes activity. Post-hoc comparisons demonstrated that SOD activity decreased in kidney tissue of the animals treated with HgCl<sub>2</sub> when compared to no-ASX control group ( $p < 0.05$ ; Fig. 2A) and this effect was prevented by all ASX doses. Post-hoc comparisons also demonstrated that GSH-Px and CAT activities increased ( $p < 0.05$ ) in renal tissue of the animals treated with HgCl<sub>2</sub>, when compared to control group (Fig. 2B and C). ASX prevented HgCl<sub>2</sub> effect on these antioxidant enzymes at all evaluated



doses ( $p < 0.05$ ). Besides, ASX had no effect *per se* on any of the evaluated parameters

**<Insert figure 2 here>**

Histological changes in kidney are presented in Fig. 3. ANOVA revealed a significant main effect of  $\text{HgCl}_2$  treatment on renal tubular damage, indicating that tubular necrosis was observed 12 hours after  $\text{HgCl}_2$  exposure ( $p < 0.05$ ). Treatment with 50 mg/kg ASX partially prevented such damage. ASX alone did not cause histological changes in kidney (data not shown).

**<Insert figure 3 here>**

#### **4. Discussion**

Here, we evaluated the effects of pretreatment with ASX against  $\text{HgCl}_2$  nephrotoxicity. Our results revealed that pretreatment with ASX (6 hours before) prevented  $\text{HgCl}_2$ -induced lipid peroxidation, suggesting that  $\text{HgCl}_2$ -generated reactive species are scavenged by astaxanthin. Moreover, 50 mg/kg of ASX partially prevented renal tubular necrosis caused by  $\text{HgCl}_2$ . However, ASX treatment did not prevent the increase in creatinine levels induced by this metal. We previously demonstrated that lycopene (10 and 50 mg/kg) prevented  $\delta$ -ALA-D inhibition by  $\text{HgCl}_2$  (Augusti et al., 2007). In contrast, in the present study we observed that ASX did not prevent  $\delta$ -ALA-D inhibition by  $\text{HgCl}_2$ .

$\text{HgCl}_2$  exposure increased the activities of CAT and GSH-Px in kidney probably as a defense response against free radicals. This proposal is supported by the  $\text{HgCl}_2$ -induced increase of TBARS, which additionally indicates that free radicals generated by  $\text{HgCl}_2$  exceeded endogenous antioxidant activity and induced renal oxidative damage. Interestingly, we found depressed SOD activity in animals treated

with  $\text{HgCl}_2$ , which could contribute to the enhanced lipid peroxidation in these animals. SOD catalyzes superoxide anion radical dismutation to hydrogen peroxide, and lipid peroxidation induced by  $\text{HgCl}_2$  seems to be related to increase in superoxide anion radical production (Girardi and Elías, 1995). All ASX doses prevented  $\text{HgCl}_2$ -induced changes in antioxidant enzymes. This contrasts with the absence of  $\beta$ -carotene protective effect against methylmercury toxicity (Andersen and Andersen, 1993). Also, we recently observed that just some doses of the carotenoid lycopene protected against  $\text{HgCl}_2$ -induced changes in antioxidant enzymes activity (Augusti et al., 2007). Moreover, a low lycopene dose (10 mg/kg) had an inhibitory effect *per se* on SOD activity (Augusti et al., 2007), which was not observed with ASX. These findings indicate that different carotenoids may have different mechanisms of action and effects. In fact, this is the first report about ASX effects against metal toxicity.

Some reports have described the protective effect of ASX against hydroxyl radicals and singlet oxygen-induced oxidative damage (Berstein et al., 2001; Wu et al., 2006). Additionally, it has been demonstrated that ASX biosynthesis is stimulated by  $\text{H}_2\text{O}_2$ , singlet oxygen and superoxide radical in yeast, probably as an antioxidant response (Schroeder and Johnson, 1993; Schroeder and Johnson, 1995; Liu and Wu, 2006). Previous reports demonstrated that ASX protects against ethanol and naproxen-induced gastric lesions by its ability to restore the activities of SOD, GSH-Px and CAT (Kim et al., 2005a; Kim et al., 2005b). Accordingly, here we demonstrated that ASX was effective in restoring SOD activity inhibited by  $\text{HgCl}_2$ . Additionally, ASX reduced the oxidative stress in kidneys and prevented renal cell damage caused by diabetes in mice (Naito et al., 2004). Accordingly, 50 mg/kg of

ASX partially prevented histopathological changes caused by HgCl<sub>2</sub>, besides the protective effect against HgCl<sub>2</sub>-induced changes in antioxidant enzymes activities.

ASX has been demonstrated to protect *in vitro* against oxidation of lipids at the surface and inside phospholipid membrane (Goto et al., 2001). Accordingly, here we observed that this carotenoid prevented lipid peroxidation caused by HgCl<sub>2</sub>. This effectiveness can be explained by location of ASX inside in membranes, where polar ring of astaxanthin would scavenge reactive oxygen species near the membrane surface, while the polyene chain would inhibit the radical chain reaction into the membrane (Goto et al., 2001).

Although ASX is mainly recognized by its reactive oxygen scavenging effect, there is some evidence that its cyclohexene ring may be a site for binding of divalent ions (Wu et al., 2006). Besides, it has been suggested that the four oxygen atoms in each ASX ring can coordinate with metal ions such as Cu (II) and Fe (III) (Zhao et al., 2005). Therefore, we can not rule out that Hg<sup>2+</sup> binding could underlie some of the protective effects of ASX against HgCl<sub>2</sub>.

In conclusion, we demonstrated that, although ASX did not prevent HgCl<sub>2</sub>-induced creatinine increase in plasma and δ-ALA-D inhibition, protection against oxidative damage, changes in the activity of antioxidant enzymes and histopathological damage caused by HgCl<sub>2</sub> might be achieved by the use of ASX. We suggest that use of ASX may offer a beneficial strategy against HgCl<sub>2</sub> toxicity.

### **Acknowledgements**

We would like to thank Fuji Chemical Industry Co., Ltd., Toyama for kindly donation of the astaxanthin product. This work was supported by CNPq (grant 470582/2004-9 to T. Emanuelli). T. Emanuelli is the recipient of CNPq research

Fellowship (proc. 304257/2004-4). S. Somacal and R. Sobieski are the recipients of PIBIC/CNPq-UFSM fellowship. P. Spohr is the recipient of CNPq Scientific Initiation fellowship. P.R. Augusti and G.M.M. Conterato are the recipients of CAPES Master degree fellowships.

### References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Method. Enzymol.* 105,121-126.
- Andersen, H.R. and Andersen, O., 1993. Effects of dietary  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene on lipid peroxidation induced by methyl mercuric chloride in mice. *Pharmacol. Toxicol.* 73,192-201.
- Augusti, P.R., Conterato, G.M.M., Somacal, S., Einsfeld, L., Ramos, A.T., Hosomi, F.Y.M., Graça, D.L., Emanuelli, T., 2007. Effect of lycopene on nephrotoxicity induced by mercuric chloride in rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* *In press.*
- Bernstein, P.S., Khachik, F., Carvalho, L.S., Muir, G.J., Zhao, D.Y., Katz, N.B., 2001. Identification and quantification of carotenoids and their metabolites in the tissues of the human eye. *Exp. Eye Res.* 72, 215-223.
- Chew, B.P., Park, J.S., Wong, M.W., Wong, T.S., 1999. A comparison of the anticancer activities of dietary beta-carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice in vivo. *Anticancer Res.* 19, 1849-1853.
- Clarkson, T.W., 1997. The toxicology of mercury. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 34, 369-403.
- Drasch, G., Bose, O', Reilly, S., Beinhoff, C., Roider, G., Maydl, S., 2001. The Mt. Diwata study on the Philippines 1999 – assessing mercury intoxication of the population by small scale gold mining. *Sci. Total Environ.* 267, 151-158.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77.

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

Girardi, G. and Elías, M.M., 1995. Mercuric chloride effects on rat renal redox enzymes activities: SOD protection. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 61-66.

Goodwin, T.W., 1986. Metabolism, Nutrition, and Function of Carotenoids. *Annu. Rev. Nutr.* 6, 273-297.

Goto, S., Kogure, K., Abe, K., Kimata, Y., Kitahama, K., Yamashita, E., Terada, H., 2001. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta* 1512, 251-258.

Habig, W. and Jakoby, W.B., 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Method. Enzymol.* 77, 398-405.

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

Hussein, G., Nakamura, M., Zhao, Q., Iguchi, T., Goto, H., Sankawa, U., Watanabe, H., 2005. Antihypertensive and neuroprotective effects of astaxanthin in experimental animals. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 47-52.

Ikeuchi, M., Koyama, T., Takahashi, J., Yazawa, K., 2006. Effects of astaxanthin supplementation on exercise-induced fatigue in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 2106-2110.

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

- Jo, S., Hu, X., Youen, P.S.T., Aslamkan, A.G., Pritchard, J.B., Dear, J.W., Star, R.T., 2004. Delayed DMSO administration protects the kidney from mercuric chloride-induced injury. *Lat. Am. Soc. Nephrol.* 15, 2648-2654.
- Kim, J., Choi, S.K., Choi, S.Y., Kim, H., Chang, H., 2005a. Suppressive effect of astaxanthin isolated from the *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant on ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 1300-1305.
- Kim, J., Kim, Y., Song, G., Park, J., Chang, H., 2005b. Protective effect of astaxanthin on naproxen-induced gastric antral ulcerations in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 514, 53-59.
- Kurashige, M., Okimasu, E., Inoue, M., Utsumi, K., 1990. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* 22, 27-38.
- Liu, W.S., Wu, J.Y., 2006. Hydrogen peroxide-induced astaxanthin biosynthesis and catalase activity in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl. Microbiol. Cell. Phys.* 73, 663-668.
- Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.F., 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 93, 265-275.
- Lund, B.O., Miller, D.M., Woods, J.S., 1993. Studies on Hg (II)-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation and oxidative stress *in vivo* and *in vitro* in rat kidney mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 45, 2017-2024.
- Magos, L. and Clarkson, T.W., 2006. Overview of the clinical toxicity of mercury. *Ann. Clin. Biochem.* 43, 257-268.
- Misra H.P. and Fridovich I., 1972. The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide-dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170-3175.

- Naguib, Y. M. A., 2000. Antioxidant activity of astaxanthin and related carotenoids. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1150-1154.
- Naito, Y., Uchiyama, K., Aoi, W., Hasegawa, G., Nakamura, N., Yoshida, N., Maoka, T., Takahashi, J., Yoshikawa, T., 2004. Prevention of diabetic nephropathy by treatment with astaxanthin in diabetic db/db mice. *Biofactors* 20, 49-59.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipide peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351-358.
- Paglia, D.E. and Valentine, W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70, 158-69.
- Paller, M.S., 1985. Free radical scavengers in mercuric chloride-induced acute renal failure in the rat. *J. Lab. Clin. Med.* 105, 459-463.
- Perottoni, J., Rodrigues, O.E.D., Paixão, M.W., Zeni, G., Lobato, L.P., Braga AL, Rocha, J.B.T., Emanuelli, T., 2004. Renal and hepatic ALA-D activity and selected oxidative stress parameters of rats exposed to inorganic mercury and organoselenium compounds. *Food Chem. Toxicol.* 42, 17-28.
- Rajasingh, H., Oyehaug, L., Vage, D.I., Omholt, S.W., 2006. Carotenoid dynamics in Atlantic salmon. *BMC Biol.* 4, 1-15.
- Rumbeiha, W.K., Fitzgerald, S.D., Braselton, W.E., Roth, R.A., Pestka, J.J., Kaneene, J.B., 2000. Augmentation of mercury-induced nephrotoxicity by endotoxin in the mouse. *Toxicology* 151, 103-116.
- Schroeder, W.A. and Johnson, E.A., 1993. Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* 139, 907–912.
- Schroeder, W.A. and Johnson, E.A., 1995. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *J. Biol. Chem.* 270, 18374–18379.

- Sassa S., 1982. Delta aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 28, 133-145.
- Sener, G., Sehidi, A.O., Ayanoglu-Dulger, G., 2003. Melatonin protects against mercury (II)-induced oxidative tissue damage in rats. *Pharmacol. Toxicol.* 93, 290-296.
- Stohs, S.J. and Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal-ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 321-336.
- Tanaka-Kagawa, T., Suzuki, M., Naganuma, A., Yamanaka, N., Imura, N., 1998. Strain difference in sensitivity of mice to renal toxicity of inorganic mercury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285, 335-341.
- Uchiyama, K., Naito, Y., Hasegawa, G., Nakamura, N., Takahashi, J., Yoshikawa, T., 2002. Astaxanthin protects beta-cells against glucose toxicity in diabetic db/db mice. *Redox Rep.* 7, 290-293.
- Usuki, F., Yasutake, A., Umehara, F., Tokunaga, H., Matsumoto, M., Eto K., Ishiura, S., Higuchi, I., 2001. In vivo protection of a water-soluble derivative of vitamin E, trolox, against methylmercury-intoxication in the rat. *Neurosci. Lett.* 304, 199-203.
- Woods, J.S., Calas, C.A., Aicher, L.D., 1990. Stimulation of porphyrinogen oxidation by mercuric ion. II. Promotion of oxidation from the interaction of mercuric ion, glutathione and mitochondria-generated hydrogen peroxide. *Mol. Pharmacol.* 38, 261-266.
- Wu, T., Liao, J., Hou, W., Huang, F., Maher, T.J., Hu, C., 2006. Astaxanthin protects against oxidative stress and calcium-induced porcine lens protein degradation. *J Agr. Food Chem.* 54, 2418-2423.
- Zalups, R.K., 2000. Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol. Rev.* 52, 113-143.



Zhao, L., Chen, F., Zhao, G., Wang, Z., Liao, X., Hu, X., 2005. Isomerization of trans-astaxanthin induced by copper (II) ion in ethanol. *J. Agr. Food Chem.* 53, 9620-9623.

**Footnote to page 1**

Abbreviations:  $\delta$ -ALA-D,  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase; ANOVA, analysis of variance; ASX, astaxanthin; b.w., body weight; CAT, catalase; GSH, glutathione; GSH-Px, glutathione peroxidase;  $\text{Hg}^{+2}$ , inorganic mercury;  $\text{HgCl}_2$ , mercuric chloride; sc, subcutaneous; SEM, standard error of mean; SH, sulfhydryl; SOD, superoxide dismutase; TBARS, thiobarbituric acid-reactive substances.

### Legends

Fig. 1.  $\delta$ -Aminolevulinatase activity (ALA-D; A), thiobarbituric acid reactive substances levels (B), and creatinine levels (C) of rats treated with ASX (oral) followed by HgCl<sub>2</sub> (sc). Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 5-8). \*Different from control group ( $p < 0.05$ ). #Different from all groups ( $p < 0.05$ ). PBG = porphobilinogen. MDA = malondialdehyde.

Fig. 2. Antioxidant enzymes activity of rats treated with ASX (oral) followed by HgCl<sub>2</sub> (sc). (A) SOD, (B) GSH-Px, (C) CAT. Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n = 5-7). &Different from all other groups ( $p < 0.05$ ). \*Different from no-astaxanthin control group. #Different from no-astaxanthin mercury group ( $p < 0.05$ ).

Fig. 3. Representative histology and tubular damage score of kidney tissue of rats treated with ASX (oral) followed by HgCl<sub>2</sub> (s.c.) (n=5 per group). (A) control; (B) HgCl<sub>2</sub>; (C) HgCl<sub>2</sub> + 50 mg/kg ASX; (D) Tubular damage score. Tissues were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, sectioned at 5  $\mu$ m and stained with hematoxylin and eosin. Magnification was 400x. Score 0 indicate no tubular necrosis and score +3 indicate severe tubular necrosis. \*Different from control groups ( $p < 0.05$ ). #Different from no-astaxanthin mercury group ( $p < 0.05$ ). Observe tubules with preserved architecture and regular epithelial cells (A). In rats treated with HgCl<sub>2</sub>, there is loss of architecture, necrotic tubules with picnotic nucleus and dense and eosinophilic cytoplasm (B). In rats treated with HgCl<sub>2</sub> + ASX (C) there are identical features, although just in focal areas.

Fig. 1

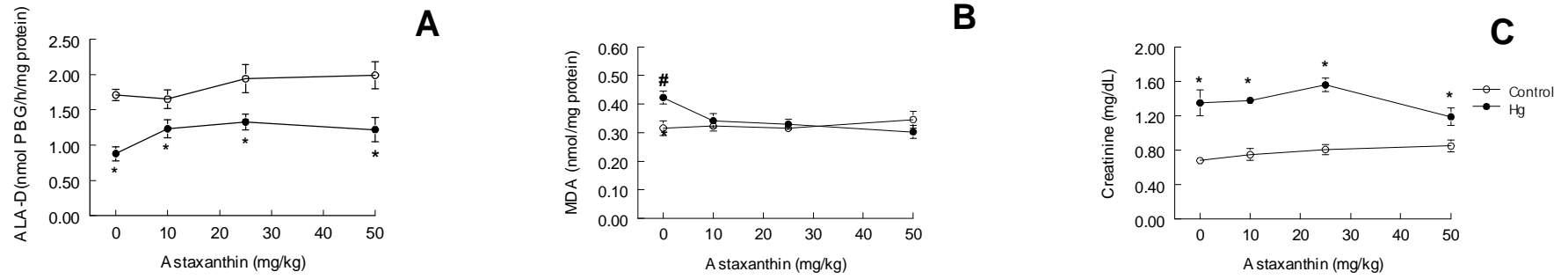


Fig. 2

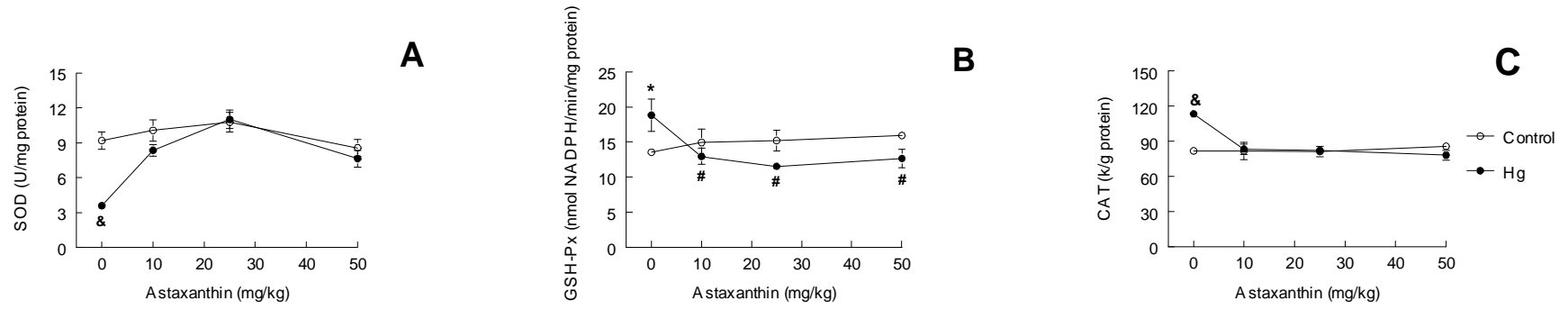
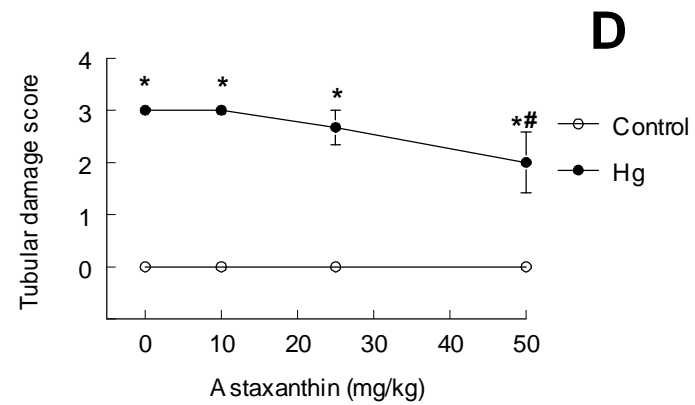
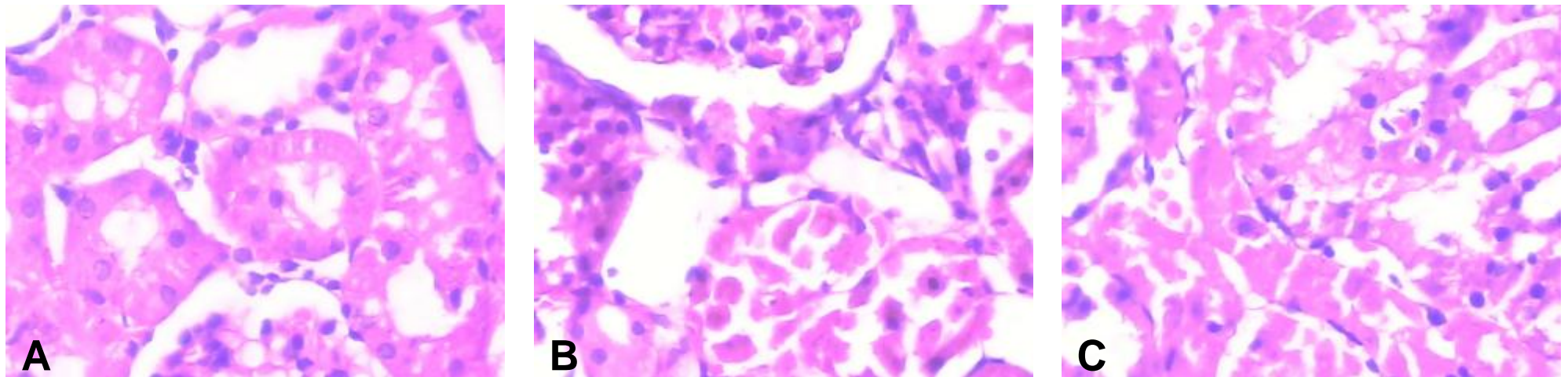


Fig. 3



## 4 DISCUSSÃO

Mercúrio (Hg) é conhecido como um perigoso poluente ambiental e a toxicidade dos compostos de mercúrio se deve, principalmente, à afinidade por grupos tiólicos de biomoléculas endógenas (Clarkson, 1997). Dessa maneira, o Hg é encontrado nas células e tecidos ligado a proteínas contendo grupos tióis ou a tióis de baixo peso molecular como cisteína e glutathiona (GSH) (Zalups, 2000). Adicionalmente, o mercúrio pode aumentar a produção de radicais livres, induzindo oxidação de lipídios, proteínas e DNA (Lund *et al.*, 1993).

Todas as formas de mercúrio são tóxicas, porém o mercúrio inorgânico afeta primeiramente os rins, devido à alta afinidade entre mercúrio e enxofre, o que leva a ligação desse metal a grupos tiólicos de proteínas, peptídeos e aminoácidos, sendo observado necrose do epitélio renal, acompanhada de proteinúria e glomerulonefrite (Goyer, 1996). Além disso, muitos estudos sugerem que a produção de radicais livres e o estresse oxidativo também estão envolvidos na injúria celular renal induzida pelo mercúrio (Stohs & Bagchi, 1995; Zalups, 2000).

Os resultados do presente estudo mostraram que, 12 horas após uma exposição aguda ao  $\text{HgCl}_2$ , a enzima  $\delta$ -ALA-D foi inibida, o que está de acordo com trabalhos anteriores (Emanuelli *et al.* 1996; Farina *et al.* 2003; Perottoni *et al.* 2004). Esse efeito é provavelmente devido à alta afinidade entre o Hg e moléculas endógenas contendo tióis, como a  $\delta$ -ALA-D (Clarkson 1997; Nogueira *et al.* 2003). Essa enzima catalisa a condensação de duas moléculas de ácido 5-aminolevulínico (ALA), formando o porfobilinogênio, um precursor do grupo heme (Gibson *et al.*, 1955). Conseqüentemente, a inibição da  $\delta$ -ALA-D pode prejudicar a biossíntese do heme e provocar o acúmulo de ALA, que por sua vez possui efeitos prooxidantes (Bechara *et al.*, 1993). Em contraste com outros autores (Stohs & Bagchi, 1995), o conteúdo de NPSH não foi alterado após exposição ao  $\text{HgCl}_2$ , como já relatado por Perottoni *et al.* (2004). Essa discrepância pode estar relacionada à dose de mercúrio administrada, uma vez que tem sido demonstrado que doses baixas ou não tóxicas aumentam o conteúdo renal do tiol não-protéico GSH. Doses altas, no entanto, diminuem o conteúdo de GSH nos rins (Zalups, 2000). De acordo com Perottoni *et*

*al.* (2004), após 12 horas de uma exposição a 5 mg/kg de HgCl<sub>2</sub>, observou-se diminuição de NPSH no fígado, mas não nos rins.

A GST é uma enzima envolvida na detoxificação de agentes tóxicos, incluindo metais pesados, via complexação com a glutatona. Um aumento na atividade e expressão desta enzima no tecido renal tem sido observado após exposição ao chumbo (Daggett *et al.*, 1998). Estes autores sugeriram que o comportamento desta enzima é independente do estresse oxidativo, uma vez que eles observaram aumento na atividade e expressão da enzima mesmo na ausência de depleção de GSH e de peroxidação lipídica. Embora McGuire *et al.* (1997) tenham relatado um aumento na expressão da enzima GST no tecido renal após exposição ao HgCl<sub>2</sub>, no presente trabalho a atividade da enzima não foi alterada após 12 horas da exposição ao HgCl<sub>2</sub>.

Os resultados deste trabalho também revelaram um aumento nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e na atividade da enzima glutatona peroxidase (GSH-Px) 12 horas após exposição ao HgCl<sub>2</sub>. Essa enzima é responsável pela detoxificação de peróxidos e pela conversão de hidroperóxidos lipídicos até álcoois não tóxicos. Entretanto, os resultados revelaram que, o aumento na atividade da enzima GSH-Px não foi capaz de prevenir a peroxidação lipídica induzida pelo HgCl<sub>2</sub>.

O HgCl<sub>2</sub> também causou um aumento na atividade da enzima catalase (CAT), como já observado por Addya *et al.* (1984) após exposição crônica ao HgCl<sub>2</sub>. Entretanto, uma diminuição na atividade da CAT foi observada em células epiteliais renais após exposição ao HgCl<sub>2</sub> *in vitro*. Essa discrepância pode ser devido às diferenças entre um sistema de células isoladas *in vitro* e o órgão inteiro *in vivo*. Por outro lado, Girard & Elias (1995) não encontraram nenhuma alteração na atividade da CAT renal 1 hora após a exposição a 5 mg/kg de HgCl<sub>2</sub>, embora aumento na peroxidação lipídica e dano renal tenham sido encontrados. Esses autores sugerem que alterações nas atividades das enzimas antioxidantes CAT e GSH-Px não são responsáveis pela peroxidação lipídica e pelo dano renal induzido por HgCl<sub>2</sub>. Os resultados deste trabalho confirmam essa hipótese, uma vez que peroxidação lipídica e dano renal foram observados mesmo com um aumento nas atividades da GSH-Px e CAT.

O aumento nas atividades das enzimas antioxidantes ocorreu provavelmente como um mecanismo de defesa contra os radicais livres produzidos pelo HgCl<sub>2</sub>.



Essa hipótese é sustentada pelo aumento nos níveis de TBARS, que indica que os radicais livres produzidos pelo Hg excederam a capacidade antioxidante endógena e induziram dano oxidativo nos rins. Mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos tratados *in vivo* com HgCl<sub>2</sub> apresentaram aumento na produção de peróxido de hidrogênio, depleção de glutathiona e aumento na peroxidação lipídica (Lund *et al.*, 1993). Além disso, a administração de superóxido dismutase (SOD) preveniu a peroxidação lipídica e o dano renal induzido pelo HgCl<sub>2</sub> *in vivo* (Girardi & Elías 1995). Esses resultados sustentam a hipótese de que o estresse oxidativo, especialmente na mitocôndria, é um importante mecanismo envolvido na injúria tubular renal induzida pelo HgCl<sub>2</sub> (Zalups, 2000). De acordo com esses resultados, o aumento na peroxidação lipídica encontrado neste trabalho foi acompanhado pelo aumento nos níveis plasmáticos de creatinina, indicando um decréscimo na filtração glomerular. O dano aos rins foi confirmado pela análise histopatológica, que revelou necrose tubular severa. Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos (Girardi & Elías 1995; Tanaka-Kagawa *et al.* 1998). Embora metais pesados nefrotóxicos, como o chumbo, promovam o aumento dos níveis plasmáticos de ácido úrico como resultado do dano tubular (ATSDR, 2000), no presente trabalho a exposição aguda ao HgCl<sub>2</sub> não alterou os níveis de ácido úrico no plasma. Isso pode ser explicado pelas variações fisiológicas no conteúdo de ácido úrico, dependente do metabolismo de proteínas (Choi *et al.*, 2005).

Os resultados deste trabalho demonstraram que a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) diminuiu nos animais tratados com HgCl<sub>2</sub>, o que contribuiria para o aumento da peroxidação lipídica nesses animais. A SOD catalisa a dismutação do radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) até peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e a peroxidação lipídica induzida pelo HgCl<sub>2</sub> parece estar relacionada ao aumento na produção do radical superóxido (Girardi & Elías 1995). Shimojo *et al.* (2002) demonstraram que o HgCl<sub>2</sub> diminuiu a atividade da Mn-SOD em camundongos. Essa inibição foi atribuída à ligação covalente do mercúrio ao resíduo de cisteína 196 reativo da enzima. Estudos sugerem que a diminuição na atividade da Cu,Zn-SOD em ratos expostos ao cádmio estaria ligada com o decréscimo da disponibilidade de Cu e Zn como resultado da imobilização destes minerais na forma ligada a metalotioneína, uma proteína envolvida na detoxificação do cádmio (Brzoska *et al.*, 2002). De maneira semelhante ao cádmio, a exposição ao HgCl<sub>2</sub> também induz a síntese de metalotioneínas nos rins (Tanaka-Kagawa *et al.*, 1998). Assim, a ligação

do Cu e Zn as metalotioneínas poderia ser responsável pela diminuição da atividade da SOD induzida por Hg. De forma alternativa, a inibição da atividade da SOD pode ser consequência de um excesso de espécies reativas de oxigênio, que afetaria a estrutura da enzima (Salo *et al.*, 1988).

Alguns antioxidantes, como melatonina e trolox, são capazes de prevenir dano oxidativo e toxicidade induzida por mercúrio (Usuki *et al.*, 2001; Sener *et al.*, 2003). Além disso, Sharma *et al.* (2005) sugerem que o pré e pós-tratamento com extrato de *Ocimum sanctum*, uma planta com poder antioxidante, podem proteger contra os danos renais induzidos pelo HgCl<sub>2</sub>. Adicionalmente, trabalhos anteriores mostraram o efeito protetor de carotenóides contra danos oxidativos induzidos por metais (El-Missiry & Shalaby 2000; El-Demerdash *et al.*, 2004; Atessahin *et al.*, 2005; Matos *et al.*, 2006). De acordo com Sarafian & Verity (1991), o  $\alpha$ -tocoferol protegeu células cerebelares da peroxidação lipídica induzida por metil mercúrio (MeHg), mas não protegeu contra a perda da viabilidade celular induzida por esse composto. Andersen & Andersen (1993) também relataram o efeito protetor de níveis elevados de vitamina E na dieta contra peroxidação lipídica induzida pelo MeHg no fígado. Além disso, decréscimo dessa vitamina na dieta aumentou a peroxidação lipídica causada pelo MeHg nesse tecido. Entretanto, concentrações de  $\beta$ -caroteno compatíveis com as encontradas na dieta não preveniram o aumento da atividade da GSH-Px e peroxidação lipídica induzida MeHg nos rins, enquanto um excesso de  $\beta$ -caroteno aumentou a peroxidação lipídica (Andersen & Andersen, 1993).

No presente estudo, avaliou-se os efeitos do pré-tratamento com licopeno e astaxantina contra a nefrotoxicidade causada pelo HgCl<sub>2</sub>. Embora o rim não seja o órgão preferencial para o acúmulo de licopeno e astaxantina, esse órgão parece desempenhar importante papel no metabolismo destes carotenóides (Zharipheh *et al.*, 2003; Page & Davies, 2006).

Os resultados deste trabalho revelaram que o pré-tratamento com licopeno e astaxantina preveniu a peroxidação lipídica induzida por mercúrio, mas não o aumento nos níveis plasmáticos de creatinina causado por este metal. Muitos autores sugerem que a prevenção da peroxidação lipídica é responsável pelo efeito protetor conferido por licopeno e astaxantina contra danos teciduais induzidos por muitos compostos (Kang *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005a; Kim *et al.*, 2005b;

Atessahin *et al.* 2005; Karahan *et al.* 2005; Yilmaz *et al.* 2006). Embora o licopeno não tenha prevenido a necrose tubular, a astaxantina protegeu parcialmente o tecido renal dos danos causados pelo HgCl<sub>2</sub>.

Este é o primeiro estudo avaliando o efeito protetor do licopeno e astaxantina sobre a inibição da enzima sulfidrilica  $\delta$ -ALA-D por metais. Já foi demonstrado que o licopeno previne a redução dos níveis de GSH causada por cisplatina (Atessahin *et al.*, 2005). Dessa forma, um efeito protetor seria esperado também sobre outros tióis endógenos. Neste sentido, observou-se no presente estudo que o licopeno protegeu a  $\delta$ -ALA-D da inibição causada por HgCl<sub>2</sub>. No entanto, a ASX não apresentou efeitos protetores sobre a  $\delta$ -ALA-D, sugerindo que diferentes carotenóides possuem diferentes mecanismos de ação.

O licopeno e a astaxantina preveniram as alterações nas enzimas antioxidantes induzidas por HgCl<sub>2</sub>, em contraste com a ausência de proteção do  $\beta$ -caroteno contra alteração na atividade da GSH-Px causada por MeHg (Andersen & Andersen, 1993). As três doses de licopeno avaliadas preveniram o efeito do HgCl<sub>2</sub> sobre a enzima antioxidante CAT. Entretanto, os animais pré-tratados com 10 mg/kg de licopeno e expostos ao HgCl<sub>2</sub> apresentaram atividade da CAT menor que os animais do grupo controle sem pré-tratamento com licopeno. Embora o licopeno também tenha prevenido a redução da atividade da SOD e GSH-Px, esse efeito foi observado apenas nas doses de 10 e 25 mg/Kg e 10 e 50 mg/Kg, respectivamente. Esses resultados podem estar relacionados ao efeito do licopeno sozinho sobre as enzimas antioxidantes descrito por Breinholt *et al.* (2000), que observou que o licopeno, em doses baixas, aumentou a atividade das enzimas antioxidantes, enquanto em doses mais altas, as atividades foram reduzidas aos níveis controle. A ação antioxidante do licopeno poderia alterar a homeostase entre oxidantes/antioxidantes no organismo, uma vez que a atividade da CAT foi aumentada e a atividade da SOD foi diminuída pelo licopeno, mesmo na ausência de um tratamento prooxidante (Moreira *et al.*, 2005). Além de não apresentar efeito *per se* sobre nenhum dos parâmetros avaliados neste trabalho, a ASX protegeu as enzimas antioxidantes das alterações causadas pelo HgCl<sub>2</sub> em todas as doses estudadas.

Os efeitos protetores do licopeno têm sido associados a sua atividade antioxidante frente a espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Mortensen *et al.*

1997; Musandu *et al.*; 2006). Por outro lado, Wu *et al.* (2006) sugerem que além da atividade antioxidante, ASX pode ligar íons divalentes, como cálcio e outros. Em acordo com essa hipótese, Zhao *et al.* (2005) sugerem que os átomos de oxigênio em cada anel da ASX podem coordenar íons metálicos como Cu (II) e Fe (III). Estes mecanismos, em conjunto, explicariam o efeito protetor desses carotenóides frente aos danos causados por  $Hg^{+2}$  observado nesse estudo.

Os resultados deste trabalho indicam que, embora o licopeno tenha prevenido a inibição da enzima  $\delta$ -ALA-D, esse carotenóide não foi capaz de prevenir as alterações histopatológicas causadas pelo  $HgCl_2$ . Além disso, ele apresentou efeito *per se* sobre a atividade das enzimas antioxidantes. Por outro lado, todas as doses estudadas de ASX restauraram as enzimas antioxidantes e impediram a peroxidação lipídica causada por  $HgCl_2$ , sem causar nenhum efeito *per se* sobre a atividade das enzimas antioxidantes. Além disso, a ASX preveniu parcialmente as alterações histopatológicas causadas pelo  $HgCl_2$ . Entretanto, esse carotenóide não protegeu a enzima  $\delta$ -ALA-D da inibição causada pelo  $HgCl_2$ . Esse resultado contrasta com trabalhos que apontam o licopeno como o principal antioxidante da classe dos carotenóides (Stahl & Sies 2003). Essa discrepância está relacionada, provavelmente, a ausência de anéis polares na estrutura do licopeno, o que limitaria sua atividade antioxidante ao interior da membrana, uma vez que a estrutura é totalmente hidrofóbica. Adicionalmente, carotenóides apolares, tais como o licopeno e o  $\beta$ -caroteno, têm sido apontados como sendo capazes de aumentar a permeabilidade da bicamada lipídica da membrana, permitindo a entrada de oxidantes polares. Desse modo, esses carotenóides poderiam agir como prooxidantes, mascarando sua atividade antioxidante (Britton, 1995).

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho indicam que:

→ A exposição aguda ao  $\text{HgCl}_2$  provocou inibição da atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D renal e esse efeito foi parcialmente prevenido por licopeno (10 e 50 mg/Kg), mas não por astaxantina;

→ A exposição aguda ao  $\text{HgCl}_2$  não afetou os níveis de SHNP e atividade da enzima GST nos rins, bem como os níveis plasmáticos de ácido úrico; licopeno e astaxantina também não causaram nenhum efeito *per se* sobre tais parâmetros;

→ A exposição aguda ao  $\text{HgCl}_2$  provocou danos à função renal, evidenciado pelo aumento nos níveis plasmáticos de creatinina e pela presença de necrose tecidual. Embora o aumento nos níveis plasmáticos de creatinina não tenha sido prevenido por nenhum dos carotenóides estudados, a ocorrência de necrose tecidual foi parcialmente prevenida por astaxantina, mas não por licopeno;

→ A exposição aguda ao  $\text{HgCl}_2$  causou peroxidação lipídica e alteração na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px. Tais efeitos foram parcialmente prevenidos por licopeno e totalmente prevenidos por astaxantina;

Apesar do licopeno e da astaxantina não terem evitado a falência renal causada pelo  $\text{HgCl}_2$ , os resultados deste trabalho sugerem que tais carotenóides podem oferecer proteção contra a peroxidação lipídica e as alterações das enzimas antioxidantes causadas pelo  $\text{HgCl}_2$ . Além disso, o licopeno protegeu a enzima  $\delta$ -ALA-D contra inibição causada por  $\text{HgCl}_2$ , enquanto a astaxantina preveniu parcialmente as alterações histopatológicas causadas pelo metal. Assim, licopeno e astaxantina podem desempenhar um papel benéfico contra a nefrotoxicidade causada por  $\text{HgCl}_2$ . Entretanto, mais estudos são necessários antes de uma conclusão definitiva sobre o potencial destes carotenóides como adjuntos na prevenção e tratamento de intoxicações causadas por mercúrio.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDYA, A. et al. Effects of mercuric chloride on several scavenging enzymes in rat kidney and influence of vitamin E supplementation. **Acta Vitaminol Enzymol.** vv. 6, p. 03 -107, 1984.

AGARWAL, A.; RAO, A.V. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. **Canad Med Assoc J.** v. 163, p. 739 - 744, 2000.

ALEO, M. F. et al. Antioxidant potential and gap junction-mediated intercellular communication as early biological markers of mercuric chloride toxicity in the MDCK cell line. **Toxicol in vitro.** v.16, p. 457- 465, 2002.

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T.M. Oxidants, and the degenerative diseases of aging. **P Natl Acad Sci USA.** v. 90, p. 7915-7922, 1993.

ANDERSEN, H.R.; ANDERSEN, O. Effects of dietary alpha-tocopherol and beta-carotene on lipid peroxidation induced by methyl mercuric chloride in mice. **Pharmacol Toxicol.** v. 73, p. 192 - 201, 1993.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução 528 de 17 de abril de 2001. [www.anvisa.br](http://www.anvisa.br).

ATESSAHIN, A. et al. Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. **Toxicology.** v. 212, p. 116 -123, 2005.

ATESSAHIN, A. et al. Lycopene prevents adriamycin-induced testicular toxicity in rats. **Fertil Steril.** v. 85, p. 1216 -1222, 2006a.

ATESSAHIN, A. et al. Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. **Reprod Toxicol.** v. 21, p. 42 - 47, 2006b.

ASTDR. **Case studies in environmental medicine:** lead toxicity. U.S. Department of health and human services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2000.

BARROS, M.P. et al. Astaxanthin and Peridin inhibit oxidative damage in Fe<sup>+2</sup>-loaded liposomes: scavenging oxyradicals or changing membrane permeability? **Biochem Biophys Res Comm.** v. 228, p. 225-232, 2001.

BECHARA, E. J. H. et al. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyries associated with 5-aminolevulinic acid overload. **Quím Nova.** v. 16, p. 385-392, 1993.

- BOILEAU, A. C. et al. Cis-lycopene is more bioavailable than trans-lycopene in vitro and in vivo in lymph-cannulated ferrets. **J Nutr.** v. 129, p. 1176 -1181, 1999.
- BREINHOLT, V. et al. Dose response effects of lycopene on selected drug-metabolizing and antioxidant enzymes in the rat. **Cancer Lett.** v. 154, p. 201-210, 2000.
- BRITON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **FASEB J.** v. 9, p. 1551-1558, 1995.
- BRZÓSKA, M. M. et al. Cadmium turnover and changes of zinc and copper body status of rats continuously exposed to cadmium and ethanol. **Alcohol Alcoholism.** v. 37, p. 213 -221, 2002.
- CHENG, J. P. et al. Effect of methylmercury on some neurotransmitters and oxidative damage of rats. **J Environ Sci.** v. 17, p. 469 - 473, 2005.
- CHEW, B.P. et al. A comparison of the anticancer activities of dietary beta-carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice in vivo. **Anticancer Res.** v.19, p.1849-1853, 1999.
- CHOI, H.K.; LIU, S.; CURHAN, G. Intake of purine-rich foods, protein, and dairy products and relationship to serum levels of uric acid: The Third National Health and Nutrition Examination Survey. **Arthritis Rheum.** v.52, p. 283-289, 2005.
- CLARKSON, T. W. The toxicology of mercury. **Crit Rev CL Lab Sci.** v. 34, p. 369 - 403, 1997.
- CLINTON, S. K. et al. Cis-trans lycopene isomers, carotenoids and retinol in the human prostate. **Cancer Epidemiol.** v. 5, p. 823 - 833, 1996.
- DAGGETT, D.A. et al. Effects of lead on rat kidney and liver: GST expression and oxidative stress. **Toxicology.** v. 128, p. 191-206, 1998.
- DAVISON, A.; ROESSEAU, E.; DUNN, B. Putative anticarcinogenic actions of carotenoids: nutritional implications. **Can J Physiol Pharmacol.** v. 71, p. 732 -745, 1993.
- DRASCH et al. The Mt. Diwata study on the Philippines 1999 – assessing mercury intoxication of the population by small scale gold mining. **Sci Total Environ.** v. 267, p. 151-158, 2001.
- EL-DEMERDASH, F. M. et al. Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and  $\beta$ -carotene. **Food Chem Toxicol.** v. 42, p.1563 -1571, 2004.
- ELIA, A.C. et al. Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. **Ecotoxicol Environ Saf.** v. 55, p. 162 -167, 2003.

EL-MISSIRY, M.A.; SHALABY, F. Role of beta-carotene in ameliorating the cadmium-induced oxidative stress in rat brain and testis. **J Biochem Mol Toxicol.** v. 14, p. 238 - 243, 2000.

EMANUELLI, T. et al. Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on delta-aminolevulinic acid deshydratase from brain, liver and kidney of adult mice. **Pharmacol Toxicol.** v. 79, p. 136 - 143, 1996.

ERDMAN Jr., J. W.; Variable bioavailability of carotenoids from vegetables. **Am J Clin Nutr.** v. 70, p. 179 -180, 1999.

FARINA, M. et al. Additive pro-oxidative effects of methylmercury and selenium in liver from suckling rat pups. **Toxicology Lett.** v. 146, p. 227-235, 2004.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Center for Drug Evaluation and Research**, United States, 1997.

FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals. **Science.** v. 201, p. 875 - 880, 1978.

FUHRMAN, B.; ELIS, A.; AVIRAM, M. Hypocholesterolemic effect of lycopene and  $\beta$ -carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor in macrophages. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 233, p. 658 - 662, 1997.

GALE, T. F. The amelioration of mercury-induced embryotoxic effects by simultaneous treatment with zinc. **Environ Res.** v. 35, p. 405 - 412, 1984.

GIBSON, K. D. A.; NEUBERGER, A.; SCOTT, J. J. The purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase. **Biochem J.** v. 61, p. 618-629, 1955.

GIOVANNUCCI, E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. **J Nat Cancer Inst.** v. 91, p. 317-331, 1999.

GIRARDI, G.; ELÍAS, M. M. Mercuric chloride effects on rat renal redox enzymes activities: SOD protection. **Free Radical Bio Med.** v. 18, p. 61-66, 1995.

GOTO, S. et al. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. **Biochim Biophys Acta.** v. 1512, p. 251-258, 2001.

GOYER, R. A. Toxic Effects of metals In: **Cassaret and Doull's Toxicology: The basic Science of poisons**, 5<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill Publishing Co, 1996.

GROSS, G. J., HAZEN, S. L., LOCKWOOD, S. F. Seven day oral supplementation with Cardax<sup>TM</sup> (disodium disuccinate astaxanthin) provides significant cardioprotection and reduces oxidative stress in rats. **Mol Cell Biochem.** v. 283, p. 23-30, 2006.

GUERIN, M., HUNTLEY, M. E., OLAIZOLA, M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. **Trends Biotechnol.** v. 21, p. 210-216, 2003.



GUTIERREZ, L. L. et al. Peripheral markers of oxidative stress in chronic mercuric chloride intoxication. **Braz J Med Biol Res.** v. 39, p. 767-772, 2006.

HAZARDOUS SUBSTANCES DATA BANK (HSDB). Mercury. In: TOMES CPS SYSTEM. **Toxicology, occupational medicine and environmental series.** Englewood: Micromedex, CD-ROM, 2000.

HIGUERA-CIAPARA, L., VELENZUELA, F., GOYCOOLEA, F.M. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. **Crit Rev Food Sci Nutr.** v. 46, p. 185-196, 2006.

HILL, E. F.; SOARES, J. H. Subchronic mercury exposure in Coturnix and a method of hazard evaluation. **Environ Toxicol Chem.** v. 3, p. 489 -502, 1984.

HUSSEIN, G. et al. Antihypertensive and neuroprotective effects of astaxanthin in experimental animals. **Biol Pharm Bull.** v. 28, p. 47-52, 2005a.

HUSSEIN, G. et al. Antihypertensive potential and mechanism of action of astaxanthin: II. Vascular reactivity and hemorheology in spontaneously hypertensive rats. **Biol Pharm Bull.** v.28, p. 967-971, 2005b.

HUSSEIN, G. et al. Antihypertensive potential and mechanism of action of astaxanthin: III. Antioxidant and histopathological effects in spontaneously hypertensive rats. **Biol Pharm Bull.** v. 29, p. 684-688, 2006.

JUGO, S. Retention and distribution of  $^{203}\text{HgCl}_2$  in suckling adult rats. **Health Phys.** v. 30, p. 240 -241, 1976.

KANG, J.O., KIM, S.J., KIM, H. Effect of astaxanthin on the hepatotoxicity, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in the liver of CCl<sub>4</sub>-treated rats. **Methods Find Exp Clin Pharmacol.** v. 23, p. 79-84, 2001.

KARAHAN, I. et al. Protective effect of lycopene on gentamicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in rats. **Toxicology.** v. 215, p. 198 - 204, 2005.

KHACHIK, F. et al. Chemistry, distribution and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. **Exp Biol Med.** v. 227, p. 845 - 851, 2002.

KIM, L.; RAO, A.V.; RAO, L.G. Effect of lycopene on prostate LNCaP cancer cells in culture. **J Med Food.** v. 5, p. 181-187, 2002.

KIM, J. et al. Suppressive effect of astaxanthin isolated from the Xanthophyllomyces dendrorhous mutant on ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **Biosci Biotechnol Biochem.** v. 69, p. 1300-1305, 2005a.

KIM, J. et al. Protective effect of astaxanthin on naproxenl-induced gastric antral ulcerations in rats. **Eur J Pharmacol.** v. 514, p. 53-59, 2005b.

KLAASSEN, C.D. Heavy metals and heavy-metal antagonists. In: **The Pharmacological basis of therapeutics**. Eds. M.J. Wonsiewics & P. Mc Curdy, New York, 1649-1671, 1996.

KUCUK, O. et al. Phase II randomized clinical trial of lycopene supplementation before radical prostatectomy. **Cancer Epidemiol Biomark.** v. 10, p. 861-868, 2001.

KURASHIGE, M. et al. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. **Physiol Chem Phys Med NMR.** v. 22, p. 27-38, 1990.

LAWLOR, S.M., O'BRIEN, N.M. Astaxanthin: antioxidant effects in chicken embryo fibroblasts. **Nut Res.** v. 15, p. 1695-1704, 1995.

LEONARD, A.; JACQUET, P.; LAWERYYS, R.R. Mutagenicity and teratogenicity of mercury compounds. **Mutat Res.** v. 114, p.1-18, 1983.

LI, W. et al. Alpha-tocopherol and astaxanthin decrease macrophage infiltration, apoptosis and vulnerability in atheroma of hyperlipidaemic rabbits. **J Mol Cell Cardiol.** v. 37, p. 969-978, 2004.

LIU, W. S., WU, J. Y. Hydrogen peroxide-induced astaxanthin biosynthesis and catalase activity in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Appl Microbiol Cell Phys.** v. 73, p. 663-668, 2006.

LORSCHIEDER, F. L. et al. The dental amalgam mercury controversy - inorganic mercury and the CNS; genetic linkage of mercury and antibiotics resistances in intestinal bacterias. **Toxicology.** v. 97, p. 19 -22, 1995.

LUND, B. O.; MILLER, D. M.; WOODS, J. S. Studies on Hg (II)-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation and oxidative stress *in vivo* and *in vitro* in rat kidney mitochondria. **Biochem Pharmacol.** v. 45, p. 2017-2024, 1993.

MAGOS, L; HALBACH, S.; CLARKSON, T. W. Role of catalase in the oxidation of mercury vapor. **Biochem Pharmacol.** v. 27, p. 1373 -1377, 1978.

MATOS, H. R. et al. Lycopene and beta-carotene protect *in vivo* iron-induced oxidative stress damage in rat prostate. **Braz J Med Biol Res.** v. 39, p. 203 -210, 2006.

Miki, W. Biological functions and activities of animal carotenoids. **Pure Appl Chem.** 63(1):141-146, 1991.

MOREIRA. E. A. M.; SHAMI, N. J. I. E. Licopeno como agente antioxidante. **Rev. Nutr.** v. 17, p. 227-236, 2004.

MOREIRA, E. A. M. et al. Effects of diet energy level and tomato powder consumption on antioxidant status in rats. **Clin Nutr.** v. 24, p. 1038-1046, 2005.

MORTENSEN, A.; SKIBSTED, L. H.; TRUSCOTT, T. G. The interaction of dietary carotenoids with radical species. **Arch Biochem Biophys.** v. 385, p.13 -19, 2001.

- MORTENSEN, A. et al. Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. **FEBS Lett.** v.18, p. 91-97, 1997.
- MUZANDU, K. et al. Effect of lycopene and  $\beta$ -carotene on peroxy-nitrite-mediated cellular modifications. **Toxicol App Pharmacol.** v. 215, p. 330-340, 2006.
- NAGUIB, Y. M. A. Antioxidant activity of astaxanthin and related carotenoids. **J Agric Food Chem.** v. 48, p. 1150-1154, 2000.
- NAITO, Y. et al. Prevention of diabetic nephropathy by treatment with astaxanthin in diabetic db/db mice. **Biofactors.** v. 20, p. 49-59, 2004.
- NASCIMENTO, E. S.; CHASIN, A. A. M. Ecotoxicologia do mercúrio e seus compostos. **Cadernos de Referência Ambiental**, Vol. 1. Centro de Recursos Ambientais, Bahia, 176p., 2001.
- NIELSEN, J. B.; HULTMAN, P. Mercury-Induced Autoimmunity in Mice. **Environ Health Persp.** v. 110, p. 877- 881, 2002.
- NOGUEIRA, C. W. et al. 2,3 – Dimercaptopropane - 1 - sulfonic acid and meso - 2,3 – dimercaptosuccinic acid increase mercury and cadmium –induced inhibition of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehidratase. **Toxicology.** v. 184, p. 85 - 95, 2003.
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biol Med** v. 31, p. 1287-1312, 2001.
- O'CONNOR, I., O'BRIEN, N. Modulation of UVA light-induced oxidative stress by  $\beta$ -carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts. **J Dermatol Sci.** v. 16, p. 226-230, 1998.
- OLSON, J. A. Carotenoids and human health. **Arch Latinoamerican Nutr.** v. 49, p. 7-11, 1999.
- OMONI, A. O.; ALUKO, R. O. The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review. **Trends Food Sci Tech.** v.16, p.344 - 350, 2005.
- PAGE, G. I., DAVIES, S. J. Tissue astaxanthin and canthaxanthin distribution in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Comp Biochem Phys A.** v.143, p. 125-132, 2006.
- PALOZZA, P., KRINSKY, N. I. Astaxanthin and cantaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. **Arch Biochem Biophys.** v. 297, p. 184-187, 1992.
- PATRICK, L. Mercury toxicity and antioxidants: Part I: Role of glutathione and alpha-lipoic acid in the treatment of mercury toxicity. **Altern Med Rev.** v.7, p.456-471, 2002.
- PEROTTONI, J. et al. Renal and hepatic ALA-D activity and selected oxidative stress parameters of rats exposed to inorganic mercury and organoselenium compounds. **Food Chem Toxicol.** v. 42, p.17-28, 2004.

RAJASINGH, H. et al. Carotenoid dynamics in Atlantic salmon. **BMC Biol.** v. 4, p. 1-15, 2006.

REIFEN, R. et al. 5-ASA and lycopene decrease the oxidative stress and inflammation induced by iron in rats with colitis. **J Gastroenterol.** v. 39, p. 514 - 519, 2004.

RISHER, J. F., AMLER, S. N. Mercury exposure: evaluation and intervention. The inappropriate use of chelating agents in the diagnosis and treatment of putative mercury poisoning. **Neurotoxicology** v. 26, p. 691-699, 2005.

SALO, D. C.; PACIFINI R. E.; DAVIES, K. J. N. Superoxide dismutase is preferentially degraded by a proteolytic system from red blood cells following oxidative modification by hydrogen peroxide. **Free Radical Bio Med.** v. 5, p. 335 - 339, 1988.

SARAFIAN, T.; VERITY, M. A. Oxidative mechanisms underlying methyl mercury neurotoxicity. **Int J Neurosc.** v. 9, p. 147-153, 1991.

SCHROEDER, W. A., JOHNSON, E.A. Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. **J Gen Microbiol.** v. 139, p. 907–912, 1993.

SCHROEDER, W. A., JOHNSON, E. A. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. **J Biol Chem.** v. 270, p. 18374-18379, 1995.

SENER, G.; SEHIDI, A. O.; AYANOGLU-DULGER, G. Melatonin protects against mercury (II)-induced oxidative tissue damage in rats. **Pharmacol Toxicol.** v. 93, p. 290-296, 2003.

SHARMA, M. K.; KUMAR, M.; KUMAR, A. Protection against mercury-induced renal damage in Swiss albino mice by *Ocimum sanctum*. **Environ Toxicol Pharmacol.** v. 19, p. 161-167, 2005.

SHIMOJO, N.; KUMAGAI, Y.; NAGAFUNE, J. Difference between kidney and liver in decreased manganese superoxide dismutase activity caused by exposure of mice to mercuric chloride. **Arch Toxicol.** v. 76, p. 383 - 387, 2002.

SILVA, C. R. M.; NAVES, M. M. V. Suplementação de vitaminas na prevenção de câncer. **Revista Nutr.** v.14, p. 135 -143, 2001.

SIES, H. What is oxidative stress? In: Keaney, J. F. Jr., ed. **Oxidative stress and vascular disease**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 1-8.

STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Protein oxidation. Reactive oxygen species: From radiation to molecular biology. **Ann NY Acad Sci.** v. 899, p. 191-208, 2000.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Mol Aspects Med.** v. 24, p. 345-351, 2003.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative Mechanisms In The Toxicity Of Metal-Ions. **Free Rad Biol Med.** v.18, p. 321-336, 1995.

STRINGARI, J. et al. Postnatal Methylmercury Exposure Induces Hyperlocomotor Activity and Cerebellar Oxidative Stress in Mice: Dependence on the Neurodevelopmental Period. **Neurochem Res.** v. 31, p. 563-569, 2006

TANAKA-KAGAWA, T. et al. Strain difference in sensitivity of mice to renal toxicity of inorganic mercury. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 285, p. 335-341, 1998.

UCHIYAMA, K. et al. Astaxanthin protects beta-cells against glucose toxicity in diabetic db/db mice. **Redox Report** . v. 7, p. 290-293, 2002.

USUKI, F. et al. In vivo protection of a water-soluble derivative of vitamin E, trolox, against methylmercury-intoxication in the rat. **Neurosci Lett.** v. 304, p.199-203, 2001.

VELMURUGAN, B., SANTHIYA, S. T., NAGINI, S. Protective effect of S-allylcysteine and lycopene in ombination against N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine-induced genotoxicity. **Pol J Pharmacol.** v. 56, p. 241-245.

(WHO). WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Inorganic Mercury.** Environmental Health Criteria 118:168p, Geneva, 1991.

(WHO). WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Methylmercury.** Environmental Health Criteria 101: 144p, Geneva, 1990.

(WHO). WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mercury-environmental aspects.** Environmental Health Criteria 86:115p, Geneva, 1989.

WILLCOX, J. K.; CATIGNANI, G. L.; LAZARUS, S. Tomatoes and cardiovascular health. **Crit Rev Food Sci Nutr.** v. 43, p. 1-18, 2003.

WOODS, J. S.; DAVIS, H. A.; BAER, R. P. Enhancement of  $\gamma$ -glutamylcysteine syntethase mRNA in rat kidney by methyl mercury. **Arch Biochem Biophys.** v. 296, p. 350-353, 1992.

WU, T. et al. Astaxanthin protects against oxidative stress and calcium-induced porcine lens protein degradation. **J Agric Food Chem.** v.54, p. 2418-2423, 2006.

YLMAZ, S. et al. Protective effect of lycopene on adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. **Toxicology.** v. 218, p. 164-171, 2006.

ZALUPS, R. K. Early aspects of the intrarenal distribution of mercury after the intravenous administration of mercuric chloride. **Toxicology** v. 79, p. 215-228, 1993.

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

ZHANG, L. X.; COONEY, R. V.; BERTRAM, J. S. Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. **Carcinogenesis**. v. 12, p. 2109 - 2114, 1991.

ZHARIPHEH, S. et al. [14C]-lycopene and [14C]-labeled polar products are differentially distributed in tissues of F344 rats prefed lycopene. **J Nutr**. v. 133, p. 4189 - 4195, 2003.

## 7 ANEXOS

### 7.1 ANEXO A – Comprovante de aceite do manuscrito “Effect of lycopene on nephrotoxicity induced by mercuric chloride” pela Revista Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology



## Decision

Manuscript title: Effect of lycopene on nephrotoxicity induced by mercuric chloride in rats

Manuscript type: Original Article

All Authors: Augusti, Paula R.; Conterato, Greicy M.M.; Somacal, Sabrina; Einsfeld, Lídia; Ramos, Adriano T.; Hosomi, Fernando Y.M.; Graça, Dominguita L.; Emanuelli, Tatiana.

---

Decision: **Accept**

Submission number: 2

Decision date: 2007-01-15

Decision letter: It is a pleasure to inform you that the above manuscript is acceptable for publication.

It should be noted that the authors will be charged GBP 150 for each page by which the article exceeds 6 pages in the printed issue (or 2 pages for Short Communications) incl. tables and figures and for coloured illustrations (see "Notice to Contributors", *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2007, 100, 71-72, and homepage [www.bcpt.org](http://www.bcpt.org) or [www.blackwellpublishing.com/pto](http://www.blackwellpublishing.com/pto) (in "Notice to Contributors" see "For authors" and "View a sample issue").

Please CONFIRM that you accept to pay page charge for each page over and above 6 printed pages and for coloured illustrations.

Please confirm by e-mail to [fighm@farmakol.ku.dk](mailto:fighm@farmakol.ku.dk)

Please also send fig. 3 which is missing in the available Word document. Please send in black/white unless you wish to keep the coloured figure.

Please also complete and return an "Exclusive Licence Form" with ORIGINAL signature to the address indicated at the very bottom of the form. The form can be downloaded from the abovementioned homepages.

When received the manuscript will be subjected to editorial revision, and proofs will appear in 2-3 months.

For further correspondence regarding the publication of the manuscript, please contact Grete Hoppe Mouret at [fighm@farmakol.ku.dk](mailto:fighm@farmakol.ku.dk)

I thank you very much for submitting this valuable report and hope that you will continue to consider *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* the primary journal of publication for your most interesting and important studies.

Yours sincerely  
Kim Brøsen



**7.2 ANEXO B – Comprovante de submissão do manuscrito “Effect of astaxanthin on kidney function changes and oxidative stress induced by mercuric chloride in rats” à Revista Food and Chemical Toxicology**

**De:** [josephborzelleca@comcast.net](mailto:josephborzelleca@comcast.net)  
**Para:** [etaty@terra.com.br](mailto:etaty@terra.com.br), [tatiemanuelli@smail.ufsm.br](mailto:tatiemanuelli@smail.ufsm.br)  
**Cópia:**  
**Data:** Sun, 11 Feb 2007 20:05:41 -0000  
**Assunto:** Editor handles FCT-D-07-00085

Ms. Ref. No.: FCT-D-07-00085

Title: Effect of astaxanthin on changes in kidney function and oxidative stress induced by mercuric chloride in rats.  
Food and Chemical Toxicology

Dear Tatiana,

Your submission entitled "Effect of astaxanthin on changes in kidney function and oxidative stress induced by mercuric chloride in rats." will be handled by Receiving Editor Joseph Borzelleca, PhD.

The review process for this journal takes 8-10 weeks on average so please be patient. You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/fct/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System  
Food and Chemical Toxicology