

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

**EFEITO TOXICOGENÉTICO DO POLIMORFISMO  
ALA16VAL DO GENE MnSOD EM LEUCÓCITOS  
EXPOSTOS *IN VITRO* AO METIL MERCÚRIO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO VINCULADO AO PPGBTOX**

**Thaís Doeler Algarve**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2012**

EFEITO TOXICOGENÉTICO DO POLIMORFISMO  
ALA16VAL DO GENE MnSOD EM LEUCÓCITOS  
EXPOSTOS *IN VITRO* AO METIL MERCÚRIO

**Thaís Doeler Algarve**

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 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**.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivana Beatrice Mânica da Cruz**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

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

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

**EFEITO TOXICOGENÉTICO DO POLIMORFISMO ALA16VAL DO GENE  
MnSOD EM LEUCÓCITOS EXPOSTOS *IN VITRO* AO METIL MERCÚRIO**

elaborada por  
**Thaís Doeler Algarve**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Ivana Beatrice Mânica da Cruz, MSc, PhD.  
(Orientadora)**

**Guilherme Bresciani, Dr. (UFSM)**

**Michel Mansur Machado, Dr. (UNIPAMPA)**

**Santa Maria, 19 de março de 2012.**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico aos meus pais, Eurico e Vera, e à Ivana pelo apoio e aconselhamentos que me conduziram até aqui.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Eurico e Vera, pelo amor e carinho. E por sempre me apoiarem e incentivarem os meus estudos e formação acadêmica.

Aos meus irmãos e à minha família, em especial minha avó, Anida, que me ofereceu amparo quando o barulho da rua não permitia que eu estudasse com qualidade, e à Naira e o Guilherme que, assim como minha avó, sempre me apoiaram.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Ivana, pela oportunidade, apoio, dedicação, amizade e confiança. Por todos os conselhos e ensinamentos transmitidos. Além da minha sincera gratidão, te admiro pelo teu caráter, dedicação à pesquisa e pela sabedoria que demonstras nas relações interpessoais que tornou o laboratório minha segunda casa, sentimento este que compartilho com meus colegas, já que afinal, como você mesma diz “o laboratório é a cara do orientador”.

Ao Clairton, pelo amor, incentivo, compreensão e por sempre estar ao meu lado me apoiando nos momentos que mais precisei.

Aos meus amigos em Santa Cruz, como a Maira, Vanessa, Débora, Carina e Ana Cláudia que apesar de voltar menos do que gostaria pra casa, me acompanham desde a 7<sup>a</sup> série, além dos amigos mais “recentes”, como a Josi, Otávio, Leandro e Tadeu, agradeço pela compreensão e apoio. Vocês conseguem sempre fazer com que a minha cabeça se desligue da rotina, relaxando através do bom humor e da presença de espírito de vocês!

A toda equipe do Laboratório de Biogenômica que contribuiu com a parte experimental. Em especial aos meus colegas Maria Fernanda, Greice, Fernanda B., Clarice, Eduardo, Mara, Danise, Raul e Adriano pelas conversas, companheirismo, discussões produtivas e pela disposição de me ajudarem de manhã bem cedinho e até mesmo durante a noite nos experimentos.

À Prof. Maria Isabel, Prof<sup>a</sup> Cristina Krewer por sempre estarem de braços estendidos para ajudar e pelos socorros prestados nas férias. Agradeço a disposição de vocês.

À Dra. Marta Duarte, pelo auxílio na genotipagem das amostras.

À Universidade Federal de Santa Maria, referência em qualidade pela formação acadêmica.

À CAPES pela bolsa concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, pelo alto nível de seus docentes e discentes na produção científica.

A todos os demais amigos e pessoas que não foram citadas, mas que de alguma forma foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

Projeto Vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria

### **EFEITO TOXICOGENÉTICO DO POLIMORFISMO ALA16VAL DO GENE MnSOD EM LEUCÓCITOS EXPOSTOS *IN VITRO* AO METIL MERCÚRIO**

AUTORA: THAÍS DOELER ALGARVE

ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> IVANA BEATRICE MÂNICA DA CRUZ

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 19 de março de 2012.

A contaminação ambiental por metilmercúrio (MeHg) é uma grande problema para a saúde pública em algumas regiões do mundo, como a Amazônia. Entretanto, os seus efeitos tóxicos parecem ser influenciados tanto por fatores ambientais como genéticos. Porém ainda há poucos estudos avaliando a influencia genética em humanos expostos ao MeHg. Assim, o presente estudo buscou avaliar a influência de um polimorfismo genético presente na enzima superóxido dismutase dependente de manganês (Ala16Val-MnSOD) sobre os efeitos citotóxicos relacionados a exposição *ex vivo* ao MeHg em leucócitos humanos. A partir da genotipagem de 100 indivíduos (26,4±7,3 anos) foram selecionados sujeitos com diferentes genótipos (AA=08, VV=06 e AV=12) para a realização dos testes. Foi avaliada a citotoxicidade (via ensaio MTT) e a produção de radicais livres – RL – (via ensaio da fluorescência do DCFDA) em amostras de leucócitos, dos mesmos sujeitos, expostas e não expostas ao MeHg (2,5µM por 6h). Os resultados mostraram que leucocitos AA e VV expostos ao MeHg não aumentaram os níveis de produção de ROS quando comparados ao grupo controle. Enquanto os leucocitos AV quando expostos ao MeHg aumentaram a produção de EROs. Contudo, leucocitos-AA expostos ao MeHg apresentaram menor viabilidade quando comparados aos leucócitos dos genótipos VV e AV sob as mesmas condições. Isto ocorre provavelmente pelo ao fato do genótipo AA apresentar maior produção basal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do que os demais genótipos. Estes resultados sugerem efeito toxicogenético na resposta de células humanas expostas ao MeHg.

**Palavras-chaves:** Metil Mercúrio. Polimorfismo MnSOD Ala16Val. Estresse Oxidativo. Toxicidade.

## ABSTRACT

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológica – Bioquímica  
Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

### TOXIGENETIC EFFECT OF ALA16VAL MnSOD GENE POLYMORPHISM ON LEUCOCYTES *IN VITRO* EXPOSED TO METHYL MERCURY

AUTHOR: THAÍS DOELER ALGARVE

ADVISOR: PROF. DR. IVANA BEATRICE MANICA DA CRUZ

Date and Place: March 19<sup>th</sup>, 2012, Santa Maria.

The environmental contamination by methyl mercury (MeHg) is a great health public problem in some world regions like Amazonia. The MeHg toxic effects seem to be influenced by environmental and genetic factors. However, there are few studies evaluating the genetic influence on MeHg toxicity in humans. Therefore, the aim of this present study was to evaluate the genetic influence of Ala16Val superoxide dismutase manganese dependent gene polymorphism (Ala16Val-MnSOD) on cytotoxic effects of *in vitro* human leucocytes exposed to MeHg. Subjects were selected from 100 individuals genotyped to Ala16Val-MnSOD polymorphism (26,4±7,3 years) with different genotypes (AA=08, VV=06 and AV=12) to perform the *in vitro* tests. The reactive oxygen species (ROS) production was measured using 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) fluorimetric assay and the cell viability was measured using the MTT assay were performed in leucocyte samples with the same subjects exposed and not exposed to MeHg (2,5µM for 6h). The results showed that AA and VV-leucocytes exposed to MeHg did not increase the ROS levels when compared to the cells that were not exposed. However, the AV-leucocyte MeHg exposure increased the ROS levels. The cellular viability comparison among different genotypes exposed to MeHg showed lower AA-leucocyte viability when compared to VV-leucocytes, whereas heterozygous cells (AV) presented intermediary values. This occurred probably due to the fact of AA-leucocytes present a higher basal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production than other genotypes. The whole of these results suggests toxicogenetic effects of Ala16Val-SOD polymorphism in human cells exposed to MeHg.

Keywords: Methyl mercury, SOD2 Ala16Val polymorphism, oxidative stress, toxicogenetic.



## LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

Ala16Val	Alanina16Valina
CBS	Células Brancas Sanguíneas
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GCT	Códon (sequência de três nucleotídeos) que codifica o aminoácido alanina
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione Reduzida
GST	Glutathione-S-Transferase
GTT	Códon (sequência de três nucleotídeos) que codifica o aminoácido valina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution (Solução Salina Balanceada de Hank's)
Hg	Mercúrio
Hg <sup>0</sup>	Mercúrio metálico ou elementar
Hg <sup>2+</sup>	Mercúrico, forma catiônica divalente do mercúrio
Hg <sup>+</sup>	Mercuroso, forma catiônica monovalente do mercúrio
HgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Mercúrio
Hgp	Mercúrio particulado (associado a partículas sólidas)
HgS	Sulfeto Mercúrico ou Sulfeto de Mercurio (II) ou Cinábrio
IPCS	International Programme on Chemical Safety
MeHg	Metil-Mercúrio ou Metilmercúrio
Me <sub>2</sub> Hg	Dimetil-Mercúrio ou Dimetilmercúrio
MnSOD	Enzima Superóxido Dismutase Dependente de Manganês (ou SOD2)
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (RNA mensageiro)
mDNA	<i>Mitochondrial DNA</i> (DNA mitocondrial)
MTS	<i>Mitochondrial Targeting Sequence</i> (Sequência de Alvo Mitocondrial)
O <sub>2</sub>	Oxigênio Molecular
O <sub>2</sub> <sup>-·</sup>	Radical Superóxido
OH <sup>·</sup>	Radical Hidroxila
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PBSg	Tampão PBS (Phosphate Buffered Saline - salina tamponada) com 2% de glicose
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Espécies Reativas ao Oxigênio – EROs)
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	<i>Single Nucleotide Polimorphysm</i> (Polimorfismo de Um Único Nucleotídeo)
SOD2	Enzima Superóxido Dismutase 2 (ou MnSOD)

TBARS      *Thiobarbituric Acid Reagent Substance* (Substâncias Reativas ao Ácido Tio-Barbitúrico)

WHO        *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 Objetivo geral .....	15
2.2 Objetivos específicos .....	15
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
3.1 Mercúrio: formas de apresentação, ciclo e toxicidade .....	16
3.2 Contaminação populacional por mercúrio: o caso da Amazônia .....	18
3.3 Mecanismos de toxicidade .....	19
3.4 O dilema dos perfis de toxicidade .....	20
3.5 Toxicogenética associada à contaminação por mercúrio .....	21
3.6 Superóxido dismutase dependente de manganês .....	22
3.7 Células brancas sanguíneas: os leucócitos.....	25
<b>4 RESULTADOS</b> .....	27
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	52
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	60
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	61

# 1 INTRODUÇÃO

Metais pesados como o mercúrio (Hg) são conhecidos por sua ação tóxica no organismo humano, sendo o órgão mais suscetível o cérebro (Clarkson, 1997). A exposição ao Hg durante a gestação e o início da infância pode causar distúrbios e disfunções sistêmicas e neurais. Isto porque o Hg consegue atravessar a placenta humana e a barreira hematoencefálica. Esta condição pode desencadear uma cascata de alterações metabólicas que resultam em danos permanentes que só são detectados em idades mais avançadas (RICE & BARONE, 2000).

Em geral a severidade do efeito tóxico do Hg depende da dose, da duração e tempo de exposição. Nos seres humanos, entretanto, observa-se uma grande variação nos efeitos tóxicos mesmo em situações comparáveis de exposição. Diversos fatores parecem afetar a maior ou menor toxicidade a um determinado composto, como a idade, o gênero e a dieta. Além disso, fatores genéticos parecem contribuir com esta variação da suscetibilidade a metais pesados como o Hg (GUNDACKER et al., 2010).

Apesar da alta toxicidade do Hg acredita-se que 25% da toxicidade ao Hg é influenciada por interações entre fatores ambientais e a suscetibilidade genética individual (National Research Council, USA, 2000a). No caso, a variação individual pode alterar padrões toxicocinéticos do Hg fazendo com que ele tenha um efeito mais exacerbado ou atenuado no organismo. Além disso, também devem ser consideradas variações genéticas em rotas que potencialmente auxiliam a minimizar os efeitos tóxicos do Hg no organismo, como o estresse oxidativo.

Polimorfismos de nucleotídeos simples (*single nucleotide polymorphism*, SNPs) representam o mais frequente tipo de variação genética no DNA humano. Existem alguns SNPs que ocorrem em regiões funcionais de um dado gene levando a alterações na forma e função do RNA mensageiro (mRNA) ou proteínas sintetizadas. Outros SNPs ocorrem em regiões promotoras de genes fazendo com que a quantidade e o momento da transcrição de determinados genes sejam alterados. Também existem SNPs que ocorrem em regiões não-transcritas do gene e não causam nenhum tipo de alteração fenotípica. Portanto, na atualidade autores como Gundacker e colaboradores

(2010) acreditam que é crucial conhecer como os aspectos genéticos influenciam a função e atividade das proteínas envolvidas na cinética do Hg e também na modulação dos efeitos tóxicos bioquímicos e fisiológicos que são provocados por este metal pesado. Uma situação que corrobora com a ideia da relevância da genética na toxicidade do Hg é proveniente de estudos epidemiológicos relacionados à contaminação de populações ribeirinhas na Amazônia e República do Seicheles, onde a população está cronicamente exposta às altas concentrações de mercúrio através do consumo de peixes contaminados, mas ao contrário do que era esperado, não apresentavam o mesmo grau de lesão, ou até mesmo lesão alguma, comparado com outras populações com grau de intoxicação semelhante (PFEIFFER et al., 1990; BOISCHIO et al., 1995; MYERS et al., 1997, 2003). Isso chamou a atenção de diversos pesquisadores que acompanharam crianças da República do Seicheles até os 9 anos de idade que não identificaram retardo mental nessas crianças, contrastando com o encontrado na Baía de Minamata e Niigata no Japão, onde a população também foi exposta à altas concentrações de metil-mercúrio (MeHg), porém a população que consumia os peixes desta baía ficaram com graves sequelas neurológicas (NATIONAL INSTITUTE FOR MINAMATA DISEASE, 1986; MYERS et al., 2003).

Deste modo, as populações ribeirinhas da Amazônia que caracteristicamente utilizam o pescado local como principal fonte alimentar pareceriam estar seriamente ameaçadas pelo MeHg. Entretanto, são inúmeras as variáveis que interferem na exposição destes indivíduos ao Hg, relacionadas tanto ao comportamento do Hg nesta cadeia trófica (por exemplo, biomagnificação) quanto ao consumo de pescado e uso de águas contaminadas (BOISCHIO et al., 1995; *WATER, SANITATION AND HEALTH – World Health Organization – WHO*, 2005).

É claro que a ocorrência de sintomas clínicos de intoxicação ao Hg é dose-dependente (*INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY – WHO*, 1990; *WATER, SANITATION AND HEALTH – WHO*, 2005). Entretanto, ao contrário do esperado foi observada uma incidência mais baixa de efeitos colaterais e de desenvolvimento de doenças e disfunções crônicas degenerativas (FILLION et al., 2009) nestas comunidades amazônicas. Esta condição foi considerada surpreendente já que as taxas estimadas de ingestão diária de Hg bastante elevadas (entre 1-

2µg/kg/dia) sendo consideravelmente acima das doses de referência estabelecidas pela *Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América* (0,1µg/kg/dia) ou pela *Organização Mundial da Saúde* (0,5µg/kg/dia) (CLARKSON et al., 2003; BOISCHIO et al., 1995).

Na Amazônia, além da contaminação com Hg em consequência do garimpo foram observados altas concentrações deste metal pesado nos solos de regiões onde não ocorre a mineração de ouro. A erosão do solo e a intensificação das atividades humanas parecem também contribuir para a origem do Hg nos sistemas aquáticos desta região. Nestes locais os níveis de Hg também são elevados na população (ROULET et al., 1998, 1999, 2000a,b).

Uma vez que, além de compostos antioxidantes presentes na dieta, o organismo possui um sistema enzimático antioxidante geneticamente determinado, é importante averiguar se a modulação dos efeitos tóxicos do Hg pode ser geneticamente influenciada (podendo ser maior ou menor conforme variações dos polimorfismos genéticos associados ao sistema antioxidante). Dentro do sistema enzimático antioxidante, a enzima superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD ou SOD2) se destaca. A SOD2 é uma enzima mitocondrial que tem como função metabolizar o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) transformando-o em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio molecular ( $O_2$ ). Posteriormente o  $H_2O_2$  é degradado em água por outras enzimas antioxidantes (glutathione peroxidase e catalase) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Estudos prévios descreveram um SNP no qual ocorre a troca da Alanina (A) por uma Valina (V) no códon 16 do gene da enzima MnSOD (Ala16Val MnSOD ou Ala16Val SOD2). Como este polimorfismo está localizado na sequência de alvo mitocondrial (*Mitochondrial Targeting Sequence* - MTS), essa alteração confere ao alelo A uma diferença conformacional que resulta na maior atividade catalítica do  $O_2^{\cdot-}$  deste alelo em relação ao alelo V, sendo possíveis 3 genótipos, onde o AA apresenta maior eficiência enzimática que o AV e o VV respectivamente (MONTAGNER et al., 2010; TAUFER et al., 2005). Estudos *in vitro* em cultura de células tem demonstrado que o genótipo AA apresenta maior viabilidade e índice mitótico, além de menores níveis de

TBARS do que os genótipos VV e AV. Porém, os níveis de dano no DNA são mais expressivos nos AA do que nos VV (MONTAGNER et al., 2010).

Uma vez que o conjunto destes resultados prévios sugere papel importante do polimorfismo Ala16Val MnSOD na modulação do estresse oxidativo celular, o estudo aqui desenvolvido buscou elucidar se tal polimorfismo poderia apresentar ação toxicogénica *in vitro* de leucócitos expostos ao MeHg.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial efeito toxicogénico do polimorfismo Ala16Val do gene codificante da enzima MnSOD em leucócitos humanos expostos ao MeHg.

### 2.2 Objetivos específicos

- A partir de adultos saudáveis genotipados para o polimorfismo Ala16Val MnSOD avaliar o efeito *in vitro* da exposição ao MeHg de leucócitos:
  - na produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs)
  - na viabilidade celular
- Determinar as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo Ala16Val MnSOD em uma população de adultos jovens saudáveis;

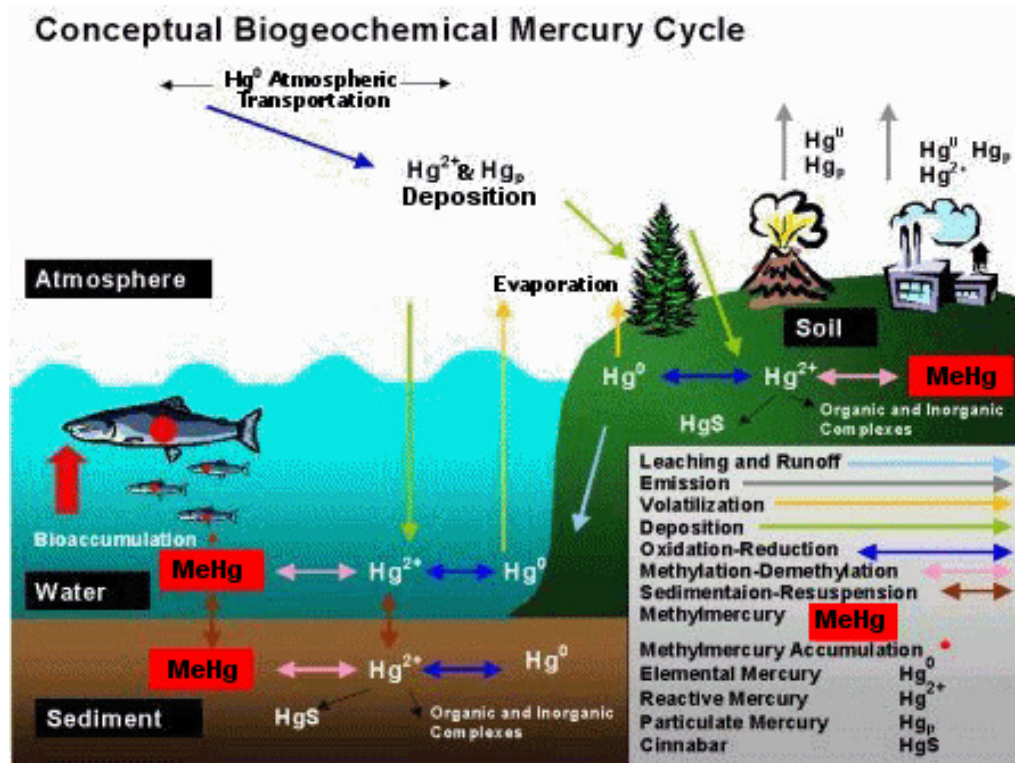


## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Mercúrio: formas de apresentação, ciclo e toxicidade

O Hg é uma ameaça à saúde humana bem conhecida devido a sua toxicidade sistêmica. É possível encontra-lo em várias formas: metálico ( $\text{Hg}^0$ ), particulado (Hg associado a partículas sólidas), iônica ( $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^+$ ), inorgânica (exemplo  $\text{HgS}$ ,  $\text{HgCl}_2$ ) e orgânica (exemplo  $\text{MeHg}$ ,  $\text{Me}_2\text{Hg}$ ). As principais formas de exposição humana são o vapor de  $\text{Hg}^0$  e os compostos de metilmercúrio ( $\text{MeHgX}$ ) (CLARKSON, 1997). O  $\text{MeHg}$  é considerado a forma mais tóxica deste elemento para o sistema nervoso central (SNC) (IPCS-WHO, 1990). Vários experimentos e estudos epidemiológicos têm demonstrado que a exposição ao  $\text{MeHg}$  está associada a efeitos neurotóxicos e deficiência na função motora (DOLBEC et al., 2000; DO NASCIMENTO et al., 2008; MARTINS et al., 2009), danos no sistema imune (MOSZCZYŃSKI et al., 1998), rins (RUTOWSKI et al., 1998), sistema cardiovascular (VIRTANEN et al., 2007) e dano genéticos (CRESPO-LÓPEZ et al., 2009; GROTTTO et al., 2009 e 2011a).

A exposição dos seres humanos ao  $\text{MeHg}$ , se dá, principalmente através da ingestão de peixes contaminados com este metal (BOISCHIO & HENSHEL, 2000). Esta contaminação ocorre a partir de etapas bem definidas. O primeiro passo do processo é a bioacumulação que ocorre a partir da metilação do Hg inorgânico por bactérias aquáticas. Como estas fazem parte da cadeia alimentar aquática, ocorre o acúmulo de  $\text{MeHg}$  ao longo da mesma incluindo animais de maior porte como os peixes (DA SILVA et al., 2005). Esse processo recebe o nome de biomagnificação, segundo passo do processo, que é a capacidade de se acumular na cadeia trófica. Em decorrência disso, o  $\text{MeHg}$  encontra-se em maior concentração nas espécies de peixes carnívoras do que nas herbívoras (DOS SANTOS et al., 2000). Portanto, a maior fonte de exposição humana ao  $\text{MeHg}$  são os peixes (BARGHIGIANI & RISTORI, 1994; URSÍNYOVÁ et al., 1997). A Figura 1 apresenta uma síntese do ciclo biogeoquímico do Hg na natureza.



**Figura 1.** Ciclo Biogeoquímico Conceitual do Mercúrio – A figura exhibe as várias fontes de Hg, naturais (gases vulcânicos, evaporação ou lixiviação de solos ricos neste metal) e antropológicas (como exemplo usinas termelétricas, despejo de resíduos industriais, entre outros), seus processos de oxidação na atmosfera e os de oxi-redução através das bactérias do solo e água, mostrando um panorama geral do seu ciclo no meio ambiente até chegar aos peixes, principal fonte de contaminação humana. Ainda, através dos círculos vermelhos, ilustra o processo de bioacumulação e biomagnificação, se acumulando na direção do topo da cadeia alimentar – Fonte: “Environment Canada”

Além desta via, o MeHg pode contaminar o ser humano a partir da exposição a pesticidas na agricultura (fenilmercúrio - PhHg), em certos medicamentos bacteriostáticos (PhHg, Etilmercúrio - EtHg), em conservantes de vacinas (Timerosal também conhecido como EtHg, mertiolate, entre outros), como componente de bateria e lâmpadas fluorescentes (TCHOUNWOU et al., 2003; DÓREA, 2011). Entretanto, nestas vias a concentração de MeHg está bastante reduzida. Se tem sugerido que muitos fatores podem influenciar a vulnerabilidade das populações aos efeitos do MeHg. Entre

aqueles que receberam considerável atenção estão a idade, sexo, condições de saúde e nutricionais e a ingestão de outros alimentos ou nutrientes que podem influenciar a absorção, captação, distribuição e metabolismo do MeHg (*National Research Council, USA, 2000b*).

### **3.2 Contaminação populacional por mercúrio: o caso Amazônia**

Nas últimas décadas, a presença de Hg na Amazônia e seu potencial risco à saúde humana deu origem a muita preocupação. Na Amazônia Brasileira, altos níveis de Hg foram encontrados no solo e na água (FADINI & JARDIM, 2001). A população ribeirinha local está exposta cronicamente a altos níveis de MeHg através do consumo dos peixes (BASTOS et al., 2006; PASSOS & MERGLER, 2008; PINHEIRO et al., 2008; BERZAS-NEVADO et al., 2010; GROTTTO et al., 2011b). Constatação que só foi realizada no final da década de 1970, quando foi realizada intensa mineração de ouro, o que resultou na liberação do Hg na atmosfera (através da queima do amálgama – liga metálica entre o ouro e o Hg), perdas/despejos deste metal no solo e no leito dos rios (MARTINELLI et al., 1988; BARBOSA et al., 1995).

Porém, embora os elevados níveis de Hg tenham sido primariamente atribuídos às atividades de mineração do ouro (HYLANDER, 1994; MALM et al., 1990) estudos mais recentes também observaram altas concentrações de Hg, tanto em peixes quanto em humanos, em regiões onde não houve mineração de ouro (GUIMARÃES et al., 1999; SILVA-FORSBERG et al., 1999; DÓREA, 2003). De fato, o solo amazônico contém uma importante reserva de Hg (ROULET et al., 1998, 1999, 2000a,b; FADINI & JARDIM, 2001), e uma parte significativa da contaminação do sistema aquático pelo Hg é causada pelo desflorestamento, devido à massiva colonização daquele período e da cultura de corte-e-queimadas, para agricultura e pecuária, que gerou intensa erosão de solos ricos em Hg de ocorrência natural, expondo esse metal aos processos de oxidação, evaporação e lixiviação, contribuindo, por sua vez, com a contaminação dos rios (ROULET et al., 1999; ALMEIDA et al., 2005; FARELLA et al., 2001, 2006).

Logo, na Amazônia, parece que o Hg de diferentes fontes está disponível para os processos de metilação, contaminando os peixes, que constituem a base da dieta da população que vive ao longo do leito dos rios (BOISCHIO et al., 1995; LEBEL et al., 1997; DOLBEC et al., 2001). Assim, as populações ribeirinhas da Amazônia que caracteristicamente utilizam o pescado local como principal fonte alimentar estão seriamente ameaçadas pelo Hg orgânico que se concentra nos diferentes níveis tróficos das cadeias alimentares. Estudos epidemiológicos da população ribeirinha têm demonstrado associação dose-dependente entre consumo de peixe, exposição ao MeHg e efeitos adversos como déficits neurológicos e neuropsicológicos, assim como mudanças citogenéticas têm sido relatadas em adultos e/ou crianças dessas áreas (LEBEL et al., 1996, 1998; GRANDJEAN et al., 1999; AMORIM et al., 2000; DOLBEC et al., 2000; HARADA et al., 2001; CORDIER et al., 2002; YOKOO et al., 2003). Adicionalmente, estudos exploratórios na região do Tapajós sugerem que o Hg pode estar associado ao aumento da pressão sanguínea (FILLION et al., 2006) e disfunção autoimune (SILVA et al., 2004).

Apesar da alta concentração de Hg nas populações ribeirinhas, nem sempre estas parecem ser acompanhadas por efeitos tóxicos esperados (FILLION et al., 2009). Esta condição tem gerado estudos complementares e hipóteses que tem como objetivo explicar tais resultados. Entre estas hipóteses acredita-se que a dieta poderia ser um elemento protetor contra a intoxicação ao Hg (PASSOS et al., 2007). Entretanto, a genética também poderia contribuir na modulação de tais efeitos tóxicos (GUNDACKER et al., 2009). Em ambos os casos se faz necessário entender os mecanismos de toxicidade do Hg.

### **3.3 Mecanismos de toxicidade**

O processo responsável por desencadear a toxicidade MeHg não está totalmente esclarecido. Entretanto, provavelmente, envolve alterações metabólicas importantes como aumento do estresse oxidativo (SARAFIAN, 1999; SU et al., 2008) e da resposta

inflamatória (HAVARINASAB & HULTMAN, 2005; VAS & MONESTIER, 2008; GARDNER et al., 2010) devido a sua alta afinidade por moléculas com grupamentos tióis, como a glutatona reduzida (GSH), cisteína, N-acetilcisteína, metalotioneína e albumina (CLARKSON, 1997). Tais moléculas são a base do transporte, ligação, distribuição, metabolismo e detoxicação do MeHg em sistemas biológicos (ZALUPS, 2000). Além disso, estudos demonstraram que o Hg está relacionado com mudanças na atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) (ARIZA et al., 1998) e catalase (CAT) (HUSSAIN et al., 1999), indução a produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs), especialmente o  $H_2O_2$  e o  $O_2^{\cdot-}$  (LUND et al., 1991; DO NASCIMENTO et al., 2008), que promovem estresse oxidativo, peroxidação lipídica e genotoxicidade (GROTTO et al., 2010, 2011b).

A este respeito, investigações em comunidades ribeirinhas Amazônicas expostas a altos níveis de Hg apresentaram indicação de estresse oxidativo medidos em sangue total, plasma e cabelo. No caso, quanto maiores os níveis de Hg menores foram os níveis das enzimas antioxidantes glutatona peroxidase (GPx) e CAT que catalisam a  $H_2O_2$  em  $H_2O$  (GROTTO et al., 2010). No entanto, a dinâmica do processo toxicológico do Hg na célula humana e tecidos envolvendo o metabolismo oxidativo é difícil de determinar devido à influência de vários fatores ambientais e genéticos.

### **3.4 O dilema dos perfis de toxicidade**

Estudos conduzidos em diferentes partes do mundo têm mostrado diferenças na toxicidade do Hg em populações expostas à doses relativamente similares de MeHg (GRANDJEAN et al., 1997; MYERS et al., 1997, 2003; LEBEL et al., 1998; DOLBEC et al., 2000; WHEATLEY & PARADIS, 2000). Como foi anteriormente comentado, pesquisas relataram alto nível de contaminação por Hg em comunidades ribeirinhas da Amazônia. Entretanto, ao contrário do esperado foi observada uma baixa incidência de efeitos colaterais e de desenvolvimento de doenças e disfunções crônicas degenerativas (FILLION et al., 2009). Essas inconsistências na toxicidade do MeHg são

frequentemente atribuídas ao possível efeito da modulação da dieta, embora o mecanismo das interações entre nutrientes e MeHg não tenham sido ainda completamente elucidados (CHAPMAN & CHAN, 2000).

### **3.5 Toxicogenética associada à contaminação por mercúrio**

Investigações mostraram que alguns fatores genéticos podem modificar a toxicocinética do Hg (absorção, distribuição, biotransformação e processos de eliminação) que é um requisito essencial para a compreensão dos riscos à saúde individuais associados com a exposição ao Hg. Gundacker et al. (2010) analisaram potenciais genes de suscetibilidade considerando aqueles que desempenham um papel significativo na toxicocinética do Hg incluindo as enzimas relacionadas ao controle e utilização da glutatona reduzida (GSH), como a GPx e glutatona-S-transferase (GST) (CUSTODIO et al., 2004; KLAUTAU-GUIMARÃES et al., 2005; SCHLÄWICKE ENGSTRÖM et al., 2008; GUNDAKER et al., 2009), às metalotioneínas (GIACCONI et al., 2007; GUNDAKER et al., 2007), as proteínas associadas a absorção e depuração do Hg pelo organismo (BOADO et al., 2005).

Estudos sobre polimorfismos genéticos relacionados ao estresse oxidativo provocado pela intoxicação e metabolismo do Hg estão centrados principalmente na GSH e enzimas relacionadas (WESTPHAL et al., 2000; CUSTÓDIO et al., 2004; GUNDAKER et al., 2007; SCHLÄWICKE ENGSTRÖM et al., 2008; LEE et al., 2010; ENGSTRÖM et al., 2011; HARARI et al., 2011). No entanto, para definir com segurança os grupos de risco geneticamente susceptíveis, também é necessário investigar os genes/proteínas envolvidas na toxicodinâmica, isto é, nos mecanismos responsáveis pelos efeitos adversos no organismo (GUNDAKER et al., 2010). Assim, estudos envolvendo polimorfismos de outras enzimas antioxidantes podem auxiliar na compreensão da variação da susceptibilidade ao Hg encontradas entre diferentes indivíduos. Este é o caso da enzima SOD2 que atua na mitocôndria, organela

responsável por grande produção de EROs em condições fisiológicas (ZOROV et al., 2006).

### 3.6 Superóxido dismutase dependente de manganês

A superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD ou SOD2) é uma enzima antioxidante primária na mitocôndria que converte o  $O_2^{\cdot -}$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$  (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). No caso, o  $O_2^{\cdot -}$  é produzido dentro da mitocôndria através do escape de elétrons da fosforilação oxidativa. Estes elétrons estão envolvidos na produção de energia através da cadeia de transporte elétrons mitocondrial (Complexo I e III). O  $O_2^{\cdot -}$  é liberado para a matriz mitocondrial através do Complexo I, sendo também liberado tanto para a matriz quanto no espaço intermembranas da mitocôndria pelo complexo III (MURPHY, 2009; BAFANA et al., 2011).

Além de ser um importante local de produção de EROs, as mitocôndrias são alvo das mesmas e de espécies reativas de nitrogênio (ERNs). A produção continuada e crescente destas moléculas gera estresse oxidativo grave que, por sua vez pode levar ao comprometimento na estrutura e função mitocondrial (ZOROV et al., 2006). Assim, o desbalanço na produção de EROs pode representar o estabelecimento de um ciclo vicioso que amplifica a produção de EROs mitocondrial, causando danos oxidativos ao DNA mitocondrial (mtDNA), que induz a disfunção mitocondrial e estimula uma maior geração de EROs (FUKAI & USHIO-FUKAI, 2011).

Assim, o controle dos níveis de  $O_2^{\cdot -}$  pela SOD2 desempenha uma função essencial para a mitocôndria (LI et al., 1995). Investigações em modelos experimentais *knockout* mostrou que a ausência do gene da enzima e, portanto, da sua atividade na mitocôndria, provoca sérios danos ainda nos primeiros dias de vida provocando cardiomiopatia dilatada e neurodegeneração, levando à morte pós-natal precoce (LEBOVITZ et al., 1996; JANG & REMMEN, 2009).

Por outro lado, a super expressão da SOD2 não acarreta benefícios às células. Isto porque, ao contrário das outras SODs celulares que exercem sua atividade em

função dos níveis, não somente do  $O_2^{\cdot-}$  mas também de  $H_2O_2$ , a SOD2 enquanto houver excesso de  $O_2^{\cdot-}$  vai dismutando este radical livre e formando de modo continuado o  $H_2O_2$ . Se não ocorrer ação das demais enzimas antioxidantes (GPX e CAT) ou de compostos antioxidantes não-enzimáticos armazenados na célula o excesso de  $H_2O_2$  pode desencadear a produção de outras EROs como o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), via reação de Fenton, e o peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ) desencadeando assim efeitos genotóxicos e de lipoperoxidação que são danosos as células. Assim, a super expressão da SOD2 tem sido associada a fenômenos fisiológicos e disfuncionais importantes como a indução da angiogênese, diferenciação celular, e hipertensão pulmonar através da geração de moléculas sinalizadoras de  $H_2O_2$  na mitocôndria ao invés de sua função antioxidante (FUKAI & USHIO-FUKAI, 2011).

Em termos genéticos, o gene humano da enzima SOD2 está localizado no DNA nuclear. Deste modo, inicialmente é produzido um mRNA que migra para o citoplasma a fim de ocorrer a síntese da proteína SOD2 que ainda não é funcional. Esta proteína possui uma sequência polipeptídica denominada MTS que direciona a proteína SOD2 para o interior da mitocôndria. Neste local, a enzima SOD2 é finalmente ativada e passa a apresentar atividade (ZELKO et al., 2002). Em seres humanos foi observado que o gene da SOD2 apresenta um polimorfismo dialélico que resulta na substituição do aminoácido alanina (A) no códon 16 (GCT) por uma valina (V) (GTT) da cadeia polipeptídica. Por este motivo este polimorfismo é denominado Ala16Val (Ala16Val SOD2) (ZELKO et al., 2002).

Tal polimorfismo afeta a importação da SOD2 na mitocôndria, leva a uma alteração estrutural da SOD2. No caso do alelo A produz uma SOD2 com forma  $\alpha$ -hélice enquanto o alelo V produz uma SOD2 com forma  $\beta$ -lâmina. Esta alteração afeta o transporte da SOD2 para dentro da mitocôndria. Os portadores do alelo V apresentam uma diminuição na eficiência de transporte desta enzima, bem como na sua atividade no interior da mitocôndria (SUTTON et al., 2003). Um estudo realizado por Sutton et al. (2005) sugeriu que o precursor Ala-SOD2 gera 30-40% SOD2 ativa do que o precursor Val-SOD2. Portanto, os resultados sugerem que a sequência alvo Ala-SOD2 (MTS) permite a importação da SOD2 mais eficientemente para a matriz mitocondrial, enquanto que a variante V provoca parada parcial do precursor no interior da



membrana interna e diminuição da formação do tetrâmero SOD ativo na matriz mitocondrial (SUTTON et al., 2005).

O polimorfismo Ala16ValSOD2 resulta em três genótipos: AA, VV e AV onde o genótipo AA, é mais eficiente na dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$  e o genótipo VV é menos eficiente (SUTTON et al., 2003). Entretanto, se o sistema enzimático e não enzimático que catalisa a  $H_2O_2$  não estiver funcionando plenamente portadores do genótipo AA podem apresentar excesso desta ERO, causando danos à célula. Já portadores do genótipo VV tendem a apresentar excesso do radical  $O_2^{\cdot-}$  que também causa danos para a célula. Portanto, parece que os dois genótipos homocigotos apresentam uma espécie de desbalanço basal da SOD2 em suas células (TAUFER et al., 2005; MONTAGNER et al., 2010).

Vários estudos, incluindo as investigações realizadas pelo grupo de pesquisa que executou o presente estudo, sugeriram que o polimorfismo Ala16ValSOD2 está associado a diferentes patologias estresse oxidativo-dependentes. Curiosamente, em alguns casos, o risco de doença está associado com o alelo A ou genótipo AA, como cânceres de próstata (TAUFER et al., 2005; ZEJNILOVIC et al., 2009; IGUCHI et al., 2009; MAO et al., 2010.), mama (COX et al., 2006; ERAS-ERDOGAN et al., 2009; BICA et al., 2009) e outros tipos de cânceres. Em outros casos, o risco de doença está ligado ao alelo V ou genótipo VV como complicações microvasculares do diabetes (JONES et al., 2010; TIAN et al., 2011), obesidade (MONTANO et al., 2009), hipercolesterolemia (DUARTE et al., 2010), e do potencial metastático do câncer de mama (BICA et al., 2010).

A partir destes resultados epidemiológicos foi delineado um protocolo *in vitro* para avaliar se as células portadoras do polimorfismo Ala16Val SOD2 poderiam apresentar resposta diferencial quando exposta a um agente tóxico como radiação ultravioleta (UV). Os resultados mostraram resposta diferencial *in vitro* dos genótipos Ala16Val SOD2 em linfócitos de indivíduos saudáveis ao estresse oxidativo induzido por UV. Em geral, culturas de células VV apresentaram linfócitos com viabilidade reduzida, menor índice mitótico e níveis mais elevados de lipoperoxidação do que os genótipos AA em controle e grupos de exposição à radiação UV (MONTAGNER et al., 2010).

Um estudo complementar mais recente também observou que a atividade antioxidante do medicamento para a indução da ovulação (citrato de clomifeno) era influenciada pelo polimorfismo Ala16Val SOD2 em um protocolo *in vitro* no qual foi utilizado células mononucleares sanguíneas periféricas humanas como modelo experimental (COSTA et al., 2012). Portanto estes estudos sugeriram que o polimorfismo Ala16Val SOD2 poderia ter ação toxicogénica e farmacogénica.

### **3.7 Células brancas sanguíneas: os leucócitos**

O uso de células sanguíneas para ensaios toxicológicos vem sendo amplamente utilizados, devido à facilidade de seu uso. As células brancas sanguíneas (CBS) incluem células mononucleares (linfócitos e monócitos) e polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos e eosinófilos), são as células de defesa do sistema imune, que por sua vez é afetado pelos efeitos deletérios do Hg (GIACCONI, et al., 2007, HAVARINASAB & HULTMAN, 2005; VAS & MONESTIER, 2008; GARDNER et al., 2010). O uso dessas células é interessante pela diferença de suscetibilidade de cada tipo celular ao mesmo agente químico, que pode se aproximar mais dos efeitos ao sistema imune do indivíduo, já que o mesmo não é composto por um único tipo celular, e talvez, essas pequenas variações intercelulares possam representar o efeito esperado no organismo como um todo se comparado com os efeitos obtidos com o uso de células isoladas, resultando numa “resposta média” ao agente tóxico.

CBS foram utilizadas com êxito em PBS para avaliar EROs quando comparado com a solução salina balanceada de Hank's (HBSS), com e sem glicose, apresentando fluorescência intermediária entre HBSS e tampão de Tris (FREITAS et al., 2009). Este estudo viabiliza o uso deste tampão para avaliar a produção de EROs e a viabilidade celular.

Com base neste contexto, a investigação do potencial efeito toxicogénico do polimorfismo Ala16Val SOD2 sobre a intoxicação pelo MeHg através do seu efeito na produção de EROs viabilidade célula de CBS humanas expostos ao MeHg poderia

ajudar a entender as diferenças relacionadas a suscetibilidade a este metal pesado entre as populações, uma vez que seus efeitos tóxicos são mediados principalmente pelo aumento do estresse oxidativo, a avaliação das EROs e da viabilidade celular permite averiguar se este polimorfismo é capaz de modular os efeitos ao MeHg.

## 4 RESULTADOS

Os resultados que fazem parte dessa dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito apresentado a seguir. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados, Referências Bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito. A apresentação do manuscrito está disposto da mesma forma que será submetido à revista *Toxicology and Applied Pharmacology* cujo título é “*Toxigenetic effect of Ala16Val MnSOD gene polymorphism on human leucocytes in vitro exposed to methyl mercury*”.

## **TOXIGENETIC EFFECT OF Ala16Val MnSOD GENE POLYMORPHISM ON LEUCOCYTES IN VITRO EXPOSED TO METHYLMERCURY**

Thaís Doeler Algarve<sup>a</sup>, Fernanda Barbisan<sup>b</sup>, Euler Esteves Ribeiro<sup>c</sup>, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte<sup>d</sup>, Maria Fernanda Mânica-Cattani<sup>e</sup>, Clarice Pinheiro Mostardeiro<sup>f</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>g</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 18, Santa Maria-RS, Brazil. ZP: 97105-900.

<sup>b</sup>Laboratório de Biogenômica, Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 19, Santa Maria-RS, Brazil. ZP: 97105-900.

<sup>c</sup>Universidade Aberta da Terceira Idade, Universidade do Estado do Amazonas

<sup>d</sup>Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima n. 1000, Prédio 21, Santa Maria-RS, Brazil. ZP: 97105-900.

Corresponding author: Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Address: Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 18, Santa Maria-RS, Brazil. ZP: 97105-900. Phone: 55-55-32208736, Fax: 55-55-32208239

Email: [ibmcruz@gmail.com](mailto:ibmcruz@gmail.com)

**Abstract**

The environmental contamination by methylmercury (MeHg) is a great health public concern in some world regions like Amazonia. The MeHg toxic effects seem to be influenced by environmental and genetic factors. However, there are few studies evaluating the genetic influence on MeHg toxicity in humans. Therefore, the aim of this present study was to evaluate the genetic influence of Ala16Val manganese superoxide dismutase gene polymorphism (Ala16Val-MnSOD) on cytotoxic effects of *in vitro* human leucocytes exposed to MeHg. Subjects were selected from 100 individuals genotyped to Ala16Val-MnSOD polymorphism (26,4±7,3 years) with different genotypes (AA=08, VV=06 and AV=12) to perform the *in vitro* tests. The reactive oxygen species (ROS) production was measured using 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) fluorimetric assay and the cell viability was measured using the MTT assay were performed in leucocyte samples with the same subjects exposed and not exposed to MeHg (2,5µM for 6h). The results showed that AA and VV-leucocytes exposed to MeHg did not increase the ROS levels when compared to the cells that were not exposed. However, the AV-leucocyte MeHg exposure increased the ROS levels. The cellular viability comparison among different genotypes exposed to MeHg showed lower AA-leucocyte viability when compared to VV-leucocytes, whereas heterozygous cells (AV) presented intermediary values. This occurred probably due to the fact of AA-leucocytes present a higher basal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production than other genotypes. The whole of these results suggests toxicogenetic effects of Ala16Val-MnSOD polymorphism in human cells exposed to MeHg.

**Key-words:** Methylmercury, MnSOD Ala16Val polymorphism, oxidative stress, toxicogenetic.

## INTRODUCTION

Methylmercury (MeHg) is well recognized as a potential threat to human health due to its capacity to cause systemic toxicity including damage to the body causing neurotoxic effects, motor function impairment (Clarkson and Magos, 2006; Mergler et al., 2007) immune, kidney, and cardiovascular systems dysfunctions (Moszczyński et al., 1998; Rutowski et al., 1998; Virtanen et al., 2007) and genotoxicity (Crespo-López et al., 2009, 2011; Grotto et al., 2009, 2011).

The process responsible for triggering MeHg toxicity is not totally elucidated and probably involves metabolic alteration such as an increase of oxidative stress (Sarafian, 1999; Su et al., 2008) and inflammatory response (Havarinasab and Hultman, 2005; Vas and Monestier, 2008; Gardner et al., 2010). Previous investigations described how MeHg is related to changes in antioxidant enzyme activity like superoxide dismutase (SOD) (Ariza et al., 1998) and catalase (CAT) (Hussain et al., 1999). It also induces the production of reactive oxygen species (ROS) especially hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot -}$ ) (Lund et al., 1991; Do Nascimento et al., 2008) which promotes oxidative stress and lipid peroxidation. Populations exposed to high Hg levels such as occur in Amazonian communities, showed that oxidative stress biomarkers measured in whole blood, plasma and hair, presented significant inverse relations with antioxidant enzymes like glutathione peroxidase (GPx) and CAT clearly demonstrated an association between Hg exposure and oxidative stress (Grotto et al., 2010). However, the dynamic of the Hg toxicological process in human cell and tissues involving an oxidative metabolism is difficult to determine due to the influence of several environmental and genetic factors.

On the other hand, genetic polymorphism studies related to oxidative stress triggered by Hg intoxication metabolism focused mainly on glutathione (GSH)-related enzymes (Westphal et al., 2000; Custodio et al., 2004; Gundacker et al., 2007; Engström et al., 2008; 2011; Lee et al., 2010; Harari et al., 2011). However, to completely define the genetically susceptible risk groups, research is also needed on the genes/proteins involved in the toxicodynamics, i.e., in the mechanisms causing adverse effects in the organism (Gundacker et al., 2010). Therefore, gene polymorphism studies involving other antioxidant enzymes could help us to understand the differences in Hg susceptibility found among different individuals.

This is the case of the manganese superoxide dismutase enzyme (MnSOD or SOD2) which is a primary antioxidant enzyme in the mitochondria that converts ROS into oxygen and  $H_2O_2$  (Ferreira and Matsubara, 1997). ROS in mitochondria are produced by an oxidative phosphorylation pathway involved in energy production in the mitochondrial electron transport chain; complex I and III are the primary source of  $O_2^{\cdot -}$  production in mitochondria. Superoxide is released into the matrix from complex I, whereas it is released into both matrix and inter-membrane space by complex III (Murphy, 2009). In addition to being a major site of ROS production, mitochondria are also a target for ROS and reactive nitrogen species (RNS) and are compromised by severe and/or prolonged oxidative stress (Zorov et al., 2006). This will represent a vicious cycle to amplify mitochondrial ROS, whereby mitochondrial ROS/RNS causes oxidative damage to mitochondrial DNA (mtDNA), which leads to further mitochondrial dysfunction and oxidant generation (Fukai and Ushio-Fukai, 2011).



The human SOD2 enzyme gene presents a diallelic polymorphism in the mitochondrial targeting sequence (MTS) that results in the replacement of alanine 16 (GCT) with a valine (GTT); known as the Ala16Val polymorphism (Ala16Val SOD2). This polymorphism affects the import of MnSOD into the mitochondria by altering the conformation of its leader signal (Zelko et al., 2002). This mutation may reflect a functional polymorphism of the mitochondrial transport of human SOD2. Ala16Val is implicated in a decreased efficiency of SOD2 transport into the target mitochondria in V allele carriers (Sutton et al., 2003). A study performed by Sutton et al. (2005) suggested the Ala-SOD2 precursor generated 30%–40% more SOD2 homotetramer than the Val-SOD2 precursor. Therefore, the Ala-SOD2 MTS allows efficient SOD2 import into the mitochondrial matrix, while the Val-variant causes a partial arrest of the precursor within the inner membrane and decreased formation of the active SOD tetramer in the mitochondrial matrix. The Ala16Val polymorphism results in three genotypes: AA, VV and AV (Sutton et al., 2005).

Several studies, including investigations performed by our team and other research groups, have suggested that the Ala16Val SOD2 polymorphism is associated with different oxidative stress-dependent pathologies. Interestingly, in some cases the disease risk is associated with the A allele or AA genotype as with prostate (Taufers et al., 2005; Zejnilovic et al., 2009; Iguchi et al., 2009; Mao et al., 2010), breast (Cox et al., 2006; Eras-Erdogan et al., 2009; Bica et al., 2009), and others cancers; disease risk is linked to the V allele or VV genotype as with diabetes microvascular complications (Jones et al., 2010; Tian et al., 2011), obesity (Montano et al., 2009),

hypercholesterolemia (Duarte et al., 2010), and breast cancer metastatic potential (Bica et al., 2010).

Recently, we started to test if this polymorphism could have some influence on the human body's response to toxic agents. In the first *in vitro* protocol that evaluated if the cell carriers of Ala16Val SOD2 polymorphism could present differential responses when exposed to ultraviolet radiation (UV) it was found that human VV-lymphocyte cell cultures presented lower viability, lower mitotic index and higher lipoperoxidation levels than AA genotypes in both control and UV exposure groups (Montagner et al., 2010). On the other hand, this polymorphism has some *in vitro* influence on antioxidant drug response (Costa et al., 2012).

Therefore, we postulated that Ala16Val SOD2 polymorphism could present some influence on white blood cells (WBC) MeHg *in vitro* exposure through modulation of different ROS concentration. The use of WBC is a good model to evaluate MeHg toxicity because it includes many cell types, with different MeHg sensibility. Those little differences may represent the MeHg impact in the whole body, being able to evaluate the impact of its toxicity depending on the Ala16ValSOD2 polymorphism. In order to evaluate it, we analyze ROS production and cellular viability.

## **METHODS**

### **Reagents**

All chemicals used for the biochemical and molecular analyses were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) and Cultilab Co. (São Paulo, SP, BR).

### **Subjects selection**

To test the MeHg cytotoxicity on human WBC carriers with different Ala16Val genotypes, to analyze ROS production and cell viability. The blood was obtained from healthy adult subjects living in a Brazilian region with no history of MeHg exposure (Rio Grande do Sul) enrolled within an university community (Universidade Federal de Santa Maria, UFSM). Initially, we selected 100 young, healthy people ( $26.4 \pm 7.3$  years old, sex 55 female and 45 male) and considered the following factors for inclusion: non-smokers, not obese, no use of chronic medication or vitamin supplements, no previous cardiovascular medical history or hypertensive disorder, and no metabolic diseases or other morbidity that could affect the results. The research study described here was approved by the Ethics Committee of the UFSM (no 23081.015838/2011-10). All blood cell donors signed a written informed consent.

### **Ala16Val SOD2 genotyping**

Blood samples were collected from this group by venipuncture, using Vacutainers® (BD Diagnostics, Plymouth, DEV, UK) tubes with EDTA and the Ala16Val gene polymorphism was assessed by the Polymerase Chain Reaction and the Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) method. Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using a DNA Purification Mini Kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA). The PCR-RFLP method used here to detect Ala-16Val polymorphism is described in detail by Costa et al. (2012).

### ***In vitro* treatments**

From these subjects, a sub-group was invited to donate blood again to realize the *in vitro* tests because a previous study performed by Montano et al. (2009) showed an

association between the Ala16Val polymorphism, dietary behavior, and health conditions. The 8 mL blood samples were collected by venipuncture using top tubes with heparin, which were centrifuged within 1 hour of collection for 15 minutes at 3000 rpm. Furthermore, the WBC were collected and resuspended in a PBS buffer with 2% glucose (PBSg) at a final concentration of  $1 \times 10^6$  cells/mL (Freitas et al., 2009). Two treatments were performed for each sample: negative control and MeHg at 2.5  $\mu$ M of final concentration exposure in PBSg (Shenker et al., 2002). The samples were maintained in sterile conditions at 37°C for 6 h; after this time, the viability and ROS production were analyzed and compared among *in vitro* treatments.

### **Cell viability assays**

The experiment was performed using a 96-well plaque. The cytotoxicity was evaluated by MTT (3-[4,5dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolic bromide) reduction assay described by Mosmann et al. (1983), in spectrophotometry at 570nm (SpectraMax M2/M2e Multi-mode Plate Reader, Molecular Devices Corporation, CA, USA). All tests were performed in triplicate for each sample tested.

### **Reactive Oxidative Species (ROS) WBCs production**

In all treatments, intracellular ROS production was detected in WBC samples using the non-fluorescent cell permeating compound 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA). DCFDA is hydrolyzed by intracellular esterases to DCFH, which is trapped within the cell. This non-fluorescent molecule is then oxidized to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) by cellular oxidants. After the designated exposure time, the cells were treated with DCFDA (10  $\mu$ M) for 60 minutes at 37°C. The fluorescence was measured at an excitation of 485nm and an emission of 520nm (SpectraMax M2/M2e

Multi-mode Plate Reader, Molecular Devices Corporation, CA, USA). All tests were performed in triplicate for each of the samples tested (Lebel et al., 1992; Halliwell and Whiteman, 2004).

### **Statistics**

All analyses were carried out using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS), version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). The cytotoxicity and ROS production on WBC samples from different Ala16Val SOD2 donors treated with and without MeHg was compared using the One-way analysis of variance followed by a *post hoc* Tukey's test. All p values were two-tailed. The alpha value was set to < 0.05 to determine statistical relevance.

### **RESULTS**

The SOD2 genotype frequencies were as follows: AA= 31%, VV= 23% and AV= 46%. The calculation of possible deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium, which was used to assess the  $\chi^2$  goodness-of-fit, showed that the samples were in genetic equilibrium. From this sample, we selected 26 volunteers (AA=08, VV=06 and AV=12) with similar self-report lifestyle behaviors regarding diet and physical activity to perform the WBC *in vitro* exposure to avoid possible environmental interferences.

Initially, we evaluated the potential toxicity of MeHg treatment considering the whole of WBC samples. We observed that after *in vitro* treatment, the viability of WBC exposed to MeHg decreased significantly to  $89.1 \pm 15.4$  % ( $p= 0.022$ ). On the other hand, the ROS production increased 16.9%, with a 15% of standard deviation indicating large sample variability in the WBC treated with MeHg when compared to the control group ( $p= 0.032$ ).

The viability and ROS production was also compared among WBC samples, using different Ala16Val SOD2 genotypes without MeHg treatments. After six hours, the WBC *in vitro* viability showed differences among Ala16Val SOD2 genotypes. The absorbance in AA ( $3.46 \pm 0.13$  SE) and AV ( $3.23 \pm 0.8$  SE) groups was significantly higher than the VV group ( $3.08 \pm 0.77$  SE) ( $p=0.033$ ) indicating that VV cells presented lower viability than AA and AV cells independent of MeHg treatment. The ROS production was also higher in VV than in AA and AV groups (VV=  $477.7 \pm 137.45$ ; AA=  $343.9 \pm 184.3$ ; AV=  $297.0 \pm 155.7$   $p=0.0001$ ).

The MeHg WBC cytotoxicity and ROS production was influenced by the Ala16ValSOD2 genotypes. As can be seen in Figure 1, in the AA-WBC samples, the ROS production was similar between the control and MeHg treatments ( $p= 0.532$ ). Similar results were also observed in VV-WBC samples ( $p=0.516$ ). However, in the heterozygous (AV-WBC), the ROS production increased 27% when exposed to MeHg ( $p= 0.037$ ).

Figure 1 here

Despite the AA-WBC presenting similar ROS production between the control and MeHg treatments, cell viability decreased significantly in the presence of MeHg ( $p= 0.020$ ). As can be seen in Figure 2, these results were not observed in VV-WBC and AV-WBC groups, where the cell viability was similar between the control and MeHg treatments ( $p= 0.145$ , and  $p=0.759$ , respectively).

Figure 2 here

## DISCUSSION

The *in vitro* exposure of human WBCs to MeHg obtained from different human subjects increased the ROS production and decreased cell viability according to the genotype. The results corroborate investigations performed in animals and *in vitro* protocols that showed an increase on cellular MeHg-induced oxidative stress which was also present with cytotoxicity effect (Barcelos et al. 2011; Farina et al., 2011).

*In vivo* and *in vitro* studies showed that MeHg-exposed systems from different species present an increase in different reactive species such as  $O_2^{\cdot -}$ ,  $H_2O_2$  and nitric oxide (NO) (Farina et al., 2011). Excessive free radical formation has been implicated as one of the causative factors in neurotoxic damage associated with a variety of metals, including MeHg. MeHg-induced increased the ROS formation in astrocytes (Shanker et al., 2004), as well as in the presence of  $O_2^{\cdot -}$  and hydroxyl scavenger antioxidant molecules attenuates the ROS MeHg-induced formation (Shanker et al., 2005). Filipak Neto et al. (2008) and Bussolaro et al. (2010) investigating the hepatocytes of tropical fishes *Hypostomus commersoni* and *H. malabaricus* indicating that MeHg deregulate the redox intracellular milieu leading to cell death and oxidative stress.

The severity of a toxic effect depends on the dose, duration and timing of exposure. Humans, however, show a greatly varying susceptibility towards toxic substances even under comparable exposure situations. Several biological and non-biological factors can modulate individual susceptibility to toxic compounds (e.g., age, gender, diet). The genetic variation plays a key role because it constitutes various detoxifier phenotypes, ranging from individuals with regular enzyme and detoxification functions to the poor metabolizers with low or no enzyme activity to the high metabolizers (Gundacker et al., 2010).

In humans, the cytosolic glutathione-S-transferases catalyze the intracellular conjugation reaction between GSH and various electrophilic substrates, among them Hg. These GSH conjugates can be easily effluxed from the cells. The concomitant GSH depletion must be compensated by *de novo* synthesis (Dickinson and Forman, 2002). Thus, the interplay of all GSH-system components is required to confer that GSH affine Hg can be rapidly bound and removed from the cell (Gundacker et al., 2010).

There is evidence that gene variants can influence mercury toxicokinetics. This genetic background can therefore potentially explain some of the individual vulnerability towards mercury toxicity. Mercury is capable of altering the expression levels and/or activity of many genes/proteins, but functional proof is frequently lacking. There are many studies directly involving Hg toxicokinetic and detoxification pathways analyzing the impact of a gene knockout/knockdown or a gene sequence variation (mostly SNPs) (Gundacker et al., 2010), though none of them are SNPs indirectly related to its toxicity as SODs are by ROS toxicity pathways. The major daily source of ROS in the cell is the mitochondria in which SOD2 is located to protect against  $O_2^{\cdot -}$ , and the Ala16Val polymorphism is playing its role.

Our results were directly influenced by Ala16Val SOD2 genotypes of WBC samples. VV-WBCs exposed to MeHg did not present an increase in ROS production nor did they present similar cell viability when compared to the control group, suggesting a protective role against Hg intoxication. Despite this, the AA-WBC present similar ROS production between cells with and without MeHg exposition, while the cells exposed to MeHg decreased cell viability compared to the control group. The heterozygous genotype presented the intermediary phenotype of AA and VV-WBC since the increase



occurred in ROS production, but did not decrease cell viability. The potential protective effect of VV genotype that, in the presence of MeHg, did not show an increase in ROS production and cell mortality, can be related to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production that is lower than the AA genotype.

The SOD2 enzyme belongs to a set of antioxidant defense mechanisms that prevent high levels of ROS, limiting their deleterious effects to macromolecules into the cell. As the O<sub>2</sub><sup>•-</sup> is produced by NADPH oxidase, xanthine oxidase, nitric oxide synthase, lipoxygenase, and mitochondrial enzymes, so the levels of its molecule must be highly controlled by the cell. Superoxide radical is converted by SOD to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which in turn, is reduced to water by CAT, GPx, and peroxiredoxins (Prx). Thus, SOD2, as well as others SODs, is considered a first line of defense against toxicity of O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Fukai and Ushio-Fukai, 2011).

This enzyme is synthesized in the cytoplasm and directed to the mitochondria by a peptide signal where it is involved in dismutating O<sub>2</sub><sup>•-</sup>; mainly generated by the electron transport chain from cellular respiration. The Ala16Val SOD2 polymorphism presented in the peptide signal region has two homozygous genotypes with unbalanced SOD2 activity since the AA genotype present high and VV lower efficiency in enzyme transport into the mitochondria. In biochemical terms, the AA genotype is able to convert a high quantity of O<sub>2</sub><sup>•-</sup> in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. However, unlike SOD1, SOD2 does not exhibit product inhibition by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the excess of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by AA can undergo spontaneous conversion or react with transition metals producing a hydroxyl radical (•OH) (Asada et al., 1975; Beyer and Fridovich, 1987). As the •OH presents high affinity to the DNA molecule causing mutations, the Ala allele or genotype AA has been associated with

increased risk for breast cancer (Taufer et al., 2005; Bica et al., 2009; Zejnilovic et al., 2009).

On the other hand, the VV genotype did not present an efficient  $O_2^{\cdot-}$  dismutation in  $H_2O_2$ . The  $O_2^{\cdot-}$  is extremely reactive mainly with NO leading to the production of the strong oxidant peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) that has a higher affinity to the lipids of the membrane causing lipoperoxidation. The VV genotype has been associated with carotid atherosclerosis (Kakko et al., 2003), non-familial dilated cardiomyopathy in Japanese subjects (Hiroi et al., 1999), higher oxidized LDL levels in Brazilian subjects with synergic effects in Type II diabetes patients (Gottlieb et al., 2005), obesity (Montano et al., 2009) and hypercholesterolemia (Duarte et al., 2010).

From the results described here and the results of previous studies performed by our research team, who observed that *in vitro* lymphocytes exposure to ultraviolet (UV) radiation produced less toxicological effect in AA cells than VV cells (Montagner et al., 2010), we can postulated that a SOD2 gene presents a dual toxic protective characteristic dependent of toxic agents (Figure 3). This dual characteristic is similar to what was observed in the association between SOD2 gene function and the susceptibility of non-transmissible diseases (Bica et al., 2009).

Figure 3 here

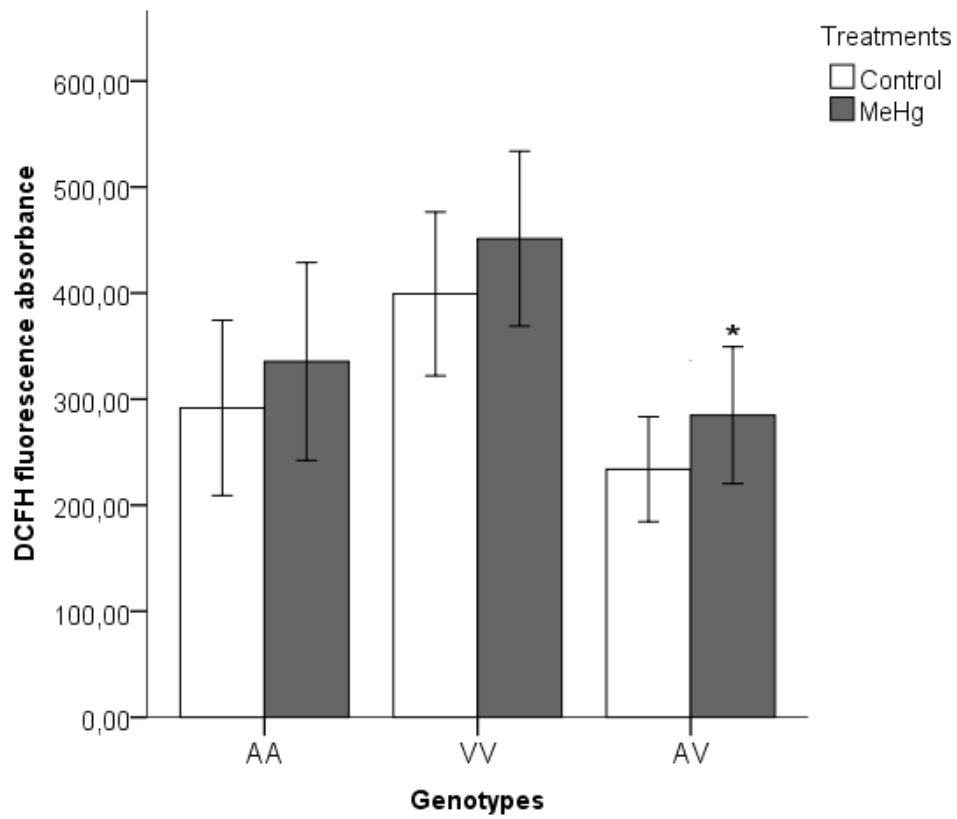
Unfortunately, studies supporting this hypothesis are still incipient. However, we can cite some investigations as performed by Lund et al. (1991) that observed that mercury compounds as mercuric ion  $[Hg(II)]$  present the  $H_2O_2$  as a principal intracellular target increasing approximately 4-fold its production in rat kidney mitochondria. The

authors suggest that the  $\text{H}_2\text{O}_2$  formation by  $\text{Hg}(\text{II})$  may lead to oxidative tissue damage, such as lipid peroxidation, observed in mercury-induced nephrotoxicity.

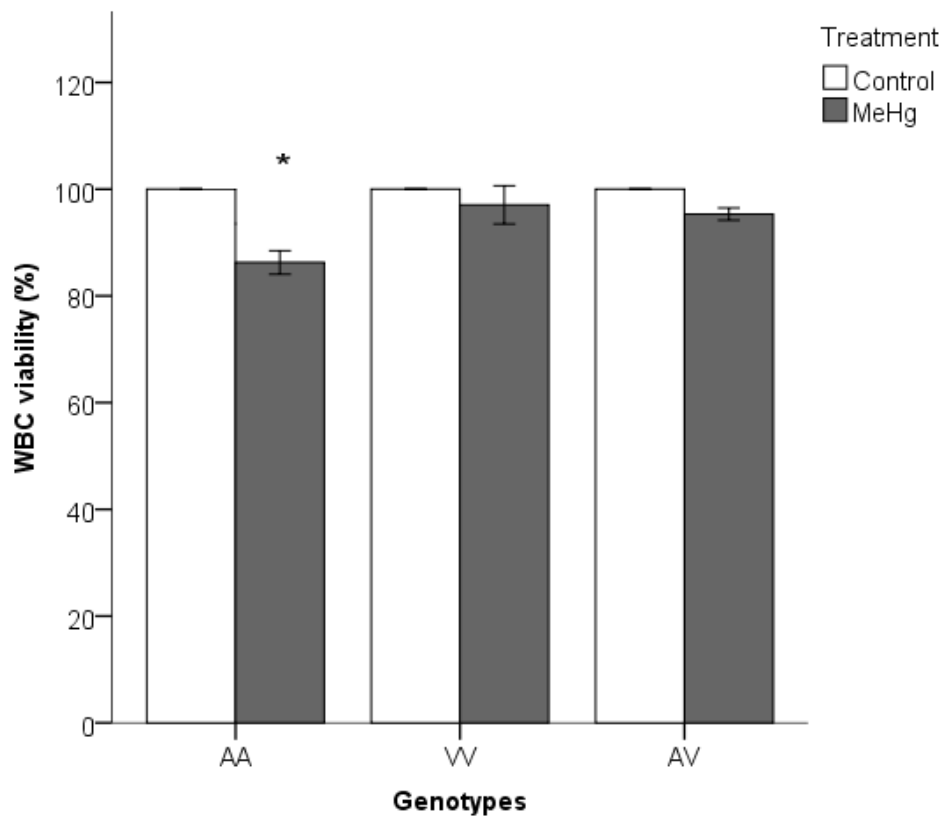
Another question that needs to be discussed is related to WBC as a potential cell affected by exposure to Hg. Studies using animal models have previously demonstrated that Hg affects the immune function in a complex manner. This influence depends on both the species of Hg used and the genetic background against which exposure takes place. In genetically susceptible mouse strains, inorganic and organic Hg species, including MeHg, induce autoimmunity, results in a lupus-like condition (Havarinasab and Hultman, 2005). Investigations suggest that humans may also be susceptible to the immunotoxic effects of MeHg exposure and have been associated with an increased risk of lupus and greater severity of scleroderma (Arnett et al., 1996; Cooper et al., 2004; Prochazkova et al., 2004). Among the toxic effects of MeHg on leukocytes, a stimulation of ROS formation was observed, including  $\text{O}_2^{\cdot -}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Jansson and Harms-Ringdahl, 1993). Therefore, the WBC can be a good model to *in vitro* evaluation of the potential influence of human genetic polymorphisms in response to Hg contamination. Based on these results, complementary investigations could help us understand the cell biochemical influence of SOD2 modulation in MeHg toxicity.

The study described here presents some methodological concerns on which we need to comment. The choice to perform a short test was based on the idea that the protocol includes a large number of subjects to evaluate the toxic effect in *in vitro* human blood samples exposed to MeHg. The classic leukocyte cell culture becomes no realistic the analysis of blood some several subjects with different gene polymorphism genotypes.

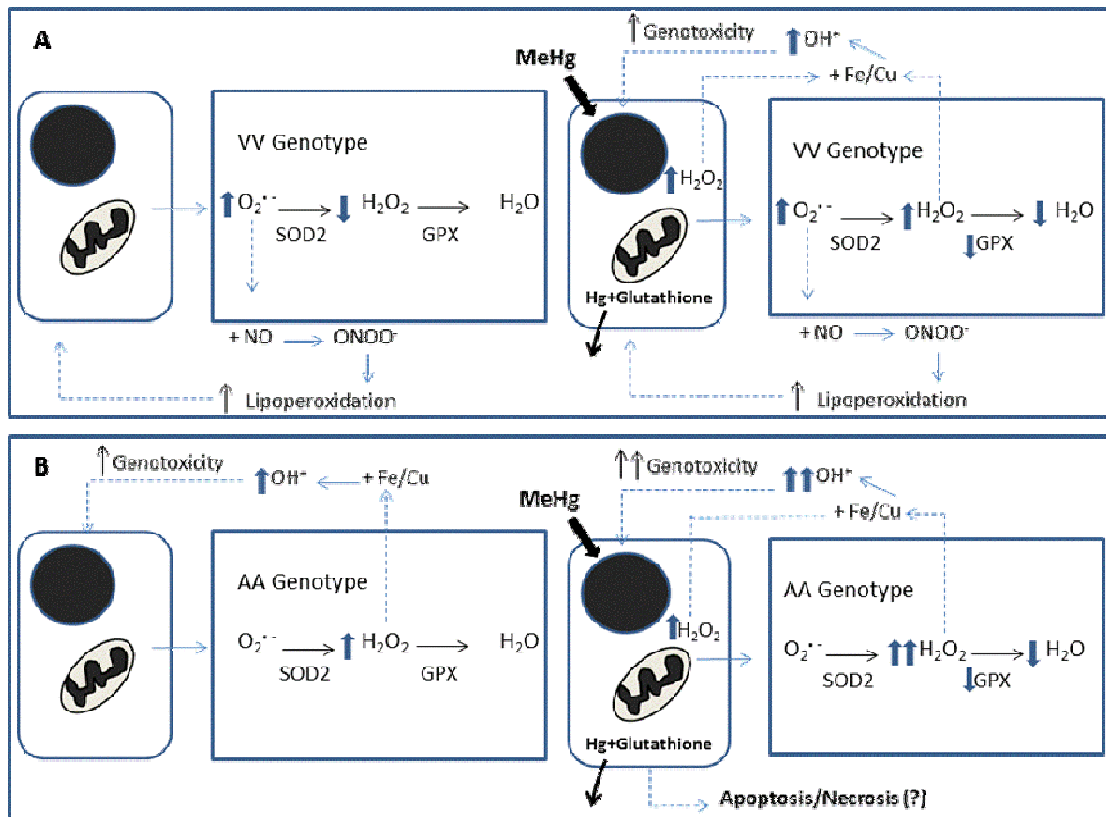
On the other hand, the use of mononuclear cells greatly decreases the concentration of the sample of leukocytes that could difficult the analysis of oxidative biomarkers. Additionally, the protocol used here did not permit the analysis of different oxidative and antioxidant biomarkers in the samples exposed or not exposed to MeHg. However, these limitations can be solved through complementary cell culture studies which search the causal mechanisms to discover if the genetic polymorphism presents some toxic response influence as observed in the present study. Since human studies involving controlled toxicological exposure are ethically inappropriate, despite these methodological limitations studies, that integrate genetic polymorphism and *in vitro* protocol as performed here can be useful to our understanding about toxicogenetic effects to compounds as Hg.



**Figure 1** Reactive oxygen production (ROS) comparison among white blood cell carriers (WBC) and different Ala16Val SOD2 genotypes. \* indicates a significant increase from the control group ( $p < .05$ ).



**Figure 2** Viability (% in relation to control group considered as 100% viability) between WBC with different Ala16Val SOD2 genotypes exposed to MeHg compound. \* indicates significant increase from the control group ( $p < .05$ ).



**Figure 3** Synthesis of the potential protective role of human VV genotypes of Ala16Val SOD2 gene polymorphism on toxic effect caused by MeHg acute exposition. (A) VV genotype metabolizes smaller rates of  $O_2^{\cdot -}$  than AV and AA genotypes, which can react to NO producing  $ONOO^{\cdot}$ , resulting in lipoperoxidation. When Hg enters into the cell, MeHg rapidly binds to reduced glutathione (GSH) besides binding other thiol groups (-SH) present in proteins. Not only does GSH deflect mercury from binding to target proteins inside the cell, but it also serves as a means of removing mercury from the cells. As GSH is consumed through mercury binding, lower amounts of this molecule are available to prevent  $H_2O_2$  toxic effects, which in turn (by Fenton's reaction or spontaneously) produce  $^{\cdot}OH$  that leads to DNA damage. (B) AA genotype presents the highest  $O_2^{\cdot -}$  dismutation rates between genotypes resulting in excessive production of  $H_2O_2$  that needs to be processed by glutathione (mitochondria and cytoplasm) and catalase (cytoplasm). However,  $H_2O_2$  production rates exceeding enzymatic metabolism capacity in physiological conditions, results in DNA damage. This genotype, in the presence of Hg, is exposed to a higher amount of  $H_2O_2$  than they are used to, leading to an increase in DNA damage, reaching the cell apoptosis/necrosis.

## **References**

- Ariza, M.E., Bijur, G.N., Williams, M.V., 1998. Lead and mercury mutagenesis: role of h<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, superoxide dismutase, and xanthine oxidase. *Environ. Mol. Mutagen.* 31, 352-61.
- Arnett, F.C., Reveille, J.D., Goldstein, R., Pollard, K.M., Leaird, K., Smith, E.A., Leroy, E.C., Fritzler, M.J., 1996. Autoantibodies to fibrillarin in systemic sclerosis (scleroderma). An immunogenetic, serologic, and clinical analysis. *Arthritis Rheum.* 39, 1151-60.
- Asada, K., Yoshikawa, K., Takahashi, M., Maeda, Y., Enmanji, K., 1975. Superoxide dismutases from a blue-green alga, *Plectonema boryanum*. *J. Biol. Chem.* 250, 2801–2807.
- Barcelos, G.R., Grotto, D., Serpeloni, J.M., Angeli, J.P., Rocha, B.A., De Oliveira Souza, V.C., Vicentini, J.T., Emanuelli, T., Bastos, J.K., Antunes, L.M., Knasmüller, S., Barbosa, F.Jr., 2011. Protective properties of quercetin against dna damage and oxidative stress induced by methylmercury in rats. *Arch Toxicol.* 85, 1151-7.
- Beyer, W.F.Jr., Fridovich, I., 1987. Effect of hydrogen peroxide on the iron-containing superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 26, 1251–1257.
- Bica, C.G., Silva, L.L.M., Toscani, N.V., Cruz, I.B.M., Sá, G., Graudenz, M.S., Zettler, C.G., 2009. MnSOD Gene Polymorphism Association with Steroid-Dependent Cancer. *Pathol. Oncol. Res.* 15, 19-24.
- Bica, C. G.; Da Silva, L. L.; Toscani, N. V.; Zettler, C. G.; Gottlieb, M. G.; Alexandre, C. O.; Graudenz, M. S.; Mânica Da Cruz, I. B. 2010. Polymorphism (ALA16VAL) correlates with regional lymph node status in breast cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 196, 153-8.
- Bussolaro, D., Filipak Neto, F., Ribeiro, C.A., 2010. Responses of hepatocytes to DDT and methyl mercury exposure. *Toxicol. In Vitro* 24, 1491-7.
- Clarkson, T.W., Magos, L., 2006. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 36, 609-62.
- Cooper, G.S., Parks, C.G., Treadwell, E.L., St Clair, E.W., Gilkeson, G.S., Dooley, M.A. 2004. Occupational risk factors for the development of systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 31, 1928-33.
- Costa, F., Dornelles, E., Mânica-Cattani, M.F., Algarve, T.D., Souza Filho, O.C., Garcia, L.F.M., da Cruz, I.B.M., 2012. Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the in-vitro effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism. *Reprod. Biomed. Online* [In Press].
- Cox, D.G., Tamimi, R.M., Hunter, D.J., 2006. Gene x Gene interaction between MnSOD and GPX-1 and breast cancer risk: a nested case-control study. *BMC Cancer* 6, 217.
- Crespo-López, M.E., Macêdo, G.L., Arrifano, G.P., Pinheiro, M. da C., do Nascimento, J.L., Herculano, A.M., 2011. Genotoxicity of mercury: contributing for the analysis of Amazonian populations. *Environ. Int.* 37, 136-41.
- Crespo-López, M.E., Macêdo, G.L., Pereira, S.I.D, Arrifano, G.P., Picanço-Diniz, D.L.W., do Nascimento, J.L., Herculano, A.M., 2009. Mercury and human genotoxicity: critical considerations and possible molecular mechanisms. *Pharmacol. Res.* 60, 212–220.



- Custodio, H.M., Broberg, K., Wennberg, M., Jansson, J.H., Vessby, B., Hallmans, G., Stegmayr, B., Skerfving, S., 2004. Polymorphisms in glutathione-related genes affect methylmercury retention. *Arch. Environ. Health* 59, 588-95.
- Dickinson, D.A., Forman, H.J., 2002. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 64, 1019-1026.
- Do Nascimento, J.L.M., Oliveira, K.R., Crespo-Lopez, M.E., Macchi, B.M., Maués, L.A., Pinheiro, M.daC., Silveira, L.C., Herculano, A.M., 2008. Methylmercury neurotoxicity & antioxidant defenses. *Indian J. Med. Res.* 128, 373–382.
- Duarte, M.M., Moresco, R.N., Duarte, T., Santi, A., Bagatini, M.D., da Cruz, I.B., Schetinger, M.R., Loro, V.L., 2010. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. *Clin. Biochem.* 43, 1118-1123.
- Engström, K.S., Strömberg, U., Lundh, T., Johansson, I., Vessby, B., Hallmans, G., Skerfving, S., Broberg, K., 2008. Genetic variation in glutathione-related genes and body burden of methylmercury. *Environ. Health Perspect.* 116, 734-9.
- Engström, K.S., Wennberg, M., Strömberg, U., Bergdahl, I.A., Hallmans, G., Jansson, J.H., Lundh, T., Norberg, M., Rentschler, G., Vessby, B., Skerfving, S., Broberg, K., 2011. Evaluation of the impact of genetic polymorphisms in glutathione-related genes on the association between methylmercury or n-3 polyunsaturated long chain fatty acids and risk of myocardial infarction: a case-control study. *Environ. Health* 19, 10-33.
- Eras-Erdogan, N., Akbas, E., Senli, H., Kul, S., Colak, T., 2009. Relationship between polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene and breast cancer. *Mutat. Res.* 689, 7-11.
- Farina, M., Rocha, J.B., Aschner, M., 2011a. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. *Life Sci.* 89, 555-63.
- Farina, M., Aschner, M., Rocha, J. B., 2011b. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 256, 405-17.
- Ferreira, A.L.A., Matsubara, L.S., 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas e sistema de defesa e estresse oxidativo. *R. da Assoc. Méd. Bras.* 43, 61-68.
- Filipak Neto, F., Zanata, S.M., Silva De Assis, H.C., Nakao, L.S., Randi, M.A., Oliveira Ribeiro, C.A., 2008. Toxic effects of DDT and methyl mercury on the hepatocytes from *Hoplias malabaricus*. *Toxicol. In Vitro* 22, 1705-13.
- Freitas, M., Porto, G., Lima, J. L., Fernandes, E., 2009. Optimization of experimental settings for the analysis of human neutrophils oxidative burst in vitro. *Talanta* 78, 1476-83.
- Fukai, T., and Ushio-Fukai, M., 2011. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 1583-606.
- Gardner, R.M., Nyland, J.F., Silbergeld, E. K., 2010. Differential immunotoxic effects of inorganic and organic mercury species in vitro. *Toxicol. Lett.* 198, 182-90.
- Gottlieb, M.G.V., Shwanke, C.H.A., Santos, A.F.R., Jobim, P.F., Müssel, D.P., Cruz, I.B.M., 2005. Association among oxidized LDL levels, MnSOD, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. *Genet. Mol. Res.* 30, 691-703.

- Grotto, D., Barcelos, G.R., Valentini, J., Antunes, L.M., Angeli, J.P., Garcia, S.C., Barbosa Jr., F., 2009. Low levels of methyl mercury induce DNA damage in rats: protective effects of selenium. *Arch. Toxicol.* 83, 249–254.
- Grotto, D., Valentini, J., Fillion, M., Passos, C.J.S., Garcia, S.C., Mergler, D., Barbosa, F.Jr., 2010. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. *Sci. Total. Environ.* 408, 806-811.
- Grotto, D., Vicentini, J., Angeli, J.P., Latorraca, E.F., Monteiro, P.A., Barcelos, G.R., Somacal, S., Emanuelli, T., Barbosa, F. Jr., 2011. Evaluation of protective effects of fish oil against oxidative damage in rats exposed to methylmercury. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 487-93.
- Gundacker, C., Komarnicki, G., Jagiello, P., Gencikova, A., Dahmen, N., Wittmann, K.J., Gencik, M., 2007. Glutathione-S-transferase polymorphism, metallothionein expression, and mercury levels among students in Austria. *Sci. Total Environ.* 385, 37-47.
- Gundacker, C., Gencik, M., Hengstschläger, M., 2010. The relevance of the individual genetic background for the toxicokinetics of two significant neurodevelopmental toxicants: mercury and lead. *Mutat. Res.* 705, 130-40.
- Halliwell, B., Whitemann, M., 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142, 231-55.
- Harari, R., Harari, F., Gerhardsson, L., Lundh, T., Skerfving, S., Strömberg, U., Broberg, K., 2011. Exposure and toxic effects of elemental mercury in gold-mining activities in Ecuador. *Toxicol. Lett.* [Epub ahead of print]
- Havarinasab, S., Hultman, P., 2005. Organic mercury compounds and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 4, 270-5.
- Hiroi, S., Harada, H., Nishi, H., Satoh, M., Nagai, R., Kimura, A., 1999. Polymorphisms in the SOD2 and HLA-DRB1 genes are associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 332-9.
- Hussain, S., Atkinson, A., Thompson, S.J., Khan, A.T., 1999. Accumulation of mercury and its effect on antioxidant enzymes in brain, liver, and kidneys of mice. *J. Environ. Sci. Health B* 34, 645-60.
- Iguchi, T., Sugita, S., Wang, C.Y., Newman, N.B., Nakatani, T., Haas, G.P., 2009. MnSOD genotype and prostate cancer risk as a function of NAT genotype and smoking status. *In Vivo* 23, 7-12.
- Jansson, G., Harms-Ringdahl, M., 1993. Stimulating effects of mercuric and silver ions on the superoxide anion production in human polymorphonuclear leukocytes. *Free Radic. Res. Commun.* 18, 87-98.
- Jones, D.A., Prior, S.L., Tang, T.S., Bain, S.C., Hurel, S.J., Humphries, S.E., Stephens, J.W., 2010. Association between the rs4880 superoxide dismutase 2 (C>T) gene variant and coronary heart disease in diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 90, 196-201.
- Kakko, S., Päivänsalo, M., Koistinen, P., Kesäniemi, Y.A., Kinnula, V.L., Savolainen, M.J., 2003. The signal sequence polymorphism of the MnSOD gene is associated with the degree of carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 168, 147-52.

- Lebel, C.P., Ischiropoulos, H., Bondy, S.C., 1992. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 227–231.
- Lee, B.E., Hong, Y.C., Park, H., Ha, M., Koo, B.S., Chang, N., Roh, Y.M., Kim, B.N., Kim, Y.J., Kim, B.M., Jo, S.J., Ha, E.H., 2010. Interaction between GSTM1/GSTT1 polymorphism and blood mercury on birth weight. *Environ. Health Perspect.* 118, 437-43.
- Lund, B.O., Miller, D.M., Woods, J.S., 1991. Mercury-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and lipid peroxidation in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 42, 181-7.
- Mao, C., Qiu, L.X., Zhan, P., Xue, K., Ding, H., Du, F.B., Li, J., Chen, Q., 2010. MnSOD Val16Ala polymorphism and prostate cancer susceptibility: a meta-analysis involving 8,962 subjects. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 136, 975-9.
- Mergler, D., Anderson, H.A., Chan, L.H., Mahaffey, K.R., Murray, M., Sakamoto, M., Stern, A.H., Panel on Health Risks and Toxicological Effects of Methylmercury, 2007. Methylmercury exposure and health effects in humans: a worldwide concern. *Ambio* 36, 3-11.
- Montagner, G.F.S., Sagrillo, M., Machado, M.M., Almeida, R.C., Mostardeiro, C.P., Duarte, M.M.M.F., Cruz, I.B.M., 2010. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicol. in Vitro* 24, 1410–1416.
- Montano, M.A.E., Lera, J.P.B., Gottlieb, M.G.V., Schwanke, C.H.A., Rocha, M.I.U.M., Manica-Cattani, M.F., Santos, G.F., Cruz, I.B.M., 2009. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity. *Mol. Cell. Biochem.* 328, 33-40.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65, 55-63.
- Moszczyński, P., Rutowski, J., Słowiński, S., Bem, S., 1998. Immunological effects of occupational exposure to metallic mercury in the population of t-cells and nk-cells. *Analyst.* 123, 99–103.
- Murphy, M.P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1–13.
- Prochazkova, J., Sterzl, I., Kucerova, H., Bartova, J., Stejskal, V.D., 2004. The beneficial effect of amalgam replacement on health in patients with autoimmunity. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 25, 211–218.
- Rutowski, J., Moszczyński, P., Bem, S., Szewczyk, A., 1998. Efficacy of urine determination of early renal damage markers for nephrotoxicity monitoring during occupational exposure to mercury vapours. *Med. Pr.* 49, 129–135.
- Sarafian, T.A., 1999. Methylmercury generation of free radical: biological implications. *Met. Ions Biol. Syst.* 36, 415–444.
- Shanker, G., Aschner, J.L., Syversen, T., Aschner, M., 2004. Free radical formation in cerebral cortical astrocytes in culture induced by methylmercury. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 128, 48-57.
- Shanker, G., Syversen, T., Aschner, J.L., Aschner, M., 2005. Modulatory effect of glutathione status and antioxidants on methylmercury-induced free radical formation in primary cultures of cerebral astrocytes. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 137, 11-22.

- Shenker, B.J., Pankoski, L., Zekavat, A., Shapiro, I.M., 2002. Mercury-induced apoptosis in human lymphocytes: caspase activation is linked to redox status. *Antioxid. Redox Signal.* 4, 379-389.
- Su, L., Wang, M., Yin, S.T., Wang, H.L., Chen, L., Sun, L.G., Ruan, D.Y., 2008. The interaction of selenium and mercury in the accumulations and oxidative stress of rat tissues. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 70, 483–489.
- Sutton, A., Khoury, H., Prip-Buus, C., Capanec, C., Pessayre, D., Degoul, F., 2003. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics.* v. 13, n. 3, p. 145-57.
- Sutton, A.; Imbert, A.; Igoudjil, A.; Descatoire, V.; Cazanave, S.; Pessayre, D.; Degoul, F., 2005. The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimorphism modulates both mitochondrial import and mRNA stability. *Pharmacogenet. Genomics* 15, 311-9.
- Taufer, M., Peres, A., Andrade, V.M., Oliveira, G., Sá, G., Canto, M.E., Santos, A.R., Bauer, M.E., Cruz, I.B., 2005. Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 60, 432-8.
- Tian, C., Fang, S., Du, X., Jia, C., 2011. Association of the C47T polymorphism in SOD2 with diabetes mellitus and diabetic microvascular complications: a meta-analysis. *Diabetologia* 54, 803-811.
- Vas, J., Monestier, M., 2008. Immunology of mercury. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1143, 240-67.
- Virtanen, K.J., Rissanen, T.H., Voutilainen, S., Tuomainen, T.P., 2007. Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases. *J. Nutr. Biochem.* 18, 75–85.
- Westphal, G.A., Schnuch, A., Schulz, T.G., Reich, K., Aberer, W., Brasch, J., Koch, P., Wessbecher, R., Szliska, C., Bauer, A., Hallier, E., 2000. Homozygous gene deletions of the glutathione S-transferases M1 and T1 are associated with thimerosal sensitization. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 73, 384-8.
- Zejnilovic, J., Akev, N., Yilmaz, H., Isbir, T., 2009. Association between manganese superoxide dismutase polymorphism and risk of lung cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 189, 1-4.
- Zelko, I.N., Mariani, T.J., Folz, R.J., 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biol. Med.* 33, 337–49.
- Zorov, D.B., Juhaszova, M., Sollott, S.J., 2006. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 509–517.

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo foi averiguado se a exposição *in vitro* de leucócitos humanos ao MeHg teria efeitos tóxicos dependentes do metabolismo da enzima SOD2. A exposição *in vitro* de CBS humanas ao MeHg obtidos de diferentes seres humanos mostrou aumento na produção de EROs e diminuição na viabilidade celular. Os resultados corroboram com pesquisas realizadas em animais e protocolos *in vitro* que mostraram aumento no estresse oxidativo celular induzido por MeHg com efeito notável da citotoxicidade (BARCELOS et al., 2011; FARINA et al., 2011ab).

Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que sistemas expostos ao MeHg de diferentes espécies apresentam um aumento em diferentes espécies reativas como  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  e óxido nítrico (NO) (FARINA et al., 2011ab). Assim, a formação excessiva de radicais livres tem sido apontada como um dos fatores causadores de dano neurotóxico associado com uma variedade de metais, incluindo MeHg. A toxicidade induzida pelo MeHg aumenta a formação de EROs em astrócitos (SHANKER et al., 2004), bem como a presença de moléculas de  $O_2^{\cdot-}$  e antioxidantes com afinidade para o  $OH^{\cdot}$  atenuam a formação de EROs induzidas pelo MeHg (SHANKER et al., 2005). Filipak Neto et al. (2008) e Bussolaro et al. (2010) investigaram hepatócitos de peixes tropicais *Hypostomus commersoni* e *H. malabaricus* sugeriram que o MeHg desregula o ambiente redox intracelular levando à morte celular e a um estado de estresse oxidativo. Portanto, os resultados gerais obtidos neste trabalho concordam com estes estudos.

Nesta investigação também foi observada que a toxicidade ao Hg é dependente do genótipo do polimorfismo Ala16Val SOD2. Em geral, a gravidade de um efeito tóxico depende da dose, a duração e do tempo de exposição. Os seres humanos, no entanto, mostram suscetibilidades muito diferentes para substâncias tóxicas, mesmo em situações de exposição comparáveis. Entre os fatores biológicos e não biológicos que modulam a susceptibilidade individual (por exemplo, idade, sexo, dieta), a variabilidade genética de moléculas que atuam no organismo desempenha seu papel, pois constitui vários fenótipos desintoxicantes. Assim podem existir moléculas, como enzimas, que

são mais ou são menos eficientes conforme a genética do indivíduo (GUNDACKER et al., 2010).

Há evidências de que variações genéticas podem influenciar a toxicocinética do Hg. Este fundo genético pode, portanto, potencialmente explicar alguma vulnerabilidade dos indivíduos em decorrência da toxicidade do Hg. O Hg é também capaz de alterar os níveis de expressão e/ou atividade de vários genes/proteínas, mas a prova funcional desta alteração está frequentemente ausente. Existem muitos estudos relacionados diretamente as vias toxicocinéticas e de desintoxicação do Hg, analisando o impacto da inibição/deleção do gene (*knockout*) e da redução da sua expressão (*knockdown*) ou variação de sequências (principalmente SNPs) (GUNDACKER et al., 2010).

Entretanto, em seres humanos, estudos sobre a influência da genética na toxicidade ao Hg têm se concentrado no sistema glutathione-S-transferase (GST). Isto porque a enzima GST citosólica catalisa a reação intracelular de conjugação entre de GSH e vários substratos eletrofílicos, entre eles o Hg. Esta relação forma conjugados entre Hg e GSH, o que leva a depleção das reservas de GSH. Tal depleção deve ser compensada via síntese *de novo* da GSH, já que o complexo formado é excretado (DICKINSON & FORMAN, 2002). Contudo, a GSH é necessária em vários processos biológicos, principalmente controlando as concentrações de  $H_2O_2$  dentro da mitocôndria, que é a principal fonte diária de EROs na célula, onde está localizada a SOD2 para proteger contra  $O_2^{\cdot -}$  e onde polimorfismo Ala16Val desempenha o seu papel. Embora o genótipo AA apresente uma enzima SOD2 mais eficiente, o que significa aumento na dismutação do  $O_2^{\cdot -}$  em  $H_2O_2$ , este aumento não é automaticamente compensado pelo aumento nos níveis da enzima GPX (MONTAGNER et al., 2010). Esta condição gera um estado de estresse oxidativo via exposição crônica ao  $H_2O_2$  que pode influenciar os níveis de toxicidade celular ao MeHg.

Esta hipótese foi aqui testada e os resultados mostraram que tanto a produção de EROs quanto a viabilidade celular foram diretamente influenciadas pelo polimorfismo Ala16Val SOD2. Em condições basais e sem a exposição ao MeHg os leucócitos VV apresentaram menor viabilidade do que os leucócitos AA e AV ( $p = 0,003$ ). Os níveis de EROs também foram mais altos nos VV quando comparados aos demais ( $p \leq 0,0001$ ). Estes resultados corroboram estudo prévio feito por Montagner et al. (2010) que

também encontraram menor viabilidade em linfócitos VV quando comparados aos outros genótipos. Esta condição possivelmente esta relacionada com os níveis aumentados de  $O_2^{\cdot -}$  que potencialmente reagem com o NO e aumentam as taxas de lipoperoxidação celular e os níveis elevados de EROs. Esta situação facilmente leva a potencial morte da célula.

Entretanto, a exposição ao MeHg mostrou uma situação inversa: leucócitos AA mostraram maior suscetibilidade a este composto em relação a viabilidade. Já, os leucócitos carreadores do genótipo VV expostos ao MeHg não apresentaram aumento significativo na produção de EROs, bem como diminuição na viabilidade celular semelhante quando comparado ao grupo controle. Estes resultados sugerem que, para compostos cuja intensidade da toxicidade está diretamente associada a presença de  $H_2O_2$  têm um efeito mais dramático nas células AA. Neste caso, o genótipo VV pareceria possuir um papel protetor contra a intoxicação ao Hg. Embora as AA apresentem produção de EROs semelhante entre as células sem e com exposição ao MeHg, as mesmas expostas ao MeHg apresentaram redução da viabilidade celular em relação ao controle. O genótipo heterozigótico apresentou o fenótipo intermediário de CBS-AA e VV desde que ocorreu aumento na produção de EROs, mas não houve diminuição da viabilidade celular. O efeito potencial protetor do genótipo VV, que na presença de MeHg não mostrou aumento na produção de EROs e mortalidade das células, pode ser relacionado com a produção de  $H_2O_2$  que é menor do que o genótipo AA.

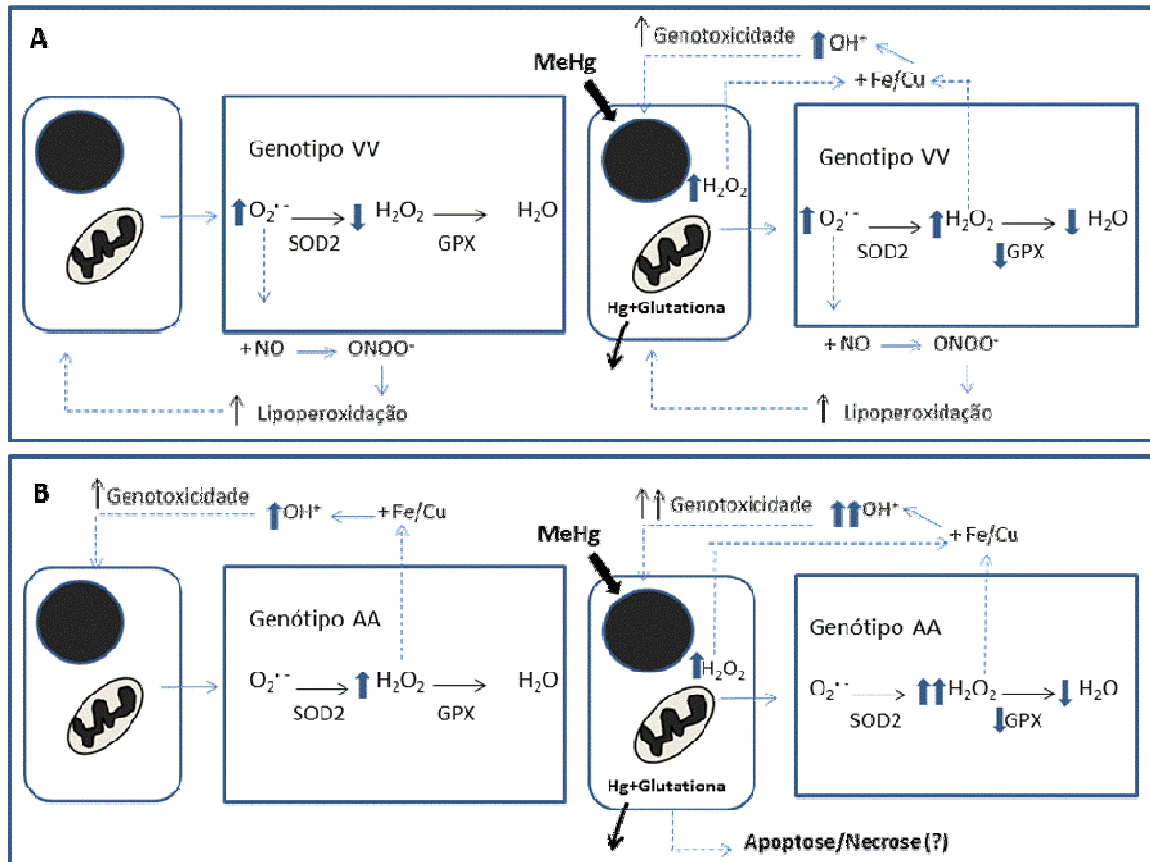
A enzima SOD2 pertence a um conjunto de mecanismos de defesa antioxidantes que impedem os níveis elevados de radicais livres, o que limita os seus efeitos deletérios a macromoléculas na célula. À medida que o  $O_2^{\cdot -}$  é produzido por NADPH oxidase, xantina oxidase, sintase do óxido nítrico, lipoxigenase, e as enzimas mitocondriais, a SOD2 desempenha seu papel controlando os níveis desta molécula na mitocôndria. O  $O_2^{\cdot -}$  é convertido pela SOD à  $H_2O_2$ , que por sua vez, é reduzido a água por CAT, GPx e peroxirredoxinas. Assim, a SOD2, bem como outras SODs, é considerada uma primeira linha de defesa contra a toxicidade do  $O_2^{\cdot -}$  (Fukai e Ushio-Fukai, 2011).

Esta enzima é sintetizada no citoplasma e conduzida para a mitocôndria por um peptídeo de sinalização (MTS). O polimorfismo SOD2 Ala16Val apresenta na região do MTS dois genótipos homozigóticos com desequilíbrio de atividade SOD2 de modo que o genótipo AA apresentar alta e o VV menor eficiência do transporte de enzima para dentro da mitocôndria. Em termos bioquímicos, genótipo AA é capaz de converter uma elevada quantidade de  $O_2^{\cdot -}$  em  $H_2O_2$ . No entanto, ao contrário da SOD1, a SOD2 não apresenta inibição pelo produto e o excesso de  $H_2O_2$  produzido por AA pode sofrer conversão espontânea ou reagir com os metais de transição que produzem  $OH^{\cdot}$  (ASADA et al., 1975; BEYER E FRIDOVICH, 1987 ). Como o  $OH^{\cdot}$  apresenta alta afinidade pela molécula de DNA, causando mutações, o alelo A ou genótipo AA tem sido associado com risco aumentado para câncer de mama (TAUFER et al., 2005; BICA et al., 2009; ZEJNILOVIC et al., 2009).

Por outro lado, o genótipo VV não apresenta uma dismutação de  $O_2^{\cdot -}$  em  $H_2O_2$  eficiente. O  $O_2^{\cdot -}$  é extremamente reativo principalmente com o NO que conduz à produção do forte oxidante  $ONOO^-$  que têm maior afinidade para lipídios de membrana causando lipoperoxidação. O genótipo VV tem sido associado com aterosclerose carotídea (KAKKO et al., 2003), miocardiopatia dilatada não-familiar em japoneses (HIROI et al., 1999), maiores níveis de LDL oxidado em brasileiros com efeito sinérgico em pacientes diabetes tipo II (GOTTLIEB et al., 2005), obesidade (MONTANO et al., 2009) e hipercolesterolemia (DUARTE et al., 2010).

A partir dos resultados aqui descritos e os resultados do estudo anterior realizado por nossa equipe de pesquisa que observou que na exposição de linfócitos *in vitro* à radiação ultravioleta (UV) produzem menos efeitos toxicológicos em células AA do que as células VV (MONTAGNER et al., 2010) podemos postular que o gene da SOD2 apresenta uma característica dual tóxica-proteção dependente do agente tóxico (Figura 2). Esta característica dual é semelhante ao observado na associação entre SOD2 função dos genes e susceptibilidade de doenças não-transmissíveis (BICA et al., 2009).





**Figura 2.** Síntese do potencial papel protetor de genótipos humanos VV de Ala16Val polimorfismo do gene SOD2 sobre o efeito tóxico causado por MeHg exposição aguda. (A) genótipo VV metaboliza menores taxas de  $O_2^{\cdot -}$  do que AV e AA genótipos, que podem reagir com NO produzindo  $ONOO^-$ , resultando em lipoperoxidação. Quando Hg para dentro da célula se liga rapidamente com a glutatona reduzida (GSH), além de outros grupos de ligação tióis (-SH) presentes em proteínas. Ainda, além da GSH evitar que o Hg se ligue a proteínas alvo no interior da célula, também serve como um meio de eliminar o Hg do interior das células. Como GSH é consumida através da ligação com o Hg, menores quantidades desta molécula estarão disponíveis para evitar os efeitos tóxicos do  $H_2O_2$ , que por sua vez (por reação de Fenton ou espontaneamente) produzem o radical hidroxil ( $\cdot OH$ ) que leva a danos no DNA. (B) O genótipo AA apresenta a maior taxa de produção de  $O_2^{\cdot -}$  entre genótipos, resultando numa produção excessiva de  $H_2O_2$  que precisa de ser processado pela glutatona (em mitocôndrias e citoplasma) e catalase (no citoplasma). No entanto, as taxas de produção de  $H_2O_2$  excedem a capacidade de metabolização enzimática em condições fisiológicas, resultando em danos no DNA. Este genótipo, na presença de Hg, é exposto a uma maior quantidade de  $H_2O_2$  do que a célula está acostumada, levando a um aumento dos danos no DNA, conduzindo à apoptose/necrose das células.

Infelizmente, os estudos que sustentam essa hipótese ainda são incipientes. No entanto, podem ser citadas algumas investigações como as realizadas por Lund et al. (1991) que observou que compostos de Hg, como íon mercúrico ( $Hg^{2+}$ ), provocam

aumento de até 4 vezes na concentração de  $H_2O_2$ , mostrando-se como principal mecanismo intracelular em mitocôndrias de rim de rato. Insug et al. (1997) realizaram um experimento com culturas de células onde monócitos foram expostos à vários compostos orgânicos de Hg. O estudo constatou que os compostos de Hg inibiam as funções dos monócitos através da indução de apoptose devido a formação de EROs, perda da integridade da membrana mitocondrial, o que está relacionado com a perda das funções da mitocôndria, e perda das reservas redutivas. Os autores sugeriram que a formação de  $H_2O_2$  por  $Hg^{2+}$  pode levar a danos oxidativos no tecido, tal como a peroxidação lipídica, observada na nefrotoxicidade induzida por Hg.

Outra questão que deve ser discutida está relacionada com leucócitos como uma célula potencialmente afetada pela exposição ao Hg. Anteriormente foi demonstrado a partir de estudos em modelos animais que o Hg afeta a função imune de uma forma complexa. Esta influência depende tanto das espécies de Hg utilizados quanto dos fatores genético, contra a qual a exposição atua. Em linhagens de camundongos geneticamente suscetíveis, Hg inorgânico (iHg) e espécies orgânicas de Hg, incluindo MeHg, induz auto-imunidade, resultando em uma condição como lúpus (HAVARINASAB & HULTMAN, 2005). Investigações sugerem que os seres humanos também podem ser susceptíveis aos efeitos imunotóxicos da exposição ao MeHg que tem sido associado com um risco aumentado de lúpus e maior gravidade da esclerodermia (PROCHAZKOVA et al., 2004; ARNETT et al, 1996; COOPER et al, 2004).

Entre os efeitos tóxicos do MeHg em leucócitos polimorfonucleares foi observada estimulação da formação de EROs incluindo  $O_2^{\cdot -}$  e  $H_2O_2$  (JANSSON & HARMS-RINGDAHL, 1993). Esses efeitos também foram observados em células mononucleares (monócitos e linfócitos) expostas ao MeHg, atribuídos ao aumento do estresse oxidativo, esgotamento do GSH, e perda da função mitocondrial e, conseqüentemente, apoptose (INSUG et al., 1997; SHENKER et al., 2002). Portanto, as CBS, ou seja, polimorfonucleares e mononucleares, podem ser um bom modelo para avaliação *in vitro* da potencial influência de polimorfismos genéticos humanos em resposta a contaminação por Hg. Baseados nestes resultados, investigações complementares

poderiam nos ajudar a entender a influência bioquímica da SOD2 na modulação da toxicidade ao MeHg em células humanas.

O estudo aqui descrito apresenta algumas limitações metodológicas que precisam ser comentadas. Esta primeira investigação sobre a potencial influência do polimorfismo Ala16Val-SOD2 na toxicidade do MeHg em células humanas foi baseada na ideia de estudos populacionais precisam de um grande número de indivíduos para avaliar se uma dada variação genética atua ou não a intensidade da toxicidade de um dado composto. Muitas vezes, após a análise de mais de 600 à 1000 pessoas conclui-se que não existe uma associação significativa. Entretanto, o tempo e os recursos dispendidos para a realização destes estudos são bastante elevados. Por outro lado, estudos de intervenção (farmacológicos ou não farmacológicos) levando-se em conta o polimorfismo de um dado gene também estão sendo bastante realizados. No entanto, não é possível a realização deste tipo de estudo controlado quando se trata de análises que envolvem toxicogenética, já que não seria ético expor a vida e a saúde dos seres humanos pesquisados a um determinado composto, como é o caso do Hg. Deste modo, investigações preliminares em condições experimentais *in vitro*, controladas para evitar interferências de fatores ambientais (como estilo de vida, alimentação e prática de exercícios) e histórico de doenças, parecem ser apropriadas para se observar a potencial associação entre um dado polimorfismo genético e uma resposta toxicológica. Assim, este trabalho apoia-se nesta ideia. É claro que, a partir dos resultados aqui descritos sugere-se investigações mais aprofundadas em nível populacional para averiguar se indivíduos portadores dos diferentes genótipos do polimorfismo Ala16Val-SOD2 possuiriam sintomas clínicos de intoxicação ao MeHg diferenciados.

Outra questão importante a ser comentada diz respeito aos biomarcadores plasmáticos do metabolismo oxidativo que potencialmente podem ser analisados neste tipo de estudo. Estudos *in vitro* utilizando células mononucleares periféricas são bastante utilizados em investigações toxicológicas. Entretanto, para compor uma investigação *in vitro* que envolve um número maior de sujeitos e a análise de biomarcadores do estresse oxidativo celular em condições *in vitro* o uso da cultura de mononucleares fica bastante complexo. Por este motivo, optou-se neste primeiro estudo realizar análises com um tempo relativamente curto de exposição ao Hg. Entretanto,

como as células sanguíneas não foram cultivadas ao longo de 72h a quantidade destas células ficou bastante reduzida. Este fato fez com que apenas duas variáveis fossem investigadas e comparadas entre as amostras e tratamentos: a produção de EROs que indica ação tóxica do MeHg e a morte celular. Assim, investigações adicionais a fim de averiguar possíveis mecanismos causais relacionados a resposta diferencial ao MeHg de células com diferentes genótipos Ala16Val-SOD2 devem ser realizados a fim de complementar o presente estudo.

Apesar destas limitações, a revisão da literatura sobre o tema indica que o presente estudo é uma das primeiras investigações a relacionar resposta tóxica ao MeHg com o polimorfismo Ala16Val do gene codificante da enzima MnSOD (ou SOD2) em seres humanos.

## 6 CONCLUSÕES

No presente estudo em que CBS humano foram expostas ao MeHg observou-se que a exposição ao MeHg aumentou a produção de EROs e diminuiu a viabilidade celular dos leucócitos. Além disso, a toxicidade ao MeHg foi dependente do polimorfismo Ala16Val MnSOD sendo que o genótipo VV apresentou um potencial efeito protetor tanto na produção de EROs quanto na viabilidade celular. Constatamos ainda que a frequência alélica da população respeita o equilíbrio de Hardy-Weiberg.

Os resultados sugerem efeito toxicogenético do polimorfismo Ala16Val da enzima humana MnSOD ao Hg. Sendo que o genótipo AA exacerba os mesmos provavelmente devido a concentração relativamente maior de  $H_2O_2$  que caracteriza este genótipo. Estudos complementares devem ser feitos para avaliar outros parâmetros bioquímicos do metabolismo oxidativo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. D.; LACERDA, L. D.; BASTOS, W. R.; HERRMANN, J. C. Mercury loss from soils following conversion from forest to pasture in Rondônia, Western Amazon, Brazil. **Environ. Pollut.** v. 137, n. 2, p. 179-86, Sept. 2005.

AMORIM, M. I.; MERGLER, D.; BAHIA, M. O.; DUBEAU, H.; MIRANDA, D.; LEBEL, J.; BURBANO, R. R.; LUCOTTE, M. Cytogenetic damage related to low levels of methylmercury contamination in the brazilian amazon. **An. Acad. Bras. Cienc.** v. 72, n. 4, p. 497-507, Dec. 2000.

ARIZA, M. E.; BIJUR, G. N.; WILLIAMS, M. V. Lead and mercury mutagenesis: role of h<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, superoxide dismutase, and xanthine oxidase. **Environ. Mol. Mutagen.** v. 31, n. 4, p. 352-61, 1998.

ARNETT, F. C.; REVEILLE, J. D.; GOLDSTEIN, R.; POLLARD, K. M.; LEAIRD, K.; SMITH, E. A.; LEROY, E. C.; FRITZLER, M. J. Autoantibodies to fibrillarin in systemic sclerosis (scleroderma). An immunogenetic, serologic, and clinical analysis. **Arthritis Rheum.** v. 39, n. 7, p. 1151-1160, July 1996.

ASADA, K.; YOSHIKAWA, K.; TAKAHASHI, M.; MAEDA, Y.; ENMANJI, K. Superoxide dismutases from a blue-green alga, *Plectonema boryanum*. **J. Biol. Chem.** v. 250, n. 8, p. 2801-7, Apr. 1975.

BAFANA, A.; DUTT, S.; KUMAR, S.; AHUJA, P. S. Superoxide dismutase: an industrial perspective. **Crit. Rev. Biotechnol.** v. 31, n. 1, p. 65-76, Mar. 2011.

BARBOSA, A. C.; BOISCHIO, A. A.; EAST, G. A.; FERRARI, I.; GONÇALVES, A.; SILVA, P. R. M.; CRUZ, T. M. E. Mercury contamination in the brazilian Amazon. Environmental and occupational aspects. **Water Air Soil Pollut.** v. 80, n. 1-4, p. 109-121, 1995.

BARCELOS, G. R.; ANGELI, J. P.; SERPELONI, J. M.; GROTTTO, D.; ROCHA, B. A.; BASTOS, J. K.; KNASMÜLLER, S.; JÚNIOR, F. B. Quercetin protects human-derived liver cells against mercury-induced DNA-damage and alterations of the redox status. **Mutat. Res.** v. 726, n. 2, p. 109-15, Dec. 2011.

BARGHIGIANI, C.; RISTORI, T. Mercury levels in agricultural products of Mt. Amiata (Tuscany, Italy). **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v. 26, n. 3, p. 329-34, Apr. 1994.

BASTOS, W. R.; GOMES, J. P.; OLIVEIRA, R. C.; ALMEIDA, R.; NASCIMENTO, E. L.; BERNARDI, J. V.; DE LACERDA, L. D.; DA SILVEIRA, E. G.; PFEIFFER, W. C. Mercury in the environment and riverside population in the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. **Sci. Total Environ.** v. 368, n. 1, p. 344-51, Sept. 2006.

BERZAS-NEVADO, J. J.; RODRÍGUEZ MARTÍN-DOIMEADIOS, R. C.; GUZMÁN BERNARDO, F. J.; JIMÉNEZ MORENO, M.; HERCULANO, A. M.; DO NASCIMENTO, J. L.; CRESPO-LÓPEZ, M. E. Mercury in the tapajós river basin, brazilian amazon: a review. **Environ. Int.** v. 36, n. 6, p. 593-608, Aug. 2010.

BEYER, W. F. JR; FRIDOVICH, I. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. **Anal. Biochem.** v. 161, n. 2, p. 559-66, Mar. 1987.

BICA, C. G.; SILVA, L. L. M.; TOSCANI, N. V.; CRUZ, I. B. M.; SÁ, G.; GRAUDENZ, M. S.; ZETTLER, C. G. MnSOD Gene Polymorphism Association with Steroid-Dependent Cancer. **Pathol. Oncol. Res.** v. 15, n. 1, p.19-24, Mar. 2009.

BICA, C. G.; DA SILVA, L. L.; TOSCANI, N. V.; ZETTLER, C. G.; GOTTLIEB, M. G.; ALEXANDRE, C. O.; GRAUDENZ, M. S.; MÂNICA DA CRUZ, I. B. Polymorphism (ALA16VAL) correlates with regional lymph node status in breast cancer. **Cancer Genet. Cytogenet.** v. 196, n. 2, p. 153-8, Jan. 2010.

BOADO, R. J.; LI, J. Y.; CHU, C.; OGOSHI, F.; WISE, P.; PARDRIDGE, W. M. Site-directed mutagenesis of cysteine residues of large neutral amino acid transporter LAT1. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1715, n. 2, p. 104-10, Sept. 2005.

BOISCHIO, A.; HENSHEL, D.; BARBOSA, A. Mercury exposure through fish consumption by the upper Madeira River population, Brazil -1991. **Ecosyst. Health** v. 1, n. 3, p. 177-192, 1995.

BOISCHIO, A. A.; HENSHEL, D. Fish consumption, fish lore, and mercury pollution--risk communication for the Madeira River people. **Environ. Res.** v. 84, n. 2, p. 108-26, Oct. 2000.

BUSSOLARO, D.; FILIPAK NETO, F.; RIBEIRO, C. A. Responses of hepatocytes to DDT and methyl mercury exposure. **Toxicol. In Vitro** v. 24, n. 6, p. 1491-7, Sep. 2010.

CHAPMAN, L.; CHAN, H. M. The influence of nutrition on methyl mercury intoxication. **Environ. Health Perspect.** v. 108, n 1, p. 29-56. Mar. 2000.

CLARKSON, T. W. The toxicology of mercury. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.** v. 34, n. 4, p. 369-403, Aug. 1997.

CLARKSON, T. W.; MAGOS, L.; MYERS, G. J. The Toxicology of Mercury — Current exposures and Clinical Manifestations. **N. Engl. J. Med.** v. 349, n. 18, p. 1731-7, Oct. 2003.

COOPER, G. S.; PARKS, C. G.; TREADWELL, E. L.; St CLAIR, E. W.; GILKESON, G. S.; DOOLEY, M. A. Occupational risk factors for the development of systemic lupus erythematosus. **J. Rheumatol.** v. 31, n. 10, p. 1928-33, Oct. 2004.

CORDIER, S.; GAREL, M.; MANDEREAU, L.; MORCEL, H.; DOINEAU, P.; GOSME-SEGURET, S.; JOSSE, D.; WHITE, R.; AMIEL-TISON, C. Neurodevelopmental investigations among methylmercury-exposed children in French Guiana. **Environ. Res.** v. 89, n. 1, p. 1-11, May 2002.

COSTA, F.; DORNELLES, E.; MÂNICA-CATTANI, M. F.; ALGARVE, T. D.; SOUZA FILHO, O. C.; GARCIA, L. F. M.; DA CRUZ, I. B. M. The Ala16Val SOD2 polymorphism on the in vitro effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism. **Reprod. Biomed. Online** 2012. [IN PRESS]

COX, D. G.; TAMIMI, R. M.; HUNTER, D. J. Gene x Gene interaction between MnSOD and GPX-1 and breast cancer risk: a nested case-control study. **B. M. C. Cancer** v. 6, p. 217, Aug. 2006.

CRESPO-LÓPEZ, M. E.; MACÊDO, G. L.; PEREIRA, S. I. D; ARRIFANO, G. P.; PIKANÇO-DINIZ, D. L. W.; do NASCIMENTO, J. L.; HERCULANO, A. M. Mercury and human genotoxicity: critical considerations and possible molecular mechanisms. **Pharmacol. Res.** v. 60, n. 4, p. 212–220, Oct. 2009.



CUSTODIO HM, BROBERG K, WENBERG M, JANSSON JH, VESSBY B, HALLMANS G, STEGMAYR B, SKERFVING S. Polymorphisms in glutathione-related genes affect methylmercury retention. **Arch. Environ. Health** v. 59, n. 11, p. 588-95, Nov. 2004.

DA SILVA, D. S.; LUCOTTE, M.; ROULET, M.; POIRIER, H.; MERGLER, D.; SANTOS, E. O. Trophic structure and bioaccumulation of mercury in fish of three natural lakes of the Brazilian Amazon. **Water Air Soil Pollut.** v. 165, p. 77–94, 2005.

DICKINSON, D. A.; FORMAN, H. J. Cellular glutathione and thiols metabolism. **Biochem. Pharmacol.** v. 64, n. 5-6, p. 1019-1026, Sept. 2002.

DOLBEC, J.; MERGLER, D.; SOUSA PASSOS, C. J.; SOUSA DE MORAIS, S.; LEBEL, J. Methylmercury exposure affects motor performance of a riverine population of the tapajós river, Brazilian Amazon. **Int. Arch. Occup. Environ. Health.** v. 73, n. 3, p. 195–203, Apr. 2000.

DOLBEC, J.; MERGLER, D.; LARRIBE, F.; ROULET, M.; LEBEL, J.; LUCOTTE, M. Sequential analysis of hair mercury levels in relation to fish diet of an Amazonian population, Brazil. **Sci. Total Environ.** v. 271, n. 1-3, p. 87-97, Apr. 2001.

DO NASCIMENTO, J. L. M.; OLIVEIRA, K. R.; CRESPO-LOPEZ, M. E.; MACCHI, B. M.; MAUÉS, L. A.; PINHEIRO, M. DA C.; SILVEIRA, L. C.; HERCULANO, A. M. Methylmercury neurotoxicity & antioxidant defenses. **Indian J. Med. Res.** v. 128, n. 4, p. 373–382, Oct. 2008.

DÓREA JG. Fish are central in the diet of Amazonian riparians: should we worry about their mercury concentrations? **Environ. Res.** v. 92, n. 3, p. 232-44, July 2003.

DÓREA, J. G. Integrating experimental (in vitro and in vivo) neurotoxicity studies of low-dose thimerosal relevant to vaccines. **Neurochem. Res.** v. 36, n. 6, p. 927-38, June 2011.

DOS SANTOS, L. S.; MÜLLER, R. C.; DE SARKIS, J. E.; ALVES, C. N.; BRABO, E. S.; SANTOS, E. O.; BENTES, M. H. Evaluation of total mercury concentrations in fish consumed in the municipality of Itaituba, Tapajós River Basin, Pará, Brazil. **Sci. Total Environ.** v. 261, n. 1-3, p. 1-8, Oct. 2000.

DUARTE, M. M.; MORESCO, R. N.; DUARTE, T.; SANTI, A.; BAGATINI, M. D.; DA CRUZ, I. B.; SCHETINGER, M. R.; LORO, V. L. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. **Clin. Biochem.** v. 43, n. 13-14, p. 1118-23, Sep. 2010.

ENVIRONMENTAL CANADA. Figura: Conceptual biogeochemical mercury cycle. **Mercury**. Disponível em: <<http://www.ec.gc.ca/mercure-mercury/default.asp?lang=En&n=67E16201-1>>. Acesso em: 20 abr. 2012.

ENGSTRÖM, K. S.; WENNBERG, M.; STRÖMBERG, U.; BERGDAHL, I. A.; HALLMANS, G.; JANSSON, J.-H.; LUNDH, T.; NORBERG, M.; RENTSCHLER, G.; VESSBY, B.; SKERFVING, S.; BROBERG, K. Evaluation of the impact of genetic polymorphisms in glutathione-related genes on the association between methylmercury or n-3 polyunsaturated long chain fatty acids and risk of myocardial infarction: a case-control study. **Environ. Health** v. 10, p. 33, 2011.

ERAS-ERDOGAN, N.; AKBAS, E.; SENLI, H.; KUL, S.; COLAK, T. Relationship between polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene and breast cancer. **Mutat. Res.** v. 680, n. 1-2, p. 7-11, Nov.-Dec. 2009.

FADINI, P. S.; JARDIM, W. F. Is the negro river basin (amazon) impacted by naturally occurring mercury? **Sci. Total Environ.**; v. 275, n. 1-3, p. 71-82, July 2001.

FARELLA, N.; LUCOTTE, M.; LOUCHOUARN, P.; ROULET, M. Deforestation modifying terrestrial organic transport in the Rio Tapajos, Brazilian Amazon. **Org. Geochem.** v. 32, n. 12, p. 1443-58, 2001.

FARELLA, N.; LUCOTTE, M.; DAVIDSON, R.; DAIGLE, S. Mercury release from deforested soils triggered by base cation enrichment. **Sci. Total Environ.** v. 368, n. 1, p. 19-29, Sept. 2006.

FARINA, M.; ROCHA, J. B.; ASCHNER, M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. **Life Sci.** v. 89, n. 15-16, p. 555-63, Oct. 2011a.

FARINA, M.; ASCHNER, M.; ROCHA, J. B. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 256, n. 3, p. 405-17, Nov. 2011b.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas e sistema de defesa e estresse oxidativo. **R. da Assoc. Méd. Bras.** v.43, p.61-68, 1997.

FILIPAK NETO, F.; ZANATA, S. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; NAKAO, L. S.; RANDI, M. A.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Toxic effects of DDT and methyl mercury on the hepatocytes from *Hoplias malabaricus*. **Toxicol. In Vitro** v. 22, n. 7, p. 1705-13, Oct. 2008.

FILLION, M.; MERGLER, D.; SOUSA PASSOS, C. J.; LARRIBE, F.; LEMIRE, M.; GUIMARÃES, J. R. A preliminary study of mercury exposure and blood pressure in the Brazilian Amazon. **Environ. Health** v. 5, p. 29, Oct. 2006

FILLION, M.; PASSOS, C. J.; LEMIRE, M.; FOURNIER, B.; MERTENS, F.; GUIMARÃES, J. R.; MERGLER, D. Quality of life and health perceptions among fish-eating communities of the Brazilian Amazon: an ecosystem approach to well-being. **Ecohealth**. v. 6, n. 1, p. 121-34, Mar. 2009.

FREITAS, M.; PORTO, G.; LIMA, J. L.; FERNANDES, E. Optimization of experimental settings for the analysis of human neutrophils oxidative burst *in vitro*. **Talanta** v. 78, n. 4-5, p. 1476-83, June 2009.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxid. Redox Signal**. v. 15, n. 6, p. 1583-606, Sep. 2011.

GARDNER, R. M.; NYLAND, J. F.; SILBERGELD, E. K. Differential immunotoxic effects of inorganic and organic mercury species *in vitro*. **Toxicol. Lett.** v. 198, n. 2, p. 182-90, Oct. 2010.

GOTTLIEB, M. G. V.; SHWANKE, C. H. A.; SANTOS, A. F. R.; JOBIM, P. F.; MÜSSEL, D. P.; CRUZ, I. B. M. Association among oxidized LDL levels, MnSOD, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. **Genet. Mol. Res.** v. 30, n. 4, p. 691-703, Dec. 2005.

GIACCONI, R.; MUTI, E. MALAVOLTA, M.; CIPRIANO, C.; COSTARELLI, L.; BERNARDINI, G.; GASPARINI, N.; MARIANI, E.; SABA, V.; BOCCOLI, G.;

MOCCHIGIANI, E. The +838c/g mt2a polymorphism, metals, and the inflammatory/immune response in carotid artery stenosis in elderly people. **Mol. Med.**;v. 13, n. 7-8, p. 388-95, July-Aug. 2007.

GRANDJEAN, P.; WEIHE, P.; WHITE, R. F.; DEBES, F.; ARAKI, S.; YOKOYAMA, K.; MURATA, K.; SØRENSEN, N.; DAHL, R.; JØRGENSEN, P. J. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. **Neurotoxicol. Teratol.** v. 19, n. 6, p. 417-28, Nov.-Dec. 1997.

GRANDJEAN, P.; WHITE, R. F.; NIELSEN, A.; CLEARY, D.; DE OLIVEIRA SANTOS, E. C. Methylmercury neurotoxicity in Amazonian children downstream from gold mining. **Environ. Health Perspect.** v. 107, n. 7, p. 587-91, July 1999.

GROTTO, D.; BARCELOS, G. R.; VALENTINI, J.; ANTUNES, L. M.; ANGELI, J. P.; GARCIA, S. C.; BARBOSA JR., F. Low levels of methylmercury induce DNA damage in rats: protective effects of selenium. **Arch. Toxicol.** v. 83, n. 3, p. 249–254, Mar. 2009.

GROTTO, D.; VALENTINI, J.; FILLION, M.; PASSOS, C. J. S.; GARCIA, S. C.; MERGLER, D.; BARBOSA, F. JR. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. **Sci. Total. Environ.** v. 408, n. 4, p. 806-811, Jan. 2010.

GROTTO, D.; VICENTINI, J.; ANGELI, J. P.; LATORRACA, E. F.; MONTEIRO, P. A.; BARCELOS, G. R.; SOMACAL, S.; EMANUELLI, T.; BARBOSA, F. JR. Evaluation of protective effects of fish oil against oxidative damage in rats exposed to methylmercury. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 74, n. 3, p. 487-93, Mar. 2011a.

GROTTO, D.; VALENTINI, J.; SERPELONI, J. M.; MONTEIRO, P. A.; LATORRACA, E. F.; DE OLIVEIRA, R. S.; ANTUNES, L. M.; GARCIA, S. C.; BARBOSA, F. JR. Evaluation of toxic effects of a diet containing fish contaminated with methylmercury in rats mimicking the exposure in the amazon riverside population. **Environ. Res.** v. 111, n. 8, p. 1074-82, Nov. 2011b.

GUIMARÃES, J. R. D.; FOSTIER, A. H.; FORTI, M. C.; MELFI, J. A.; KEHRIG, H.; MAURO, J. B. N.; MALM, O.; KRUG, J. F. Mercury in human and environmental samples from two lakes in amapá, brazilian amazon. **Ambio** v. 28, n. 4, p. 296-301, 1999.

GUNDACKER, C.; KOMARNICKI, G.; JAGIELLO, P.; GENCIKOVA, A.; DAHMEN, N.; WITTMANN, K. J.; GENCIK, M. Glutathione-s-transferase polymorphism, metallothionein expression, and mercury levels among students in austria. **Sci. Total Environ.** v. 385, n. 1-3, p. 37-47, Oct. 2007.

GUNDACKER C, WITTMANN KJ, KUKUCKOVA M, KOMARNICKI G, HIKKEL I, GENCIK M. Genetic background of lead and mercury metabolism in a group of medical students in austria. **Environ. Res.** v. 109, n. 6, p. 786-96, Aug. 2009.

GUNDACKER, C.; GENCIK, M.; HENGSTSCHLÄGER, M. The relevance of the individual genetic background for the toxicokinetics of two significant neurodevelopmental toxicants: mercury and lead. **Mutat. Res.** v. 705, n. 2, p. 130-40, Oct. 2010.

HARADA, M.; NAKACHI, S.; TASAKA, K.; SAKASHITA, S.; MUTA, K.; YANAGIDA, K.; DOI, R.; KIZAKI, T.; OHNO, H. Wide use of skin-lightening soap may cause mercury poisoning in Kenya. **Sci. Total Environ.** v. 269, n. 1-3, p. 183-7, Mar. 2001.

HARARI, R.; HARARI, F.; GERHARDSSON, L.; LUNDH, T.; SKERFVING, S.; STRÖMBERG, U.; BROBERG, K. Exposure and toxic effects of elemental mercury in gold-mining activities in Ecuador. **Toxicol. Lett.** [epub ahead of print], Sep. 2011.

HAVARINASAB, S.; HULTMAN, P. Organic mercury compounds and autoimmunity. **Autoimmun. Rev.** v. 4, n. 5, p. 270-5, June 2005.

HIROI, S.; HARADA, H.; NISHI, H.; SATOH, M.; NAGAI, R.; KIMURA, A. Polymorphisms in the SOD2 and HLA-DRB1 genes are associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 261, n. 2, p. 332-9, Aug. 1999.

HYLANDER, L. D.; SILVA, E. C.; OLIVEIRA, L. J.; SILVA, A. S.; KUNTZE, E. K.; SILVA, D. X. Mercury levels in Alto-Pantanal – a screening study. **Ambio** v. 23, n. 8, p. 478–484, 1994.

HUSSAIN, S.; ATKINSON, A.; THOMPSON, S. J.; KHAN, A. T. Accumulation of mercury and its effect on antioxidant enzymes in brain, liver, and kidneys of mice. **J. Environ. Sci. Health B** v. 34, n. 4, p. 645-60, July 1999.

IGUCHI, T.; SUGITA, S.; WANG, C. Y.; NEWMAN, N. B.; NAKATANI, T.; HAAS, G. P. MnSOD genotype and prostate cancer risk as a function of NAT genotype and smoking status. **In Vivo** v. 23, n. 1, p. 7-12, Jan.-Feb. 2009.

INSUG, O.; DATAR, S.; KOCH, C. J.; SHAPIRO, I. M.; SHENKER, B. J. Mercuric compounds inhibit human monocyte function by inducing apoptosis: evidence for formation of reactive oxygen species, development of mitochondrial membrane permeability transition and loss of reductive reserve. **Toxicology** v. 124, n. 3, p. 211-224, Dec. 1997.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS). World Health Organization (WHO). **Methylmercury-Environmental Health Criteria 101**. Geneva, 1990.

JANG, Y. C.; REMMEN, V. H. The mitochondrial theory of aging: insight from transgenic and knockout mouse models. **Exp. Gerontol.** v. 44, n. 4, p. 256-60, Apr. 2009.

JANSSON, G.; HARMS-RINGDAHL, M. Stimulating effects of mercuric- and silver ions on the superoxide anion production in human polymorphonuclear leukocytes. **Free Radic. Res. Commun.** v. 18, n. 2, p. 87-98, 1993.

JONES, D. A.; PRIOR, S. L.; TANG, T. S.; BAIN, S. C.; HUREL, S. J.; HUMPHRIES, S. E.; STEPHENS, J. W. Association between the rs4880 superoxide dismutase 2 (C>T) gene variant and coronary heart disease in diabetes mellitus. **Diabetes Res. Clin. Pract.** v. 90, n. 2, p. 196-201, Nov. 2010.

KLAUTAU-GUIMARÃES, M. de N.; D'ASCENÇÃO, A. CALDART, R.; F.; GRISOLIA, C. K.; SOUZA, J. R. de; BARBOSA, A. C.; CORDEIRO, C. M.T.; FERRARI, I. Analysis of genetic susceptibility to mercury contamination evaluated through molecular biomarkers in at-risk Amazon Amerindian populations. **Genet. Mol. Biol.** v. 28, n. 4, p. 827-832, Oct.-Dec. 2005.

LEBEL, J.; MERGLER, D.; LUCOTTE, M.; AMORIM, M.; DOLBEC, J.; MIRANDA, D.; ARANTÈS, G.; RHEAULT, I.; PICHET, P. Evidence of early nervous system dysfunction in Amazonian populations exposed to low-levels of methylmercury. **Neurotoxicology** v. 17, n. 1, p. 157-67, Spring 1996.

LEBEL, J.; ROULET, M.; MERGLER, D.; LUCOTTE, M.; LARRIBE, F. Fish diet and mercury exposure in a riparian Amazonian population. **Water Air Soil Pollut.** v. 97, n. 1-2, p. 31-44, 1997.

LEBEL, J.; MERGLER, D.; BRANCHES, F.; LUCOTTE, M.; AMORIM, M.; LARRIBE, F.; DOLBEC, J. Neurotoxic effects of low-effects methylmercury contamination in the Amazonian Basin. **Environ. Res. Sec. A** v. 79, n. 1, p. 20–32, Oct. 1998.

LEBOVITZ, R. M.; ZHANG, H.; VOGEL, H.; CARTWRIGHT, J. JR.; DIONNE, L.; LU, N.; HUANG, S.; MATZUK, M. M. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 93, n. 18, p. 9782-7, Sep. 1996.

LEE, B. E.; HONG, Y. C.; PARK, H.; HA, M.; KOO, B. S.; CHANG, N.; ROH, Y. M.; KIM, B. N.; KIM, Y. J.; KIM, B. M.; JO, S. J.; HA, E. H. Interaction between GSTM1/GSTT1 polymorphism and blood mercury on birth weight. **Environ. Health Perspect.** v. 118, n. 3, p. 437-43, Mar. 2010.

LI, Y.; HUANG, T. T.; CARLSON, E. J.; MELOV, S.; URSELL, P. C.; OLSON, J. L.; NOBLE, L. J.; YOSHIMURA, M. P.; BERGER, C.; CHAN, P. H.; WALLACE, D. C.; EPSTEIN, C. J. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. **Nat. Genet.** v. 11, n. 4, p. 376-81, Dec. 1995.

LUND, B. O.; MILLER, D. M.; WOODS, J. S. Mercury-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and lipid peroxidation *in vitro* in rat kidney mitochondria. **Biochem. Pharmacol.** v. 11, n. 42 p. 181-7, Dec. 1991.

KAKKO, S.; PÄIVÄNSALO, M.; KOISTINEN, P.; KESÄNIEMI, Y. A.; KINNULA, V. L.; SAVOLAINEN, M. J. The signal sequence polymorphism of the MnSOD gene is associated with the degree of carotid atherosclerosis. **Atherosclerosis** v. 168, n. 1, p. 147-52, May 2003.

MALM, O.; PFEIFFER, W.; SOUZA, C.; REUTHER, R. Mercury pollution due to gold mining in the Madeira River Basin, Brazil. **Ambio** v. 19, n. 1, p. 11-15, 1990.

MAO, C.; QIU, L. X.; ZHAN, P.; XUE, K.; DING, H.; DU, F. B.; LI, J.; CHEN, Q. MnSOD Val16Ala polymorphism and prostate cancer susceptibility: a meta-analysis involving 8,962 subjects. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** v. 136, n. 7, p. 975-9, July 2010.

MARTINELLI, L. A.; FERREIRA, J. R.; FORSBERG, B. R.; VICTORIA, L. Mercury contamination in the amazon: a gold rush consequence. **Ambio** v. 17, n. 4, p. 252-254, 1988.

MARTINS, R. de P.; BRAGA, H. de C.; da SILVA, A. P.; DALMARCO, J. B.; de BEM, A. F.; dos SANTOS, A. R.; DAFRE, A. L.; PIZZOLATTI, M. G.; LATINI, A.; ASCHNER, M.; FARINA, M. Synergistic neurotoxicity induced by methylmercury and quercetin in mice. **Food Chem.Toxicol.** v. 47, n. 3, p. 645–649, Mar. 2009.

MONTAGNER, G. F. S.; SAGRILLO, M.; MACHADO, M. M.; ALMEIDA, R. C.; MOSTARDEIRO, C. P.; DUARTE, M. M. M. F.; CRUZ, I. B. M. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. **Toxicol. in Vitro.** v. 24, n. 5, p. 1410–1416, Aug. 2010.

MONTANO, M. A. E.; LERA, J. P. B.; GOTTLIEB, M. G. V.; SCHWANKE, C. H. A.; ROCHA, M. I. U. M.; MANICA-CATTANI, M. F.; SANTOS, G. F.; CRUZ, I. B. M. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity. **Mol. Cell. Biochem.** v. 328, n. 1-2, p. 33-40, Aug. 2009.

MOSZCZYŃSKI, P.; RUTOWSKI, J.; SŁOWIŃSKI, S.; BEM, S. Immunological effects of occupational exposure to metallic mercury in the population of t-cells and nk-cells. **Analyst.** v. 123, n.1, p. 99–103, Jan 1998.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochem. J.** v. 417, n. 1, p. 1-13, Jan. 2009.

MYERS, G. J.; DAVIDSON, P. W.; SHAMLAYE, C. F.; AXTELL, C. D.; CERNICHIARI, E.; CHOISY, O.; CHOI, A.; COX, C.; CLARKSON, T. W. Effects of prenatal methylmercury exposure from a high fish diet on developmental milestones in the Seychelles Child Development Study. **Neurotoxicology** v. 18, n. 3, p. 819-29, 1997.

MYERS, G. J.; DAVIDSON, P. W.; COX, C.; SHAMLAYE, C. F.; PALUMBO, D.; CERNICHIARI, E.; SLOANE-REEVES, J.; WILDING, G. E.; KOST, J.; HUANG, L. S.; CLARKSON, T. W. Prenatal methylmercury exposure from ocean fish consumption in the seychelles child development study. **Lancet** v. 361, n. 9370, p. 1686–1692, May 2003.



National Institute For Minamata Disease (NIMD). **World Health Organization**. 1986. Disponível em: <<http://www.nimd.go.jp/english/index.html>>. Acesso em: 20 abr. 2012.

National Research Council (NRC). National Academy Press. **Scientific frontiers in developmental toxicology and risk assessment**. Washington, DC, 2000a.

National Research Council (NRC). National Academy Press. **Toxicological effects of methylmercury**. Washington, DC, 2000b.

PASSOS, C. J. S.; MERGLER, D.; FILLION, M.; LEMIRE, M.; MERTENS, GUIMARÃES, F.; J. R. D.; PHILIBERT, A. Epidemiologic confirmation that fruit consumption influences mercury exposure in riparian communities in the Brazilian Amazon. **Environ. Res.** v. 105, n. 2, p. 183–193, Oct. 2007.

PASSOS, C. J.; MERGLER, D. Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review. **Cad. Saude Pública**. v. 24, n. 4, p. S503-20, 2008.

PFEIFFER, W. C.; MALM, O.; SOUZA, C. M. M.; LACERDA, L. D.; SILVEIRA, E. G. A ameaça do mercúrio nos garimpos. **Ciência Hoje**. v. 11, p. 10-12. 1990

PINHEIRO, M. C.; MACCHI, B. M.; VIEIRA, J. L.; OIKAWA, T.; AMORAS, W. W.; GUIMARÃES, G. A.; COSTA, C. A.; CRESPO-LÓPEZ, M. E.; HERCULANO, A. M.; SILVEIRA, L. C.; DO NASCIMENTO JL. Mercury exposure and antioxidant defenses in women: a comparative study in the amazon. **Environ. Res.** v. 107, n. 1, p. 53-9, May 2008.

PROCHAZKOVA, J.; STERZL, I.; KUCEROVA, H.; BARTOVA, J.; STEJSKAL, V. D. The beneficial effect of amalgam replacement on health in patients with autoimmunity. **Neuro Endocrinol. Lett.** v. 25, n. 3, p. 211-8, June 2004.

RICE, D.; BARONE, S. JR. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environ. Health Perspect.** v. 108, n. 3, p. 511-33, June 2000.

ROULET, M.; LUCOTTE, M.; SAINT-AUBIN, A.; TRAN, S.; RHÉAULT, I.; FARELLA, N.; DE JESUS DA SILVA, E.; DEZENCOURT, J.; SOUSA PASSOS, C. J.; SANTOS SOARES, G.; GUIMARÃES, J. R.; MERGLER, D.; AMORIM, M. The geochemistry of mercury in central Amazonian soils developed on the Alter-do-Chão formation of the lower Tapajós River Valley, Pará state, Brazil. **Sci. Total Environ.** v. 223, n. 1, p. 1-24, Nov. 1998.

ROULET, M.; LUCOTTE, M.; FARELLA, N.; SERIQUE, G.; COELHO, H.; SOUSA PASSOS, C. J.; SILVA, E. J.; ANDRADE, P. S.; MERGLER, D.; GUIMARÃES, J. R. D.; AMORIM, M. Effects of recent human colonization on the presence of mercury in amazonian ecosystems. **Water Air Soil Pollut.** 112, 297–313. 1999.

ROULET, M.; LUCOTTE, M.; CANUEL, R.; FARELLA, N.; COURCELLES, M.; GUIMARÃES, J.; MERGLER, D.; AMORIM, M. Increase in mercury contamination recorded in lacustrine sediments following deforestation in central Amazon. **Chem. Geol.** v. 156, p. 243-266, 2000a.

ROULET, M.; LUCOTTE, M.; GUIMARÃES, J. R.; RHEAULT, I. Methylmercury in water, seston, and epiphyton of an Amazonian river and its floodplain, Tapajós River, Brazil. **Sci. Total Environ.** v. 261, n. 1-3, p. 43-59, Oct. 2000b.

RUTOWSKI, J.; MOSZCZYŃSKI, P.; BEM, S.; SZEWCZYK, A. Usefulness of determining urinary markers of early renal damage for monitoring nephrotoxicity during occupational exposure to mercury vapors. [Article in Polish] **Med. Pr.** v. 49, n. 2, p. 129–135, 1998.

SARAFIAN, T. A. Methylmercury generation of free radical: biological implications. **Met. Ions Biol. Syst.** v. 36, p. 415–444, 1999.

SCHLÄWICKE ENGSTRÖM, K.; STRÖMBERG, U.; LUNDH, T.; JOHANSSON, I.; VESSBY, B.; HALLMANS, G.; SKERFVING, S.; BROBERG, K. Genetic variation in glutathione-related genes and body burden of methylmercury. **Environ. Health. Perspect.** v. 116, n. 6, p. 734-9, June 2008.

SHANKER, G.; ASCHNER, J. L.; SYVERSEN, T.; ASCHNER, M. Free radical formation in cerebral cortical astrocytes in culture induced by methylmercury. **Brain Res. Mol. Brain Res.** v. 128, n. 1, p. 48-57 Sep. 2004.

SHANKER, G.; SYVERSEN, T.; ASCHNER, J. L.; ASCHNER, M. Modulatory effect of glutathione status and antioxidants on methylmercury-induced free radical formation in primary cultures of cerebral astrocytes. **Brain Res. Mol. Brain Res.** v. 137, n. 1-2, p. 11-22, June 2005.

SHENKER, B. J.; PANKOSKI, L.; ZEKAVAT, A.; SHAPIRO, I. M. Mercury-induced apoptosis in human lymphocytes: caspase activation is linked to redox status. **Antioxid. Redox Signal.** v. 4, n. 3, p. 379-389, June 2002.

SILVA-FORSBERG, M. C.; FORSBERG, B. R.; ZEIDEMAN, V. K. Mercury contamination in humans linked to river chemistry in the amazon basin. **Ambio** v. 28, n. 6, p. 519-521, Sept.1999.

SILVA IA, NYLAND JF, GORMAN A, PERISSE A, VENTURA AM, SANTOS EC, SOUZA JM, BUREK CL, ROSE NR, SILBERGELD EK. Mercury exposure, malaria, and serum antinuclear/antinucleolar antibodies in Amazon populations in Brazil: a cross-sectional study. **Environ. Health** v. 3, n. 1, p.11, Nov. 2004.

SU, L.; WANG, M.; YIN, S. T.; WANG, H. L.; CHEN, L.; SUN, L. G.; RUAN, D. Y. The interaction of selenium and mercury in the accumulations and oxidative stress of rat tissues. **Ecotoxicol. Environ. Safety** v. 70, n. 3, p. 483-489, July 2008.

SUTTON, A.; KHOURY, H.; PRIP-BUUS, C.; CEPANEC, C.; PESSAYRE, D.; DEGOUL, F. The ala16val genetic dimorphism modulates the import of human manganese Superoxide dismutase into rat liver mitochondria. **Pharmacogenetics** v. 13, n. 3, p. 145-57, Mar. 2003.

SUTTON, A.; IMBERT, A.; IGOUDJIL, A.; DESCATOIRE, V.; CAZANAVE, S.; PESSAYRE, D.; DEGOUL, F. The manganese superoxide dismutase ala16val dimorphism modulates Both mitochondrial import and mrna stability. **Pharmacogenet. Genomics** v. 15, n. 5, p. 311-9, May 2005.

TAUFER, M.; PERES, A.; ANDRADE, V. M.; OLIVEIRA, G.; SÁ, G.; CANTO, M. E.; SANTOS, A. R.; BAUER, M. E.; CRUZ, I. B. Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? **J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.** v. 60, n. 4, p. 432-8, Apr. 2005.

TCHOUNWOU, P. B.; AYENSU, W. K.; NINASHVILI, N.; SUTTON, D. Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. **Environ. Toxicol.** v. 18, n. 3, p. 149–175, Jun. 2003.

TIAN, C.; FANG, S.; DU, X.; JIA, C. Association of the C47T polymorphism in SOD2 with diabetes mellitus and diabetic microvascular complications: a meta-analysis. **Diabetologia** v. 54, n. 4, p. 803-11, Apr. 2011.

URSÍNYOVÁ, M.; HLADÍKOVÁ, V.; UHNÁK, J.; KOVACICOVÁ, J. Toxic elements in environmental samples from selected regions in Slovakia. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v. 58, n. 6, p. 985-92, June 1997.

VAS, J.; MONESTIER, M. Immunology of mercury. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 1143, p. 240-67, Nov. 2008.

VIRTANEN, K. J.; RISSANEN, T. H.; VOUTILAINEN, S.; TUOMAINEN, T. P. Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases. **J. Nutr. Biochem.** v. 18, p. 75–85, 2007.

WATER, SANITATION AND HEALTH. **World Health Organization (WHO)**. 2005 Disponível em: <[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/medicalwaste/mercury/polpap230506.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/medicalwaste/mercury/polpap230506.pdf)>. Acesso: 20 de abr. de 2012.

WESTPHAL, G. A.; SCHNUCH, A.; SCHULZ, T. G.; REICH, K.; ABERER, W.; BRASCH, J.; KOCH, P.; WESSBECHER, R.; SZLISKA, C.; BAUER, A.; HALLIER, E. Homozygous gene deletions of the glutathione S-transferases M1 and T1 are associated with thimerosal sensitization. **Int. Arch. Occup. Environ. Health** v. 73, n. 6, p. 384-8, Aug. 2000.

WHEATLEY, B.; PARADIS, S. Exposure of Canadian aboriginal peoples to methylmercury. **Water Air Soil Pollut.** v. 80, p. 3-11, 2000.

YOKOO, E. M.; VALENTE, J. G.; GRATTAN, L.; SCHMIDT, S. L.; PLATT, I.; SILBERGELD, E. K. Low level methylmercury exposure affects neuropsychological function in adults. **Environ. Health** v. 2, n. 1, p. 8, June 2003.

ZALUPS, R. K. Molecular interactions with mercury in the kidney. **Pharmacol. Rev.** v. 52, n. 1, p. 113-43, Mar. 2000.

ZEJNILOVIC, J.; AKEV, N.; YILMAZ, H.; ISBIR, T. Association between manganese superoxide dismutase polymorphism and risk of lung cancer. **Cancer Genet. Cytogenet.** v. 189, n. 1, p. 1-4, Feb. 2009.

ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free. Radic. Biol. Med.** v. 33, n. 3, p. 337-349, Aug. 2002.

ZOROV, D. B.; JUHASZOVA, M.; SOLLOTT, S. J. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1757, n. 5-6, p. 509-17, May-June 2006.