



UFSM

Dissertação de Mestrado

**Ratas lactantes e não lactantes diferem quanto à
sensibilidade ao HgCl_2 : efeito protetor do ZnCl_2**

Vitor Antunes de Oliveira

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**Ratas lactantes e não lactantes diferem quanto à
sensibilidade ao HgCl₂: efeito protetor do ZnCl₂**

por

Vitor Antunes de Oliveira

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

Orientadora: Maria Ester Pereira

SANTA MARIA, RS, BRASIL

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Antunes de Oliveira, Vitor

Ratas lactantes e não lactantes diferem quanto à sensibilidade ao HgCl₂: efeito protetor do ZnCl₂ / Vitor Antunes de Oliveira.-2012.

66 p.; 30cm

Orientadora: Maria Ester Pereira

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, RS, 2012

1. Toxicologia de Metais I. Pereira, Maria Ester II. Título.

Universidade Federal de Santa Maria

Centro de Ciências Naturais e Exatas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

A comissão Examinadora, abaixo assinada,

Aprova a Dissertação de Mestrado

Ratas lactantes e não lactantes diferem quanto à sensibilidade ao HgCl₂: efeito protetor do ZnCl₂

elaborada por

Vitor Antunes de OliveiraComo requisito parcial para obtenção de grau de
Mestre em Ciências Biológicas - Bioquímica Toxicológica**COMISSÃO ORGANIZADORA**-----
Prof^a. Dr^a. Maria Ester Pereira
(Presidente/Orientadora)-----
Prof. Dr. Ricardo Brandão-----
Prof^a. Dr^a. Vera Maria Melchiors Morsch**Santa Maria, 17 de Agosto de 2012**

Dedicatória

Dedico esta dissertação as pessoas mais importantes em minha vida:

Aos meus irmãos, Éder e Bianca, pelo companheirismo, amizade, incentivo, compreensão e apoio em todos os momentos.

Aos meus pais, Pedro e Mari Lúcia, que tanto me apoiaram, me incentivaram e me deram força para que eu jamais desistisse mesmo nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida e por guiar meus caminhos.

À professora Dr^a. Maria Ester Pereira, pela oportunidade que me deste, pelos ensinamentos transmitidos, amizade, paciência e confiança. “Eu sempre serei grato”.

Aos meus pais e meus irmãos, por todo apoio, amor e incentivo. Muito obrigado.

À Cláudia, por ter me ajudado tanto na realização desse trabalho e pela amizade.

Aos demais colegas de laboratório, Rafael, Lucélia, Mariana, Taise, Michael, Tiago, Lucieli, Daiane, Lidiane, pela ajuda, companheirismo e amizade.

Aos meus amigos, que sempre torceram por mim.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica pela possibilidade de realização deste curso.

Aos demais professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica que de alguma maneira contribuíram para minha formação.

À CAPES pela Bolsa de Pós-Graduação concedida.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram e torceram para que alcançasse esse objetivo. Obrigado.

Resumo

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

Ratas lactantes e não lactantes diferem quanto à sensibilidade ao HgCl₂: efeito protetor do ZnCl₂

AUTOR: Vitor Antunes de Oliveira

ORIENTADOR: Maria Ester Pereira

LOCAL E DATA DA DEFESA: Santa Maria, 17 de Agosto de 2012

O mercúrio é um metal divalente, encontrado no estado líquido à temperatura ambiente e sem funções biológicas. A exposição ocupacional a esse metal ocorre principalmente em atividades industriais e na agricultura. Sugere-se que sua toxicidade é devida, principalmente, à afinidade por grupamentos sulfidrílicos e indução de estresse oxidativo. Estudos demonstram que o mercúrio causa alterações fisiológicas e bioquímicas em animais e humanos. O zinco também é um metal divalente, mas, em contra partida, é um elemento essencial para os seres vivos com importantes funções metabólicas. Estudos tem apontado efeitos benéficos desse metal contra danos oxidativos causados por muitas substâncias tóxicas, inclusive o mercúrio. Assim, o objetivo desse trabalho foi investigar o efeito do ZnCl₂ e do HgCl₂ sobre marcadores de efeitos e de dano oxidativo em ratas lactantes (RL) e não lactantes (RNL). RL e RNL adultas receberam subcutaneamente uma dose de 27 mg/kg de ZnCl₂ e após 24 horas receberam uma dose de 5 mg/kg de HgCl₂. Os animais foram mortos 24 horas após a última administração. Rins, fígado, cérebro e sangue foram coletados para realização dos testes bioquímicos. Foram analisados: a atividade da δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) renal, hepática, cerebral e sanguínea; os níveis de tióis totais e não protéicos e ácido ascórbico de rins, fígado e cérebro; atividade da catalase renal e hepática; os níveis séricos de ureia e creatinina; e a atividade da alanina aminotransferase (ALT) de soro e fígado. Os pesos dos animais e órgãos também foram analisados. Não se observou qualquer alteração nos parâmetros de cérebro das RL e RNL, e nos níveis de ácido ascórbico nos tecidos analisados. RL e RNL expostas ao mercúrio apresentaram uma diminuição nos níveis de SH total de rins e um aumento nos níveis de ureia e creatinina. RNL expostas ao mercúrio apresentaram uma inibição da atividade da δ -ALA-D de rins, fígado e sangue e da catalase hepática. RL expostas ao mercúrio tiveram uma inibição da atividade da δ -ALA-D sanguínea e da ALT sérica. Ainda, as RL apresentaram uma diminuição no peso absoluto de fígado e um aumento no peso relativo de rins. RNL não apresentaram alterações do peso corporal e dos órgãos. O zinco *per se* aumentou os níveis de tióis não protéicos de fígado nas RL e RNL e diminuiu o peso absoluto de fígado nas RL. O pré-tratamento com zinco preveniu a inibição da δ -ALA-D renal (parcialmente), hepática e sanguínea e da catalase hepática nas RNL. O zinco também preveniu a inibição da δ -ALA-D sanguínea, da ALT sérica (parcialmente), a diminuição nos níveis de SH não protéicos (parcialmente) e aumento do peso relativo de rins nas RL. Dessa forma, podemos sugerir que RL e RNL diferem quanto à toxicidade causada pelo mercúrio, visto que as RNL são mais sensíveis a esses efeitos tóxicos do que as RL, e que o zinco apresenta efeitos promissores contra essa ação tóxica na maioria dos parâmetros analisados.

Palavras chave: Mercúrio, zinco, lactantes, estresse oxidativo, δ –aminolevulinato desidratase

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree

Post-Graduate Course in Biological Science - Toxicological Biochemistry

Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

Lactating and no-lactating rats differ in sensitivity to HgCl₂: protective effect of ZnCl₂

AUTHOR: Vitor Antunes de Oliveira

ADVISOR: Maria Ester Pereira

DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: Santa Maria, August, 17, 2012

Mercury is a divalent metal found in the liquid state at room temperature without biological function. Occupational exposure to this metal occurs mainly in industrial activities and agriculture. Its toxicity seems to be due to affinity for sulfhydryl groups and oxidative stress induction. Studies show that mercury causes physiological and biochemical changes in animals and humans. Zinc also is a divalent metal, but in contrast, is an essential element for living beings with important metabolic functions. Studies have indicated beneficial effects of this metal against oxidative damage caused by many toxic substances, including mercury. The objective of this study was to investigate the effect of ZnCl₂ and HgCl₂ on effect markers and oxidative damage of lactating rats (LR) and non-lactating rats (NLR). Adults LR and NLR received one dose of 27 mg/kg of ZnCl₂ (subcutaneously) and after 24 hours received one dose of 5 mg/kg HgCl₂ (subcutaneously). The animals were killed 24 hours after the last administration. Kidneys, liver, brain and blood were collected to perform the biochemical test. δ -aminolevulinatase (δ -ALA-D) activity were analyzed in kidney, liver, brain, and blood; non-protein, total thiols ascorbic acid levels in kidney, liver and brain; catalase activity in kidney and liver; serum urea and creatinine levels; and alanine aminotranferase (ALT) activity in serum and liver. The weights of animals and organs were also analyzed. No alterations were observed in the brains of LR and NLR; ascorbic acid levels also was not changed in tissues analyze. LR and NLR exposed to mercury showed a decrease of kidney total SH levels and an increase of urea and creatinine levels. NLR exposed to mercury showed an inhibition of kidney, liver and blood δ -ALA-D activity, and liver catalase activity. LR exposed to mercury showed an inhibition of blood δ -ALA-D activity and serum ALT activity. LR showed a decrease of liver absolute weight and an increase of kidney relative weight. NLR showed no changes in body and organs weights. Zinc *per se* increased liver non-protein thiols levels in LR and NLR and decreased liver absolute weight in LR. The pre-treatment with zinc prevented the inhibition of kidney (partially), liver and blood δ -ALA-D and liver catalase activity in NLR. Zinc also prevented the inhibition of blood δ -ALA-D, serum ALT (partially), the decrease in non-protein SH levels (partially) and increase relative weight of kidneys in LR. Thus, we suggest that LR and NLR differ as the toxicity caused by mercury, and the NLR are more sensitive to these toxic effects than the LR. Zinc shows promising effects against the toxic effects on analyzed parameters.

Keyword: Mercury, zinc, lactating, oxidative stress, δ - aminolevulinatase dehydratase

Lista de Figuras e Tabelas

INTRODUÇÃO

FIGURA 1 – Estrutura tridimensional comparando a molécula de cisteína (a) com o complexo dicisteinilmercúrio (b).....16

FIGURA 2 – Possível mecanismo envolvendo a neutralização de radicais livres através de antioxidantes enzimáticos em células de mamíferos.....18

FIGURA 3 – Condensação assimétrica de duas moléculas de δ -ALA, catalisada pela δ -ALA-D.....19

RESULTADOS

TABLE 1 – Body, kidney, liver and brain absolute and relative weights of non-lactating and lactating rats exposed (s.c.) to saline or $ZnCl_2$ (27 mg/kg) and 24 hours after to saline or $HgCl_2$ (5 mg/kg).....52

TABLE 2 - Creatinine and urea levels and ALT activity in serum and liver of non-lactating and lactating rats exposed (s.c.) to saline or $ZnCl_2$ (27 mg/kg) and 24 hours after to saline or $HgCl_2$ (5 mg/kg).....53

FIGURE 1 – δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) activity in kidney (A), liver (B), brain (C) and blood (D). Non-lactating and lactating rats were exposed (s.c.) to one dose of saline or $ZnCl_2$ (27 mg/kg) and after 24h to one dose of saline or $HgCl_2$ (5 mg/kg).....54

FIGURE 2 – Non-protein SH levels in kidney (A), liver (B) and brain (C) of non-lactating and lactating rats treated as described in the legend of figure 1.....55

FIGURE 3 – Total SH levels in kidney (A), liver (B) and brain (C) of non-lactating and lactating rats treated as described in the legend of figure 1.....56

FIGURE 4 – Catalase activity in kidney (A) and liver (B) of non-lactating and lactating rats treated as described in legend of figure 1.....57

Lista de Abreviaturas

ALT: alanina aminotransferase

ANOVA: análise de variância (analysis of variance)

b.w.: body weight (peso corporal)

°C: grau Celsius

Cis: cisteína

DNA: ácido desoxirribonucléico

δ-ALA-D: delta-aminolevulinato desidratase

EO: estresse oxidativo

ERs: espécies reativas

GPx: glutaciona peroxidase

Gr: glutaciona redutase

GSH: glutaciona reduzida

h: hora

Hg: mercúrio

Hg⁰: mercúrio metálico; mercúrio elementar

m: mili

M: molar

μ: micro

min: minuto

N: número de repetições

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

NPSH: tióis não protéicos

O₂^{•-}: anion superóxido

p: nível de significância

p: pico

PBG: porfobilinogênio

pH: potencial hidrogeniônico

RL: ratas lactantes

RNL: ratas não lactantes

rpm: rotações por minuto

Sal: salina

s.c.: subcutânea; subcutaneamente

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

SH: grupos sulfidrílicos

SOD: superóxido dismutase

TCA: ácido tricloroacético

TSH: tióis totais

U: unidades

v/v: volume/volume

w/v: weight/volume

Zn: zinco

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Mercúrio	15
1.2	Marcadores Hepáticos e Renais de Efeitos Tóxicos	17
1.3	Sistema Antioxidante e Estresse Oxidativo.....	18
1.4	Zinco	20
1.5	Lactação	22
2	OBJETIVOS	24
2.1	Objetivo Geral	24
2.2	Objetivos Específicos	24
3	MANUSCRITO	25
4	CONCLUSÕES	58
5	REFERÊNCIAS.....	59

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está descrita na seguinte forma: primeiramente são apresentados a introdução e os objetivos. A seguir, os resultados e a discussão são apresentados no item manuscrito. O item conclusão encontrado no final desta dissertação, apresenta interpretações gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho. As referências bibliográficas apresentadas no final da dissertação referem-se somente as citações que aparecem no item introdução.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Mercúrio

O mercúrio (Hg) é um metal divalente, encontrado no estado líquido a temperatura ambiente, sem funções biológicas, e pode ser liberado naturalmente na biosfera como conseqüência de atividades vulcânicas e geotermiais. Atividades industriais e de mineração, agricultura e queima de combustíveis fósseis também contribuem para liberação do Hg, aumentando o risco de exposição ao metal (BERLIN et al., 2007; LI et al., 2009). O mercúrio pode ser encontrado nas formas de vapor, inorgânica e orgânica, sendo que seus efeitos tóxicos, distribuição e toxicocinética vão depender da forma química na qual ocorreu a exposição (CLARKSON, 2002; FARINA et al., 2011). Dentre as várias formas encontradas do metal pode-se citar o mercúrio elementar (Hg^0), o cloreto de mercúrio (HgCl_2) e o metilmercúrio (MeHg) como os principais constituintes de cada classe (vapor, inorgânico e orgânico, respectivamente). As formas orgânica e elementar atingem principalmente o sistema nervoso central e a forma inorgânica, os rins e o fígado (BERLIN et al., 2007; CECCATELLI et al., 2010; FARINA et al., 2011). Os efeitos tóxicos causados pela exposição ao Hg estão relacionados ao fato do metal interferir nos mais diferentes processos bioquímicos do organismo devido a sua grande afinidade pelos grupamentos sulfidrílicos (ROONEY, 2007).

A ação tóxica do mercúrio inorgânico está voltada principalmente ao sistema renal, uma vez que o metal causa dano nos túbulos proximais e lesão glomerular. A toxicidade das formas inorgânicas do Hg pode estar ligada ao fato destas interagirem com moléculas como a da cisteína formando complexos chamados de dicisteinilmercúrio (Figura 1), os quais conseguem transpor mais facilmente a membrana das células renais e dessa forma causar dano (ZALUPS, 2000). Além disso, o HgCl_2 danifica o sistema renal por ligar-se a enzimas sulfidricas como a delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (Gr), levando a falha do sistema renal (FARINA et al., 2003; SARWAR et al., 2007; AGARWAL et al., 2010).

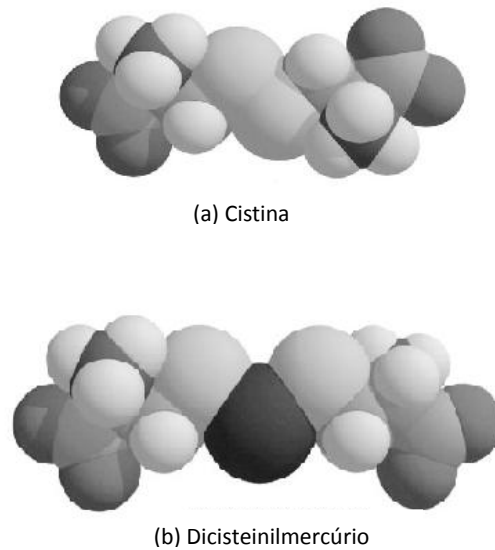


Figura 1: Estrutura tridimensional da molécula de cisteína (a) e da dicisteinilmercúrio (b) (Adaptado de ZALUPS, 2000).

O acúmulo de mercúrio inorgânico nos rins ocorre de forma rápida. Alguns estudos tem associado os efeitos tóxicos do metal ao estresse oxidativo (EO) (ZALUPS, 2000; BERLIN et al., 2007). De fato, o mercúrio tem afinidade por compostos que possuem grupamentos tióis, especialmente a glutathiona (GSH), e dessa forma causa uma pré-disposição ao EO. Além disso, o HgCl_2 também atinge outros sistemas antioxidantes não enzimáticos como os tióis não protéicos (NPSH) e totais (FARINA et al., 2003) e enzimáticos como a GPx, catalase e superóxido dismutase (SOD) (AGARWAL et al., 2010). Logo após a exposição ao mercúrio inorgânico, cerca de 50 % do metal encontra-se no tecido renal sendo que a maior parte acumula-se no córtex renal e nos túbulos proximais (ZALUPS & CHERIAN, 1992; ZALUPS, 2000; BERLIN et al., 2007).

Apesar de o rim ser o órgão alvo primário do HgCl_2 , o fígado é outro órgão atingido por esta forma do metal (BERLIN et al., 2007). Estudos utilizando ratos e camundongos tem verificado que o HgCl_2 atinge as defesas antioxidantes e aumenta a peroxidação lipídica em fígado tornando o sistema hepático deficitário (FARINA et al., 2003; PEROTTONI et al., 2004; AGARWAL et al., 2010). A hepatotoxicidade dessa forma de mercúrio ainda não está totalmente esclarecida. Entretanto, assim como nos rins, acredita-se ocorrer interação do metal com estruturas orgânicas permitindo ao metal transpor a membrana dos hepatócitos mais facilmente (BERLIN et al., 2007; ROONEY, 2007).

Além de rins e fígado, a exposição a essa forma do metal causa alterações no sistema imunológico, no sistema nervoso central, na capacidade reprodutiva, induz problemas de pele, alergias e alterações cardiovasculares (CLARKSON, 2002; ZAHIR et al., 2005; BERLIN et al., 2007).

A meia vida biológica do HgCl_2 pode chegar a 90 dias em ratos e a 40 dias em humanos dependendo da forma e do tempo de exposição ao metal; a excreção ocorre principalmente através da urina e fezes pela ação de substâncias com capacidade quelante (BERLIN et al., 2007). Entretanto, os danos causados pelo mercúrio podem ser evitados ou mesmo revertidos através de terapias que consigam reduzir a meia vida desse metal.

1.2 Marcadores Hepáticos e Renais de Efeitos Tóxicos

Como já mencionado anteriormente, os rins e o fígado são órgãos alvo do HgCl_2 (BERLIN et al., 2007). Alguns estudos tem relacionado a toxicidade renal causada pelo mercúrio com o aumento sanguíneo de ureia e creatinina em ratos jovens (PEIXOTO & PEREIRA, 2007; FRANSCISCATO et al., 2011) e em ratos adultos (AGARWAL et al., 2010). Esses marcadores são os principais indicadores de dano renal agudo e muito utilizado no diagnóstico clínico (EDELSTEIN, 2008). A ureia é produto do catabolismo das proteínas servindo como mecanismo de excreção da amônia. A creatinina é formada pelo metabolismo normal da musculatura devido a degradação da fosfocreatinina. Ambos os metabólitos são excretados pelos rins, dessa forma, o aumento de seus níveis no sangue indica falha na função renal (RAVEL, 1997).

Estudos tem mostrado que o HgCl_2 também causa alterações na atividade da alanina aminotransferase (ALT), possibilitando a utilização dessa enzima como marcador de hepatotoxicidade (VEDAVATHI et al., 2004;). Recentemente verificou-se uma inibição da ALT sérica de ratos jovens expostos ao HgCl_2 , onde foi sugerido uma provável relação do metal com grupamentos sulfidrílicos presentes na estrutura da enzima (MORAES-SILVA et al., 2012).

Outra enzima muito utilizada como marcador de efeito tóxico, tanto hepático como renal, é a δ -ALA-D. Essa enzima catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido δ aminolevulínico (δ -ALA) para formação do produto porfobilinogênio (PBG) (Figura 2) (JAFFE, 1995). Estudos recentes tem mostrado

que a exposição a metais como cádmio (BRANDÃO et al., 2009a), chumbo (RENDON-RAMIREZ et al., 2007) e cobre (GIODA et al., 2007) altera a atividade da enzima. Outros trabalhos demonstraram que a inibição da δ -ALA-D está relacionada à intoxicação por mercúrio inorgânico tanto em ratos jovens (PEIXOTO et al., 2003; FRANCISCATO et al., 2011) como em adultos (PEROTTONI et al., 2004).

Dessa forma, podemos considerar os níveis de creatinina e de ureia, e a atividade da ALT e da δ -ALA-D importantes marcadores de efeitos tóxicos induzidos por agentes como o cloreto de mercúrio.

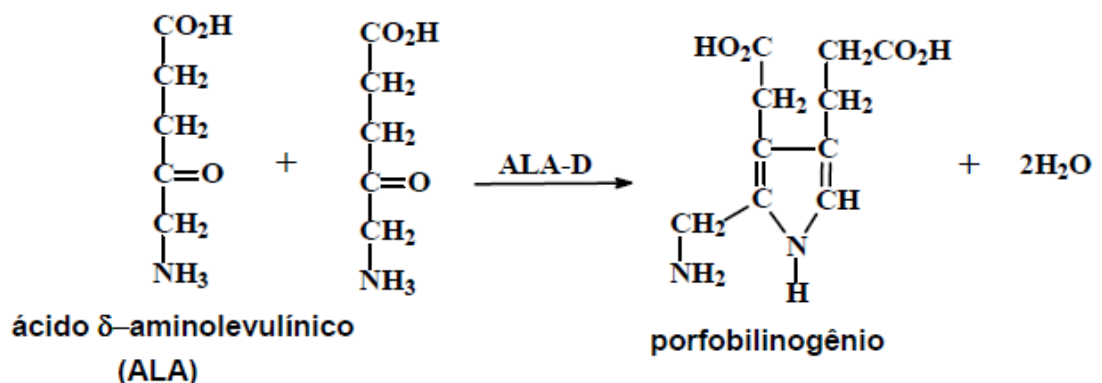
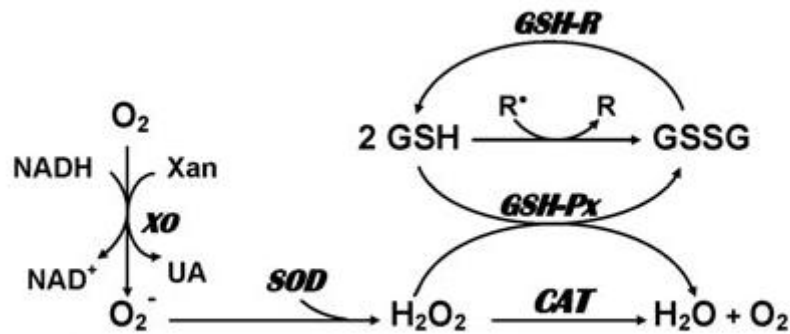


Figura 2: Condensação assimétrica de duas moléculas de δ -ALA catalisada pela δ -ALA-D (adaptado de JAFFE, 1995).

1.3 Sistema Antioxidante e Estresse Oxidativo

Os efeitos tóxicos do mercúrio ainda não estão totalmente esclarecidos, mas alguns estudos sugerem uma forte relação entre a intoxicação por esse metal e o EO (VICENTE et al., 2004; AGARWAL et al., 2010). O EO é controlado através de um complexo sistema antioxidante que atua em duas linhas (sistema enzimático e não enzimático) (JORDÃO et al., 2004). Entre os principais antioxidantes não enzimáticos podemos citar os tióis totais e NPSH, ácido ascórbico e GSH; e quanto aos enzimáticos, catalase, GPx e SOD (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). O sistema não enzimático age neutralizando as espécies reativas através da interação direta com esses radicais ativados. Essa interação resulta na troca de elétrons e dessa forma impede que a cascata de reações causadora de danos às células prossiga. O sistema antioxidante enzimático, por sua vez, atua de uma forma interligada onde o produto de uma enzima serve de substrato para outra até que o

radical livre seja neutralizado (YAO & KESHAVAN, 2011) (Figura 3). Quando ocorrem falhas nesse sistema antioxidante e um aumento das Espécies Reativas (ERs) se estabelece o dano oxidativo.



Xan: Xantina

XO: Xantina Oxidase

UA: Ácido Úrico

Figura 3: Possível mecanismo envolvendo a neutralização de radicais livres através de antioxidantes enzimáticos em células de mamíferos (Adaptado de YAO & KESHAVAN, 2011).

O EO é caracterizado pela produção de ERs maior do que a capacidade de neutralização por parte dos antioxidantes, ou seja, um desequilíbrio na homeostase do organismo (SIES, 1991). Essa alteração em favor dos pró-oxidantes pode ocorrer por muitos fatores, mas é agravada por substâncias tóxicas como o chumbo (LIU et al., 2010), alumínio (VIEZELIENE et al., 2011), organofosforados (ALY et al., 2010; MANSOUR & MOSSA, 2010), cádmio (NEMMICHE et al., 2007), arsênio (MESSARAH et al., 2012) e pelas diferentes formas do mercúrio (KOBAL et al., 2008; AGARWAL et al., 2010; PAL & GOSH, 2012).

Vários estudos tem apontado o mercúrio como responsável por causar dano oxidativo no fígado (FARINA et al., 2003; DE FREITAS et al., 2009), rins (BRANDÃO et al., 2009b; PAL & GOSH, 2012) e em diferentes regiões do cérebro (SU et al., 2008; DE FREITAS et al., 2009). A ação oxidativa dos compostos mercuriais pode estar ligada ao fato do metal aumentar a peroxidação lipídica (DE FREITAS et al., 2009), diminuir as defesas antioxidantes não enzimáticas como GSH (SU et al., 2008), tióis totais e NPSH (FARINA et al., 2003) e inibir enzimas antioxidantes como a catalase, glutatona peroxidase (GPx), GR, e SOD (VICENTE et al., 2004;

AUGUSTI et al., 2008; AGARWAL et al., 2010, PAL & GOSH, 2012). O fato de o mercúrio apresentar grande afinidade por grupamentos sulfidrílicos (SH) também contribui para sua toxicidade, pois forma complexos muito estáveis os quais podem alterar a função de várias proteínas (BERLIN et al., 2007; ROONEY, 2007; FARINA et al., 2011). Tendo em vista que muitos anti-oxidantes apresentam resíduos de SH em suas estruturas, a formação desses complexos favorece o dano oxidativo. Essas alterações podem ser intensificadas caso a demanda dos antioxidantes não seja restabelecida através da suplementação com substâncias que auxiliem nesse processo (HUSSAIN, 2010; PI et al., 2010; SIMMONS et al., 2011). O desequilíbrio no sistema antioxidante devido à exposição ao mercúrio também contribui para o aumento das ERs, em especial o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é quantitativamente o mais importante oxidante gerado, bem como o anion superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e óxido nítrico (NO), substâncias essas que causam importantes alterações celulares (FARINA et al., 2011).

A produção em baixas concentrações de ERs tem um importante papel na regulação das funções celulares, entretanto a superprodução dessas substâncias leva a destruição de proteínas, DNA e lipídios que podem resultar em alterações celulares graves (ROSENFELDT et al., 2012). Muitos estudos tem apontado também que alterações metabólicas como processos inflamatórios, diabetes *mellitus*, dislipidemias, somados ao envelhecimento (período onde aparentemente ocorre uma maior produção de ERs e uma diminuição das defesas antioxidantes), podem favorecer o EO (AKSOY et al., 2005; HOOPS et al., 2010; VALLE, 2010; GUEVARA et al., 2011).

Pesquisas recentes tem testado alternativas contra o dano oxidativo causado por substâncias tóxicas ou pelos processos metabólicos naturais. Alguns desses estudos tem demonstrado que a suplementação com compostos como selênio (JIHEN et al., 2009), flavonóides (Procházková et al., 2011), vitamina E (AGARWAL et al., 2010), vitamina C (AKSOY et al., 2005), Cisteína (JOSHI et al., 2011) e zinco (JEMAI et al., 2007) podem ter efeitos relevantes.

1.4 Zinco

O zinco (Zn) também é um metal divalente, e é o segundo elemento traço mais abundante dos organismos vivos com diferentes funções vitais. Esse metal essencial está envolvido na atividade e estrutura de muitas enzimas, desempenha importante papel na divisão e crescimento celular e expressão gênica (STEBENS, 2003; SANDSTEAD & AU, 2007; SHAH, 2011). A absorção desse micronutriente ocorre principalmente no intestino delgado e sua meia vida é de aproximadamente 280 dias, sendo que um adulto pesando aproximadamente 70 kg contém cerca de 2 a 3 gramas de zinco e excreta 12 a 15 mg por dia, principalmente pelas fezes (SANDSTEAD & AU, 2007; SAPER & RASH, 2009).

Recentemente o papel do zinco na modulação do estresse oxidativo tem sido alvo de muitos estudos, uma vez que ele é co-fator de enzimas como a SOD (importante antioxidante enzimático) e também pelo fato desse metal apresentar atividade quelante, estabilizar membranas celulares, inibir a peroxidação lipídica, induzir a síntese de metalotioneínas (proteína de baixo peso molecular com importante papel “scavenger” de ERs) (STEBENS, 2003; PEIXOTO et al., 2007; PRASAD, 2008) e de GSH no fígado (LANGE et al., 2002; BHASIN et al., 2012).

Estudos testando a capacidade protetora do zinco frente ao dano oxidativo induzido pelo mercúrio já foram realizados e tem mostrado resultados relevantes (JOSHI et al., 2011, 2012). Muitos mecanismos podem estar envolvidos nessa ação protetora do zinco contra o mercúrio, mas ainda não estão totalmente esclarecidos. Entretanto, é sabido que em casos de aumento das ERs (induzido por agentes tóxicos como o mercúrio), o organismo inicia, através de “sinais” químicos, um aumento da expressão de enzimas como a SOD, GPx e catalase, além da síntese de antioxidantes não enzimáticos com GSH, NPSH, tióis totais e metalotioneínas. Assim, a ação do zinco tanto pode ser direta (indução da síntese como no caso da GSH e metalotioneínas) ou agindo como co-fator (SOD), o que faz desse metal um importante antioxidante (STEBENS, 2003; SANDSTEAD & AU, 2007).

Nos últimos anos tem-se testado o zinco como tratamento contra a toxicidade do mercúrio em diferentes aspectos. Esse metal mostrou-se extremamente eficiente contra alterações comportamentais e bioquímicas em ratos jovens expostos ao mercúrio (FRANCISCATO et al., 2009, 2011). Além disso, Peixoto et al. (2003, 2007) mostraram que o pré-tratamento com zinco protegeu contra a inibição da δ -ALA-D renal e hepática causada pelo mercúrio em ratos jovens, bem como aumentou a síntese de metalotioneínas nesse animais.

A manutenção dos níveis de zinco em quantidades adequadas para que ele possa exercer suas funções pode se dar pela ingestão do mineral. Em crianças recém-nascidas o aleitamento materno é fundamental para que as quantidades desse mineral possam ser mantidas, uma vez que 1,6 mg de zinco por dia é passado da mãe para o filho através da amamentação. Dessa forma, preservar os valores zinco no período lactacional por meio da alimentação ou ainda através de suplementação é fundamental (PRENTICE, 2003).

Apesar de poucos estudos terem relatado efeitos tóxicos do zinco e a literatura mostrar que são necessárias altas doses do metal para que ele cause danos (PIAO et al., 2003; SANDSTEAD & AU, 2007) é muito importante a realização de testes com animais buscando entender melhor os efeitos do zinco e, dessa forma, evitar problemas de intoxicação e ainda torná-lo mais seguro quando usado contra danos causados por substâncias tóxicas.

1.5 Lactação

O período lactacional é caracterizado por muitas alterações morfológicas, hormonais e metabólicas as quais favorecem a produção e excreção do leite quando ocorre o estímulo mecânico ou da prole (MARTINS et al., 2010). Muitas são as modificações no organismo de uma fêmea nesse período, entretanto, a combinação da secreção de hormônios lactogênicos bem como a proliferação e diferenciação das células mamárias são as ações que coordenam e mantem a produção e a excreção do leite (HURLEY, 2001). Os principais hormônios que regulam a produção do leite são a ocitocina e a prolactina. A ocitocina é liberada através de estímulos (sucção) e é responsável pela ejeção do leite (DAMM et al., 2002), além disso, há indícios de que esse hormônio tenha atividade anti-estresse durante a lactação (UVNAS-MOBERG et al., 2001). Já, a prolactina é fundamental para manter a lactogênese, a concentração plasmática desse hormônio atinge o pico na primeira semana de lactação. Outros hormônios como a insulina e o hormônio do crescimento também atuam de forma indireta no controle da produção de leite (MARTINS et al., 2010).

A lactação causa importantes mudanças metabólicas e hormonais no organismo. Entre estas mudanças destacam-se o aumento do volume de sangue e plasma

(SUZUKI et al., 1993) e diminuição da pressão osmótica plasmática (SUZUKI et al., 2000). Estas alterações aumentam o fluxo sanguíneo principalmente nas glândulas mamárias, trato gastrointestinal e tecido hepático (HANWELL & LINZELL, 1973). Solaiman et al. (2001) observaram que a lactação aumenta os níveis de metalotioneínas (MT) em vários órgãos de camundongos, as quais podem atuar na proteção contra os efeitos tóxicos de diversas substâncias e estar relacionadas a maior resistência desses animais. Greenwood et al. (1978) e Prester et al. (1994), constataram que durante a lactação a meia vida biológica do mercúrio, tanto em humanos quanto em animais, diminui de 40 a 50% dependendo da forma as quais eles foram expostos. Neste contexto, Franco et al. (2007) verificaram uma possível resistência de ratas lactantes frente a alguns parâmetros oxidativos quando expostas ao mercúrio. Entretanto, pouco é conhecido sobre a resistência de animais em lactação aos efeitos tóxicos do mercúrio, e a possível proteção pelo zinco.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a ação do cloreto de mercúrio sobre parâmetros de stresse oxidativo e marcadores hepáticos e renais de ratas lactantes e não lactantes. Além disso, avaliar o efeito protetor do cloreto de zinco sobre alterações induzidas pelo mercúrio.

2.2 Objetivos Específicos

Este trabalho teve como objetivos específicos verificar a ação do cloreto de zinco e do cloreto mercúrio sobre:

- a atividade da δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) de rins, fígado, cérebro e sangue de ratas lactantes e não lactantes como marcador de efeito;
- a função renal através da análise dos níveis séricos de uréia e creatinina;
- as condições hepáticas por meio da atividade da alanina aminotransferase (ALT) tecidual e sérica;
- atividade da catalase (antioxidante enzimático) de rins e fígado;
- parâmetros oxidativos não enzimáticos como tióis totais e não protéicos e ácido ascórbico de rins, fígado e cérebro;
- o possível efeito protetor do Zn sobre a toxicidade do Hg nos parâmetros anteriormente citados.

3 MANUSCRITO

Os resultados inseridos nessa dissertação apresentam-se sob a forma de um manuscrito científico. Os itens Material e Métodos, Resultados, Discussão dos resultados e Referências encontram-se no próprio manuscrito.

Effects of zinc chloride and mercury chloride on the oxidative profile of lactating and
non-lactating rats

Vitor Antunes de Oliveira¹, Cláudia Sirlene de Oliveira¹, Rafael Porto Ineu¹, Lucélia
Moraes-Silva¹, Lucieli Flores de Siqueira², Maria Ester Pereira^{1,2*}

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

²Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade
Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

*Correspondent author:

Maria Ester Pereira

Departamento de Química, CCNE, UFSM

97105-900 – Santa Maria, RS, Brasil

Fone: +55 55 3220 8799

Email: pereirame@yahoo.com.br

Abstract

This work investigated the zinc and mercury effects on oxidative parameters and markers of toxicity in kidney, liver and brain of non-lactating rats (NLR) and lactating rats (LR). NLR (about 190 g) and LR (days 7 and 8 of lactation) received subcutaneously ZnCl₂ (27 mg/kg) and after 24 h HgCl₂ (5 mg/kg). LR exposed to Hg presented a decrease in liver absolute weight and an increase in kidney relative weight; zinc pre-treatment prevented the Hg effect on kidney. Hg exposure inhibited the δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) activity from kidney and liver of NLR as well as from blood of LR. Zinc pre-exposure prevented Hg effects on these alterations. Zinc *per se* increased hepatic non-protein SH levels of NLR and LR and decreased liver absolute weight of LR. Zinc pre-treatment did not prevent the decrease of total SH levels induced by Hg in kidney of NLR but partially prevented in LR. Hg exposure inhibited serum alanine amino transferase (ALT) activity of LR and increased serum creatinine and urea levels of NLR and LR. Zn pre-exposure partially prevented the ALT activity inhibition induced by Hg. These results show that NLR and LR are differently sensitive to HgCl₂ and that ZnCl₂ showed promising effect against Hg toxicity on these biochemical parameters analyzed.

Keywords: Non-lactating rats, lactating rats, zinc, mercury, δ -aminolevulinic acid dehydratase.

1. Introduction

Mercury (Hg) is a toxic metal extensively involved in the environmental and industrial pollution. In Asia, one of the largest emitters of this metal in the world, the main contact occurs on chemistry industry and mining activity (Li et al., 2009). According to data of WHO (2007), many people are intoxicated annually by Hg via ingestion of contaminated food. This toxic metal is known to cause metabolic alterations, favoring the pro-oxidative complex and changing the antioxidant system leading to a frame of oxidative stress in various tissues (Agarwal et al., 2010; de Freitas et al., 2009; Franco et al., 2007).

The susceptibility to Hg toxicity may differ in relation to the development phase of the animal, gestational and lactational periods in which several physiological conditions are altered. For example, young animals, mainly during the first days after birth, seem to be more sensitive than adults to toxic agents (Jugo, 1976; Nielsen and Andersen, 1996; Null et al., 1973). This vulnerability may be related to organ immaturity (Schulz et al., 1962; Winick and Noble, 1965). Recently, it was reported that young rats exposed to HgCl₂ during the precocious phase of development (8-12 days of age) present several biochemical alterations including renal insufficiency, decrease in the δ -ALA-D activity, and activation of gluconeogenesis mechanism (Moraes-Silva et al., 2012; Peixoto and Pereira, 2007; Peixoto et al., 2003; Rocha et al., 1995; Roza et al., 2005). Other studies have shown that HgCl₂ exposure can also cause alterations on central nervous system of young rats (Franciscato et al., 2009; Peixoto et al., 2007a). In relation to adult rats, different sensitivity between LR and NLR has been reported (Franco et al., 2007; Magos et al., 1980), which may be due to several hormonal, morphologic and biochemical changes that occur during

lactation period (Carvalho and Tamez, 2005). Solaiman et al. (2001) showed an increase of metallothionein levels in mouse during lactation. In this line, Greenwood et al. (1978) checked that blood half-time mercury is lower in lactation period. These changes may certainly influence the distribution and elimination of chemical compounds (Sundberg et al., 1998).

In an attempt to reduce damages caused by mercury, many drugs and compounds have been tested (Rooney, 2007). Several studies have shown that substances such as vitamin E (Agarwal et al., 2010), selenium (Farina et al., 2003) and melatonin (Rao and Chhunchha, 2010) have beneficial effects against Hg toxicity in various organs. Moreover, previous studies from our research group have shown the importance of zinc against the toxicity of Hg in young rats (Franciscato et al., 2011, 2009; Moraes-Silva et al., 2012; Peixoto et al., 2007b, 2003).

Zinc (Zn) is an essential metal necessary to the activity of more than 300 enzymes (Sandstead and Au, 2007). Moreover, Zn deficiency causes several alterations in growth and development due to its importance to proteins, DNA synthesis and cellular division (Crook, 2011; Sandstead and Au, 2007), besides affecting the children growth and increasing the infection risk (Shah, 2011). Zn levels can be maintained or replaced by adequate food (beef, poultry, seafood, and grains) or through supplementation (Saper and Rash, 2009). In fact, the supplementation with Zn has also been used effectively against oxidative stress (OS) caused by chlorpyrifos (Mansour and Mossa, 2010), cadmium (Messaoudi et al., 2010; Saïd et al., 2010), arsenic (Modi et al., 2006), and malathion (Franco et al., 2009) in various tissues.

Although we have recently demonstrated the action of Zn against various toxic effects of HgCl₂ in young rats (Franciscato et al., 2011, 2009; Moraes-Silva et al.,

2012; Peixoto et al., 2007b, 2003), few studies have broached about the effect of Zn and Hg on LR (Franco et al., 2007, 2006). Thus, the present work aims to investigate the action of mercury chloride on oxidative stress parameters and on markers of renal and hepatic toxicity in NLR and LR. Furthermore, this study evaluated the preventing role of zinc chloride against the alterations induced by mercury chloride.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Reagents used were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) and standard commercial suppliers. The commercial kit for biochemical dosages was obtained from Kovalent do Brasil Ltda. (São Gonçalo/ RJ/ Brazil) or Labtest Diagnóstica S.A. (Lagoa Santa/ MG/ Brazil).

2.2. Animals

Adult female *Wistar* rats (pregnant and non-pregnant), 90 days old, obtained from the Animal House of the Federal University of Santa Maria were transferred to our breeding colony and maintained on a 12 h light/dark cycle and at a controlled temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Animals had free access to water and commercial food (GUABI, RS, Brazil) and were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, Federal University of Santa Maria, Brazil (096/2011).

2.3. Exposure to metals

NLR (around 180 g) and LR (on days 7 and 8 of lactation) were distributed on a random basis into four exposure groups and individually housed in standard polypropylene plastic cages (41 x 34 x 18 cm). Animals were weighed and subcutaneously (s.c.) injected with 0.9% NaCl (saline solution) or ZnCl₂ 27mg/kg. Twenty four hours after, they received saline or HgCl₂ 5 mg/kg (s.c.). Metals were dissolved in saline solution and injected at a volume of 1 mL/kg body weight (b.w.). The doses of Zn and Hg were selected according to previous studies performed by our research group (Franciscato et al., 2009, Peixoto and Pereira, 2007, Peixoto et al., 2008, 2007b, 2003). This study was conducted using the following experimental design: NLR and LR were submitted to the same protocol of exposure, except that LR were exposed on days 7 and 8 of lactation.

Group 1 (Sal–Sal): day 1 – saline, day 2 – saline (control group).

Group 2 (Sal–Hg): day 1 – saline, day 2 - HgCl₂ 5 mg/kg.

Group 3 (Zn–Sal): day 1 - ZnCl₂ 27 mg/kg, day 2 - saline.

Group 4 (Zn–Hg): day 1 - ZnCl₂ 27 mg/kg, day 2 - HgCl₂ 5 mg/kg.

2.4. Tissue preparation

Twenty-four hours after the last administration of saline or HgCl₂, NLR and LR were weighed and killed by decapitation. Blood samples were collected in tubes without anticoagulant and centrifuged at 1,050 g for 10 min at 4°C to obtain the serum, which was used for the determination of urea and creatinine levels and ALT activity. A portion of liver was retired and homogenized in Tris-HCl buffer (10 mM, pH

7.4) containing 1mM of magnesium sulfate (MgSO_4) for the determination of the ALT activity in tissue. For δ -ALA-D activity assay, blood was collected in tubes with heparin and hemolyzed in distilled water 1:4 (v/v) with agitation in ice bath for 10 min. Kidneys, liver and brain were quickly removed, placed on ice and homogenized in 5, 7 and 3 volumes of NaCl (150 mM, pH 7.4) with 10 up-and-down strokes at ~1,200 rpm in a Teflon-glass homogenizer, respectively. The homogenate was centrifuged at 8,000 g for 30 min at 4°C and the supernatant fraction (S1) was used in the enzyme assay. To analyze the oxidative parameters, tissue were quickly placed on ice and homogenized in 5 volumes of Tris-HCl buffer (10 mM, pH 7.4). The homogenate was centrifuged at 1,050 g for 20 min at 4°C and the supernatant fraction was used for analysis.

2.5. Biochemical determinations

2.5.1. δ -ALA-D activity

The enzymatic activity was assayed according to the method of Sassa (1982) by measuring the rate of product (porphobilinogen - PBG) formation, as previously described by (Peixoto et al., 2003). The incubation was initiated by adding 200 μL of S1 or hemolyzed blood and was carried out for 60, 30, 180 and 120 min for kidney, liver, brain and blood, respectively, at 39 °C. The reaction was stopped by the addition of TCA 10% containing HgCl_2 0.05 M and the PBG was measured with Ehrlich's reagent, using the molar absorption coefficient of 6.1×10^4 for Ehrlich-PBG salt. The specific enzymatic activity was expressed as nmol of PBG formed per hour per mg protein.

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

Thiol levels from kidney, liver and brain were determined as previously described by Ellman (1959). Total thiol levels were determined in S1. For non-protein thiol (NPSH) determination, the protein fraction of 200 μL S1 was precipitated with 200 μL of 4% trichloroacetic acid (v/v) followed by centrifugation (1,050 g, 10 min) and the supernatant was used to analyze. The colorimetric assay was carried out in 1 M phosphate buffer, pH 7.4. A standard curve using glutathione as standard was constructed in order to calculate the SH in the tissue samples.

2.5.3. Catalase activity

Kidney and liver samples (S1) were assayed spectrophotometrically by the method of Aebi (1984). This method monitors the disappearance of H_2O_2 in the presence of cell homogenate.

2.5.4. Ascorbic acid levels

Ascorbic acid determination was performed as described by Roe (1954) with some modifications. Kidney, liver and brain S1 were precipitated in 10 volumes of cold 4% trichloroacetic acid solution and centrifuged. An aliquot of the sample in a final volume of 500 μL of the solution was incubated for 3 h at 37°C then 500 μL of H_2SO_4 65% (v/v) was added to the medium. The reaction product was determined

using color reagent containing 4.5 mg/mL dinitrophenyl hydrazine and CuSO₄ (0.075 mg/mL).

2.5.5. Alanine aminotranferase activity

The enzymatic activity was determined by the Thomas (1998) method, using a commercial kit Kovalent in a medium containing Tris-HCl buffer 55.8 mmol/L pH 7.15, L-alanine 500 mmol/L, 2-Oxoglutarate 15mmol/L and NADH 0.18 mmol/L, with 50 µL of serum or tissue.

2.5.6. Creatinine

The estimation of serum creatinine level was carried out by measuring the quantity of product formed, creatinine picrate, and by utilizing creatinine as standard, using a commercial kit Labtest. The reaction was conducted in a medium containing picric acid 20.2 mmol/L and NaOH 145.4 mmol/L at 37°C with 50 µL of serum.

2.5.7. Urea

The incubation at 37°C for 5 min was started by adding 10 µL of serum sample to a medium containing phosphate buffer 19.34 mmol/L pH 6.9, sodium salicylate 58.84 mmol/L, sodium nitroprusside 3.17 mmol/L, and urease (≥ 12.63 UK/L), using a commercial kit Labtest. The reaction was stopped by adding the oxidant solution (final concentrations: NaOH 0.07 mol/L and sodium hypochlorite 3.01 mmol/L) and the mixture was incubated for 5 min to achieve color development.

2.6. Protein determination

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

2.8. Statistical analysis

Results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's multiple range test when appropriate. The comparisons between two groups were performed by the Student *t* test. Different letters or asterisk (*) were used to indicate significant differences among groups. LR and NLR were independently analyzed. A value of $P \leq 0.05$ was considered to be significant.

3. Results

3.1. Body and tissue weight

Treatments altered neither body weight nor organ weight of NLR (Table 1). However, for LR, the one-way ANOVA revealed a significant effect of treatment on renal relative weight [$F(3,23)=5.885$; $p < 0.005$] and liver absolute weight [$F(3,23)=6.479$; $p < 0.003$]. Hg-treated rats presented liver absolute weight significantly lower and kidney relative weight significantly higher than other groups (Duncan's multiple range test: $p < 0.05$). Zn *per se* significantly decreased the liver absolute weight and prevented the increase of renal relative weight induced by Hg (Table 1).

3.2. δ -ALA-D activity

The δ -ALA-D activity from different tissues is presented in Figure 1. For NLR, the one-way ANOVA revealed a significant effect of treatment on renal [$F(3,23)=9.150$; $p<0.001$] and hepatic activity [$F(3,23)=5.523$; $p<0.006$] due to the inhibition of the enzyme activity induced by Hg exposure. Zn pre-treatment prevented the Hg effect on the δ -ALA-D activity from kidney (partially) and from liver (totally). Although the one-way was not significant for blood activity, when the comparison was performed between the two groups, the Student's t test indicated significant difference between sal-sal and sal-Hg groups [$t(10)=3.120$; $p<0.015$]. For LR, the one-way ANOVA revealed a significant effect of treatment on blood δ -ALA-D activity [$F(3,23)=3.171$; $p<0.047$] but not on enzyme from kidney, liver and brain. The *post-hoc* test revealed that the administration of Hg caused an inhibition in the blood δ -ALA-D activity ($P<0.05$) and that pre-treatment with Zn prevented this effect.

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

Kidney, liver and brain non-protein SH levels are shown in Figure 2. One-way ANOVA revealed that liver NPSH levels of both NLR and LR were altered by treatment [$F(3,23)=3.882$; $p<0.024$] and $F(3,23)=3.556$; $p<0.033$, respectively] as a consequence of increased liver NPSH levels ($p<0.05$) induced by Zn administration. Kidney and brain NPSH levels were unaltered.

Renal, hepatic and cerebral total SH levels are shown in Figure 3. One-way ANOVA revealed that kidney total SH levels of both NLR and LR were altered by treatment [$F(3,23)=22.724$; $p<0.001$ and $F(3,23)=3.361$; $p<0.031$, respectively],

whereas liver and brain levels were unaltered. The *post hoc* analysis showed that the Hg exposure caused a decrease in kidney total SH levels ($p < 0.05$). Zn exposure partially prevented this alteration just in LR ($p < 0.05$, Duncan's multiple range test).

3.4. Catalase activity

Kidney and liver catalase activities were not altered by treatments for NLR nor LR (Figure 4). For liver from NLR the comparison between the two groups indicated significant inhibition of catalase activity by Hg exposure [$t(10) = 4.270$; $p < 0.013$] when compared to sal-sal group (Student's *t* test).

3.5. Ascorbic acid levels

Kidney, liver and brain ascorbic acid levels from both NLR and LR were not altered by treatments (data not shown).

3.6. Creatinine and urea levels

Creatinine and urea levels are shown in table 2. One-way ANOVA revealed that serum creatinine and urea levels of both NLR [$F(3,23) = 21.769$; $p \leq 0.001$ and $F(3,23) = 13.361$; $p < 0.001$, respectively] and LR [$F(3,23) = 5.443$; $p < 0.007$ and $F(3,23) = 4.571$; $p < 0.014$, respectively] were altered by treatment. The *post hoc* analysis showed that the administration of Hg caused an increase in serum creatinine and urea levels ($P < 0.05$); Zn did not prevent this alteration.

3.7. Alanine aminotranferase activity

Serum and hepatic ALT activity are represented in table 2. For LR, one-way ANOVA revealed a significant effect of treatment on serum ALT activity [$F(3,22)=7.544$, $p<0.002$], whereas hepatic ALT activity were unaltered. The *post-hoc* test revealed that the administration of Hg inhibited serum ALT activity ($p<0.05$) and that pre-treatment with Zn prevented this effect. For NLR, serum and hepatic ALT activities were not altered by treatments.

4. Discussion

This research investigated the damages caused by one dose of HgCl_2 in NLR and LR, evaluating body and organ weight, δ -ALA-D activity, oxidative stress parameters, and renal and hepatic damage. Moreover, we verified the effectiveness of Zn in protecting against toxic effects induced by Hg. Results show that Hg exposure increased the kidney relative weight and decreased the liver absolute weight of LR but not of NLR. Several studies have reported about alterations in body and organ weight of animals exposed to Hg (Moraes-Silva et al., 2012; Peixoto et al., 2003; Rocha et al., 1995; Roza et al., 2005). In fact, exposure to multiple dose of HgCl_2 (s.c.) causes a decrease in body weight gain in mice (Brandão et al., 2006; Orisakwe et al., 2001) and in young (Peixoto et al., 2007b) and adult rats (Rao and Chhunchha, 2010). In the present study, however, NLR and LR exposed to Hg did not present body weight alterations, and LR showed only alterations on their kidney and liver weight. These subtle effects are probably due to the fact that these animals received just one dose of HgCl_2 .

The large affinity of mercury by sulfhydryl groups is an important contributor to its toxicity (Clarkson, 1997). The enzyme δ -ALA-D contains sulfhydryl residues which have high affinity for heavy metals (Peixoto et al., 2004, 2003; Rooney, 2007) and is an important biomarker of toxic effects (Franciscato et al., 2011; Peixoto et al., 2003; Rocha et al., 1995). The HgCl_2 exposure caused inhibition of renal (70%) and hepatic (30%) δ -ALA-D activity in NLR. These results are in agreement with other authors who showed a large sensitivity of kidney and liver enzyme to Hg (Franciscato et al., 2011; Peixoto et al., 2003; Rocha et al., 1995). This effect may be related to the fact that the kidney and liver are the organs that more accumulate mercury (Franciscato et al., 2011; Peixoto et al., 2008, 2003). Regarding blood enzyme, the Hg-exposed NLR and LR presented Hg inhibition of about 50%. This inhibition can be due to the metal action current, since the rats received an acute dose of Hg one day before the euthanasia. In fact, blood Hg has been suggested to be a useful short-term marker (blood half-life of approximately 3 days) (Holmes et al., 2009). Zn pre-exposure prevented kidney (partially) and liver (totally) δ -ALA-D activity inhibition in NLR. Other studies have also reported protection of Zn against kidney and liver δ -ALA-D activity inhibition caused by Hg (Franciscato et al., 2011; Peixoto and Pereira, 2007; Peixoto et al., 2003; Zalups and Cherian, 1992). The δ -ALA-D activity of Hg-exposed LR was not inhibited in kidney, liver and brain. Indeed, lactating animals seem to be more resistant to Hg than non-lactating (Greenwood et al., 1978; Sundberg et al., 1998). This resistance can be due to the fact that the biological half-time of inorganic Hg decreases 50% due to a higher rate of excretion in LR (i.e., 3.5 days in LR compared with ~7 days in NLR adult females) (Prester et al., 1997, 1994).

One of the most important intracellular antioxidant mechanisms is the reduced glutathione (GSH). GSH is an essential compound in the maintenance of cellular

homeostasis because of its reducing properties (Farina et al., 2003; Rooney, 2007). Some works have demonstrated that Zn exposure increased liver GSH levels (Bhasin et al., 2012; Lange et al., 2002). Since GSH is the main endogenous non-protein thiol with important protective role against toxic agents (Koster et al., 1986) the increase of hepatic NPSH levels in NLR and LR caused by Zn can be associated to the increase of GSH levels.

Catalase is an important enzymatic antioxidant acting in the detoxification process of H_2O_2 , which can be generated by toxic substances such as Hg to give H_2O and O_2 (Aebi, 1984). In our studies its activity in liver of NLR showed to be inhibited in the Hg group. Tissue catalase inhibition has been related in animals exposed to different forms of Hg (Boujbiha et al., 2009; Pal and Ghosh, 2012; Rao and Chhunchha, 2010). Grosicki and Kossakowski (1990) reported that this effect can be due to the decrease of liver iron levels induced by $HgCl_2$ in its active centre. LR exposed to Hg did not present hepatic alterations in catalase activity. The lower sensitivity of catalase of LR to Hg may also be due to some changes that occur during lactation period.

In relation to markers of renal toxicity, we verified that both NLR and LR exposed to $HgCl_2$ presented an increase of creatinine and urea levels. NLR and LR presented serum creatinine levels increased around 5.3 times and 3.6 times, respectively; and an increase of serum urea levels around 4.3 and 1.6 times, respectively. These results indicate a higher renal sensitivity of NLR than LR to $HgCl_2$. Increase of creatinine and urea by Hg exposure was observed in young rats exposed to $HgCl_2$ (Peixoto and Pereira, 2007), which persists even after a long time of exposure (Franciscato et al., 2011). However, differently from our previous results, the effect of Hg on renal parameters was not prevented by Zn exposure. Liver is also

a target organ of Hg toxicity. Hepatic enzymes such as ALT are commonly used as a biochemical indicator of hepatocellular damage (Liu et al., 2008). However, the present study revealed that Hg exposure caused inhibition in serum ALT activity of LR, an alteration that does not indicate hepatic damage. Our results differ from those reported by Kumar et al. (2005) that found elevation in serum ALT and AST activities of adult mice exposed to HgCl₂ (5 mg/kg) intraperitoneally, revealing hepatotoxicity; Zn partially prevented this effect. Other studies have reported the inhibition of serum ALT activity in vivo (Peixoto and Pereira, 2007) as well as in vitro (Moraes-Silva et al., 2012). Data from elsewhere have suggested that chemical modification of sulfhydryl group of cysteine is involved in the inactivation of ALT (Vedavathi et al., 2004).

In conclusion, results show that NLR differ from LR on some parameters analyzed in relation to the toxicity induced by mercury chloride. It is known that, several metabolic alterations may occur during the lactation period. This way, higher resistance apparent of LR can be due to this alteration. Moreover, Zn pre-treatment was efficient over biochemical alterations caused by HgCl₂ suggesting that this may serve as a promising preventive alternative treatment of Hg poisoning cases. However, further biochemical investigations are needed to ascertain the precise mechanism of Zn action, since it was not effective against some alterations induced by Hg.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

M.E.P. is recipient of CNPq fellowships (503867/2011-0); C.S.O., V.A.O., L.M-S., and R.P.I. are recipients of fellowships from CAPES.

5. References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.* 105, 121-126.
- Agarwal, R., Goel, S.K., Chandra, R., Behari, J.R., 2010. Role of vitamin E in preventing acute mercury toxicity in rat. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 29, 70-78.
- Bhasin, P., Singla, N., Dhawan, D.K., 2012. Protective role of zinc during aluminum-induced hepatotoxicity. *Environ. Toxicol.* doi:10.1002/tox.21760.
- Boujbiha, M.A., Hamden, K., Guermazi, F., Bouzlama, A., Omezzine, A., Kammoun, A., El Feki, A., 2009. Testicular toxicity in mercuric chloride treated rats: association with oxidative stress. *Reprod. Toxicol.* 28, 81-89.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brandão, R., Santos, F.W., Farina, M., Zeni, G., Bohrer, D., Rocha, J.B., Nogueira, C.W., 2006. Antioxidants and metallothionein levels in mercury-treated mice. *Cell Biol. Toxicol.* 22, 429-438.
- Carvalho, M.R., Tamez, R.N. 2005. Amamentação: bases científicas para a prática profissional ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 278 p.
- Clarkson, T.W., 1997. The toxicology of mercury. *Crit. Ver. Clin. Lab. Sci.* 34, 369-403.
- Crook, M.A., 2011. Zinc deficiency. *Nutrition* 27, 1085-1086.
- de Freitas, A.S., Funck, V.R., Rotta, M.S., Bohrer, D., Mörschbacher, V., Puntel, R.L., Nogueira, C.W., Farina, M., Aschner, M., Rocha, J.B., 2009. Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury-induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. *Brain. Res. Bull.* 79, 77-84.

- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77.
- Farina, M., Soares, F.A., Feoli, A., Roehring, C., Brusque, A.M., Rotta, L., Perry, M.L., Souza, D.O., Rocha, J.B., 2003. In vitro effects of selenite and mercuric chloride on liver thiobarbituric acid-reactive substances and non-protein thiols from rats: influences of dietary cholesterol and polyunsaturated and saturated fatty acids. *Nutrition* 19, 531-535.
- Franciscato, C., Goulart, F.R., Lovatto, N.M., Duarte, F.A., Flores, E.M., Dressler, V.L., Peixoto, N.C., Pereira, M.E., 2009. ZnCl₂ exposure protects against behavioral and acetylcholinesterase changes induced by HgCl₂. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27, 459-468.
- Franciscato, C., Moraes-Silva, L., Duarte, F.A., Oliveira, C.S., Ineu, R.P., Flores, E.M., Dressler, V.L., Peixoto, N.C., Pereira, M.E., 2011. Delayed biochemical changes induced by mercury intoxication are prevented by zinc pre-exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 480-486.
- Franco, J.L., Braga, H.C., Nunes, A.K., Ribas, C.M., Stringari, J., Silva, A.P., Garcia Pomblum, S.C., Moro, A.M., Bohrer, D., Santos, A.R., Dafre, A.L., Farina, M., 2007. Lactational exposure to inorganic mercury: evidence of neurotoxic effects. *Neurotoxicol. Teratol.* 29, 360-367.
- Franco, J.L., Posser, T., Mattos, J.J., Trevisan, R., Brocardo, P.S., Rodrigues, A.L., Leal, R.B., Farina, M., Marques, M.R., Bainy, A.C., Dafre, A.L., 2009. Zinc reverses malathion-induced impairment in antioxidant defenses. *Toxicol. Lett.* 187, 137-143.
- Franco, J.L., Teixeira, A., Meotti, F.C., Ribas, C.M., Stringari, J., Garcia Pomblum, S.C., Moro, A.M., Bohrer, D., Bairros, A.V., Dafre, A.L., Santos, A.R., Farina,

- M., 2006. Cerebellar thiol status and motor deficit after lactational exposure to methylmercury. *Environ. Res.* 102, 22-28.
- Greenwood, M.R., Clarkson, T.W., Doherty, R.A., Gates, A.H., Amin-Zaki, L., Elhassani, S., Majeed, M.A., 1978. Blood clearance half-times in lactating and nonlactating members of a population exposed to methylmercury. *Environ. Res.* 16, 48-54.
- Grosicki, A., Kossakowski, S., 1990. Effect of mercuric chloride poisoning on iron distribution in rats. *Pol. Arch. Weter.* 30, 91-102.
- Holmes, P., James, K.A., Levy, L.S., 2009. Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health? *Sci. Total Environ.* 408, 171-182.
- Jugo, S., 1976. Retention and distribution of $^{203}\text{HgCl}_2$ in suckling and adult rats. *Health Phys.* 30, 240-241.
- Koster, J., Biemond, P., Gswaak, A., 1986. Intracellular and extracellular sulfhydryl levels in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 45, 44-46.
- Kumar, M., Sharma, M.K., Kumar, A., 2005. Spirulina fusiformis: a food supplement against mercury induced hepatotoxicity. *J. Health Sci.* 51, 424-430
- Lange, A., Ausseil, O., Segner, H., 2002. Alterations of tissue glutathione levels and metallothionein mRNA in rainbow trout during single and combined exposure to cadmium and zinc. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 131, 231-243.
- Li, P., Feng, X.B., Qiu, G.L., Shang, L.H., Li, Z.G., 2009. Mercury pollution in Asia: a review of the contaminated sites. *J. Hazard. Mater.* 168, 591-601.
- Liu, L., Zhong, S., Yang, R., Hu, H., Yu, D., Zhu, D., Hua, Z., Shuldiner, A.R., Goldstein, R., Reagan, W.J., Gong, D.W., 2008. Expression, purification, and

initial characterization of human alanine aminotransferase (ALT) isoenzyme 1 and 2 in High-five insect cells. *Protein Expr. Purif.* 60, 225-231.

Magos, L., Peristianis, G.C., Clarkson, T.W., Snowden, R.T., 1980. The effect of lactation on methylmercury intoxication. *Arch. Toxicol.* 45, 143-148.

Mansour, S.A., Mossa, A.-T.H., 2010. Oxidative damage, biochemical and histopathological alterations in rats exposed to chlorpyrifos and the antioxidant role of zinc. *Pest. Biochem. Physiol.* 96, 14-26.

Messaoudi, I., Hammouda, F., El Heni, J., Baati, T., Saïd, K., Kerkeni, A., 2010. Reversal of cadmium-induced oxidative stress in rat erythrocytes by selenium, zinc or their combination. *Exp. Toxicol. Pathol.* 62, 281-288.

Modi, M., Kaul, R.K., Kannan, G.M., Flora, S.J., 2006. Co-administration of zinc and n-acetylcysteine prevents arsenic-induced tissue oxidative stress in male rats. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 20, 197-204.

Moraes-Silva, L., Bueno, T.M., Franciscato, C., Oliveira, C.S., Peixoto, N.C., Pereira, M.E., 2012. Mercury chloride increases hepatic alanine aminotransferase and glucose 6-phosphatase activities in newborn rats in vivo. *Cell Biol. Int.* 36, 561-566.

Nielsen, J.B., Andersen, O., 1996. Elimination of recently absorbed methyl mercury depends on age and gender. *Pharmacol. Toxicol.* 79, 60-64.

Null, D.H., Gartside, P.S., Wei, E., 1973. Methylmercury accumulation in brains of pregnant, non-pregnant and fetal rats. *Life Sci.* 12, 65-72.

Orisakwe, O.E., Afonne, O.J., Nwobodo, E., Asomugha, L., Dioka, C.E., 2001. Low-dose mercury induces testicular damage protected by zinc in mice. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 95, 92-96.

- Pal, M., Ghosh, M., 2012. Studies on comparative efficacy of α -linolenic acid and α -oleostearic acid on prevention of organic mercury-induced oxidative stress in kidney and liver of rat. *Food Chem. Toxicol.* 50, 1066-1072.
- Peixoto, N. C., Pereira, M. E. 2007. Effectiveness of $ZnCl_2$ in protecting against nephrotoxicity induced by $HgCl_2$ in newborn rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66, 441-446.
- Peixoto, N.C., Kratz, C.P., Roza, T., Morsch, V.M., Pereira, M.E., 2007a. Effects of $HgCl_2$ on porphobilinogen-synthase (E.C. 4.2.1.24) activity and on mercury levels in rats exposed during different precocious periods of postnatal life. *Cell Biol. Int.* 31, 1057-1062.
- Peixoto, N.C., Rocha, L.C., Moraes, D.P., Bebianno, M.J., Dressler, V.L., Flores, E.M., Pereira, M.E., 2008. Changes in levels of essential elements in suckling rats exposed to zinc and mercury. *Chemosphere* 72, 1327-1332.
- Peixoto, N.C., Roza, T., Flores, E.M., Pereira, M.E., 2003. Effects of zinc and cadmium on $HgCl_2$ - δ -ALA-D inhibition and Hg levels in tissues of suckling rats. *Toxicol. Lett.* 146, 17-25.
- Peixoto, N.C., Roza, T., Pereira, M.E., 2004. Sensitivity of δ -ALA-D (E.C. 4.2.1.24) of rats to metals in vitro depends on the stage of postnatal growth and tissue. *Toxicol. In Vitro* 18, 805-809.
- Peixoto, N.C., Serafim, M.A., Flores, E.M., Bebianno, M.J., Pereira, M.E., 2007b. Metallothionein, zinc, and mercury levels in tissues of young rats exposed to zinc and subsequently to mercury. *Life Sci.* 81, 1264-1271.
- Prester, L., Blanuša, M., Kostial, K., 1994. Half-time and distribution of inorganic mercury in lactating dams and their pups. *Toxicol. Lett.* 74, 66–67.

- Prester, L., Blanuša, M., Kostial, K., Jones, M.M., Singh, P.K., 1997. Monoisoamyl Ester of DMSA reduces $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ retention in rats: 2. Chelation therapy during lactation. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 10, 183–190.
- Rao, M.V., Chhunchha, B., 2010. Protective role of melatonin against the mercury induced oxidative stress in the rat thyroid. *Food Chem. Toxicol.* 48, 7-10.
- Rocha, J.B., Pereira, M.E., Emanuelli, T., Christofari, R.S., Souza, D.O., 1995. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. *Toxicology* 100, 27-37.
- Roe, J.H., 1954. Chemical determination of ascorbic, dehydroascorbic, and diketogulonic acids. *Meth. Biochem. Anal.* 1, 115-139.
- Rooney, J.P., 2007. The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. *Toxicology* 234, 145-156.
- Roza, T., Peixoto, N.C., Welter, A., Flores, E.M., Pereira, M.E., 2005. 2,3-Dimercapto-1-propanol does not alter the porphobilinogen synthase inhibition but decreases the mercury content in liver and kidney of suckling rats exposed to HgCl_2 . *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 96, 302-308.
- Saïd, L., Banni, M., Kerkeni, A., Saïd, K., Messaoudi, I., 2010. Influence of combined treatment with zinc and selenium on cadmium induced testicular pathophysiology in rat. *Food Chem. Toxicol.* 48, 2759-2765.
- Sandstead, H. H., Au, W.. 2007. Zinc. In Nordberg G.F., Fowler B.A., Nordberg M., Friberg L.T. *Handbook on the toxicology of metals*. 3rd edit. Elsevier., Amsterdam, pp. 925-947.
- Saper, R.B., Rash, R., 2009. Zinc: an essential micronutrient. *Am. Fam. Physician.* 79, 768-772.

- Sassa, S., 1982. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 28, 133-145.
- Schulz, D.M., Giordano, D.A., Schulz, D.H., 1962. Weights of organs of fetuses and infants. *Arch. Pathol.* 74, 244-250.
- Shah, D., 2011. Magnitude of zinc deficiency and efficacy of zinc. *Indian J. Pediatr.* 78, 1140-1141.
- Solaiman, D., Jonah, M.M., Miyazaki, W., Ho, G., Bhattacharyya, M.H., 2001. Increased metallothionein in mouse liver, kidneys, and duodenum during lactation. *Toxicol. Sci.* 60, 184-192.
- Sundberg, J., Jönsson, S., Karlsson, M.O., Hallén, I.P., Oskarsson, A., 1998. Kinetics of methylmercury and inorganic mercury in lactating and nonlactating mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 151, 319-329.
- Thomas, L., 1998. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST). In: Thomas, L. editor. *Clinical Laboratory Diagnostics*. 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft, 55-65.
- Vedavathi, M., Girish, K.S., Kumar, M.K., 2004. Isolation and characterization of cytosolic alanine aminotransferase isoforms from starved rat liver. *Mol. Cell Biochem.* 267, 13-23.
- Winick, M., Noble, A., 1965. Quantitative changes in DNA, RNA, and protein during prenatal and postnatal growth in the rat. *Dev. Biol.* 12, 451-466.
- World Health Organization (WHO), 2007. Elemental mercury and inorganic mercury compounds: human health aspects. In: *Concise International Chemical Assessment Document 50*, World Health Organization, Geneva 940, 104 p.
- Zalups, R.K., Cherian, M.G., 1992. Renal metallothionein metabolism after a reduction of renal mass. I. Effect of unilateral nephrectomy and compensatory

renal growth on basal and metal-induced renal metallothionein metabolism.

Toxicology 71, 83-102.

Legends:

Figure 1: δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) activity in kidney (A), liver (B), brain (C) and blood (D). Non-lactating and lactating rats were exposed (s.c.) to one dose of saline or ZnCl_2 (27 mg/kg) and after 24h to one dose of saline or HgCl_2 (5 mg/kg). Results are presented as mean \pm S.E.M. (N=6). Different letters represent significant difference among groups at least to $p \leq 0.05$ (ANOVA/Duncan's post-hoc test). * Represents the significant difference from control group when compared by Student's *t* test ($p \leq 0.05$).

Figure 2: Non-protein SH levels in kidney (A), liver (B) and brain (C) of non-lactating and lactating rats treated as described in the legend of figure 1. Results are presented as mean \pm S.E.M. (N=6). Different letters represent significant difference among groups at least to $p \leq 0.05$ (ANOVA/Duncan's post-hoc tests).

Figure 2: Total SH levels in kidney (A), liver (B) and brain (C) of non-lactating and lactating rats treated as described in the legend of figure 1. Results are presented as mean \pm S.E.M. (N=6). Different letters represent the significant difference among groups at least to $p \leq 0.05$ (ANOVA/Duncan's post-hoc tests).

Figure 4: Catalase activity in kidney (A) and liver (B) of non-lactating and lactating rats treated as described in legend of figure 1. Results are presented as mean \pm S.E.M. (N=6). * Represents significant difference from control group by Student's *t* test ($p \leq 0.05$).

Table 1: Body, kidney, liver and brain absolute and relative weights of non-lactating and lactating rats exposed (s.c.) to saline or ZnCl₂ (27 mg/kg) and 24 hours after to saline or HgCl₂ (5 mg/kg).

Groups	Body weight (g)		Absolute weight (g)			Relative weight (%)		
	Initial	Final	Kidney	Liver	Brain	Kidney	Liver	Brain
Non-lactating								
Sal-Sal	190.5±8.6	191.6±8.9	1.47±0.05	8.15±0.4	1.55±0.03	0.86±0.03	4.24±0.2	0.82±0.04
Sal-Hg	196.8±7.9	189.8±9.5	1.63±0.04	7.26±0.3	1.51±0.03	0.88±0.03	4.40±0.2	0.74±0.10
Zn-Sal	187.0±6.4	192.1±7.0	1.54±0.06	8.43±0.3	1.60±0.05	0.83±0.02	4.30±0.2	0.84±0.04
Zn-Hg	189.0±11.7	190.8±14.0	1.66±0.08	7.68±0.5	1.64±0.02	0.85±0.04	4.15±0.1	0.98±0.05
Lactating								
Sal-Sal	318.7±14.5	321.5±13.5	2.36±0.12	14.88±0.36 ^a	1.72±0.05	0.71±0.02 ^{a,c}	4.50±0.17	0.54±0.03
Sal-Hg	315.0±16.7	321.2±18.7	2.56±0.15	12.84±0.67 ^b	1.74±0.06	0.83±0.05 ^b	4.25±0.18	0.59±0.01
Zn-Sal	294.5±19.8	290.7±10.7	2.11±0.13	13.32±0.46 ^b	1.68±0.11	0.67±0.03 ^a	4.24±0.15	0.55±0.04
Zn-Hg	281.7±17.8	280.2±15.3	2.27±0.13	11.92±0.39 ^b	1.73±0.06	0.78±0.02 ^c	4.10±0.15	0.62±0.03

The results are presented as mean ± S.E.M. (N=6). Different letters represent the significant difference among groups when p ≤ 0.05 (Duncan's post-hoc test).

Table 2: Creatinine and urea levels and ALT activity in serum and liver of non-lactating and lactating rats exposed (s.c.) to saline or ZnCl₂ (27 mg/kg) and 24 hours after to saline or HgCl₂ (5 mg/kg).

Groups	Creatinine (mg/dL)	Urea (mg/dL)	ALT Serum (U/L)	ALT Liver (U/g protein)
Non-Lactating				
Sal-Sal	0.77±0.49 ^a	48.8±2.1 ^a	49.2±5.0	504.8±62.9
Sal-Hg	4.10±0.95 ^b	209.1±32.0 ^b	34.6±7.8	415.3±64.5
Zn-Sal	0.44±0.08 ^a	84.5±33.2 ^a	47.1±5.1	403.7±24.3
Zn-Hg	5.18±0.44 ^b	264.5±35.8 ^b	35.2±3.5	372.8±46.1
Lactating				
Sal-Sal	0.54±0.16 ^a	80.2±4.4 ^a	114.5±12.0 ^a	320.9±45.9
Sal-Hg	1.96±0.40 ^b	130.6±16.4 ^b	58.6±5.9 ^b	281.4±45.5
Zn-Sal	0.82±0.20 ^a	83.3±7.0 ^a	105.1±5.3 ^{a,c}	279.2±48.9
Zn-Hg	1.72±0.35 ^b	137.6±21.7 ^b	78.2±12.2 ^{b,c}	304.2±61.9

The results are presented as mean ± S.E.M. (N=6). Different letters represent the significant difference among groups when $p \leq 0.05$ (Duncan's post-hoc test).

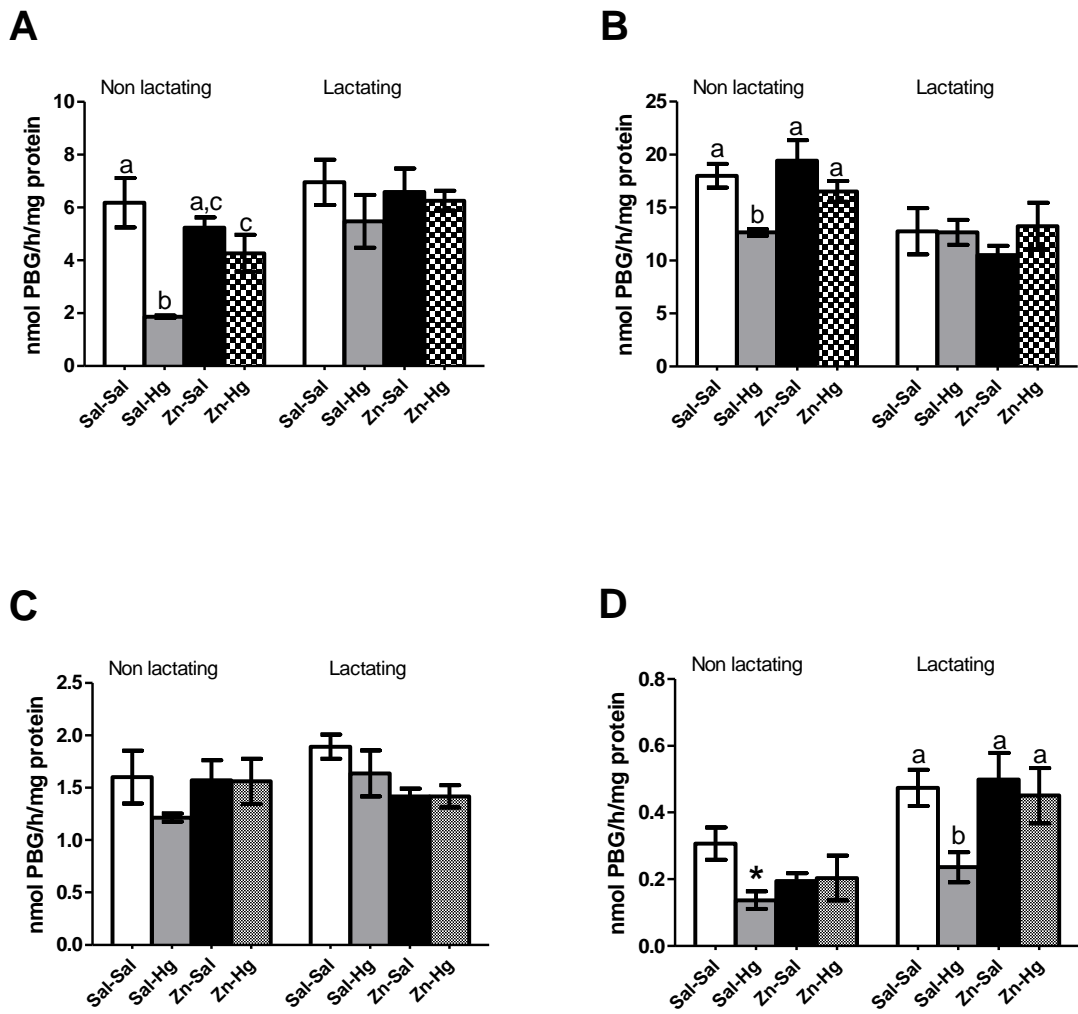


Figure 1

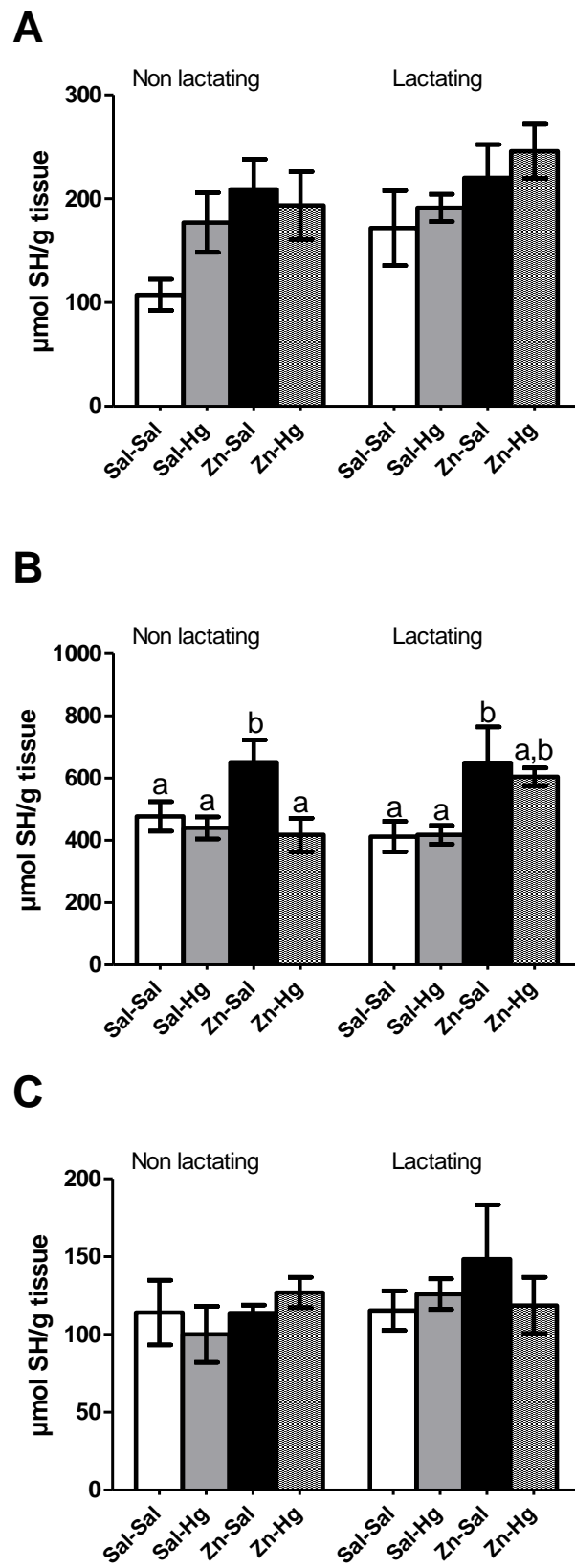


Figure 2

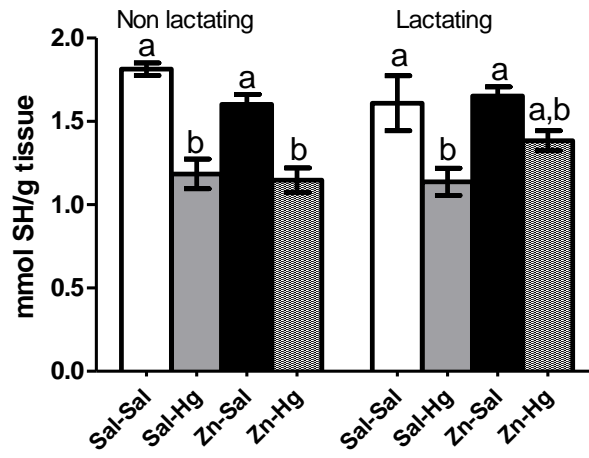
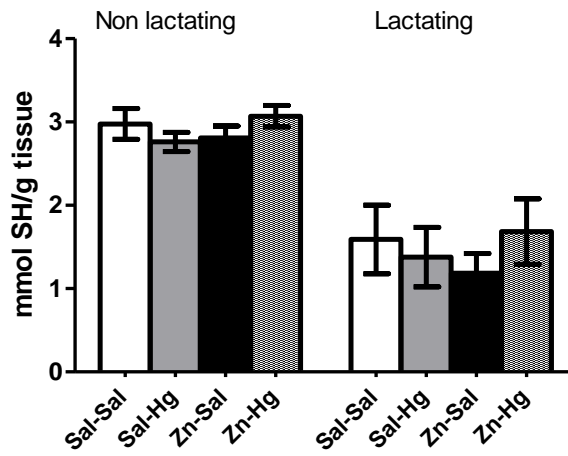
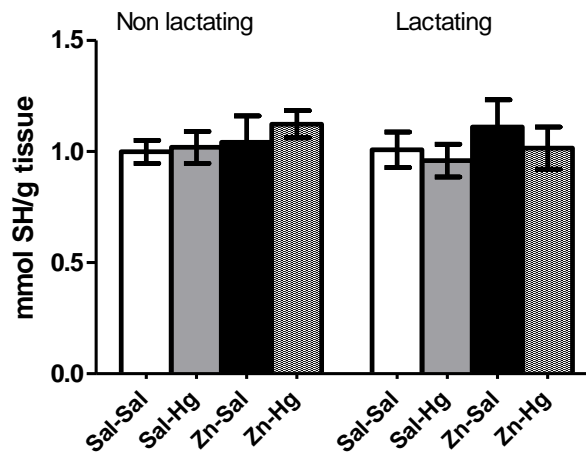
A**B****C**

Figure 3

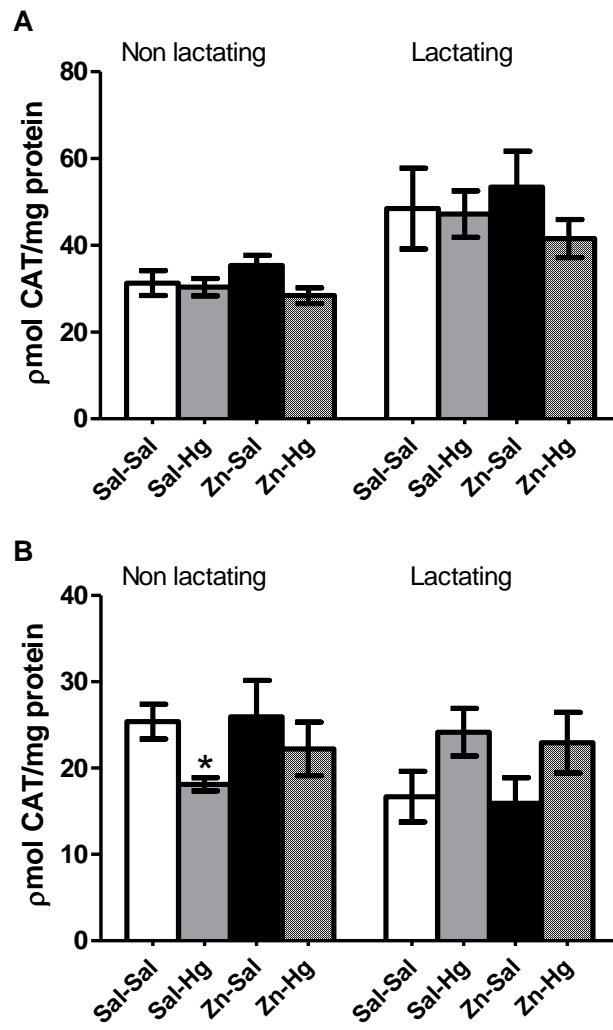


Figure 4

4 CONCLUSÕES

Em relação aos resultados apresentados podemos concluir que ratas lactantes e não lactantes apresentam diferentes sensibilidades ao mercúrio e o zinco pode ser um importante agente protetor contra a ação tóxica desse metal, tendo em vista que:

- O mercúrio inibiu a atividade da δ -ALA-D de rins, fígado e sangue das ratas não lactantes e inibiu apenas a enzima sanguínea de ratas lactantes. O pré-tratamento com zinco preveniu a inibição em todos os tecidos.
- O mercúrio inibiu a atividade da ALT sérica somente das ratas lactantes. O zinco preveniu essa inibição.
- Ratas lactantes e não lactantes expostas ao mercúrio apresentaram os níveis de tióis totais de rins diminuídos, provavelmente devido à grande afinidade do metal por grupamentos SH. O zinco preveniu parcialmente o efeito do mercúrio nas ratas lactantes.
- A exposição ao mercúrio inibiu a atividade da catalase hepática nas ratas não lactantes e o zinco preveniu essa alteração. A atividade da enzima não foi alterada nas lactantes.
- A exposição ao mercúrio causou um aumento nos níveis séricos de creatinina e ureia nas ratas não lactantes e lactantes, sendo esse efeito mais pronunciado nas ratas não lactantes. A pré-exposição ao zinco não preveniu essas alterações.

5 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, R. et al. Role of vitamin E in preventing acute mercury toxicity in rat. **Environ Toxicol Pharmacol** 29, 70-78, 2010.
- AKSOY, N. et al. Beneficial effects of vitamins C and E against oxidative stress in diabetic rats. **Nutrition Research** 25, 625-630, 2005.
- ALY, N. et al., Protective effect of vitamin C against chlorpyrifos oxidative stress in male mice. **Pest Biochem Physiol** 97, 7-12, 2010.
- AUGUSTI, P.R. et al. Effect of astaxanthin on kidney function impairment and oxidative stress induced by mercuric chloride in rats. **Food Chem Toxicol** 46, 212-219, 2008.
- BERLIN, M.; ZALUPS, R.K.; FOWLER, B.A. Mercury. In Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT, eds. Handbook on the toxicology of metals. 3rd edit. Amsterdam: Elsevier, 2007, p. 675-729, 2007.
- BHASIN, P.; SINGLA, N.; DHAWAN, D.K. Protective role of zinc during aluminum-induced hepatotoxicity. **Environ Toxicol** 2012.
- BRANDÃO, R.; BORGES, L.P.; NOGUEIRA, C.W. Concomitant administration of sodium 2,3-dimercapto-1-propanesulphonate (DMPS) and diphenyl diselenide reduces effectiveness of DMPS in restoring damage induced by mercuric chloride in mice. **Food Chem Toxicol** 47, 1771-1778, 2009b.
- BRANDÃO, R. et al. Involvement of non-enzymatic antioxidant defenses in the protective effect of diphenyl diselenide on testicular damage induced by cadmium in mice. **J Trace Elem Med Biol** 23, 324-333, 2009a.
- CECCATELLI, S.; DARÉ, E.; MOORS, M. Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. **Chem Biol Interact** 188, 301-308, 2010.

- CLARKSON, T.W. The three modern faces of mercury. **Environ Health Perspect** 11-23, 2002.
- DAMM, B.I.; BILDSOE, M.; GILBERT, C. et al. The effects of confinement on periparturient behaviour and circulating prolactin, prostaglandin F₂ α and oxytocin in gilts with access to a variety of nest materials. **App Anim Behav Sci** 76, 135-156, 2002.
- DE FREITAS, A.S. et al. Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury-induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. **Brain Res Bull** 79, 77-84, 2009.
- EDELSTEIN, C.L. Biomarkers of acute kidney injury. **Adv Chronic Kidney Dis** 15, 222-234, 2008.
- FARINA, M. et al. Profile of nonprotein thiols, lipid peroxidation and delta-aminolevulinate dehydratase activity in mouse kidney and liver in response to acute exposure to mercuric chloride and sodium selenite. **Toxicology** 184, 179-187, 2003.
- FARINA, M.; ROCHA, J.B.; ASCHNER, M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. **Life Sci** 89, 555-563, 2011.
- FERREIRA, A.L.A. & MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Bras** 43, 61-68, 1997.
- Franciscato, C. et al. Dressler, V.L., Peixoto, N.C., Pereira, M.E., 2009. ZnCl₂ exposure protects against behavioral and acetylcholinesterase changes induced by HgCl₂. **Int J Dev Neurosci** 27, 459-468, 2009.

- FRANCISCATO, C. et al. Delayed biochemical changes induced by mercury intoxication are prevented by zinc pre-exposure. **Ecotoxicol Environ Saf** 74, 480-486, 2011.
- FRANCO, J.L. et al. Zinc reverses malathion-induced impairment in antioxidant defenses. **Toxicol Lett** 187, 137-143, 2009.
- GIODA, C.R. et al. Exposure to sublethal concentrations of Zn(II) and Cu(II) changes biochemical parameters in *Leporinus obtusidens*. **Chemosphere** 69, 170-175, 2007.
- GREENWOOD, M.R. et al. Blood clearance half-times in lactating and nonlactating members of a population exposed to methylmercury. **Environ Res** 16, 48-54, 1978.
- GUEVARA, R. et al. Age and sex-related changes in rat brain mitochondrial oxidative status. **Exp Gerontol** 46, 923-928, 2011.
- HANWELL, A. & LINZELL, J.L., The effects of engorgement with milk and of suckling on mammary blood flow in the rat. **J Physiol** 233, 111-125, 1973.
- HOPPS, E. et al. A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative stress. **Nutr Metab Cardiovasc Dis** 20, 72-77, 2010.
- HURLEY, W.L. Mammary gland growth in the lactating sow. *Livestock Production Science*, Amsterdam 70, 149-157, 2001.
- HUSSAIN A.L. Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity – Short review. **Pest Biochem Physiol** 98, 145-150, 2010.
- JAFFE, E.K. Porphobilinogen synthase, the first source of heme's asymmetry. **J Bioen Biomem** v. 27, p. 169-179, 1995.

- JEMAI, H. et al. Protective effect of zinc supplementation on blood antioxidant defense system in rats exposed to cadmium. **J Trace Elem Med Biol** 21, 269-273, 2007.
- JIHEN, E.H. et al. Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver of the rat: effects on the oxidative stress. **Ecotoxicol Environ Saf** 72, 1559-1564, 2009.
- JORDAO, A.A. et al. Effect of an acute dose of ethanol on lipid peroxidation in rats: action of vitamin E. **Food Chem Toxicol** 42, 459-464, 2004.
- JOSHI, D. et al. Combined effect of N-acetyl cysteine, zinc, and selenium against chronic dimethylmercury-induced oxidative stress: a biochemical and histopathological approach. **Arch Environ Contam Toxicol** 61, 558-567, 2011.
- JOSHI, D. et al. Therapeutic potential of N-acetyl cysteine with antioxidants (Zn and Se) supplementation against dimethylmercury toxicity in male albino rats. **Experimen Toxicol Pathol** 64, 103-108, 2012.
- KOBAL, A.B. et al. Glutathione level after long-term occupational elemental mercury exposure. **Environ Res** 107, 115-123, 2008.
- LANGE, A.; AUSSEIL, O.; SEGNER, H. Alterations of tissue glutathione levels and metallothionein mRNA in rainbow trout during single and combined exposure to cadmium and zinc. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol** 131, 231-243, 2002.
- LI, P., et al. Mercury pollution in Asia: a review of the contaminated sites. **J Hazard Mater** 168, 591- 601, 2009.
- LIU, C.M. et al. Quercetin protects rat liver against lead-induced oxidative stress and apoptosis. **Environ Toxicol Pharmacol** 29, 158-166, 2010.

- MANSOUR, S.A. & MOSSA, A.-T.H. Oxidative damage, biochemical and histopathological alterations in rats exposed to chlorpyrifos and the antioxidant role of zinc. **Pest Biochem Physiol** 96, 14-26, 2010.
- MARTINS, T.D.D.; COSTA A.N.; SILVA, J.H.V. Controle neuro-endócrino da lactação em fêmeas suínas – Revisão. **Rev Eletr Cien Cent** 1, 19-32, 2010.
- MESSARAH, M. et al. Hepatoprotective role and antioxidant capacity of selenium on arsenic-induced liver injury in rats. **Exp Toxicol Pathol** 64, 167-174, 2012.
- MORAES-SILVA, L. et al. Mercury chloride increases hepatic alanine aminotransferase and glucose 6-phosphatase activities in newborn rats in vivo. **Cell Biol Int** 2012.
- NEMMICHE, S.; CHABANE-SARI, D.; GUIRAUD, P.; Role of alpha-tocopherol in cadmium-induced oxidative stress in Wistar rat's blood, liver and brain. **Chem Biol Interact** 170, 221-230, 2007.
- PAL, M. & GHOSH, M. Studies on comparative efficacy of α -linolenic acid and α -eleostearic acid on prevention of organic mercury-induced oxidative stress in kidney and liver of rat. **Food Chem Toxicol** 50, 1066-1072, 2012.
- PEIXOTO, N.C. & PEREIRA, M.E. Effectiveness of ZnCl₂ in protecting against nephrotoxicity induced by HgCl₂ in newborn rats. **Ecotoxicol Environ Saf** 66, 441-446, 2007.
- PEIXOTO, N.C. et al. Effects of zinc and cadmium on HgCl₂-delta-ALA-D inhibition and Hg levels in tissues of suckling rats. **Toxicol Lett** 146, 17-25, 2003.
- PEIXOTO, N.C. et al. Metallothionein, zinc, and mercury levels in tissues of young rats exposed to zinc and subsequently to mercury. **Life Sci** 81, 1264-1271, 2007.

- PEROTTONI, J. et al. Renal and hepatic ALA-D activity and selected oxidative stress parameters of rats exposed to inorganic mercury and organoselenium compounds. **Food Chem Toxicol** 42, 17-28, 2004.
- PI, J. et al. ROS signaling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function. **Toxicol Appl Pharmacol** 244, 77-83, 2010.
- PIAO, F. et al. Subacute toxic effects of zinc on various tissues and organs of rats. **Toxicol Lett** 145, 28-35, 2003.
- PRASAD, A.S. Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. **Exp Gerontol** 43, 370-377, 2008.
- PRESTER, L.; BLANUŠA, M.; KOSTIAL, K. Half-time and distribution of inorganic mercury in lactating dams and their pups. **Toxicol Lett**, v. 74, p. 66S–67S, 1994.
- PRINTICE, A. Pregnancy and lactation. *Med Res Coun Hum Nutri Res*. 2003
- PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia** 82, 513-523, 2011.
- RAVEL, R. Laboratório clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais. 6ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
- RENDON-RAMIREZ, A. et al. Vitamin-E reduces the oxidative damage on delta-aminolevulinic dehydratase induced by lead intoxication in rat erythrocytes. **Toxicol In Vitro** 21, 1121-1126, 2007.
- ROONEY, J.P. The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. **Toxicology** 234, 145-156, 2007.
- ROSENFELDT, F. et al. Oxidative stress in surgery in an ageing population: Pathophysiology and therapy. **Exp Gerontol** 2012.

- SOLAIMAN, D. et al. Increased metallothionein in mouse liver, kidneys, and duodenum during lactation. *Toxicol Sci* 60, 184-192, 2001.
- SANDSTEAD, H.H & AU W. Zinc. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT, editors, *Handbook on the Toxicology of Metals*, Academic Press, USA, 925-47, 2007.
- SAPER, R.B. & RASH, R., Zinc: an essential micronutrient. **Am Fam Physician** 79, 768-772, 2009.
- SARWAR A.M. et al. Eruca sativa seeds possess antioxidant activity and exert a protective effect on mercuric chloride induced renal toxicity. **Food Chem Toxicol** 45, 910-920, 2007.
- SHAH, D., Magnitude of zinc deficiency and efficacy of zinc. **Indian J Pediatr** 78, 1140-1141, 2011.
- SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **Am J Med** 91, 31-38, 1991.
- SIMMONS, S.O. et al. NRF2 Oxidative Stress Induced by Heavy Metals is Cell Type Dependent. **Curr Chem Genomics** 5, 1-12, 2011.
- STEBENS, W.E., Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc. **Exp Mol Pathol** 75, 265-276, 2003.
- SU, L. et al. The interaction of selenium and mercury in the accumulations and oxidative stress of rat tissues. **Ecotoxicol Environ Saf** 70, 483-489, 2008.
- SUZUKI, K. et al. Changes of plasma osmotic pressure during lactation in rats. **J Vet Med Sci** 55, 561-564, 1993.
- SUZUKI, K. et al. Changes in plasma arginine vasopressin concentration during lactation in rats. **Comp Med** 50, 277-280, 2000.
- UVNÄS-MOBERG, K.; JOHANSSON, B.; LUPOLI, B. et al. Oxytocin facilitates

- behavioural, metabolic and physiological adaptations during lactation. **App Anim Behav Sci** 72, 225-234, 2001.
- VALLE, L.G. Oxidative stress in aging: Theoretical outcomes and clinical evidences in humans. **Biomed Pharmacol**, 2010.
- VEDAVATHI, M.; GIRISH, K.S.; KUMAR, M.K. Isolation and characterization of cytosolic alanine aminotransferase isoforms from starved rat liver. **Mol Cell Biochem** 267, 13-23, 2004.
- VICENTE, E. et al. Hippocampal antioxidant system in neonates from methylmercury-intoxicated rats. **Neurotoxicol Teratol** 26, 817-823, 2004.
- VIEZELIENE, D. et al. Protective effect of selenium on aluminium-induced oxidative stress in mouse liver in vivo. **Environ Toxicol Pharmacol** 31, 302-306, 2011.
- YAO, J.K. & KESHAVAN, M.S. Antioxidants, redox signaling, and pathophysiology in schizophrenia: an integrative view. **Antioxid Redox Signal** 15, 2011-2035, 2011.
- ZAHIR, F. et al., Low dose mercury toxicity and human health. **Environ Toxicol Pharmacol** 20, 351-360, 2005.
- ZALUPS, R.K. Molecular interactions with mercury in the kidney. **Pharmacol Rev** 52, 113-143, 2000.
- ZALUPS, R.K. & CHERIAN, M.G. Renal metallothionein metabolism after a reduction of renal mass. I. Effect of unilateral nephrectomy and compensatory renal growth on basal and metal-induced renal metallothionein metabolism. **Toxicology** 71, 83-102, 1992.