



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

GABRIELLA ARAÚJO MATOS

**EFEITOS DA INTOXICAÇÃO MERCURIAL NO ESTRESSE OXIDATIVO E EM
MARCADORES INFLAMATÓRIOS NO DUODENO DE CAMUNDONGOS
C57BL/6J SUBMETIDOS À DIETA OCIDENTAL**

FORTALEZA

2020

GABRIELLA ARAÚJO MATOS

**EFEITOS DA INTOXICAÇÃO MERCURIAL NO ESTRESSE OXIDATIVO E EM
MARCADORES INFLAMATÓRIOS NO DUODENO DE CAMUNDONGOS
C57BL/6J SUBMETIDOS À DIETA OCIDENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre. Área de Concentração: Patogêneses das doenças imunoinflamatórias.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M381e Matos, Gabriella Araújo.
EFEITOS DA INTOXICAÇÃO MERCURIAL NO ESTRESSE OXIDATIVO E EM
MARCADORES INFLAMATÓRIOS NO DUODENO DE CAMUNDONGOS C57BL/6J
SUBMETIDOS À DIETA OCIDENTAL / Gabriella Araújo Matos. – 2020.
85 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá.

1. Metilmercúrio. 2. Intestino. 3. Dieta ocidental. 4. Estresse oxidativo. 5. Inflamação. I.
Título.

CDD 610

GABRIELLA ARAÚJO MATOS

**EFEITOS DA INTOXICAÇÃO MERCURIAL NO ESTRESSE OXIDATIVO E
INFLAMAÇÃO NO DUODENO DE CAMUNDONGOS C57BL/6J SUBMETIDOS À
DIETA OCIDENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre. Área de Concentração: Patogêneses das doenças imunoinflamatórias.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Lília Maria Carneiro Câmara
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Tudo posso naquele que me fortalece.
(Filipenses 4:13)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por sempre me guiar pelos caminhos corretos. Agradeço a meus pais, pelo incansável incentivo aos estudos, por entender minha ausência nos últimos meses, sem eles nada seria realizado. Bem como, aos meus irmãos que estão sempre na torcida. Ao meu namorado pela paciência nos momentos de angústia e pelo companheirismo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá por acreditar no meu trabalho e me proporcionar essa experiência de desenvolver uma pesquisa científica. Com certeza contribuiu bastante para meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Aos professores da banca, Profa. Dra. Lília Maria Carneiro Câmara e a Profa. Dra. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite, pela disposição e considerações. Tenho certeza que poderei enriquecer o trabalho mais ainda.

A todos do Laboratório de Produtos Naturais (LPN), a profa. Dra. Flávia Almeida Santos, por abrir as portas do seu laboratório e disponibilizar a realização dos experimentos de estresse oxidativo, em especial ao Paulo Iury por sua disposição e paciência.

À profa. Dr. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite, chefe do Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional (LABIN), da Universidade Federal de Minas Gerais, que contribuiu de forma direta para sucesso dessa pesquisa.

À Universidade de Fortaleza, em especial ao prof. Dr. Ramon Raposo (e sua equipe), obrigada pela colaboração tão importante na condução deste trabalho.

Aos técnicos do Núcleo de Ensino e Pesquisa em Microscopia e Processamento de Imagens (NEMPI). A Flávia, pelo preparo dos blocos de parafina e lâminas coradas com HE, e ao Júnior, pelo preparo das lâminas de PAS.

Ao Daniel Vieira, por toda sua ajuda com os experimentos, por cada conversa e ajuda nos gráficos que foram discutidos.

A todos meus amigos do Labiconte. Pude ter o privilégio de compartilhar momentos incríveis de alegrias com vocês: Amanda Ribeiro, Caroline Benicio, Juan

Roriz, Cristhyane Costa, André Aguiar, Carlyne Moreira, Catarina Campelo, Claudiane Carvalho, Ronaldo Dias e José Carlos.

À Cássia Rodrigues, que mesmo longe se fez presente em cada momento.

Agradecimento especial a Fátima Virgínia pela prontidão, pelas conversas sempre divertidas e pela ajuda nas análises do meu trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, aos seus professores, meu agradecimento pelos conhecimentos obtidos durante este trajeto.

À Secretaria de Pós-Graduação, em especial a Ivone e a Rita por todo suporte necessário ao longo dos anos.

A todos os funcionários do centro de Biomedicina, em especial ao José Amadeus. Jeferson. Claudinha e Marcilio, sempre nos recebendo com carinho e alegria.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e o projeto PROCAD da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

Meus sinceros e humildes agradecimentos vão às pessoas que direta ou indiretamente estiveram comigo durante esse percurso, comemorando as vitórias, mas também sofrendo as angústias, sem vocês eu não teria conseguido.

RESUMO

O mercúrio (Hg) é um poluente global com ação tóxica em diversos órgãos, tanto em animais quanto em seres humanos. Recentemente, o aumento da exposição ao Hg pode ter ocorrido em desastres ambientais no Brasil envolvendo desmoronamento de barragens, contendo rejeitos com altas concentrações de metais. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da intoxicação do MeHg no duodeno de camundongos C57BL/6J submetidos à dieta padrão ou dieta ocidental, no estresse oxidativo e em parâmetros inflamatórios. Nenhum estudo foi realizado avaliando os efeitos do MeHg no duodeno após dieta hiperlipídica. Foram utilizados camundongos machos C57BL/6J, após desmame, com 21 dias de idade e peso entre 8-11 g. Os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais de acordo com o tipo de dieta e exposição ao MeHg. Para a indução de hiperlipidemia, os animais receberam uma dieta ocidental (42% de lipídeos), durante os dias 21 a 61 de idade. Os grupos intoxicados receberam uma solução de cloreto de MeHg na água de beber (20 mg/L) nos últimos 21 dias após início das dietas. Os grupos experimentais foram: grupo normonutrido controle (CT), recebendo dieta padrão; grupo hiperlipídico (HF), recebendo dieta ocidental; grupo normonutrido intoxicado com MeHg (Hg) e um grupo hiperlipídico intoxicado com MeHg (HFHg). Os animais foram pesados 2 vezes por semana, após o início das dietas. Os animais foram eutanasiados ao completar 40 dias de dieta. Foram coletadas amostras de duodeno, sangue e pelo. O pelo foi colhido na região dorsal do animal por tricotomia para análise da concentração de Hg. O soro foi obtido para análise dos níveis de colesterol total e triglicerídeos (mg/dL). Para avaliação morfológica no duodeno foram analisados o comprimento de vilos, profundidade de cripta e razão vilos:cripta em lâminas coradas em hematoxilina e eosina (H&E) e contagem de células caliciformes PAS positivas em lâminas coradas pelo ácido periódico de Schiff. Para avaliação do estresse oxidativo, os níveis de malondialdeído (MDA), glutathione peroxidase (GPx), glutathione (GSH) e razão NO_2/NO_3 foram analisados. Além disso, a expressão gênica de Nrf2 por qRT-PCR foi avaliada. Para avaliação dos parâmetros inflamatórios, os níveis de mieloperoxidase (MPO) foram analisados por ELISA e a transcrição de IL-6, IL-10 e TNF- α por qRT-PCR. A expressão das proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas Bax e Bcl2 também foi analisada por qRT-PCR. A dieta ocidental induziu efeito

obesogênico nos animais. A intoxicação mercurial reduziu o ganho de peso nos animais quando comparado aos controles, independente da dieta. Os grupos intoxicados apresentaram maiores concentrações de MeHg no pelo em relação aos controles. A dieta hiperlipídica aumentou significativamente os níveis séricos de colesterol e triglicerídeos. O grupo HFHg apresentou reduções significativas na altura dos vilos, profundidade das criptas e na razão vilo/cripta e menor número de células PAS positivas. A dieta hiperlipídica aumentou significativamente os níveis de NO₂/NO₃ e MDA no duodeno, independente da intoxicação. A exposição ao MeHg foi capaz de diminuir os níveis de GPx e aumentar níveis de NO₂/NO₃, MDA e GSH. O grupo HFHg apresentou redução na transcrição de Nrf2. Os níveis de RNAm da IL-10 e IL-6 e de Bcl-2 foram menores no grupo HF quando comparado com os controles. A intoxicação com MeHg não alterou os níveis transcricionais de IL-10, IL-6 e TNF- α . O grupo HFHg apresentou menores níveis de MPO em relação aos demais grupos experimentais. Os resultados desse estudo sugerem que a intoxicação por MeHg causou estresse oxidativo no duodeno, porém sem alterar os marcadores inflamatórios. A dieta hiperlipídica apresentou efeito anti-inflamatório com aumento de estresse oxidativo, além de reduzir a transcrição de Bcl-2. A dieta hiperlipídica (ocidental) foi capaz de influenciar a toxicidade do MeHg no duodeno com a redução dos níveis de NO₂/NO₃ e GSH. Porém, mais estudos precisam ser realizados para entender melhor os mecanismos envolvidos na toxicidade do MeHg e modulação da dieta ocidental no intestino delgado.

Palavras-chave: Metilmercúrio. Intestino. Dieta ocidental. Estresse oxidativo. Inflamação.

ABSTRACT

Mercury (Hg) is a global pollutant with toxic action on several organs, both in animals and in humans. Recently, the increase in exposure to Hg may have occurred in environmental disasters in Brazil involving the collapse of dams, containing tailings with high concentrations of metals. The objective of this work was to evaluate the effect of MeHg intoxication in the duodenum of C57BL/6J mice subjected to the standard or western diet, on oxidative stress and inflammatory parameters. No study has been conducted evaluating the effects of MeHg on the duodenum after a high-fat diet. Male C57BL/6J mice, after weaning, with 21 days of age and weighing between 8-11 g were used. The animals were randomly divided into four experimental groups according to the type of diet and exposure to MeHg. For the induction of hyperlipidemia, the animals received a western diet (42% of lipids), during 21 to 61 days of age. The intoxicated groups received a MeHg chloride solution in their drinking water (20 mg/L) in the last 21 days after starting the diets. The experimental groups were: normonourished control group (CT), receiving a standard diet; hyperlipidic group (HF), receiving a western diet; normonourished group intoxicated with MeHg (Hg) and a hyperlipidic group intoxicated with MeHg (HFHg). The animals were weighed twice a week, after starting the diets. Mice were euthanized after completing 40 days of diet. Samples of duodenum, blood and hair were collected. The hair was harvested on the dorsal region of the animal by trichotomy to analyze the Hg concentration. The serum was obtained to analyze the levels of total cholesterol and triglycerides (mg/dL). For morphometric evaluation in the duodenum, the villus length, crypt depth and villus:crypt ratio in hematoxylin and eosin (H&E)-stained slides and PAS goblet cell count in Schiff periodic acid-stained slides were analyzed. To assess oxidative stress, the levels of malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GPx), glutathione (GSH) and NO₂/NO₃ ratio were analyzed. In addition, Nrf2 gene expression by qRT-PCR was evaluated. For the evaluation of inflammatory parameters, the levels of myeloperoxidase (MPO) were analyzed by ELISA and the transcription of IL-6, IL-10 and TNF- α by qRT-PCR. The expression of the pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins Bax and Bcl2 was also analyzed by qRT-PCR. The western diet induced an obesogenic effect in the animals. Mercurial intoxication reduced weight gain in animals when compared to controls, regardless of diet. The intoxicated groups showed higher concentrations of MeHg in the hair

compared to the controls. The high-fat diet significantly increased serum levels of cholesterol and triglycerides. The HFHg group showed significant reductions in villus height, crypt depth and villus/crypt ratio and fewer PAS positive cells. The hyperlipidic diet significantly increased the levels of NO₂/NO₃ and MDA in the duodenum, regardless of intoxication. Exposure to MeHg was able to decrease GPx levels and increase NO₂/NO₃, MDA and GSH. The HFHg group showed a reduction in Nrf2 transcription. The levels of IL-10 and IL-6 and Bcl-2 mRNA were lower in the HF group when compared to controls. MeHg intoxication did not alter the transcriptional levels of IL-10, IL-6 and TNF- α . The HFHg group had lower levels of MPO compared to the other experimental groups. The results of this study suggest that MeHg intoxication caused oxidative stress in the duodenum without altering inflammatory markers. The hyperlipidic diet had an anti-inflammatory effect with increased oxidative stress, in addition to reducing the transcription of Bcl-2. The hyperlipidic (western) diet was able to influence the toxicity of MeHg in the duodenum by reducing the levels of NO₂/NO₃ and GSH. However, more studies need to be carried out to better understand the mechanisms involved in MeHg toxicity and modulation of the western diet in the small intestine.

Keywords: Methylmercury. Gut. Western diet. Oxidative stress. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Exposição ao Hg, através dos garimpos, onde é utilizado para amalgamar o ouro no processo de extração, seguido pelo uso na indústria e agricultura	21
Figura 2 -	Organização geral das camadas intestinais	25
Figura 3 -	Representação dos grupos experimentais	37
Figura 4 -	Microisolador apresentando adesivo com símbolo de material com risco biológico e diagrama de Hommel	39
Figura 5 -	Modelo esquemático da análise morfométrica da altura do vilo e profundidade da cripta, utilizando o programa Image J 1.4®	41
Figura 6 -	Concentração de mercúrio no pelo dos grupos experimentais	49
Figura 7 -	Percentual de ganho de peso dos animais submetidos à intoxicação mercurial e expostos à dieta hiperlipídica	50
Figura 8 -	Impacto da administração de dieta ocidental e exposição ao MeHg sobre a concentração de colesterol total sérico e triglicerídeos (mg/dL) em camundongos C57BL/6J	51
Figura 9 -	Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos do duodeno de camundongos C57BL/6J, submetidos a dieta ocidental contendo (42% de lipídios) e dieta padrão, animais sem intoxicação ou intoxicados com MeHg (20 mg/l na água de beber) coradas em H&E	52
Figura 10 -	Avaliação morfométrica da altura dos vilos, profundidade das criptas e a relação vilo/cripta no duodeno de camundongos C57BL/6J, submetidos a dieta ocidental contendo (42% de lipídios) e dieta padrão, animais sem intoxicação ou intoxicados com MeHg (20 mg/L na água de beber)	53
Figura 11 -	Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos do duodeno de camundongos C57BL/6J, submetidos a dieta ocidental contendo (42% de lipídios) e dieta padrão, animais sem intoxicação ou intoxicados com MeHg (20 mg/l na água de beber) marcados com PAS	54
Figura 12 -	Quantidade de células caliciformes por vilo no duodeno de camundongos C57BL/6J, submetidos a dieta ocidental contendo	

	(42% de lipídios) e dieta padrão e animais intoxicação ou não por MeHg (20 mg/L na água de beber)	55
Figura 13 -	Avaliação da atividade enzimática da mieloperoxidase no duodeno dos camundongos C57BL/6J submetidos à dieta ocidental e/ou intoxicação pelo MeHg.....	55
Figura 14 -	Avaliação do estresse oxidativo por meio da análise das concentrações de GPx, GHS, NO ₂ /NO ₃ e MDA no duodeno dos camundongos C57BL/6J submetidos à dieta ocidental ou dieta padrão, intoxicação ou não por MeHg	57
Figura 15 -	Transcrição de Nrf2 por qRT-PCR usando β-actina como referência.	58
Figura 16 -	Transcrição de TNF-α, IL-6 e IL-10 por qRT-PCR usando β-actina como referência	58
Figura 17 -	Análise da expressão de Bcl-2 e Bax por qRT-PCR usando β-actina como referência	59
Figura 18 -	Modelo representativo da ação do MeHg e o consumo de dieta ocidental (42% de lipídios) no duodeno de camundongos C57BL/6J.....	69

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Composição nutricional da dieta ocidental e da ração comercial padrão	38
Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados nas análises de qRT-PCR	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA	Anticorpos antinucleares
ATP	Adenosina trifosfato
Bax/Bak	Proteína X associada ao Bcl-2
Bcl-2	Proteína de linfoma de células B
CAT	Catalase
Cd	Cádmio
CH ₃ COO ₂ Pb	Acetato de chumbo
Cys	Cisteína
Enxofre	S
EPI	Equipamento de proteção Individual
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutationa peroxidase
Grupos Sulfidrilas	SH
GSH	Glutationa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HClO ₄	Ácido perclórico
Hg	Mercúrio
Hg ₂ Cl ₂	Cloreto de mercúrio
Hg ₂ O ₂	Peróxido de mercúrio
HgCl ₂	Cloreto de mercúrio
HgClO	Hipoclorito de mercúrio
HgO	Óxido de mercúrio
HgS	Sulfeto de mercúrio
HNO ₃	Ácido nítrico
IGAM	Instituto Mineiro de Gestão das Águas
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
Kcal	Quilocalorias
KMnO ₄	Permanganato de potássio
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MDA	Malondialdeído
MeHg	Metilmercúrio
mg/L	Miligrama por litro
ml/Dia	Mililitro por dia
MPO	Mioleperoxidase
NF κ B	Factor nuclear kappa B
ng/mg	Nanograma por miligrama
NH ₂ OH.Cl	Cloreto de hidroxilamônio
Ni	Níquel
NO ₂	Nitrato
NO ₃	Nitrito
O ₂	Superóxido
OH	Hidroxila
Pb	Chumbo
PBS	Tampão fosfato-salino

PN	Pós-natal
QC	quercetina
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema nervoso entérico
SOD	Superóxido dismutase
TGI	Trato gastrointestinal
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
$\mu\text{g/L}$	Micrograma por litro
μm	Micrômetro
μmol	Micromolar
VALE	Companhia Vale do Rio Doce

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO	19
1.1	Contaminação ambiental e humana, uma visão geral do problema	19
1.2	Intoxicação mercurial	22
1.3	Intestino delgado, uma visão geral sobre o órgão	23
1.4	Porção do duodeno no intestino delgado	24
1.5	Vias de sinalização inflamatória e estresse oxidativo	25
1.6	Interações da intoxicação mercurial com o funcionamento intestinal	28
1.7	Consumo de dietas com alto teor de gordura e calorias	29
1.8	Interações do consumo de dietas hiperlipídicas e função intestinal	30
1.9	Possíveis interações entre a intoxicação mercurial e as dietas	31
2.0	JUSTIFICATIVA	33
3.0	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo geral	34
3.2	Objetivos específicos	34
4.0	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	Animais	36
4.2	Ética	36
4.3	Delineamento experimental	36
4.4	Coleta das amostras	37
4.5	Composição das dietas	37
4.6	Intoxicação dos animais	38
4.7	Manejo e descarte de material contaminado com MeHg	38
4.8	Dosagem de Metilmercúrio no pelo	40
4.9	Análise de lipídios séricos (colesterol total e triglicerídeos)	41
4.10	Morfometria intestinal	41
4.11	Determinação de células calciformes positivas com ácido periódico de Schiff (PAS)	42
4.12	Avaliação dos marcadores do estresse oxidativo	42
4.12.1	<i>Ensaio da glutathione peroxidase (GPx)</i>	42
4.12.2	<i>Determinação da glutathione reduzida (GSH)</i>	42

4.12.3	<i>Avaliação dos níveis de NO₂/NO₃</i>	43
4.12.4	<i>Dosagem de malondialdeído (MDA)</i>	43
4.13	Ensaio de imunoabsorção enzimática para MPO	44
4.14	Análise da expressão das citocinas TNF-α, IL-10, IL-6, Bcl2 e Bax por qRT-PCR	45
4.14.1	<i>Extração do RNA</i>	45
4.14.2	<i>Síntese do cDNA</i>	45
4.14.3	<i>PCR em Tempo Real (qRT-PCR)</i>	45
4.15	Drogas e reagentes	46
4.16	Equipamentos e materiais	47
4.17	Análise estatística	48
5.0	RESULTADOS	49
5.1	Concentração de mercúrio no pelo dos grupos experimentais	49
5.2	Ganho de peso dos animais	49
5.3	Dosagem dos níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos	50
5.4	Avaliação morfométrica	51
5.5	Determinação de células calciformes positivas	53
5.6	Atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO)	55
5.7	Determinação de marcadores de estresse oxidativo	56
5.8	Transcrição de Nrf2 por qRT-PCR	57
5.9	Transcrição de TNF-α, IL-6 e IL-10 por qRT-PCR	58
5.10	Transcrição de Bcl-2 e Bax por qRT-PCR	59
6.0	DISCUSSÃO	60
7.0	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXO	85

1.0 INTRODUÇÃO

Diversos poluentes ambientais, resultantes do crescimento industrial, vêm sendo despejados no ecossistema aquático ao longo de anos, sendo absorvidos pelo bioma aquático (WU *et al.*, 2016). Metais como o mercúrio (Hg) caracterizam-se por sua alta taxa de biotransformação, passando a se apresentar como formas associadas a um radical metil (metilmercúrio – MeHg). Além da forma metilada, as formas de Hg encontradas na natureza apresentam volatilidade e estabilidade na atmosfera, pela formação de sais mercúricos. Sua forma metilada é lipossolúvel e atravessa facilmente as membranas celulares, afetando principalmente o Sistema Nervoso Central (SNC) (AZEVEDO, 2003; LACERDA; MALM, 2008; BASTOS *et al.*, 2012; CASTELLANOS; FUENTE, 2016).

O Hg é utilizado pela humanidade há cerca de 3000 anos. Algumas das primeiras evidências do uso do Hg pelo homem vêm da China, com seu uso para o tratamento de dores de cabeça, disenteria, febre, dor de dente e infecções renais. Outros relatos descrevem o uso do Hg para tratamento da sífilis, malária e artrite (AMOLI, *et al.*, 2011; YE *et al.*, 2016).

Contudo, no ocidente sua aplicação cresceu com o uso industrial, como na fabricação de lâmpadas (incluindo as fluorescentes), de instrumentos de pressão, medição e calibração em laboratórios analíticos, produção de acetaldeído e refinamento do petróleo. Mas, seu uso não se restringiu à área industrial e de manufatura, passando a ter aplicações variadas como em amálgamas dentárias e na extração de minérios de ouro. Esse último uso é o principal agente ocasionador da poluição ambiental derivada do uso do Hg (KLAASSEN, 1990; LACERDA; PFEIFFER, 1992; CLARKSON *et al.*, 2003; COUNTER; BUCHANAN, 2004).

1.1. Contaminação por mercúrio, uma visão geral do problema

O primeiro desastre ambiental de repercussão mundial, que expôs ao mundo o risco de contaminação pelo Hg, aconteceu em meados de 1950, no Japão, após um acidente envolvendo uma indústria produtora de acetaldeído, com derramamento de dejetos químicos contendo Hg, na baía de Minamata. Esse episódio deu origem a uma desordem do SNC conhecida como doença de Minamata, síndrome caracterizada por danos neurológicos e que leva à ocorrência de distúrbios motores e sensoriais, danos oculares e auditivos e até morte em alguns casos (HA *et al.*, 2016).

No acidente de Minamata, o Hg despejado na costa acumulou-se no fundo do mar, contaminando a biota marinha e águas vizinhas. Esse metal sofre metilação pelas bactérias das algas bem como daquelas presentes no trato gastrointestinal (TGI) dos peixes, transformando-se em MeHg (forma mais tóxica devido a sua facilidade em ultrapassar camadas lipídicas) e chegou até a população através da ingestão de peixes e de frutos do mar contaminados (CLARKSON *et al.*, 2003).

Outros acidentes chamaram a atenção para o uso do Hg como fungicida em lavouras. Registrou-se em 1972 cerca de 6.530 casos de intoxicação pelo metal no Irã, sendo os mais graves os que envolviam gestantes. Irã, Paquistão e Guatemala foram alguns dos países onde esse tipo de acidente foi registrado (CLARKSON *et al.*, 2003).

Na Amazônia, em meados de 1970, a extração de ouro resultou em expansão garimpeira, trazendo como consequências o despejo de Hg no meio ambiente (SANTOS, 2002; SIQUEIRA *et al.*, 2012). Os garimpeiros usam o Hg líquido para separar o ouro das impurezas (SILBERGELD *et al.*, 2002). O amálgama é então aquecido com maçaricos em painéis ou frigideiras, a céu aberto, e dessa forma, o Hg se destaca do ouro evaporando. Esse vapor de Hg em parte absorvido diretamente pelos garimpeiros e outra liberada no ambiente, promove contaminação indireta, pela bioacumulação residual. Esse tipo de atividade mineradora é hoje relacionado com a prática ilegal e persiste no tempo (BOISCHIO; BARBOSA, 1993; WASSERMAN *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2002; BISINOTI; JARDIM, 2004).

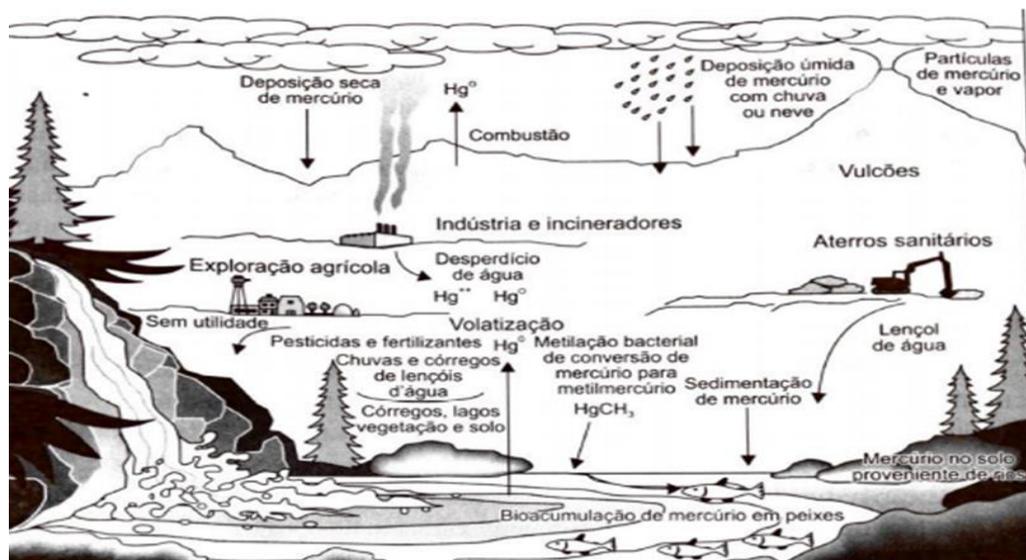
Ao avaliar o subtipo de composto mercúrico presente nos peixes da Amazônia, verificou-se que o MeHg correspondeu a 90% da concentração total de Hg analisado. Considerando que a dieta da maioria da população indígena e ribeirinha é constituída de peixes, aumenta-se assim a exposição desta população às fontes de contaminação de Hg (DIAS *et al.*, 2008; BERZAS-NEVADO *et al.*, 2010; FARINA *et al.*, 2011; CRESPO-LOPÉZ *et al.*, 2011).

Uma característica importante a se destacar do Hg é a sua capacidade de se inserir e acumular-se, em especial nos predadores do topo da cadeia alimentar, como apresentados na **Figura 1** (NORDBERG; FOWLER; NORDBERG, 2014; KIM *et al.*, 2015). O MeHg forma conjugados com biomoléculas contendo enxofre (S), fornecendo mecanismo de transporte através das membranas. Em recém-nascidos a dieta materna é a principal via de exposição, devido à sua biodisponibilidade no leite materno (HAMMERSCHMIDT; SANDHEINRICH, 2005). Já na fase adulta a principal

via de exposição ao MeHg é através de dieta (DEPEW *et al.*, 2012) e essa exposição tem sido associada a neurodegeneração (HAMMERSCHMIDT; SANDHEINRICH, 2005; RIVERA-MANCÍA *et al.*, 2010).

A concentração de mercúrio também foi avaliada em alguns peixes do litoral cearense. Os peixes analisados foram o *Scomberomorus cavale* e *Scomberomorus brasiliensis*, popularmente conhecidos como cavala e serra, respectivamente. Foi possível identificar níveis acima dos valores recomendados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) máximos (1 µg/g) em alguns exemplares de cavala, alcançando valores de 1,7 µg/g (BRAGA, 2006; LACERDA; MALM; MALM, 2008; COSTA; LACERDA, 2009; BRASIL, 2013).

Figura 1. Exposição ao Hg, através dos garimpos, onde é utilizado para amalgamar o ouro no processo de extração, seguido pelo uso na indústria e agricultura.



Fonte: AZEVEDO, 2003.

Nos últimos 5 anos outro fator chamou a atenção das autoridades brasileiras. Uma vistoria nas barragens de rejeito presentes na região de Minas Gerais (MG) demonstrou risco de rompimento devido ao aumento do volume do material represado com as chuvas na região (DE FARIA, 2019; FREITAS *et al.*, 2019).

O caso de rompimento dessas barragens mais recente aconteceu em Brumadinho, 2019, onde a barragem construída em 1976 se encontrava desativada e com nenhuma atividade operacional. Porém, devido à falta de manutenção e seu grande volume, rompeu-se liberando os rejeitos de mineração na cidade. Segundo a

Companhia Vale do Rio Doce (VALE), companhia responsável pela manutenção da barragem, ela apresentava um volume de 12 milhões de metros cúbicos (m³) de rejeitos de mineração. Número bem menor comparado com o desmoronamento ocorrido em Mariana-MG em janeiro de 2015, onde foram liberados cerca de 45 milhões de m³ de resíduos minerais em lama (DE FARIA, 2019; FREITAS *et al.*, 2019).

Os rejeitos da mineração, contendo altas concentrações de metais pesados, destruiu grande parte da vegetação local e provocou a morte de diversas espécies de animais. Os rejeitos atingiram ainda o rio Paraopeba, um dos afluentes do rio São Francisco. A economia regional foi seriamente afetada, o município de Brumadinho perdeu cerca de 60% de sua renda, e o comércio e a indústria do turismo foram gravemente prejudicados. Os impactos socioeconômicos e ambientais do desastre ainda estão sendo contabilizados. Alterações na turbidez da água e a concentração de metais presentes a saúde dos bombeiros militares envolvidos nos resgates das vítimas têm sido fonte constante de preocupação para as autoridades (DE FARIA, 2019; FREITAS *et al.*, 2019).

1.2. Intoxicação mercurial

O Hg é um poluente global, associado a danos renais, imunológicos e genéticos, tanto em animais quanto em seres humanos (LIU *et al.*, 2018). Existem três formas diferentes de Hg no ambiente: elementar (Hg⁰), inorgânico (Hg) e orgânico (MeHg) (LI *et al.*, 2017).

O MeHg, por exemplo, pode se ligar aos grupos sulfidrilas (SH) existentes nas proteínas dos seres humanos, mantendo grande mobilidade através dos tecidos. A lipossolubilidade dos compostos organomercuriais também facilita a sua passagem através dos tecidos (HAMMERSCHMIDT; SANDHEINRICH, 2005; LIU *et al.*, 2018).

Cerca de 95% do MeHg ingerido é absorvido rapidamente pelo trato gastrointestinal, posteriormente alcançando a corrente sanguínea. No plasma, o complexo formado é então transportado ativamente através das membranas biológicas principalmente como L-cisteína via transportadores de aminoácidos neutros. O conjugado formado é o metilmercúrio-cisteína (CH₃Hg-S-Cys) (CLARKSON *et al.*, 2006; NORDBERG; FOWLER; NORDBERG, 2014).

Sua excreção ocorre principalmente via fecal (90%), também podendo ocorrer através da urina e ainda via leite materno. Cerca de 5% do MeHg é acumulado na

corrente sanguínea, 10% estão distribuídos no cérebro, podendo acumular-se também em outros órgãos como rins e fígado. O MeHg é metabolizado a mercúrio inorgânico antes de sua eliminação via fezes, entretanto essa conversão é bastante lenta (CLARKSON *et al.*, 2003; CASTOLDI *et al.*, 2003; VIRTANEN *et al.*, 2007; NORDBERG; FOWLER; NORDBERG, 2014).

Lemes e Wang, (2019) demonstraram que o MeHg do músculo dos peixes é predominantemente armazenado como MeHg-Cys que entra nas células epiteliais intestinais por meio de transportadores de aminoácidos neutros (LAT). Assim como, também foi demonstrado que muitos dos mesmos mecanismos de captação de Hg, ocorre no intestino humano após a ingestão de MeHg por peixes, com o LAT tendo um papel importante no transporte de MeHg-Cys, também por outros transportadores de peptídeos (PepT-1) e o transportador de ânions orgânicos (OAT) (BRIDGES; ZALUPS, 2010).

1.3. Intestino delgado, uma visão geral sobre o órgão

O intestino delgado está localizado entre o estômago e o intestino grosso, e é dividido nos segmentos duodeno, jejuno e íleo. As suas funções básicas são a digestão e a absorção de nutrientes. O processo de digestão é realizado, principalmente, no duodeno e na porção inicial do jejuno, pela ação conjunta de componentes das secreções salivar, gástrica, pancreática e biliar. A absorção de nutrientes ocorre em todo o comprimento do intestino delgado. O TGI possui uma importância que vai além da função digestória e da absorção de nutrientes. Uma característica peculiar é sua capacidade de exibir respostas imunes, e agir de modo semelhante a uma barreira contra agentes nocivos (DUNCAN; GRANT, 2003; GANONG, 2003; VASINA *et al.*, 2006).

O TGI possui um sistema nervoso próprio denominado sistema nervoso entérico (SNE). Esse sistema controla essencialmente os movimentos e a secreção gastrointestinal. O SNE é formado principalmente por dois plexos denominados de plexo mioentérico (plexo de Auerbach) e plexo submucoso (plexo de Meissner), os quais apresentam neurônios e células gliais em gânglios entéricos, interconectados por fibras nervosas (GANONG, 2003; VASINA *et al.*, 2006). A integridade da barreira intestinal tem importância vital para o organismo, impedindo ou dificultando a

passagem de bactérias e de produtos bacterianos para a circulação sanguínea (DUNCAN; GRANT, 2003).

1.4. Porção do duodeno no intestino delgado

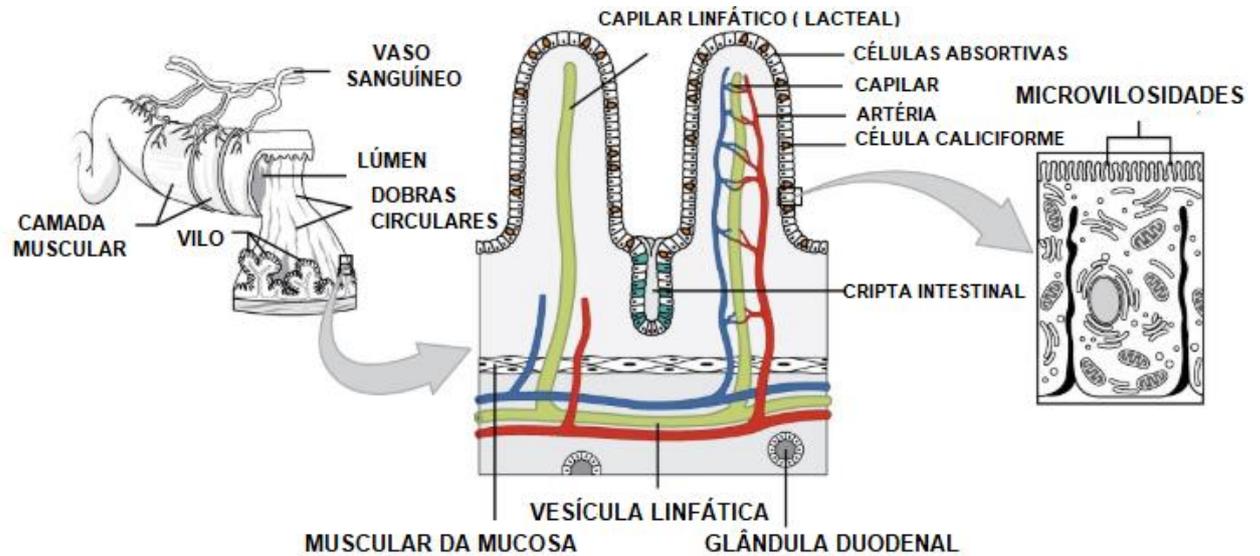
O duodeno faz parte do intestino delgado, compondo sua primeira porção, precedendo o jejuno e o íleo. Tem seu início no piloro do estômago, findando na junção duodeno-jejunal. Suas principais funções são transporte, digestão e absorção de nutrientes (RODRIGUES; MENIN, 2008).

O duodeno se liga ao estômago e ao intestino delgado. É no duodeno que o suco biliar, vindo da vesícula biliar e anteriormente do fígado, junta-se ao alimento a partir da ampola duodenal. Pela mudança de pH entre o estômago e o duodeno, diversas enzimas digestivas são ativadas. O duodeno possui diversas vilosidades. Em suas criptas encontramos várias células distintas: células absortivas, células caliciformes, enteroendócrinas e células de Paneth (SILVERTHORN, 2010; MOORE; DALLEY, AGUR, 2014).

As vilosidades (vilos), são projeções alongadas formadas pelo epitélio e lâmina própria, formadas por um eixo de tecido conjuntivo frouxo e revestidas por um epitélio simples cilíndrico, formado principalmente por células absortivas ou enterócitos, que são responsáveis pelos processos de absorção de nutrientes. Também são encontradas células caliciformes, secretoras de glicoproteínas, cuja função é de lubrificação e umidificação da superfície da mucosa, representados na **Figura 2** (RIZK; BARKER, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; SCALDAFERRI *et al.*, 2013).

Alterações morfológicas ocorrem na mucosa intestinal sob diferentes condições fisiológicas e patológicas (BARBOZA *et al.*, 1999; VIGUERAS *et al.*, 1999; GROSCWITZ; HOGAN, 2009). A inflamação intestinal pode provocar alterações significativas na estrutura da mucosa, como infiltração de polimorfonucleares, desequilíbrio de agentes oxidantes e antioxidantes e a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Essas alterações atuam sobre as das junções intercelulares, causando prejuízo na função da barreira, promovendo aumento da permeabilidade e dificultando a absorção de nutrientes (NUSRAT *et al.*, 1997; SEIDLER *et al.*, 2006).

Figura 2. Estrutura da parede do intestino delgado.



Fonte: Adaptado da Escola de medicina Regents da Universidade de Michigan, 2012.

Disponível em: <<https://courses.lumenlearning.com/cuny-kbcc-microbiologyhd/chapter/anatomy-and-normalmicrobiota-of-the-digestive-system>>

1.5. Vias de sinalização inflamatória e estresse oxidativo

Os radicais livres são definidos como moléculas que possuem um elétron desemparelhado e são altamente reativos, atuando como mediadores na sinalização extra e intracelular. As espécies reativas de oxigênio (EROs) incluem radicais livres como o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxil (OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O aumento na concentração intracelular EROs está associado com a ruptura da membrana mitocondrial. Essa disfunção mitocondrial altera a permeabilidade de sua membrana (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; DA SILVA *et al.*, 2011).

A eficiência do sistema de defesa antioxidante depende do equilíbrio entre a ingestão e depleção de antioxidantes. Sem a intervenção adequada dos mecanismos antioxidantes celulares, a peroxidação lipídica mediada por radicais livres pode promover a perda da integridade das membranas lipídicas (GEORGE; OSHARECHIREN, 2009).

O sistema de defesa enzimático inclui a enzima GPx. Essa enzima age por meio de mecanismos de prevenção, controlando a formação de radicais livres, agindo com o propósito de impedir o acúmulo de H_2O_2 (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER; DE OLIVEIRA, 2004; HUBER *et al.*, 2008).

A glutatona (GSH) atua como cofator para a ação do GPx. Também está envolvida em muitos outros processos metabólicos, como a comunicação entre

células, prevenção da oxidação de grupos tióis de proteínas, tendo como principal contribuição a manutenção do estado redox da célula (RANGAN; BULKLEY, 1993).

O TGI é considerado um local favorável para a produção de EROs. Apesar da barreira protetora desenvolvida pela camada epitelial, alimentos ingeridos e agentes patogênicos podem causar inflamação por meio da ativação epitelial, por neutrófilos polimorfonucleares e produção de citocinas e outros mediadores que contribuem ainda mais com o estresse oxidativo (BHATTACHARYA; GHOSH; MANDE, 2015).

A disfunção na barreira intestinal, acompanhada do aumento da permeabilidade intestinal, está intimamente envolvida na fisiopatologia de doenças intestinais. Além disso, o aumento da permeabilidade das células epiteliais gastrointestinais é, frequentemente, resultante da destruição das junções intercelulares e da liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios, incluindo as EROs, que contribuem ativamente para a cascata inflamatória e peroxidação lipídica. Essa peroxidação é geralmente avaliada através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que identifica o nível malondialdeído (MDA) presente na amostra, sendo este um substrato da peroxidação lipídica (MURUGAN; PARI, 2007; BHATTACHARYA; GHOSH; MANDE, 2015).

Já o estresse nitrosativo resulta de um aumento nas espécies reativas de nitrogênio (ERNs) dentro da célula. O óxido nítrico (NO) é uma ERN amplamente utilizado como molécula sinalizadora nas células de todo o corpo. Embora o NO desempenhe vários papéis importantes como regulador de vários processos biológicos, também pode causar efeitos deletérios, incluindo a inibição da função enzimática, e promover danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) e a ativação de processos inflamatórios (HOLLENBERG; CINEL, 2009). Os principais metabólitos de NO incluem nitrito (NO_2) e nitrato (NO_3) (POOLE, 2005; MARTINEZ; ANDRIANTSITOHAINA, 2009).

Outra fonte de formação de EROs é a mieloperoxidase (MPO), uma hemoproteína expressa em neutrófilos e monócitos, sendo um marcador de estresse oxidativo endotelial (ESPORCATTE *et al.*, 2007; LORIA *et al.*, 2008).

A liberação dessa enzima dos grânulos azurófilos dos neutrófilos catalisa a formação de um poderoso agente oxidante, o ácido hipocloroso (HClO), o que pode levar a danos no DNA, proteínas e lipídeos. Além disso, a MPO pode agir no endotélio vascular promovendo a liberação de mediadores pró-inflamatórios e a expressão de moléculas de adesão, levando ao aumento da permeabilidade

vascular e aumento da adesão de neutrófilos (LACY, 2006; MELO *et al.*, 2008; PAPAYANNOPOULOS *et al.*, 2010; JOHNSON *et al.*, 2011; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014; WONG *et al.*, 2015).

Após exposição celular às EROs e alteração no status redox, há uma disfunção mitocondrial, com alteração da permeabilidade de sua membrana, desencadeando uma lenta inibição da glicólise, que leva a uma depleção da produção de trifosfato de adenosina (ATP), estimulando vias inflamatórias mediadas pelo fator nuclear kappa B (NFkB). Neste sentido, a ativação do NFkB pelas EROs estimula a transcrição de um grande número de genes que codificam citocinas inflamatórias e moléculas de adesão (HWANG; KIM, 2007; OKTYABRSKY; SMIRNOVA, 2007; YASUKAWA *et al.*, 2012).

O TNF- α é uma citocina imunomodulatória e pró-inflamatória, envolvida em vias da inflamação como: apoptose, citotoxicidade, produção de outras citocinas e indução de resistência à insulina. Sua expressão e secreção estão aumentadas na obesidade (WEISBERG *et al.*, 2003).

Esta citocina também está envolvida na indução de aterogênese, participando da migração de monócitos e de sua conversão em macrófagos na parede endotelial por meio da ativação de NFkB, desencadeando mudanças inflamatórias na parede vascular. A IL-6 é outra citocina semelhante ao TNF- α . Por sua vez, a IL-6 induz quimiocinas e aumenta o número de moléculas de adesão nas células endoteliais, colaborando na geração de respostas inflamatórias (ROMANO *et al.*, 1995).

Já a interleucina 10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória, que desempenha um papel crucial na prevenção de patologias inflamatórias e autoimunes. A deficiência ou expressão anormal de IL-10 pode aumentar a resposta inflamatória e conduzir ao desenvolvimento de doença inflamatória no intestino e distúrbios autoimunes. Assim, a expressão diminuída de IL-10 pode aumentar os agentes patogênicos durante uma infecção aguda, mas também exacerba a resposta inflamatória, que resulta em imunopatologia e danos teciduais (ESKDALE; KUBE; GALLAGHER, 1996).

A liberação de fatores inflamatórios também regula proteínas envolvidas na apoptose. A morte celular por apoptose é importante tanto na remoção de células lesadas, como durante o processo de envelhecimento. É, ainda, necessária para manter a homeostase. Estando aumentada nas doenças neurodegenerativas, no

enfarte do miocárdio e no envelhecimento precoce (RAMÍREZ *et al.*, 1999; SOKOLOWSKY *et al.*, 2011; REUBOLD *et al.*, 2012).

A Bax, representa as proteínas pró-apoptóticas. Na presença de um sinal apoptótico, a Bax é translocada do citoplasma para a mitocôndria, onde sofre ativação e modificação conformacional, aderindo à membrana mitocondrial externa. Essa integração possibilita a rápida liberação do citocromo C (ANTONSSON; MARTINOU, 2000). Por outro lado, a Bcl2, favorece a sobrevivência celular. Ela impede o escape do citocromo C, possivelmente pela formação de heterodímeros com moléculas pró-apoptóticas como a proteína Bax (AMARANTE-MENDES; GREEN, 1999).

Sob condições de estresse, a regulação da expressão gênica de enzimas antioxidantes se dá principalmente pela ativação de fatores de transcrição como o fator nuclear 2 do eritróide 2 (Nrf2). Este está normalmente localizado no citoplasma, associado ao fator Keap1, sendo mantido em concentrações basais via processo de ubiquitinação e consequente degradação no proteossoma. A proteína Keap1 é sensível à ação de diversos agentes oxidantes. Após a ação das EROs sobre os grupos sulfidrilas da Keap1 ocorre a dissociação dela com o Nrf2 e este migra para o núcleo. No núcleo o Nrf2 fica associado ao sMAF (*small Maf*), ligando-se às regiões promotoras contendo elementos de resposta antioxidante, o que determina a transcrição de um conjunto de genes de proteínas ligadas ao controle de inflamação e estresse oxidativo (KOBAYASHI *et al.*, 2004; TAGUCHI; MOTOHASHI; YAMAMOTO, 2011). Acredita-se que o Nrf2 desempenhe um importante papel na manutenção da integridade intestinal, regulando diversas citocinas e induzindo a produção das enzimas antioxidantes (TRIVEDI, 2015).

1.6. Interações da intoxicação mercurial com o funcionamento intestinal

Os efeitos adversos da exposição a metais pesados no trato intestinal têm atraído cada vez mais atenção. Jiang *et al.*, (2018) demonstraram que a exposição ao HgCl₂ em camundongos fêmeas BALB/c de 4 semanas de idade, que receberam solução de Hg na concentração de 10 mg/kg por gavagem, induziu estresse oxidativo, diminuindo as atividades de SOD e GSH, aumentando os níveis de MDA e IL-10. Esse estudo também avaliou o *Lactobacillus brevis* 23017 (LAB, *L. brevis* 23017), uma cepa de probióticos selecionada com fortes capacidades de ligação ao Hg. Os resultados histológicos da coloração Hematoxilina-Eosina (H&E) mostram

que a cepa protegeu a integridade das vilosidades do intestino delgado, e diminui a perda de peso em resposta à exposição ao Hg. Esse estudo demonstrou que *L. brevis* 23017 melhora efetivamente a lesão do intestino delgado, reduzindo a inflamação intestinal e o estresse oxidativo. Além disso, foi demonstrado que essa cepa bloqueia o estresse oxidativo e a inflamação através das vias Proteínó-quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e NFκB.

Zhang *et al.*, (2019) avaliaram diferentes formas químicas do Hg, absorção e possíveis mudanças na microbiota intestinal ocasionadas pelo Hg. Os camundongos foram tratados por gavagem com HgS (30 mg/kg), HgCl₂ (33,6 mg/kg) ou MeHg (3,1 mg/kg) por 7 dias. Os resultados demonstram que a acumulação de Hg no duodeno e íleo foi 40 vezes maior quando administrado HgCL₂ e 15 vezes maior quando administrado MeHg do que HgS. HgCl₂ e MeHg diminuíram o transportador peptídico-1 e Ost-β. A microbiota intestinal teve diferentes alterações quando administrado HgCl₂ e MeHg em relação as demais formas químicas. Assim, pode-se afirmar que a toxicologia do Hg depende da sua forma química.

Rowland, Robinson e Doherty, (1984) avaliaram os efeitos de três dietas no metabolismo e excreção de Hg em camundongos e o papel da microbiota intestinal. Foram usados camundongos BALB/c fêmeas, adultos, alimentados por 3 dietas diferentes, após 7 dias foi administrado uma única dose de MeHg (0,6 mg/kg). As dietas eram: dieta padrão, dieta de leite evaporado e uma dieta sintética com alto teor de proteína e baixo teor de gordura. Os animais que consumiram dieta sintética, apresentaram maior taxa de eliminação de Hg e os que consumiram a dieta do leite, apresentaram menor taxa de eliminação. Os camundongos foram tratados com antibióticos durante o período experimental para suprimir a microbiota intestinal. Os animais tratados com antibiótico apresentaram uma redução na excreção fecal de Hg e as concentrações de Hg aumentaram no tecido. Esses resultados são consistentes com a literatura. A absorção do MeHg pode ser modulada pela ação da microbiota intestinal. Como a desmetilação da forma MeHg em formas inorgânicas, reduzindo sua solubilidade no tecido (ROWLAND *et al.*, 1984; LIN *et al.*, 2020).

1.7. Consumo de dietas com alto teor de gordura e calorias

A obesidade é causada por um desequilíbrio energético entre o consumo e a quantidade de calorias gastas, resultando em acúmulo de energia na forma de

lipídios e acompanhada de alterações hiperplásicas nos adipócitos (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2007).

A obesidade é considerada um dos principais fatores de risco para doenças crônicas, como hipertensão e diabetes tipo 2. Em 2016, mais de 1,9 bilhão de adultos, com 18 anos ou mais, estavam acima do peso; destes, mais de 650 milhões eram obesos (HOTAMISLIGIL, 2006; OMS, 2016).

Embora a genética tenha um papel importante na regulação do peso corporal e da resposta metabólica, o aumento da obesidade, a nível mundial e em um curto período de tempo, não pode somente ser explicado pela genética; muito pode ser atribuído a dietas ricas em lipídios, que podem causar alterações nas funções intestinais (ICHIHARA-YAMADA, 2008; HARIRI; THIBault, 2010; GUERRE-MILLO, 2013).

Dietas ricas em lipídios causam alterações complexas em vias inflamatórias e aumento do peso corporal, elevando os níveis séricos de glicose, com consequente aumento de mediadores inflamatórios, como TNF- α , IL-6 (RASOULI; KERN, 2008; SANTOS *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2019).

O padrão alimentar que caracteriza a dieta ocidental está fortemente associado à obesidade e doenças metabólicas. A dieta ocidental (*Western diet*) é um padrão alimentar moderno que geralmente é caracterizado por altas quantidades de alimentos processados, alimentos pré-embalados, manteiga, frituras, laticínios ricos em gordura, ovos, grãos refinados, batatas e alto teor de açúcar. Esse padrão alimentar é associado com inflamação, resultante de mudanças estruturais e comportamentais na microbiota residente. O ambiente criado no intestino por alimentos ultraprocessados pode promover diversas formas de doenças inflamatórias (ZINÖCKER; LINDSETH, 2018).

1.8. Interações do consumo de dietas hiperlipídicas e função intestinal

O tipo e as quantidades de citocinas inflamatórias expressas no intestino em resposta ao consumo de dieta hiperlipídica, parece ser dependente do tempo de exposição (WANG *et al.*, 2013).

Um estudo de caracterização do perfil imunológico intestinal após consumo de dieta hiperlipídica, verificou-se que após sete dias o íleo apresentou redução nos níveis de TNF- α e da Proteína-1 quimioatrativa de monócitos (MCP-1) (JOHNSON *et al.*, 2015). O consumo mais prolongado de 6 e 17 semanas aumentaram os níveis

de TNF- α expressos (DING *et al.*, 2010). Além disso, outros componentes do processo inflamatório intestinal como o IFN γ e a interleucina 17 (IL-17) também mantiveram altos níveis de expressão após consumo de dieta hiperlipídica no período de 12 a 17 semanas (LUCK *et al.*, 2015).

Estudos envolvendo transplante da microbiota de roedores magros e obesos para animais *germ-free* verificaram que em poucas semanas houve ganho de gordura e de calorias, mesmo sem acréscimo no consumo de ração. Estes dados sugerem que as características da microbiota dos animais obesos podem contribuir para o acúmulo de gordura e ganho de peso (LEY *et al.*, 2005; HARRIS *et al.*, 2012; TEHRANI *et al.*, 2012).

O impacto de padrões alimentares na microbiota pode ser explicado através da classificação dos indivíduos em vegetarianos estritos. Já que algumas evidências sugerem que dietas vegetarianas têm sido associadas a um melhor perfil de risco cardiometabólico (TEIXEIRA *et al.*, 2007; PETTERSEN *et al.*, 2012; TONSTAD *et al.*, 2013).

A ativação do processo inflamatório intestinal envolve muitos processos celulares. Esses processos celulares parecem estar presentes durante o consumo de dietas gordurosas. A ativação do NF κ B (DING *et al.*, 2010), o aumento da atividade da MPO (DE LA SERRE *et al.*, 2010) bem como alterações nas proporções dos filos de bactérias presentes na microbiota intestinal, são mecanismos propostos como responsáveis pelo estado inflamatório induzido por dietas hiperlipídicas (LAM *et al.*, 2015).

Há evidências consistentes de que o LPS induz inflamação subclínica e resistência à insulina. Em condições normais, a presença de LPS no lúmen intestinal não é nociva à saúde. Porém, certos padrões dietéticos podem exacerbar a transferência de LPS para circulação. A dieta hiperlipídica pode afetar indiretamente a permeabilidade intestinal por meio da ativação de mastócitos na mucosa intestinal, os quais a regulam diretamente por meio da secreção de mediadores inflamatórios (IL1- β , TNF- α) (CANI *et al.*, 2007).

1.9. Possíveis interações entre a intoxicação mercurial e as dietas

As espécies de Hg presentes no lúmen do intestino são altamente dependentes dos componentes do alimento ingerido, pois esse alimento geralmente

possui uma alta concentração de moléculas que contêm tiol, como aminoácidos e peptídeos, que podem se ligar ao Hg (DAVE *et al.*, 2004; JADÁN-PIEDRA, VÉLEZ; DEVESA, 2018).

Os conjugados Tiol/Hg formados no TGI podem ser semelhantes em forma e tamanho a certas moléculas endógenas. Como, aminoácidos e polipeptídeos absorvidos ao longo do intestino delgado. Devido a essas semelhanças e como os transportadores de aminoácidos e peptídeos são predominantes nos enterócitos. É possível que os conjugados tiol/Hg sejam absorvidos pelos enterócitos por transportadores de peptídeos (PepT1) (GANAPATHY *et al.*, 2001; DAVE *et al.*, 2004).

Stillings *et al.*, (1974) e Nielsen; Andersen, (1995) descobriram, em seus estudos, que a bioacessibilidade do Hg pode se alterar no consumo de alimentos antioxidantes. Esses achados também foram revisados por Chapman e Chan, (2000) onde foram avaliaram vários itens, incluindo chá, café e fibras. Esses alimentos reduziram a bioacessibilidade de Hg *in vitro*. Porém, o mecanismo que envolveu esses achados não ficou bem claro, sendo necessários mais estudos para entender os mecanismos envolvidos.

Jadán-Piedra, Vélez e Devesa, (2018) avaliaram a capacidade de reduzir o MeHg. Usando uma abordagem de digestão humana simulada em modelo de cultivo celular, mostraram que a adição de ácido tânico, celulose, lignina ou pectina reduziu significativamente a bioacessibilidade de Hg (redução de 30% a 98%). Estudos posteriores do mesmo grupo de pesquisa mostraram que algumas cepas de bactérias do ácido láctico e de *Saccharomyces cerevisiae* também foram eficazes na redução da acessibilidade de Hg. Os resultados obtidos mostram que a inibição do transporte de MeHg é alcançada, principalmente, com compostos que possuem grupos tiol em sua estrutura (cisteína, homocisteína, GSH e albumina), com reduções de até 89% para GSH e 55% e 25% na presença de ácido tânico e quercetina, respectivamente.

O fato de o transporte de Hg ser mediado por transportadores de nutrientes sugere a possibilidade que sua absorção através do epitélio intestinal poderia ser reduzida por processos de competição com outros componentes da dieta. Além disso, o uso de compostos alimentares que formam complexos com Hg também pode afetar o transporte, modificando a forma química (ROWLAND *et al.*, 1984; BALLATORI, 2002; JADÁN-PIEDRA, VÉLEZ; DEVESA, 2018).

2.0 JUSTIFICATIVA

Os estudos sobre dietas de alto teor de calorias e suas implicações têm se tornado cada vez mais frequentes. Segundo a OMS em 2016, mais de 1,9 bilhão de adultos, com 18 anos ou mais, estavam acima do peso. Destes, mais de 650 milhões eram obesos. O padrão alimentar que caracteriza a dieta ocidental está fortemente associado à obesidade e doenças metabólicas (WHO, 2016; ZINÖCKER; LINDSETH, 2018).

Outro fator preocupante é a exposição da população ao MeHg. Recentemente acidentes ocorridos em 2015 e 2019, devido ao rompimento de barragens em Mariana e Brumadinho-MG, respectivamente, trouxeram à tona os riscos que a contaminação por esse metal pode provocar na saúde humana. Além disso, o progresso e o desenvolvimento industrial trouxeram como consequência inevitável a mudança do ambiente químico e exposição do ser humano a um número crescente e variável de agentes químicos. O aumento da exposição à metais pesados podem contribuir para o desenvolvimento de várias doenças como câncer, diabetes, e doenças cardiovasculares (WHO 1999; WHO, 2014).

A absorção do MeHg acontece, principalmente, ao nível do TGI (CLARKSON *et al.*, 2006). Com o aumento do consumo de dietas ricas em gordura pela população e os recentes casos de intoxicação mercurial, principalmente advindas do consumo de peixes e crustáceos. Este trabalho buscou avaliar a interação desses dois elementos potencialmente inflamatórios no duodeno. Os efeitos do MeHg em marcadores de estresse oxidativo e inflamação no TGI após dieta hiperlipídica ainda não foram explorados em estudos pré-clínicos na literatura.

3.0 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Avaliar o efeito da intoxicação mercurial no duodeno de camundongos C57BL/6J submetidos à dieta padrão ou hiperlipídica em parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo.

3.2. Objetivos Específicos

- Monitorar o ganho de peso corporal de camundongos C57BL/6J submetidos à dieta ocidental e/ou expostos à intoxicação mercurial.
- Avaliar os níveis de intoxicação mercurial, por meio da concentração de mercúrio elementar no pelo de animais C57BL/6J submetidos à dieta padrão ou hiperlipídica expostos ou não ao MeHg na água de beber.
- Avaliar os níveis séricos de triglicérides e colesterol total no soro de animais C57BL/6J submetidos à dieta padrão ou hiperlipídica expostos ou não ao MeHg na água de beber.
- Avaliar as alterações dos vilos e criptas através dos escores histopatológicos e a relação vilo/cripta de animais C57BL/6J submetidos à dieta padrão ou hiperlipídica expostos ou não ao MeHg na água de beber.
- Mensurar a quantidade de células calciformes PAS-positivas presentes nos vilos de animais C57BL/6J submetidos à dieta padrão ou hiperlipídica expostos ou não ao MeHg na água de beber.
- Determinar o perfil inflamatório no duodeno a partir da detecção dos níveis de mieloperoxidase pela técnica de imun absorção enzimática (ELISA) de animais C57BL/6J submetidos à dieta padrão ou hiperlipídica expostos ou não ao MeHg na água de beber.
- Determinar os níveis de estresse oxidativo no duodeno a partir da mensuração dos níveis de GSH, GPx, MDA e NO₂/NO₃ de animais C57BL/6J submetidos à dieta padrão ou hiperlipídica expostos ou não ao MeHg na água de beber.
- Avaliar transcrição de Nrf2 por qRT-PCR de animais C57BL/6J submetidos à dieta padrão ou hiperlipídica expostos ou não ao MeHg na água de beber.

- Avaliar a resposta inflamatória no duodeno a da transcrição de TNF- α , IL-6, IL-10 por qRT-PCR de animais C57BL/6J submetidos à dieta padrão ou hiperlipídica expostos ou não ao MeHg na água de beber.
- Avaliar a transcrição dos genes relacionados à apoptose, Bcl-2 e Bax, por qRT-PCR de animais C57BL/6J submetidos à dieta padrão ou hiperlipídica expostos ou não ao MeHg na água de beber.

4.0. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6J, recém desmamados, com idade de 21 dias e peso entre 8 e 11 gramas, oriundos do biotério de produção do Núcleo de Biologia Experimental (Nubex), da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) e mantidos sob rigoroso controle sanitário.

Os animais foram mantidos em racks com microisoladores e com sistema automático de ventilação forçada, filtragem do ar e controle de luz, com livre acesso à ração e água. Os mesmos permaneceram em temperatura controlada de 21°C.

4.2. Ética

Os experimentos descritos no modelo animal seguem as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Cuidado Animal da Universidade de Fortaleza, com parecer de nº 4831110618.

4.3. Delineamento experimental

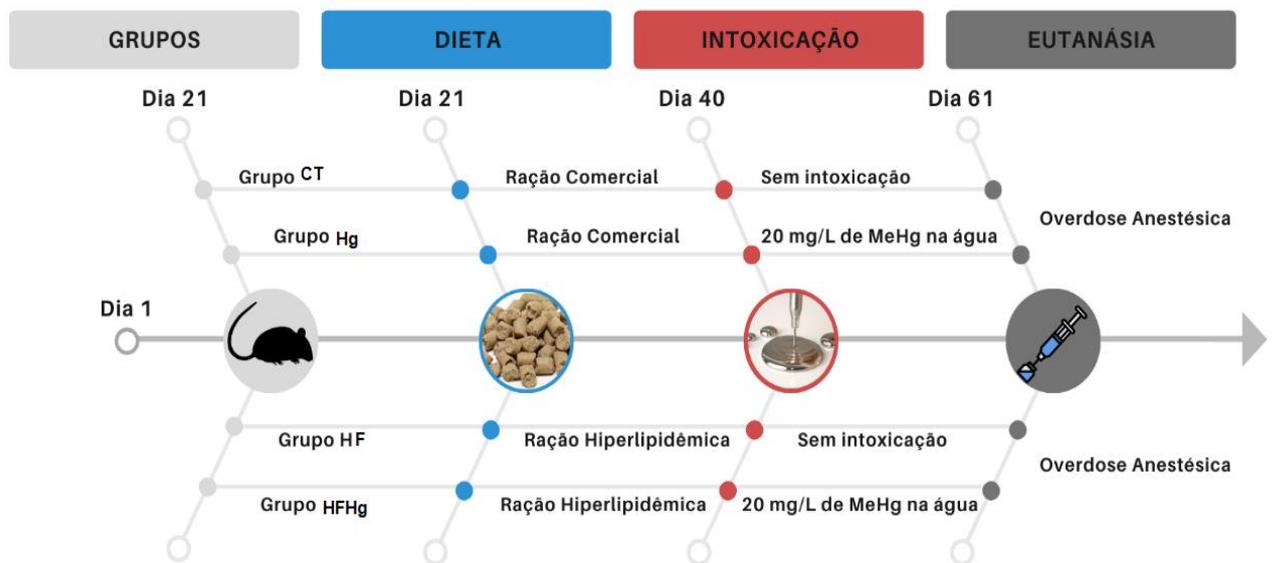
Os animais foram mantidos por um período de 40 dias sob dieta ocidental (42% de lipídeos) ou dieta padrão. Os grupos intoxicados com MeHg receberam nos últimos 21 dias de dieta uma solução de cloreto de MeHg diluído na água de beber (20 mg/L) e os controles receberam apenas água potável.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais conforme descrito a seguir:

- **Grupo controle (CT):** composto de animais que receberam dieta padrão e água potável *ad libium*.
- **Grupo hiperlipídico (HF):** composto de animais que receberam dieta rica em lipídeos (42%), e água potável *ad libium*.
- **Grupo normonutrido/intoxicado (Hg):** composto de animais que receberam dieta padrão e água com solução de cloreto de metilmercúrio 20 mg/L.
- **Grupo hiperlipídico/intoxicado (HFHg):** composto de animais que receberam dieta rica em lipídeos (42%) e água com solução de cloreto de metilmercúrio 20 mg/L.

Os animais iniciaram o protocolo no dia pós-natal 21 (PN 21). Foram então mantidos na dieta padrão ou na dieta hiperlipídica por 40 dias. Nos últimos 21 dias de dieta (PN 40) foram expostos ao cloreto de metilmercúrio (Sigma®, 20mg/L), totalizando um período de 61 dias de vida, conforme demonstrado na **Figura 3**. Ao final do protocolo, PN 61, os animais foram submetidos à eutanásia com overdose de cetamina/xilazina e em seguida foi realizada a coleta das amostras.

Figura 3. Representação dos grupos experimentais.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.4. Coleta das amostras

Após a eutanásia, a cavidade abdominal foi aberta e amostras de duodeno foram cuidadosamente retiradas. Parte do tecido coletado foi imediatamente fixado em formol, para posterior análise histológica, e outra parte foi congelada em nitrogênio líquido e depois em freezer -80°C . Consideramos o duodeno como sendo segmento de 5 cm posterior ao estômago.

4.5. Composição das dietas

Os animais nutridos foram submetidos à alimentação exclusiva com dieta Presence Ratos e Camundongos®, que constitui a dieta padrão do biotério.

Para indução da hiperlipidemia, os animais foram submetidos à alimentação exclusiva com dieta rica em gordura (42% de lipídeos). A ração foi cedida pelo

Laboratório de Bioquímica Nutricional, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte-MG. A dieta foi preparada de acordo com os padrões da Associação de Químicos Analíticos Oficiais.

Os macronutrientes da dieta ocidental foram pesados e misturados para formar uma massa homogênea e em seguida a dieta foi armazenada refrigerada (4°C) em caixas plásticas hermeticamente fechadas. A dieta foi composta de sacarose (34,15g), caseína (19,5g), amido de milho (15,0g), banha (21,0g), celulose (5,0g), mistura mineral (3,5g), mistura de vitaminas (1,0g), carbonato de cálcio (0,4g), metionina (0,3g), etoxiquina (0,005g) e colesterol (0,15g)(REZENDE *et al.*, 2011).

Tabela 1. Composição nutricional da dieta ocidental e da ração comercial padrão.

Componentes	HF	Ração Padrão
Proteínas	23 %	23 %
Carboidratos	35 %	72,5%
Gorduras	42 %	4,5%

Fonte: Ração comercial Presence Ratos e Camundongos® e Laboratório de Bioquímica Nutricional.

4.6. Intoxicação dos animais

Os grupos que foram intoxicados com MeHg receberam nos últimos 21 dias da dieta uma solução de cloreto de MeHg na água de beber (20mg/L). A dose do MeHg utilizada no nosso trabalho teve como base os estudos de Dietrich *et al.*, (2005) que utilizaram a dose de 20mg/L de MeHg no período de 21 dias.

O preparo da solução de MeHg foi realizada em cabine de biossegurança com exaustor. Os animais apresentaram um consumo médio de água de aproximadamente 6 mL/dia. A troca da solução de MeHg foi feita semanalmente.

A água contaminada residual das mamadeiras foi armazenada em recipientes de plástico, identificados com o diagrama de Hommel e o símbolo de risco biológico e armazenada e protegidos em lugar reservado e de acesso controlado (ANVISA, 2018).

4.7. Manejo e descarte de material contaminado com MeHg

Os animais expostos ao MeHg permaneceram por todo tempo em microisoladores, conforme mostrado na com suas devidas mamadeiras separadas

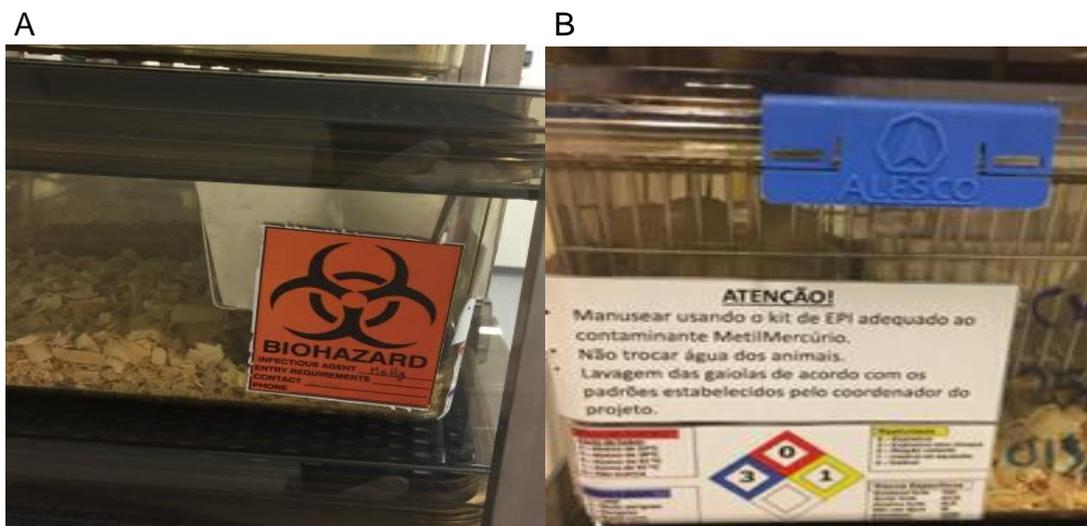
para esse fim. Os microisoladores foram devidamente identificados com adesivos contendo o símbolo de material contaminante e risco biológico **Figura 4a** e o diagrama de Hommel, mostrados na **Figura 4b**.

Toda manipulação dos animais foi feita com uso de equipamentos de proteção individual (EPIs), incluindo máscaras, luvas, gorros, aventais. Os EPIs foram descartados após serem utilizados em sacos brancos identificados como risco biológico e foram enviados para empresa especializada para tratamento do material contaminado, via incineração.

Os microisoladores contaminados foram limpos por técnicos treinados portando os EPIs necessários. O descarte da maravalha contaminada foi feito em sacos brancos com a devida identificação de risco biológico e enviada para incineração, visto que parte pequena do MeHg é excretada pela urina e fezes.

O descarte das carcaças dos animais foi feito envolvendo-as em papel alumínio e colocando-as em sacos brancos com identificação de risco biológico, sendo enviadas para empresa especializada para tratamento do material contaminado, via incineração.

Figura 4. Microisolador apresentando adesivo com símbolo de material com risco biológico e símbolo do diagrama de Hommel.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.8. Dosagem de mercúrio (Hg) no pelo

A intoxicação mercurial nos animais foi avaliada através da análise da concentração de Hg nos pelos (colhidos por tricotomia no dorso do animal). Em seguida, o material foi armazenado em eppendorfs em temperatura ambiente. As amostras foram acondicionadas em caixas sinalizadas com uma etiqueta azul contendo as precauções e cuidados com o contato da pele, olhos, roupas e inalação, bem como instruções sobre a ventilação adequada (EPA, 2002; KASPER *et al.*, 2014).

Após a coleta do material e armazenagem, o material foi enviado para o Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), para ser submetido ao método de espectrofotometria de absorção atômica. As vidrarias utilizadas nos procedimentos analíticos foram previamente mantidas em solução de ácido nítrico (HNO_3), 10%, permanganato de potássio (KMnO_4), em solução com ácido sulfúrico (H_2SO_4) e cloreto de hidroxilamônio ($\text{NH}_2\text{OH.HCl}$) a 10% por 24h, lavados com água corrente, e posteriormente lavados com água destilada e deionizada em um sistema Milli-Q e secos em estufa a temperatura de 50 °C.

As determinações de Hg total nas amostras foram submetidas aos procedimentos analíticos pelo método proposto por Akagi, Malm e Branches (1996). Descrito resumidamente a seguir: as amostras foram pesadas e acondicionadas em frascos de aproximadamente 50 mL. Em seguida, foram adicionados 2 mL de HNO_3 e ácido perclórico (HClO_4), proporção (1:1), 5 mL de H_2SO_4 , 1 mL de água deionizada. Após agitação, os frascos foram levados à chapa aquecedora a temperatura de 220°C durante 20 minutos. Em seguida, as soluções foram resfriadas à temperatura ambiente, transferidas para balão volumétrico de 50 mL, aferidas e homogeneizadas com água. Na realização das análises foram utilizados reagentes da marca Merck Suprapur®. As determinações de Hg nas amostras foram feitas por espectrofotometria de absorção atômica com sistema de geração de vapor a frio, utilizando-se analisador direto de Hg (MASCARENHAS *et al.*, 2004).

Os resultados foram expressos em média ($\mu\text{g Hg/kg}$) \pm erro padrão da média (EPM), sendo comparados os valores de concentração de Hg dos animais expostos ao MeHg com os animais controles.

4.9. Análise de lipídios séricos (colesterol total e triglicerídeos)

Amostras de sangue foram coletadas por via transcardíaca e alocadas em tubos eppendorf para obtenção de soro por centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos.

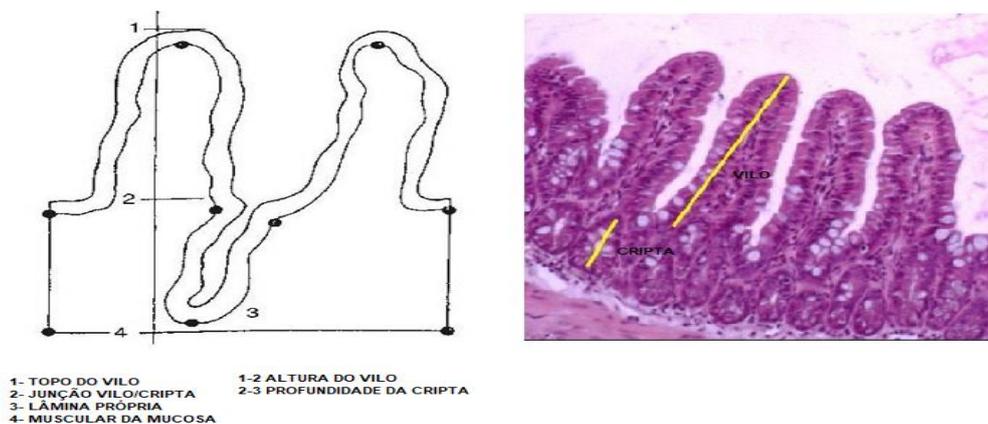
Os níveis de colesterol total e triglicérides (mg/dL) foram determinados teste colorimétricos por analisador semi-automático (LabQuest, Labtest, Brasil), utilizando kits de diagnóstico (Labtest®, Brasil).

4.10. Morfometria intestinal

Após eutanásia dos animais, amostras de duodeno foram coletadas e fixadas em formol a 10% (tamponado) durante 24 horas e posteriormente armazenada em álcool a 70%. Logo após, foram desidratadas em etanol e fixadas em parafina. Os cortes histológicos foram corados com H&E para serem analisados.

Na análise morfométrica foram analisados os parâmetros de altura dos vilos e profundidade das criptas, que são marcadores de integridade do tecido intestinal. A altura do vilos foi medida a partir da linha da base até o seu topo. A profundidade da cripta foi mensurada a partir da linha apical até o fundo da cripta (**Figura 5**). Foram observados 10 vilos por animal utilizando um microscópio óptico (Olympus CX3, Tóquio, Japão) e sistema de aquisição de imagens (Q-Color 3, Olympus, Tóquio, Japão). Medidas foram feitas a partir de imagens digitalizadas pelo programa *Image J 1.4®* (NIH – National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA), cuja calibração foi realizada através de uma micro-régua (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

Figura 5. Modelo esquemático da análise morfométrica da altura do vilos e profundidade da cripta, utilizando o programa *Image J 1.4®*.



Fonte: Adaptado de PIRES; SILVEIRA; SILVA, 2003.

4.11. Determinação de células caliciformes positivas com ácido periódico de Schiff (PAS)

Com a finalidade de detectar o muco presente em células caliciformes dos vilos dos camundongos, as amostras de duodeno foram submetidas a cortes de 4 µm de espessura e montados em lâminas de vidro, desparafinizados, reidratados e oxidados com ácido periódico a 0,5 %. Logo em seguida, as lâminas foram coradas com reagente de Schiff por 20 minutos e posteriormente, as mesmas lâminas foram contra-coradas com hematoxilina por 20 minutos. As imagens das lâminas foram obtidas pelo microscópio óptico (Olympus CX3, Tóquio, Japão) e sistema de aquisição de imagens (Q-Color 3, Olympus, Tóquio, Japão). Foram observados e quantificados dez vilos por animal. O resultado foi expresso como número de células caliciformes por vilos. Toda a análise foi feita de forma cega (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

4.12. Avaliação dos marcadores do estresse oxidativo

4.12.1. Ensaio da glutathione peroxidase (GPx)

Para o ensaio da glutathione peroxidase: os homogenatos do duodeno foram centrifugadas a 1200 rpm por 15 minutos a 4°C, e 100µL do sobrenadante foi misturado a 150 µL do coquetel (glutathione reductase: 50µL; GSH: 0,0768g, NADPH: 0,0167g e peróxido de hidrogênio H₂O₂ 0,4%, diluídos em 25 mL de tampão fosfato de potássio) em placa de 96 poços. A placa foi lida em leitor de microplacas por 10 minutos, em intervalos de 1 minuto e em comprimento de onda de 365 nm (YOSHIKAWA *et al.*, 1993). Os resultados obtidos foram expressos em µmol de glutathione peroxidase, pelo tempo, por miligrama de proteína (µmol/min/mg de proteína).

4.12.2. Determinação da glutathione (GSH)

A determinação dos níveis de grupamentos sulfidrilas não proteicas (NP-SHs) foi determinado pelo método que utiliza o reagente de Ellman's, o ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB), segundo protocolo descrito por Sedlak e Lindsay (1968). Para isso, as amostras de duodeno foram pesadas e homogeneizadas em solução de ácido etilenodiaminotetracético gelado (EDTA, 0,02 M; pH 8,9), em 10% de proporção, com auxílio do homogeneizador de tecidos. 40 µL do homogenato foi

misturados com 50 μL de água destilada, mais 10 μL de ácido tricloroacético (TCA, 50%) e centrifugados a 5000 rpm por 15 minutos, a 4 °C. O sobrenadante obtido foi pipetado em placa de 96 poços com tampão Trizma (0,4 M) mais EDTA (0,02 M, pH 8,9) e DTNB (0,01 M). A absorbância foi mensurada em leitor de microplaca, dentro de 5 minutos depois da adição de DTNB, em comprimento de onda de 412 nm. Os valores das absorbâncias foram interpolados a curva padrão de glutathiona e os resultados foram expressos como μmol de NP-SH por miligrama de proteína ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína).

4.12.3 Avaliação dos níveis de NO_2/NO_3

A avaliação dos níveis de NO_2/NO_3 foi determinada a partir da reação de Griess (GREEN *et al.*, 1982). Os tecidos foram homogeneizados com tampão fosfato de potássio (50 mM e pH 7,8). Posteriormente, o homogenato foi centrifugado a 12.000 rpm, durante 15 minutos a 4° C. O sobrenadante (100 μL) foi misturado ao reagente Griess (100 μL) (0,1% dihidroclorato de N-(1-naftill) etilenodiamida a 1% em ácido fosfórico a 5%) e após 10 minutos a absorbância foi analisada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. As absorbâncias foram interpoladas à curva padrão de nitrito de sódio. Todos os resultados foram expressos em micromols (μM) de nitrato/nitrito por miligrama de proteína. A dosagem de proteína das amostras foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951).

4.12.4. Dosagem de malondialdeído (MDA)

As amostras de duodeno foram removidas, pesadas e homogeneizadas em tampão fosfato de sódio gelado (0,1 M, pH = 7,0), com homogeneizador de tecido na proporção de 10%. Usando o método descrito por Agar *et al.*, (1999) com algumas modificações. Em seguida o homogenato foi centrifugado a 10.000 rpm, durante 5 minutos, a 4 °C. Alíquotas de 100 μL do sobrenadante foram misturadas com ácido acético 20% e ácido 2-tiobarbitúrico 0,5% (diluído em ácido acético 20%, pH 2,4 - 2,6). A mistura foi transferida para o banho-maria com temperatura de 95°C, onde ficou durante 1 hora, a amostra foi homogeneizada a cada 15 minutos e sequencialmente para o banho de gelo onde ficou durante 30 minutos. Em seguida recebeu dodecil sulfato de sódio (SDS, 8,1%) e foi imediatamente centrifugada a 12.000 rpm, durante 15 minutos, a 25 °C. A leitura da amostra foi realizada em

espectrofotômetro com comprimento de onda em 532 nm. A curva padrão foi obtida usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão. Os resultados foram expressos em nanomols de MDA por miligrama de proteína (nmol/mg de proteína).

4.13. Ensaio de imunoabsorção enzimática para MPO.

O ensaio foi feito de acordo com as instruções do Kit Mouse Mouse DuoSet ELISA AF3667 (R&D systems). As amostras que foram diluídas em tampão RIPA para realizar a quantificação de proteínas foram novamente diluídas no reagente diluente (RD) específico do kit em uso, sendo usada a proporção de 1:1 (ex: 50 µL de amostra e 50 µL de RD) e armazenados sob refrigeração (- 4°C).

Foram utilizadas placas para ELISA de 96 poços. Inicialmente os poços foram preenchidos 100 uL do anticorpo de captura e ficaram overnight à temperatura ambiente (TA). Seguiu-se à lavagem da placa, pondo tampão de lavagem do próprio kit, 200 µL por poço, e em seguida a secagem da placa impondo uma força sobre uma superfície plana revestida com papel com propriedades absorventes (todo o processo de lavagem foi repetido por três vezes). Logo após foi feito o bloqueio de cada poço com 250 µL de RD e a placa foi deixada em repouso por 1 hora em TA.

Após essa etapa foi realizado novo processo de lavagem e em seguida adicionadas amostras e curva padrão, 100 µL em cada poço (mantidos em repouso por 2 h em TA). Após essa etapa foi feita outra etapa de lavagem e adicionado 100 µL de anticorpo de detecção em cada poço (mantido por 2 h em TA), precedido de outra etapa de lavagem. Logo após foi adicionado a streptavidina HRP (100 µL) e foi mantido por 20 minutos em TA, protegido da luz. Após mais um procedimento de lavagem foi feita a junção de uma parte de CRA com 1 parte de CRB, na proporção de 1:1, totalizando-se um volume de 100 uL da solução CRA e CRB em cada poço, mantendo-se a placa em repouso por 30 minutos, TA, protegida da luz. Ao final, foi adicionado 50 µL de solução de parada e realizada uma leve agitação, seguida de leitura imediata em 450 a 540 nm. Os resultados foram expressos em picograma por mg de proteínas (pg/mg de proteínas).

4.14. Análise da expressão das citocinas TNF- α , IL-10, IL-6, Bcl2 e Bax por qRT-PCR

4.14.1. Extração do RNA

Uma alíquota de aproximadamente 30 mg de duodeno foi macerada em tampão RLT do kit comercial (RNeasy Mini Kit, Qiagen®). Após a maceração, o RNA total foi extraído conforme instruções do fabricante do kit comercial. O RNA total obtido foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific®).

4.14.2. Síntese do cDNA

Para a confecção do cDNA foi utilizado 2 μ g do RNA total. Foram utilizados iniciadores oligo (dT), dNTPs e a enzima Super Script III seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen ®). Para Bcl2, Bax, TNF- α , IL-6 e IL-10 sendo a β -actina utilizada como controle, conforme descritos na tabela abaixo:

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados nas análises de qRT-PCR. Invitrogen™.

GENE	OLIGONUCLEOTÍDEOS
Bcl2	F GAT GAC TTC TCT CGT CGC TAC
	R GAA CTC AAA GAA GGC CAC ATT C
Bax	F TTG CCC TCT TCT ACT TTG CTA G
	R CCA TGA TGG TTC TGA TCA GCT C
IL-6	F CTG CAA GAG ACT TCC ATC GAG
	R AGT GGT ATA GAC AGG TCT GTT GG
TNF- α	F AGG GAT GAG AAG TTC CCA AAT G
	R CAC TTG GTG GTT TGC TAC GAC
IL-10	F AAA GCA AGG CAG TGG AGC AG
	R TCA AAC TCA TTC ATG GCC TTG T
Nrf2	F-CAC ATC CAG TCA GAA ACC AGT GG
	R-CAC ATC CAG TCA GAA ACC AGT GG
β - actina	F CCC TGG CTC CTA GCA CCA T
	R GAG CCA CCA ATC CAC ACA GA

4.14.3. PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

Os primers foram combinados em uma mistura de reação para produzir uma amplificação. Cada mistura da reação com os determinados *primers* continha: SYBR

Green Master mix (10 µL). Primers Forward e Reverse na proporção de 1:1 (1 µL). Água livre de nuclease (7 µL) e DNA da amostra (1 µL).

Controles negativos foram realizados usando água livre de nucleases. O protocolo de amplificação do PCR foi o seguinte: AmpliTaq Gold DNA Polymerase inicial - ativação a 95 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos com desnaturação a 95 °C por 15 s, anelamento a 62 °C por 30 s e extensão a 62 °C por 30 s. A amplificação foi realizada em um LightCycler® Nano em Real Time PCR System com 32 poços. Os resultados foram expressos como quantidade de gene amplificado em comparação com genes controle (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.15. Drogas e reagentes

- Ácido 2-tiobarbitúrico (Sigma Aldrich, EUA);
- Ácido 5,5-ditiobis (Sigma Aldrich, EUA);
- Ácido acético (Vetec Química, Brasil);
- Ácido etilenodiaminotetracético (Dinâmica, Brasil);
- Ácido tricloroacético (Sigma Aldrich, EUA);
- Brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (Sigma Aldrich, EUA);
- Cloreto de metilmercúrio (Sigma-Aldrich®, Brasil);
- Dimetilsufóxido (DMSO) (Dinâmica, Brasil);
- Dodecil sulfato sódico (Sigma Aldrich, EUA);
- Eosina (Sigma Aldrich, EUA);
- Etanol absoluto (Sigma Aldrich, EUA);
- Formol (Alphatecm, Brasil);
- Fosfato de potássio monobásico e dibásico (Vetec, Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico e dibásico (Vetec, Brasil);
- Hematoxilina (Sigma Aldrich, EUA);
- Ketamina (Kensol® König);
- Kit Labstest® para dosage de colesterol;
- Kit Labstest® para dosage de triglicerídeos;
- Peróxido de hidrogênio (Dinâmica, Brasil);
- Riboflavina (Vetec, Brasil);
- Tetrametoxipropano (Sigma Aldrich, EUA);
- Xilazina (Vetanarcol® König);

4.16. Equipamentos e materiais

- Avental de algodão;
- Avental descartável;
- Balança analítica precisa (Eletronic Balance FA-2104N);
- Balança digital eletrônica para pesagem de animais – Filizola;
- Cabine de segurança biológica classe II, Tecniplast;
- Capilares vítreos;
- Centrífuga refrigerada para tubos Sigma 1-14k – Uniscience;
- Criotubos, 2,0ml;
- Espectrofotômetro de absorção atômica (DMA-80, da Milestone Sel - Itália);
- Espectrofotômetro UV-Visible (Shimadzu UV-260, Shimadzu Corp, Tóquio, Japão);
- Geladeira e freezer Thermo Scientific (-80°C);
- Glicosímetro AccuCheck e fitas reativas;
- Instrumental cirúrgico;
- Lanceta plástica;
- Luvas de nitrila;
- Máscara e óculos de proteção individual 3M contra risco biológico;
- Placas de petri;
- Ponteiras para pipetas;
- Propés (proteção para pés);
- Ração Presence-Labina®;
- Sacos plásticos, branco leitoso com símbolo de contaminante;
- Seringas (B-D Plastipak);
- Toucas;
- Tubos de polipropileno para centrífuga;
- Tubos Eppendorfs, 1,5ml;
- Tubos Falcons, 15 e 50ml;
- Vidraria: béqueres, pipetas manuais e tubos de ensaio;
- Vórtex Maxi Mix II Thermolyne tipo 37600 mixer;

4.17. Análise estatística

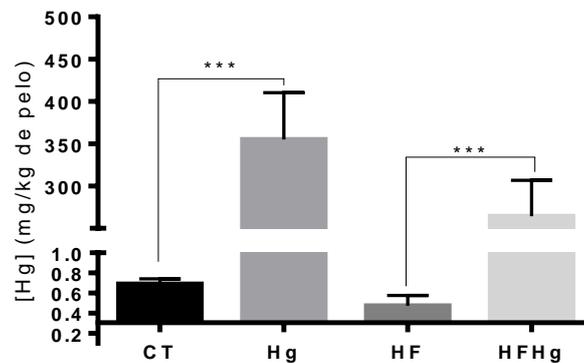
Os resultados foram apresentados em média \pm erro padrão da média (EPM). Todos os valores foram testados para a normalidade com o teste de Kolmogorov-Smirnov. A análise de variância pelos testes One-Way ANOVA, com pós teste de Bonferroni, e Two-Way ANOVA, com pós teste de Tukey. Para os resultados da morfometria foi realizado o teste T de Student para os grupos (CT x HF), (CT x Hg) e (HF x HFHg). O ganho de peso dos animais expresso em % do valor de peso inicial e erro padrão da média. Foi utilizado o software GraphPad Prisma 7 (San Diego, USA).

5.0. RESULTADOS

5.1. Concentração de mercúrio no pelo dos grupos experimentais

A exposição ao MeHg nos animais durante um período 21 dias resultou em aumento significativo nos níveis de Hg no pelo, alcançando ($355 \pm 110,8$ mg/Kg) no grupo Hg e ($264,5 \pm 84,96$ mg/Kg) no grupo HFHg (***) $p < 0,001$), quando comparado com os grupos não intoxicados, grupo CT ($0,66 \pm 0,06$ mg/Kg) e grupo HF ($0,38 \pm 0,09$ mg/Kg). Não houve diferença significativa na dosagem de Hg no pelo entre os dois grupos de animais intoxicados.

Figura 6. Concentração de Hg no pelo dos grupos experimentais.

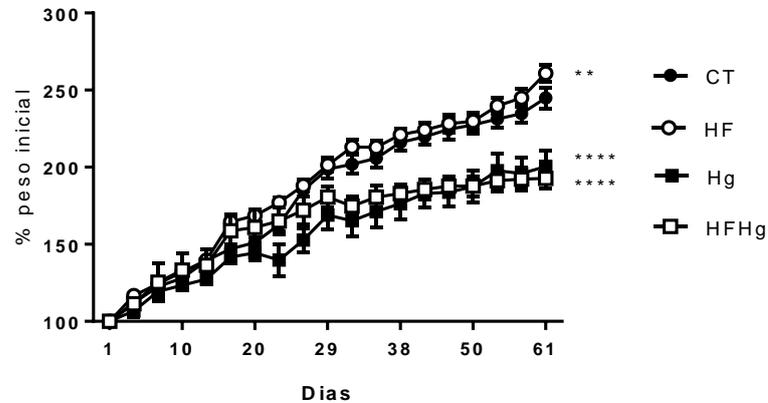


Os valores foram expressos pela média \pm EPM de 5 animais em cada grupo (ANOVA, Bonferroni).

5.2. Ganho de peso dos animais

Os animais que receberam dieta contendo 42% de lipídeos no período de 40 dias, sem intoxicação por MeHg, grupo HF ($260 \pm 11,88$), demonstraram ganho de peso quando comparado aos animais que receberam ração padrão, grupo CT ($244 \pm 14,88$). A intoxicação por MeHg nos animais durante um período 21 dias resultou em um menor ganho de peso significativo nos grupos Hg e HFHg, quando comparado com seus respectivos controles. Grupo Hg ($200 \pm 23,29$) e grupo HFHg ($192 \pm 14,12$).

Figura 7. Percentual de ganho de peso dos animais submetidos à intoxicação mercurial e expostos à dieta hiperlipídica.



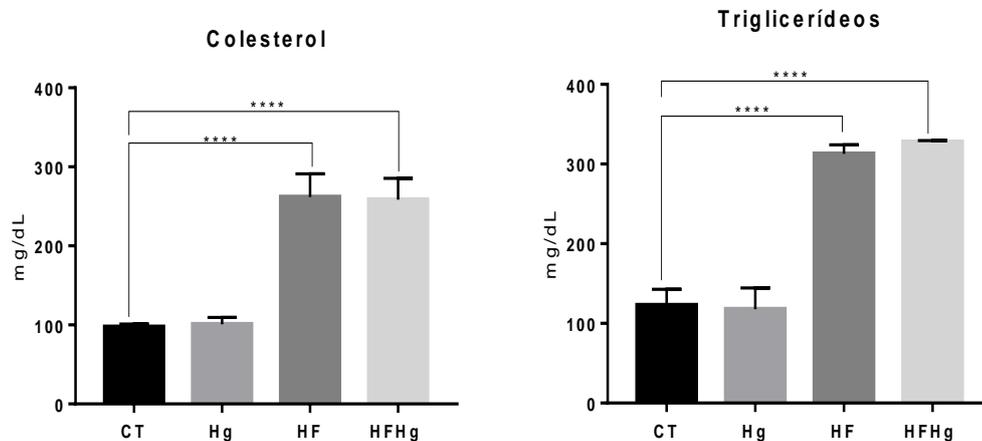
Ganho de peso dos animais expresso em % do valor de peso inicial e desvio padrão da média. Foram feitas 20 medições ao longo dos 41 dias de experimento. Valor de p calculado em Two-Way ANOVA, com pós teste de Tukey. **p=0,001 (CT x HF). ****p<0,0001 (CTx Hg e HF x HFHg).

5.3. Dosagem dos níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos

Foi observado aumento significativo nos níveis séricos de colesterol dos grupos HF (261 ± 33 mg/dL) e HFHg (258 ± 34 mg/dL) em comparação aos demais grupos (****p<0,0001), grupo CT ($97,5 \pm 0,02$ mg/dL) e grupo Hg (100 ± 14 mg/dL).

A dieta ocidental aumentou significativamente os níveis de triglicerídeos dos grupos HF (312 ± 16 mg/dL) e HFHg ($334 \pm 0,01$ mg/dL) em comparação aos demais grupos (****p<0,0001), grupo CT (122 ± 27 mg/dL) e grupo Hg (117 ± 25 mg/dL).

Figura 8. Impacto do consumo da dieta ocidental e exposição ao MeHg sobre a concentração de colesterol total sérico e triglicerídeos (mg/dL) em camundongos C57BL/6J.



Os valores foram expressos pela média \pm EPM de 5 animais em cada grupo (ANOVA, Bonferroni).

5.4. Avaliação morfométrica

Para verificar os efeitos do consumo dieta ocidental (42% de lipídeos) e os efeitos da contaminação por MeHg na água de beber (20 mg/L) sobre os parâmetros morfométricos, realizou-se a medição da altura dos vilos, profundidade das criptas e a relação vilo/cripta.

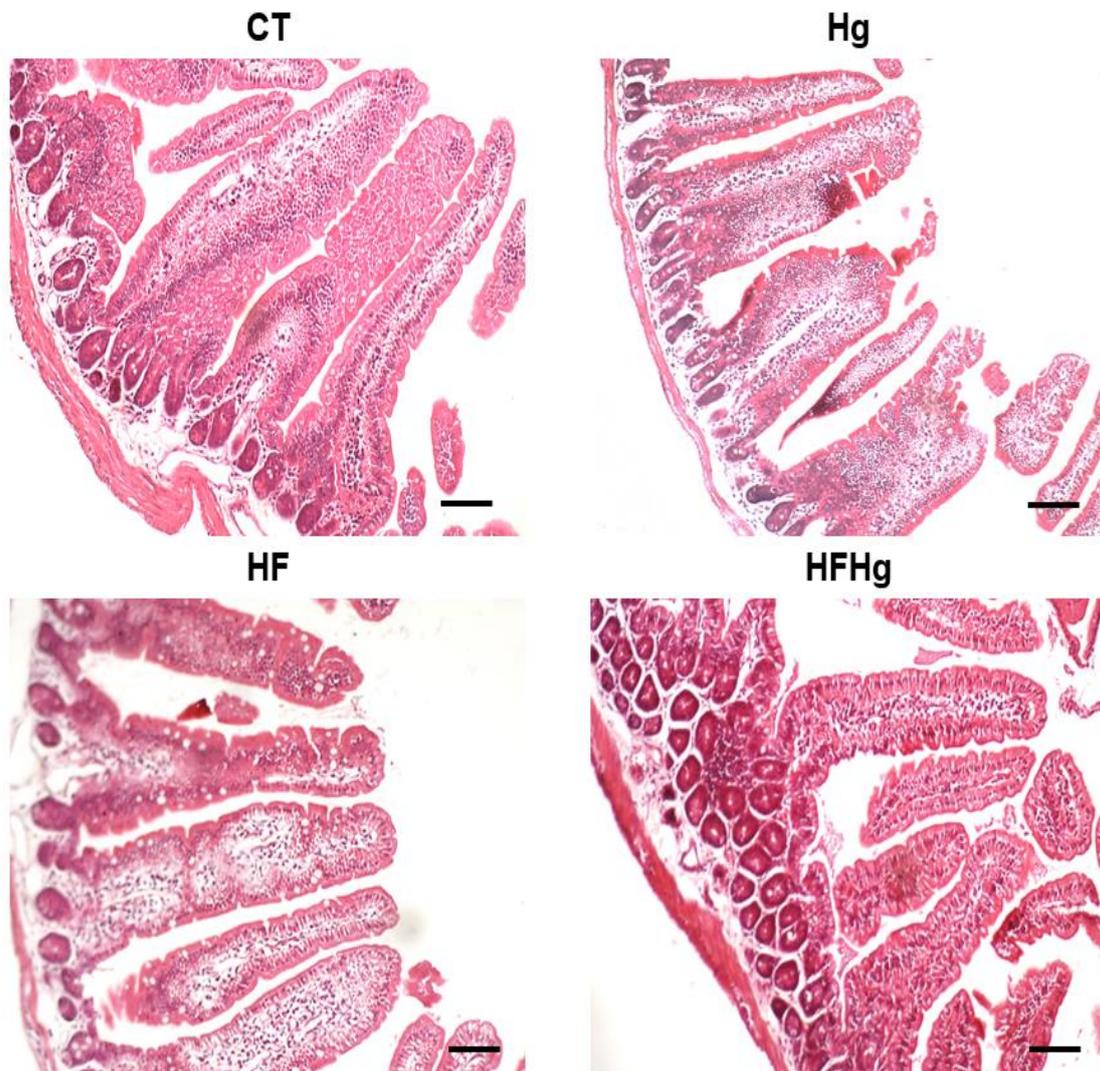
Em relação aos vilos, pode ser visto que o grupo que recebeu dieta ocidental, independente da intoxicação, apresentou redução da altura dos vilos (** $p < 0,01$), quando comparados ao grupo CT. Também foi observado uma redução significativa (* $p < 0,01$) no grupo Hg. Além disso, foi observado que o grupo que recebeu a combinação da dieta ocidental com a intoxicação por MeHg (HFHg), apresentou redução mais significativa na altura dos vilos (**** $p < 0,0001$) (**Figura 10a**).

No que se refere as criptas, observou-se que os camundongos que receberam dieta ocidental (42% de lipídeos) apresentaram uma maior profundidade das criptas (** $p < 0,01$), quando comparado ao grupo CT. Novamente foi observado que o grupo HFHg (** $p < 0,01$), também apresentou maior diferença significativa na profundidade das criptas em relação ao grupo CT. Não houve diferença significativa no grupo Hg em relação ao grupo CT (**Figura 10b**).

Quando realizado a avaliação morfométrica da razão vilo/cripta foi observado diferença significativa nos animais do grupo HF (** $p < 0,001$). em relação aos

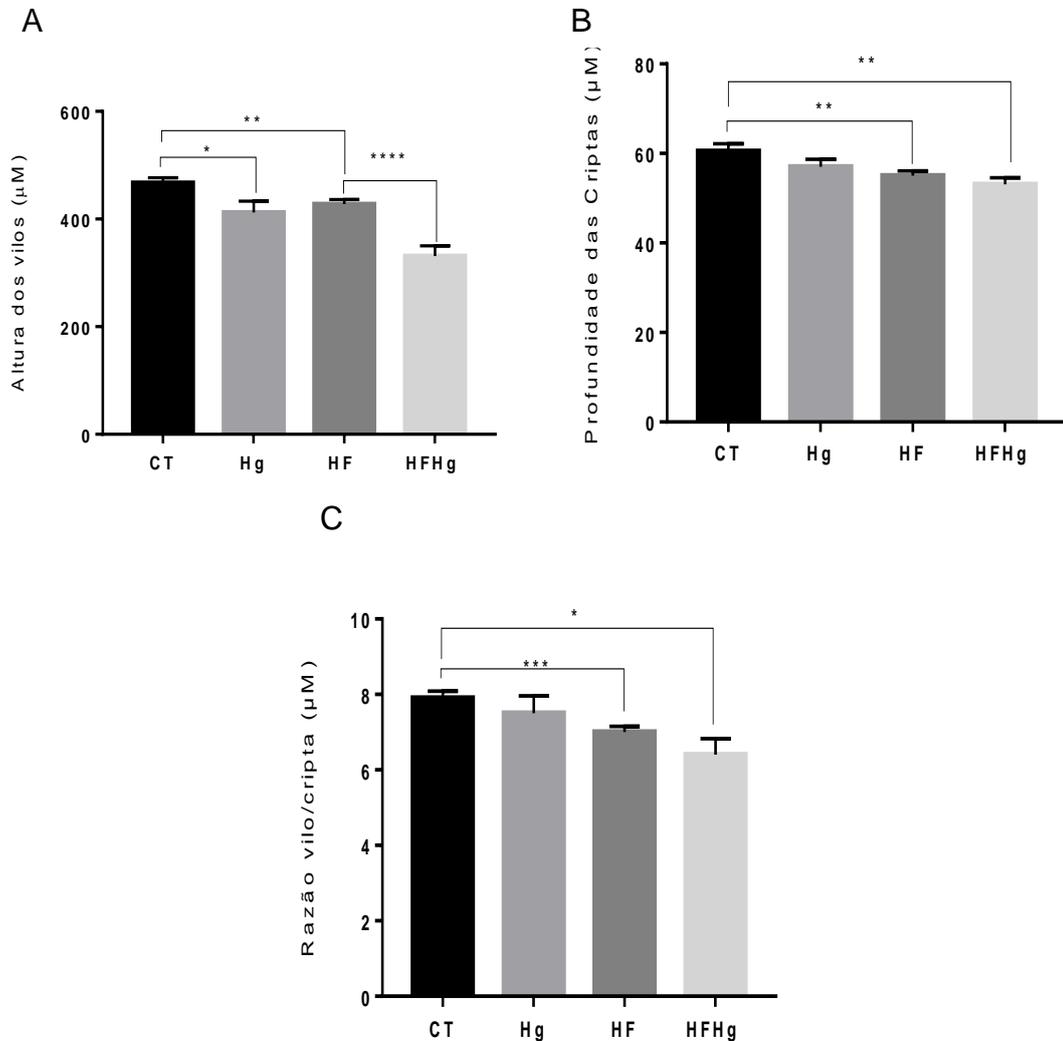
animais do grupo CT. Também foi observado diferença significativa no grupo HFHg ($*p < 0,01$) em comparação ao grupo CT (**Figura 10c**).

Figura 9. Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos do duodeno de camundongos C57BL/6J, submetidos a dieta ocidental contendo (42% de lipídios) e dieta padrão, animais sem intoxicação ou intoxicados com MeHg (20 mg/L na água de beber). Lâminas coradas em H&E (100x). Escala de 50 μ m.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 10. Avaliação morfométrica da altura dos vilos, profundidade das criptas e a relação vilo/cripta no duodeno de camundongos C57BL/6J, submetidos a dieta ocidental contendo (42% de lipídios) e dieta padrão, animais sem intoxicação ou intoxicados com MeHg (20 mg/L na água de beber).

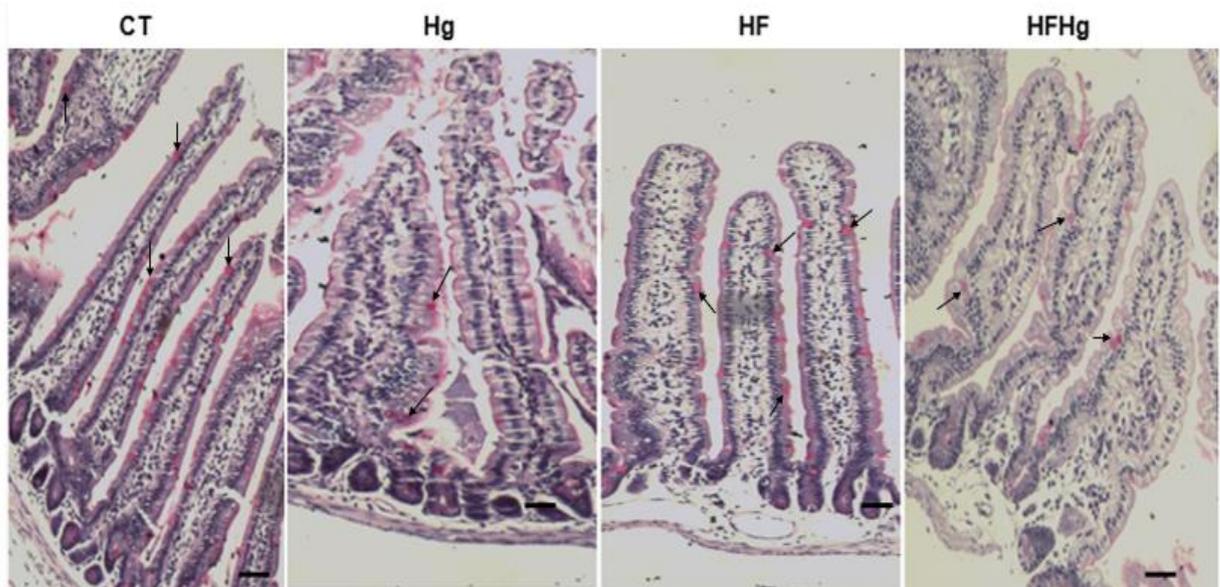


Os valores foram expressos pela média \pm EPM. teste t de Student, comparando grupos (CTx HF), (CT x Hg), (HF x HFHg) e (CTx HFHg). Número de animais por grupo (n= 4). Não foi observado diferença significativa entre os grupos experimentais por teste ANOVA,

5.5. Determinação de células PAS positivas

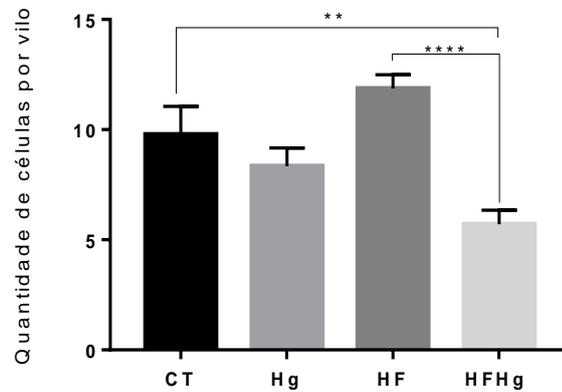
Observou-se menor quantidade de células PAS-positivas no grupo HFHg quando comparado ao grupo HF (****p<0,0001). Não foi observado diferença significativa entre os demais grupos experimentais.

Figura 11. Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos do duodeno de camundongos C57BL/6J, submetidos a dieta ocidental contendo (42% de lipídios) e dieta padrão, animais sem intoxicação ou intoxicados com MeHg (20 mg/L na água de beber) coradas com reagente de Schiff. (100x). Escala de 50 µm.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 12. Quantidade de células caliciformes por vilão no duodeno de camundongos C57BL/6J, submetidos a dieta ocidental contendo (42% de lipídios) e dieta padrão e animais intoxicação ou não por MeHg (20 mg/L na água de beber).

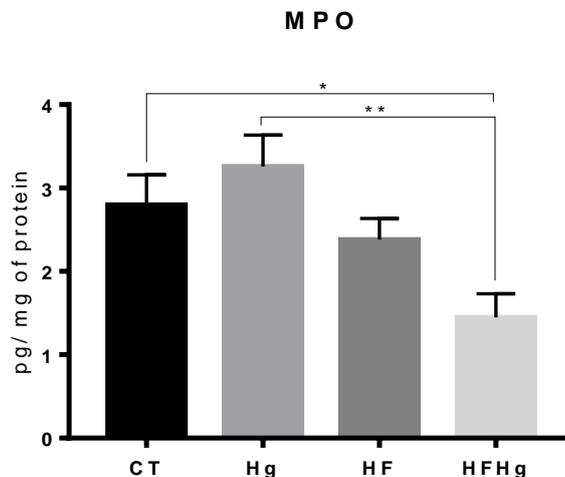


Os valores foram expressos pela média \pm EPM de 4 animais em cada grupo (ANOVA, Bonferroni).

5.6. Atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO)

Observou-se diferença na atividade enzimática da MPO quando comparado o grupo Hg e HFHg (** $p < 0,01$), também foi observado uma redução significativa entre os grupos HF e HFHg (* $p < 0,01$).

Figura 13. Avaliação da atividade enzimática da mieloperoxidase no duodeno dos camundongos C57BL/6J submetidos à dieta ocidental e/ou intoxicação pelo MeHg.



Os valores foram expressos pela média \pm EPM de 6 animais em cada grupo (ANOVA, Bonferroni).

5.7. Determinação de marcadores de estresse oxidativo

Para verificar os efeitos da intoxicação por Hg e os efeitos do consumo dieta contendo (42% de lipídeos) sobre os marcadores de estresse oxidativo, realizou-se análises da atividade das enzimas antioxidantes GPx. Além da avaliação dos níveis de GSH e NO_2/NO_3 e peroxidação lipídicas através da mensuração dos níveis de MDA presente nas amostras.

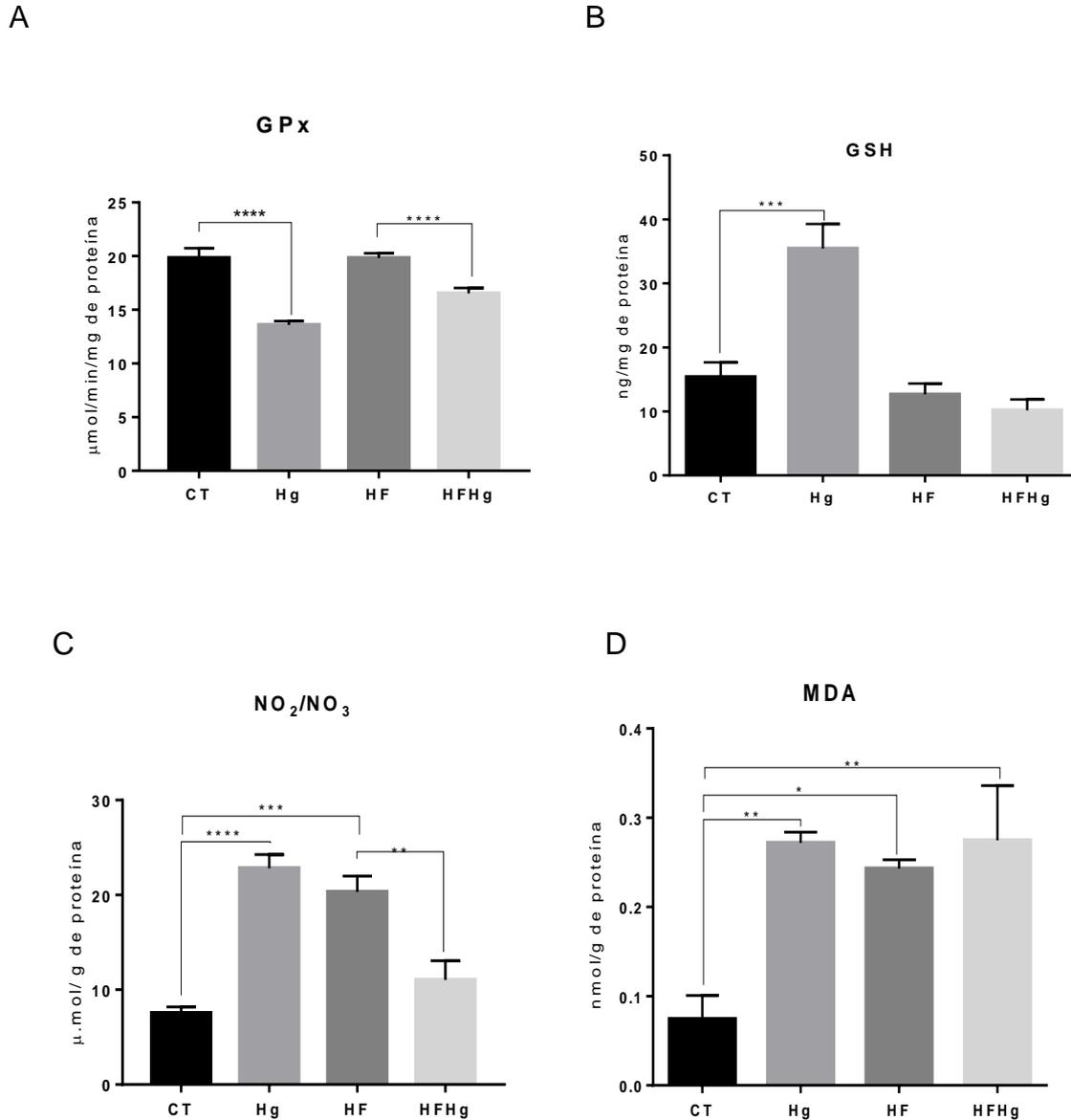
Em relação a atividade enzimática da GPx o grupo Hg demonstrou uma redução da atividade da GPx no duodeno quando comparado com o grupo CT (**** $p < 0,0001$). A atividade de GPx também apresentou redução significativa quando comparados os grupos HF e HFHg (**** $p < 0,0001$). Não houve diferença significativa quando comparado os grupos CT e HF.

A intoxicação mercurial promoveu um aumento significativo das concentrações de GSH no duodeno quando comparado com o grupo CT (**** $p < 0,0001$). Não houve diferença significativa quando comparado o grupo HF com o grupo HFHg.

Quando avaliado os níveis de NO_2/NO_3 no duodeno de camundongos. O grupo Hg teve aumento significativo nos níveis de NO_2/NO_3 quando comparado ao grupo CT (**** $p < 0,0001$). Também houve diferença significativa quando comparados os grupos CT e HF (*** $p < 0,001$). Quando avaliado o grupo HFHg foi observado uma redução quando comprado ao grupo HF (** $p < 0,001$).

Em relação ao MDA, o grupo Hg apresentou maior concentração de MDA no duodeno quando comparado com o grupo CT (** $p < 0,001$). Também houve diferença significativa entre os grupos CT e HF (* $p < 0,01$). Foi observado também um aumento significativo nas concentrações de MDA entre os grupos CT e HFHg (** $p < 0,001$).

Figura 14. Avaliação do estresse oxidativo por meio da análise das concentrações de GPx, GSH, NO₂/NO₃ e MDA no duodeno dos camundongos C57BL/6J submetidos à dieta ocidental ou dieta padrão, intoxicação ou não por MeHg.

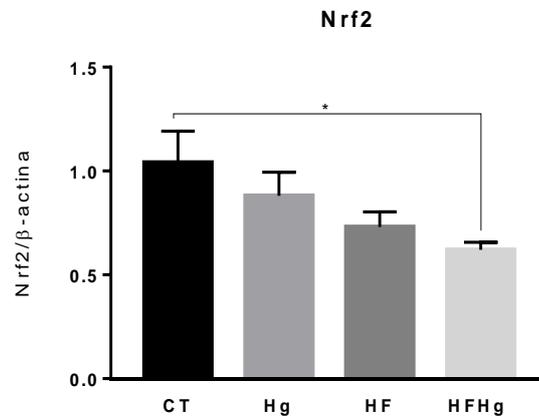


Os valores foram expressos pela média \pm EPM de 6 animais em cada grupo (ANOVA, Bonferroni).

5.8. Transcrição de Nrf2 por qRT-PCR

O grupo HFHg reduziu significativamente os níveis transcripcionais de Nrf2 (* $p < 0,01$) quando comprado com o grupo CT. Não houve diferença significativa entres os demais grupos experimentais (**Figura 15**).

Figura 15. Transcrição de Nrf2 por qRT-PCR usando β -actina como referência.

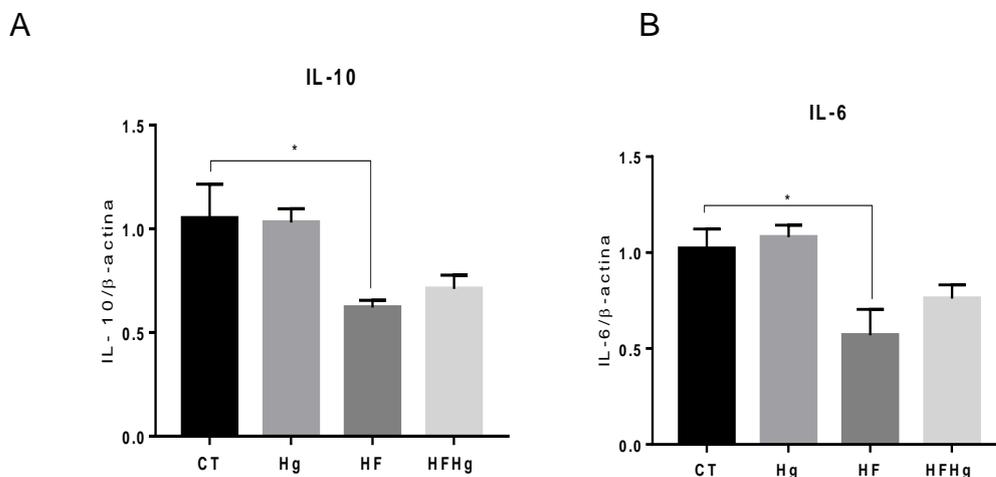


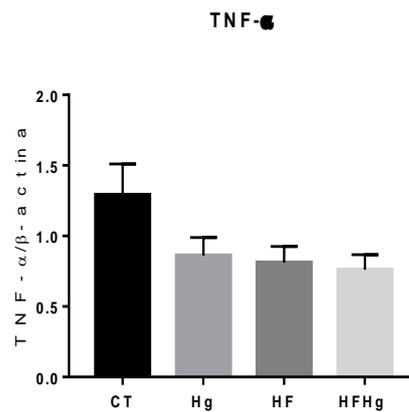
Os valores foram expressos pela média \pm EPM de 6 animais em cada grupo (ANOVA, Bonferroni).

5.9. Transcrição de TNF- α , IL-6 e IL-10 por qRT-PCR

A dieta ocidental com (42 % de lipídeos) causou uma redução significativa ($*p < 0,01$) nos níveis de IL-10 e IL-6, quando comparado ao grupo CT. Não houve diferença significativa entre os demais grupos experimentais. Quando avaliado a transcrição de TNF- α , não foi observado diferença significativa entre os grupos experimentais

Figura 16. Transcrição de TNF- α , IL-6 e IL-10 por qRT-PCR usando β -actina como referência.



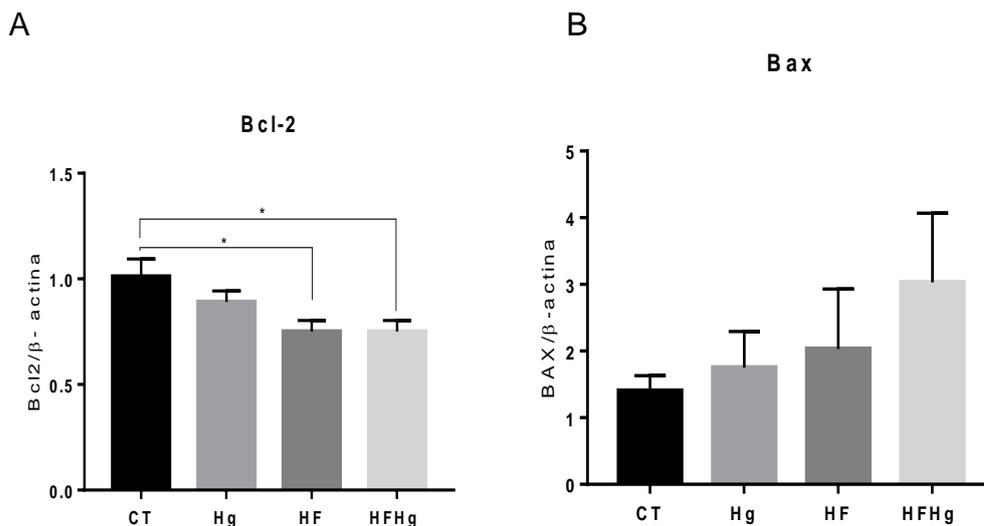


Os valores foram expressos pela média \pm EPM de 6 animais em cada grupo (ANOVA, Bonferroni).

5.10. Transcrição de Bcl-2 e Bax por qRT-PCR.

A dieta ocidental com (42% de lipídeos) causou uma redução significativa ($*p < 0,01$) os níveis transcripcionais de Bcl-2 quando comparado com o grupo CT. No grupo HFHg também foi observado uma redução significativa na expressão de Bcl-2 ($*p < 0,01$) em comparação ao grupo CT. Quando avaliado os níveis transcripcionais de Bax não foi observado diferença significativa entre os grupos experimentais

Figura 17. Análise da transcrição de Bcl-2 e Bax por qRT-PCR usando β -actina como referência.



Os valores foram expressos pela média \pm EPM de 6 e 4 animais em cada grupo (ANOVA, Bonferroni).

6.0. DISCUSSÃO

A exposição tóxica ao Hg afeta diferentes órgãos, contribuindo para insuficiência renal, doença cardiovascular e disfunção do SNC (LUND *et al.*, 1993; SAKAMOTO *et al.*, 2017). Além disso, pesquisas recentes do nosso grupo revelaram que a exposição ao MeHg 20 mg/L na água de beber aumentou significativamente os níveis de peroxidação lipídica e marcadores de estresse oxidativo, no hipocampo de animais jovens (PN 21) (BARROS, 2017) e lactentes (PINTO, 2018).

A dose escolhida para esse estudo foi fundamentada em estudos onde o MeHg (20 mg/L) foi capaz de causar alterações no SNC no período de 21 dias sem afetar a quantidade de água consumida pelos animais. Dietrich *et al.*, (2005) avaliaram os efeitos da exposição oral ao CH₃HgCl no controle e atividade locomotora em camundongos adultos. O MeHg foi diluído em água potável em doses de 20 e 40 mg/L. Foram realizados testes comportamentais e sacrifício dos animais nos dias 7, 14 e 21 após o início do tratamento, os efeitos da intoxicação foram dependentes do tempo, tendo seus efeitos mais pronunciados no dia 21. A exposição ao MeHg (20 mg/L) causou diminuição significativa na atividade locomotora espontânea. A maioria dos animais que receberam a dose de 40 mg/L morreram nos primeiros dias. Sugerindo que a dose 40 mg/L não é adequada para modelo animal de intoxicação por MeHg.

Sabendo-se dos efeitos pronunciados do Hg no SNC e a escassez de estudos voltados a exposição desse metal ao TGI, visto que a absorção do MeHg acontece, principalmente, ao nível do TGI (CLARKSON *et al.*, 2006), neste estudo buscamos identificar alterações causadas no duodeno pela intoxicação por MeHg (20mg/L na água de beber).

A escolha da dieta feita nesse estudo foi devido ao fato de inexistir estudos que relacionem efeitos de dieta ocidentalizada com os efeitos da intoxicação por MeHg. O crescente aumento do consumo de dietas ricas em gordura pela população é um problema de saúde pública (WHO, 2016; ZINÖCKER; LINDSETH, 2018).

Em nossos resultados foi observado ganho de peso nos animais que consumiram dieta ocidental, grupo HF. Da mesma forma, Carlin *et al.*, (2016) utilizaram modelo de Western Diet (17% de proteína e 41% de gordura) para camundongos C57BL/6J, de 9 semanas de idade, e observaram aumento de peso significativo após 8 semanas de consumo da dieta em relação ao grupo controle (com 13% de gordura).

Já quando comparamos os grupos submetidos a exposição ao metal, grupos Hg e HFHg, foi observado um menor ganho de peso, quando comparados com seus respectivos controles. Corte *et al.*, (2013) observaram menor ganho de peso em ratos Wistar, tratados com MeHg (5mg/kg/dia), por gavagem, durante 21 dias.

KAWAKAMI *et al.*, (2012) avaliaram se a exposição ao HgCl₂ (1mg/kg) seria capaz de induzir alterações na função dos adipócitos. Foram utilizados ratos machos com 6 semanas de idade, os animais permaneceram 24 dias em consumo de dieta padrão (357,6 kcal/100 g) ou dieta HFD (507,6 kcal/100 g), após 14 dias de consumo de dieta HFD os camundongos haviam estabelecido obesidade e dislipidemia, nos últimos 10 dias após o início das dietas foi administrado por injeção subcutânea (1 mg/kg de HgCl₂) por 10 dias. Foi observado que o Hg diminuiu significativamente o nível sérico de leptina com a regulação negativa da expressão do mRNA da leptina e uma redução no tamanho dos adipócitos. Resultados esses que podem levar ao desenvolvimento de novas abordagens para estabelecer o papel dos metais no tecido adiposo das doenças relacionadas à obesidade.

A mensuração de Hg no pelo tem sido usada como marcador de exposição ao Hg, por ser um método não invasivo de coleta e também uma matriz útil para análises de série temporal (BERGLUND, 2005). Os níveis de Hg considerados limítrofes não tóxicos, pela OMS, em humanos são de 8 µg/L, no sangue, e de 2 µg/g, nos cabelos (WHO, 1990). Neste estudo, os grupos que foram expostos ao MeHg, apresentaram concentrações 300 vezes mais elevadas de Hg no pelo, confirmando que administração de MeHg na água de beber induz intoxicação nos animais.

Nielsen, Andersen e Grandjean, (1994) avaliaram a deposição de Hg nos dias 3, 10, 20 e 30 dias após administração em dose única por gavagem (1µmol/kg) em ratos de 8 semanas de idade. A concentração de Hg foi mensurada em soro e pelo. Os resultados mostraram que a concentração Hg no sangue, foi mais elevada no dia 3. Já quando avaliado o pelo, o dia 30 se mostrou mais elevado. Demonstrando assim que a avaliação da toxicidade do Hg no pelo é útil para análises de exposição a períodos prolongados.

Já Buchanan *et al.*, (2015) avaliaram o consumo elevado de peixes entre asiáticos residentes em Chicago, nos Estados Unidos (EUA), e a relação com o aumento da concentração de Hg no cabelo, visto que a dieta em adultos é a principal via de exposição ao Hg. Foram analisados 71 participantes, coletadas

informações sobre o consumo de peixe e amostras de cabelo para avaliar a concentração de Hg. A maior concentração de Hg se deu em mulheres em idade fértil, com níveis de 1 µg/g. A média do restante dos indivíduos foi de 0,58 µg/g. 20% da amostra comiam peixe 4 ou mais vezes na semana. Os níveis de Hg nos peixes comprados eram geralmente baixos. Os peixes de maior consumo eram a tilápia, salmão, atum e cavala, os níveis mais altos de Hg foram encontrados em amostras de atum. Os resultados do estudo demonstram que o maior consumo de peixe, mesmo com baixas concentrações de Hg, demonstrou ter uma relação direta com a concentração aumentada de Hg no cabelo dos participantes.

Vários trabalhos têm relatado uma hipercolesterolemia e síndrome metabólica resultantes da exposição crônica ao MeHg (MOREIRA *et al.*, 2012; MACEDO-JÚNIOR *et al.*, 2017; JOSHI *et al.*, 2014). Quando analisamos os níveis séricos de colesterol e triglicérides, não foram observadas diferenças significativas no grupo intoxicado. Apenas aumento significativo nos grupos que consumiram dieta ocidental, efeito esse já esperado, visto que o consumo de dietas ricas em lipídios está diretamente relacionado com aumento de complicações ateroscleróticas (MARTINS; SALDANHA, 2017).

Muito tem se discutido, acerca de possíveis efeitos da modulação da dieta a intoxicação com o MeHg (NIELSEN; ANDERSEN, 1995; GANAPATHY *et al.*, 2001; DAVE *et al.*, 2004). Como foi demonstrado em nossos resultados os efeitos da intoxicação do MeHg em animais que consumiram dieta padrão, elevou os níveis de estresse oxidativo (MDA, NO₂/NO₃, GSH) porém, o grupo HFHg apresentou uma redução nos níveis de NO₂/NO₃ e GSH. Sugerindo que a dieta pode influenciar na toxicidade do Hg.

Porém, o uso de dietas ricas em lipídios por si é um problema de saúde em todo o mundo. O consumo de dieta ocidental está diretamente relacionado ao aumento de obesidade, geralmente associada à inflamação e a um conjunto de distúrbios conhecidos como síndrome metabólica (GUILLEMOT-LEGRIS; MUCCIOLI, 2017). Em nossos resultados a dieta, independente da intoxicação, se mostrou significativa ao elevar os níveis de NO₂/NO₃ e peroxidação lipídica, avaliado pelos níveis de MDA.

Kuwabara *et al.*, (2018) avaliaram a influência do diabetes tipo 2 e obesidade na via tipo Toll like 4 (TLR4) em neutrófilos de ratos. Utilizaram ratos Wistar obesos induzidos por dieta hiperlipídica. Para avaliar a resposta dos neutrófilos ao LPS, foi

realizada uma instilação intratraqueal de LPS. Os ratos obesos apresentaram uma menor resposta ao LPS, com comprometimento da via TLR4, via do sistema imunológico desses animais, o que resulta em menor produção de citocinas inflamatórias. Também foi relatada, diminuição da expressão de IL-1 β , IL-6, CXCL1, CXCL2 e atividade de MPO. Esses resultados estão de acordo com os resultados encontrados neste estudo, onde foi observado uma redução nos marcadores inflamatórios de animais que consumiram dieta ocidental.

Vários estudos sugerem o consumo de anti-inflamatórios para promover proteção contra os efeitos do MeHg. Barcelos *et al.*, (2011), demonstraram que o consumo de quercetina (QC), um flavonoide abundante na dieta humana, protege contra danos causados pela exposição ao MeHg. Os animais receberam MeHg (30 μ g/kg/dia) por gavagem e QC (0,5–50 mg/kg/dia) ou combinações de ambos durante 45 dias. Posteriormente, os níveis de GSH, GPx e CAT. O MeHg diminuiu a concentração de GSH e a atividade da GPx em 17 e 12%. Quando o flavonóide foi administrado em combinação com MeHg, as concentrações de (5,0 e 50,0 mg/kg/dia) demonstraram efeito protetor. Além disso, a redução nos níveis de GSH e GPx causada pelo tratamento com MeHg foi restaurada. Os resultados indicam que o consumo de alimentos ricos em QC pode exercer um efeito protetor em animais expostos a Hg.

Já Jadán-Piedra, Vélez e Devesa, (2018) demonstraram que o consumo alimentar de compostos com grupos tiol, flavonoides, como QC, polifenóis, como ácido tânico, extratos vegetais ou suplementos ricos nesses compostos, podem ser uma estratégia adequada para reduzir a biodisponibilidade oral de Hg. Outros alimentos como chá, café e fibras em geral também foram eficazes na modificação da biodisponibilidade do Hg (STILLINGS *et al.*, 1974; NIELSEN; ANDERSEN, 1995). Porém, são necessários mais estudos para entender os mecanismos envolvidos no consumo de deita rica em lipídios e a exposição ao MeHg, visto que a maioria dos estudos relacionam efeitos de alimentos antioxidantes.

A avaliação da arquitetura dos vilos e das criptas reflete, em parte, a saúde do intestino delgado, visto que, a altura dos vilos proporciona uma maior capacidade de absorção, a partir do aumento da área de contato, e alterações dos vilos, como na redução de sua altura, estão associados a danos nas células epiteliais intestinais (HAN *et al.*, 2016). Após a intoxicação com MeHg foram observadas alterações

caracterizadas por redução da altura dos vilos. Apesar desses achados, nota-se que os animais que receberam dieta ocidental e foram intoxicados por MeHg, grupo HFHg, apresentaram maior comprometimento da mucosa.

A avaliação morfométrica realizada demonstrou que a intoxicação pelo Hg não foi capaz de induzir danos pronunciados. Mas quando feita a associação com a dieta ocidental, foram observados maiores danos. A falta de potenciação da lesão da mucosa observada na intoxicação por MeHg possivelmente envolve mecanismos de ação ainda desconhecidos. Até o presente momento, estudos semelhantes avaliando a intoxicação por MeHg na mucosa intestinal são escassos.

A secreção do muco é um fator crítico na função de barreira do intestino e sua diminuição resulta em aumento significativo do risco de infecções (ALBANESE *et al.*, 1994). Neste estudo, foi observado que o grupo que recebeu a combinação de dieta ocidental e intoxicação por MeHg, diminuiu significativamente as células PAS positivas, sendo o grupo mais susceptível a riscos de infecções.

Jiang *et al.*, (2018) demonstraram que a exposição ao HgCl₂ em camundongos fêmeas BALB/c de 4 semanas de idade, induziu estresse oxidativo, aumento da permeabilidade celular e perda da integridade das vilosidades. Bem como, perda de peso, corroborando com os achados deste presente estudo.

Um grande número de evidências associa os danos causados pelo acúmulo do Hg no organismo às características pró-oxidantes deste metal e, conseqüentemente, a sua capacidade de contribuir para a geração de EROs (STOHS; BAGCHI, 1995; BRANDÃO *et al.*, 2008; FARINA; ROCHA; ASCHER, 2011).

A liberação de EROs, e por conseqüência a desestabilização das estruturas orgânicas, leva a destruição do DNA das células epiteliais intestinais e morte celular. (MAEDA *et al.*, 2010). Por isso, torna-se crucial a quantificação da concentração da GSH e GPx, que atuam principalmente como antioxidante endógeno, tendo papel crucial no combate aos radicais livres, defendendo as células do estresse oxidativo (LUSHCHAK, 2014). Seu consumo reflete uma defesa celular contra a liberação de EROs, que por sua vez estão presentes na fisiopatologia de doenças intestinais (SIES, 1993; MAEDA *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2016).

O MeHg interage preferencialmente com grupos tióis e selenóis de proteínas e moléculas de baixo peso molecular. Essa interação contribui para a ocorrência de estresse oxidativo, que pode produzir danos por vários mecanismos de interação,

prejudicando a função de várias moléculas, como: proteínas, lipídios e ácidos nucléicos, resultando potencialmente na modulação de diferentes vias de transdução de sinal celular (ANTUNES *et al.*, 2018).

Foi demonstrado que o MeHg liga o GSH e GPx, tanto em modelos animais quanto em sistemas de cultura de células (PATRICK, 2002; KHAN *et al.*, 2012). De fato, várias evidências *in vitro* (FRANCO *et al.*, 2009; NI *et al.*, 2011). e *in vivo* (STRINGARI *et al.*, 2008; FRANCO *et al.*, 2009; GLASER *et al.*, 2010) mostraram que a exposição ao MeHg causa depleção da GSH e da GPx.

Eritrócitos foram tratados *in vitro* com diferentes concentrações de HgCl₂ (1-100 µM) por 1 hora a 37 ° C. O poder antioxidante dos eritrócitos tratados com HgCl₂ foi prejudicado, resultando no aumento de espécies reativas. Sugerindo que o HgCl₂ induz estresse oxidativo nos eritrócitos humanos. Isso foi confirmado quando se constatou que a geração de O₂⁻, H₂O₂, ONOO⁻ aumentava de maneira dependente da dose nos eritrócitos tratados com HgCl₂. Esses resultados mostram que o HgCl₂ induz estresse oxidativo e nitrosativo, oxida a hemoglobina, prejudica o mecanismo de defesa antioxidante e altera as vias metabólicas nos eritrócitos (AHMAD E MAHMOOD, 2019).

Também foi observado que a administração HgCl₂ em ratos induziu acentuadas reduções na atividade da SOD, CAT e GPx no rim. Atividades suprimidas dessas enzimas são correlacionadas com o aumento de lesão oxidativa (GSTRAUNTHALER; PFALLER; KOTANKO, 1983).

EL-TANBOULY *et al.*, (2015) e EL KEBBAJ *et al.*, (2015) demonstraram que o LPS eleva a atividade de enzimas antioxidantes como uma resposta ao aumento de espécies reativas causado por essa substância. Sendo o LPS uma endotoxina bem conhecida. E visto os efeitos do MeHg de diminuir os efeitos das enzimas antioxidantes, essas alterações representam um mecanismo importante pelo qual o Hg causa alterações nos tecidos.

Além disso, um estudo propôs outro mecanismo molecular para explicar a atividade reduzida da GPx após a exposição ao MeHg. O MeHg induz uma "deficiência de selênio", que afeta a síntese de GPx através de um efeito pós-transcricional, levando a diminuição dos níveis de GPx e consequentemente, aumento dos níveis de H₂O₂ (USUKI *et al.*, 2010).

Nesse estudo foi verificado uma diminuição nos níveis da GPx no duodeno, dado esse de acordo com resultados presentes na literatura. Em contrapartida foi

observado um aumento nos níveis de GSH no grupo intoxicado, efeito provavelmente compensatório. Porém mais estudos precisam ser realizados para entender melhor os efeitos desse metal no intestino. Visto que a maioria dos dados na literatura se referem aos efeitos no SNC. Em nosso modelo experimental, também detectamos altos níveis de produtos de peroxidação lipídica, demonstrados pelo aumento nos níveis de MDA nos grupos Hg e HFHg. Resultados esses de acordo com a literatura.

Em nossos resultados encontramos uma redução da transcrição de Nrf2 no grupo HFHg e uma tendência a redução no grupo Hg, sugerindo que o Hg interferiu na transcrição desse gene, aumentando o estresse oxidativo.

Com o intuito de investigar a participação de infiltrados neutrófilicos no presente estudo, sabendo que estes tem uma importante participação no mecanismo de inflamação intestinal (RIBEIRO *et al.*, 2002), foi avaliada a atividade da enzima MPO, por esta ser considerada um importante marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos, entre eles, o duodeno. Foi observado nos resultados uma redução nos níveis de MPO no grupo HFHg. Efeito esse também encontrado no trabalho de Kuwabara *et al.*, (2018), onde foi observado uma desregulação da atividade da MPO.

Em nossos resultados, esperávamos que o Hg, por seus efeitos neurodegenerativos e pró-oxidantes, estivesse diretamente associado com aumento de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, IFN- γ , IL-6 IL-1 β e TNF- α) e inversamente associado a anti-inflamatórias citocinas (por exemplo, IL-10, IL-4). Porém, não foram encontradas diferenças significativas nos marcadores inflamatórios dos grupos expostos ao Hg.

Um estudo, demonstrou que a exposição elevada ao Hg está associada a níveis elevados de anticorpos antinucleares (ANA) para indivíduos expostos ao mercúrio inorgânico por meio de operações de mineração de ouro em pequena escala (SILVA *et al.*, 2004; GARDNER *et al.*, 2010) ou MeHg pelo consumo de peixes contaminados. O ANA desempenha um indicador geral de disfunção autoimune (NYLAND *et al.*, 2011).

Outro estudo, feito em mineradores na Amazônia buscou analisar novos biomarcadores séricos de imunotoxicidade induzida por Hg e desregulação autoimune. Foram colhidas amostras de soro e posteriormente foram feitas análises

pelo método de ELISA. As amostras foram colhidas de dois grupos, um em campo de mineração de ouro, grupo exposto ao Hg e um grupo controle, sem exposição ao Hg. A exposição ao Hg foi associada ao aumento dos títulos de vários autoanticorpos no soro, incluindo anti-GSTA1. Essas proteínas desempenham uma ampla variedade de papéis, inclusive como antioxidantes, na regulação de citocinas pró e anti-inflamatórias, além de estresse oxidativo. Acredita-se que a desregulação dessas proteínas e vias desempenhe um papel em doenças autoimunes, como artrite reumatoide e esclerose múltipla. Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que a exposição ao Hg pode induzir disfunção autoimune complexa e os efeitos imunotóxicos dessa disfunção podem ser medidos por concentrações elevadas de autoanticorpos como anti-GSTA1 (MOTTS *et al.*, 2015).

Apesar do SNC ser considerado o órgão crítico para o efeito tóxico do MeHg, recentemente foi sugerido que o sistema imunológico pode ser pelo menos tão afetado quanto. HAGGQVIST *et al.*, (2005) Avaliaram os efeitos do MeHg no sistema imunológico em camundongos. Foram administradas injeções de 2mg de MeHg/kg por via subcutânea a cada três dias. O Hg causou durante a primeira semana uma redução de 47 e 9% das células B e T, respectivamente.

Acredita-se que a exposição ao MeHg produza uma resposta imunossupressora inicial, caracterizada por números reduzidos de células B e T, seguidos por uma resposta Th1 atrasada, que pode persistir por muito tempo após a exposição (HÄGGQVIST *et al.*, 2015; CROWE *et al.*, 2016).

Nossos resultados, indicam que a exposição ao Hg pode desregular os sinais da inflamação no sistema imunológico, apoiando ainda mais a necessidade de se investigar as interações entre o consumo de peixe contaminados com Hg a outras vias de exposição ao Hg, biomarcadores de inflamação.

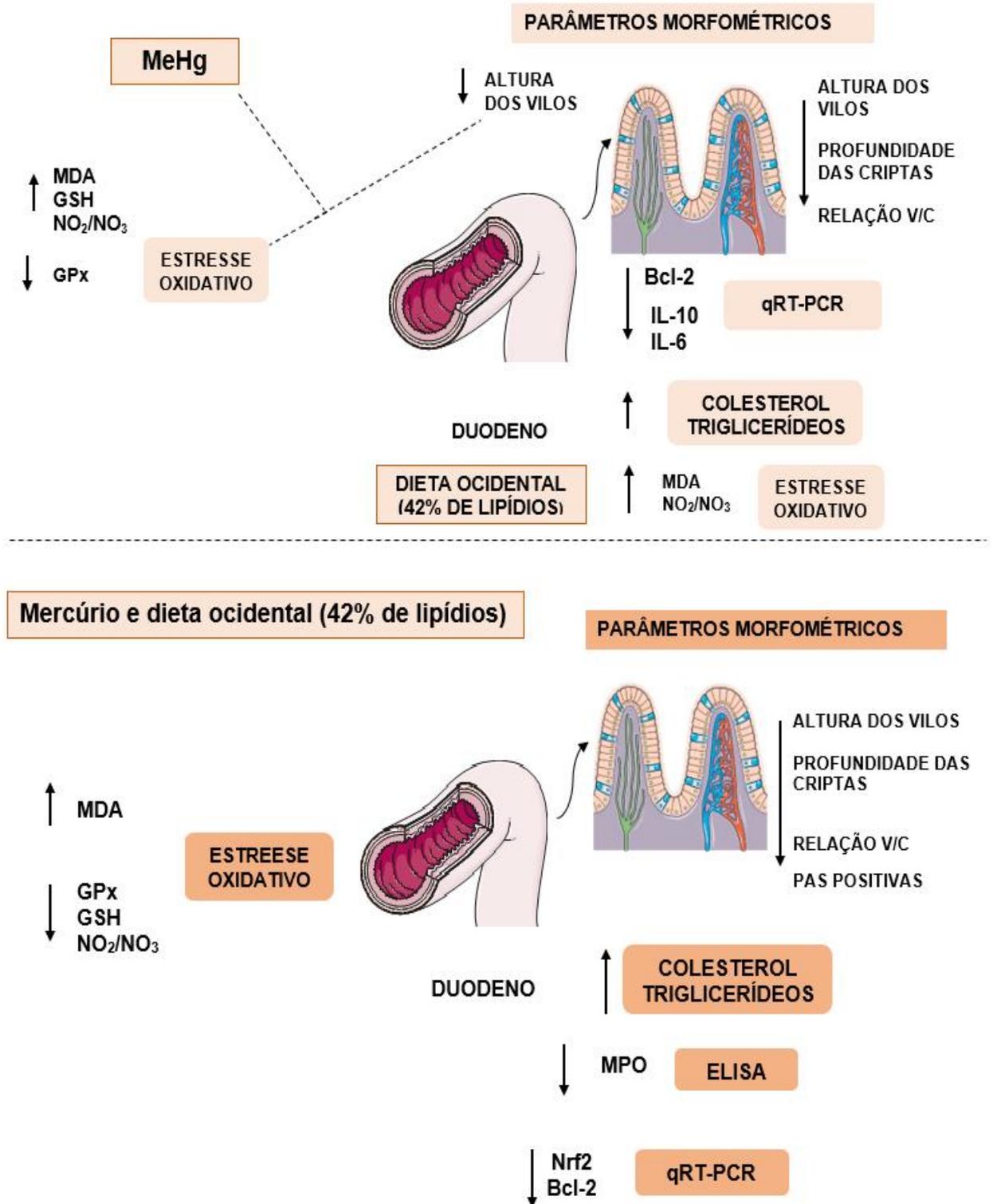
Sokolowsky *et al.*, (2011) avaliaram marcadores de apoptose em ratos expostos a uma única dose de 5mg/kg por via subcutânea. A intoxicação promoveu aumento da transcrição de proteínas ligadas à cascata de apoptose, incluindo a Bcl-2 associado à proteína X (Bax), citocromo C, caspase 9 e caspases 8 e 3. Nos nossos resultados não encontramos diferenças na transcrição de Bax, foi observado uma menor expressão de Bcl-2 nos grupos HFHg e HF. Esses resultados sugerem que a dieta ocidental foi capaz de interferir na via apoptótica. Mas são necessários mais estudos para entender melhor os mecanismos envolvidos.

Os conceitos aqui expostos contribuem para a compreensão sobre a toxicidade do MeHg, um poluente ambiental de grande risco à saúde humana. O desenvolvimento de estudos experimentais tem sido fundamental para conhecer os efeitos tóxicos do MeHg em diferentes órgãos e também para as investigações de prováveis alvos moleculares que possam minimizar os efeitos deste metal pesado. Maiores investigações sobre as vias celulares que estão envolvidas na toxicidade do MeHg no duodeno, bem como os efeitos que a dieta exerce na bioacessibilidade desse metal, são necessários.

Estudos mais voltados ao papel da microbiota intestinal também são de grande relevância, já que alguns trabalhos têm relacionado mudanças no microbiota intestinal, como um dos efeitos da exposição ao Hg (ROWLAND; ROBINSON; DOHERTY, 1984; ZHANG *et al.*, 2019). Portanto, sugerem-se que mais estudos sejam desenvolvidos envolvendo o consumo de dieta e uma possível modulação das dietas sobre os efeitos tóxicos do MeHg, influenciando na metilação e desmetilação desse metal.

Mas limitações do estudo devem ser reconhecidas. Esse estudo avaliou apenas os efeitos da intoxicação por MeHg em curto período e possivelmente a contaminação na população em geral é na maioria das vezes por longos períodos. Sendo necessários mais estudos, com um número de amostra mais robusto e um período maior de exposição.

FIGURA 18. Modelo representativo da ação do MeHg e o consumo de dieta ocidental (42% de lipídios) no duodeno de camundongos C57BL/6J.



Fonte: Elaborado pela autora.

7.0. CONCLUSÃO

- A dieta ocidental alterou o ganho de peso corporal no grupo experimental submetido a dieta hiperlipídica. Já a exposição ao MeHg demonstrou ser significativa no menor ganho de peso dos animais expostos a esse metal tóxico.
- A intoxicação pelo MeHg na água de beber (20 mg/L) aumentou as concentrações de Hg no pelo dos animais dos grupos intoxicados.
- A dieta aumentou os níveis de colesterol e triglicerídeos dos camundongos C57BL/6J, em um período de 40 dias de exposição.
- A intoxicação pelo MeHg na água de beber (20 mg/L) causou uma redução na concentração de GPx e um aumento significativo de MDA, GSH e NO₂/NO₃. Enquanto a dieta independente da intoxicação elevou os níveis de NO₂/NO₃ e MDA.
- A Transcrição de Nrf2 foi menor no grupo HFHg, não sendo significativa nos demais grupos experimentais.
- O grupo HFHg apresentou os efeitos mais prejudiciais na avaliação morfológica, com uma redução na altura dos vilos, aumento da profundidade das criptas e uma maior relação vilo/cripta.
- A contagem de células PAS positivas se mostrou reduzida no grupo HFHg.
- Quando avaliado a atividade da MPO, o grupo HFHg apresentou redução nos níveis de MPO.
- A intoxicação pelo MeHg na água de beber (20 mg/L) não alterou a expressão das citocinas pró- inflamatórias (IL-6 e TNF- α). Enquanto a dieta foi capaz de reduzir a expressão de IL-10 e IL-6.
- Não encontramos diferença significativa na expressão de Bax. Mas foi observada uma expressão reduzida de Bcl-2 nos grupos que consumiram dieta ocidental (HFHg e HF).

REFERÊNCIAS

- AGAR, E., et al. The Effect of Ethanol on Lipid Peroxidation and Glutathione Level in the Brain Stem of Rat. **NeuroReport**. v. 10, n. 8, p. 1799-1801, 1999.
- AKAGI, H.; MALM, O.; BRANCHES, F. J. P. Human exposure to mercury due to mining in the Amazon, Brasil- a review. **Journal of Environmental Science**, v. 3, p. 199–211, 1996.
- ALBANESE C. T et al. Role of intestinal mucus in transepithelial passage of bacteria across the intact ileum in vitro. **Surgery**, v.116, n.1, Jul, p.76-82. 1994.
- AMARANTE-MENDES, G. P.; GREEN, D. R. The regulation of apoptotic cell death. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 32, n. 9, p. 1053-1061, 1999.
- AMOLI, J. S.; BARIN, A.; EBRAHIMI-RADC, M.; SADIGHARAA, P. Cell damage through pentose phosphate pathway in fetus fibroblast cells exposed to methyl Mercury. **Jornal of Applied Toxicology**, 31: 685–689. 2011.
- ANTONSSON, B; MARTINOU, J. C. The Bcl-2 protein family. **Experimental cell research**, v. 256, n. 1, p. 50-57, 2000.
- ANTUNES, D. S. A., et al. Oxidative stress in methylmercury-induced cell toxicity. **Toxics**. v. 6, n. 3, p. 47, 2018.
- ANVISA. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - **RDC Nº 222**, DE 28 DE MARÇO DE 2018.
- AZEVEDO, F.A. Toxicologia do mercúrio. São Paulo: **Editora RIMA/InterTox**. 2003.
- BAGENSTOSE, L. M.; SALGAME, P; MONESTIER, M. Murine mercury-induced autoimmunity. **Immunologic research**, v. 20, n. 1, p. 67-78, 1999.
- BALLATORI, N. Transport of toxic metals by molecular mimicry. **Environmental health perspectives**, v. 110, n. suppl 5, p. 689-694, 2002.
- BARBOZA, M. S., et al. Measurement of Intestinal Permeability Using Mannitol and Lactulose in Children with Diarrheal Diseases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 32, n. 12, p. 1499–1504, 1999.
- BARCELOS, G. R. M., et al. Protective properties of quercetin against DNA damage and oxidative stress induced by methylmercury in rats. **Archives of toxicology**. v. 85, n. 9, p. 1151-1157, 2011.
- BARROS, L. L. S. **Efeitos da intoxicação mercurial no hipocampo e parâmetros lipídicos de camundongos submetidos à dieta ocidental**. 2017. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

BASTOS, W. R., et al. A contaminação por mercúrio na Bacia do Rio Madeira: uma breve revisão. **Geochimica Brasiliensis**, v. 18, n. 2, p. 99-114, 2012.

BERGLUND, M. et al. Inter-individual variations of human mercury exposure biomarkers: a cross-sectional assessment. **Environmental Health**, v. 4, n. 1, p. 20, 2005.

BERZAS NEVADO, J. J., et al. Mercury in the Tapajós River Basin, Brazilian Amazon: A Review. **Environment International**, v. 36, n. 6, p. 593–608. 2010.

BHATTACHARYA, T; GHOSH, T. S; MANDE, S S. Global profiling of carbohydrate active enzymes in human gut microbiome. **PloS one**, v. 10, n. 11, p. e0142038, 2015.

BISINOTI, M. C. JARDIM, W. F. O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente. **Química Nova**, v.27, n.4, p. 593-600. 2004.

BOISCHIO, A. A. P.; BARBOSA, A. Exposição ao mercúrio orgânico em populações ribeirinhas do Alto Madeira, Rondônia, 1991: resultados preliminares. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 9, p. 155-160, 1993.

BRAGA, T. M. B. **Aspectos preliminares da contaminação de mercúrio em peixes comercializados na praia do Mucuripe, Fortaleza e no estuário do rio Jaguaribe, CE.** 50 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

BRANDÃO, R et al. **Efeito do disseleneto de difenila sobre a toxicidade induzida por cloreto de mercúrio em camundongos.** Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – **RDC Nº 42**, de 29 de Agosto de 2013. Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos.

BRIDGES, C. C.; ZALUPS, R. K. Transport of inorganic mercury and methylmercury in target tissues and organs. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 13, n. 5, p. 385–410, 2010.

BUCHANAN, S et al. Fish consumption and hair mercury among Asians in Chicago. **Journal of occupational and environmental medicine**, v. 57, n. 12, p. 1325-1330, 2015.

CANI P. D et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**.56:1761-72, 2007.

CAPUTO, L. F. G; GITIRANA, L. B.; MANSO, P. P. A. **Técnicas histológicas. Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeira MRR. Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde.** Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, p. 89-188, 2010.

CARLIN, J. L., et al. Voluntary exercise blocks Western diet-induced gene expression of the chemokines CXCL10 and CCL2 in the prefrontal cortex. **Brain, behavior, and immunity**, v. 58, p. 82-90, 2016.

CARVALHO, D. V., et al. Cashew apple fiber prevents high fat diet-induced obesity in mice: an NMR metabolomic evaluation. **Food & function**, v. 10, n. 3, p. 1671-1683, 2019.

CASTELLANOS, M. J; FUENTE, A. The Adverse Effects of Heavy Metals with and without Noise Exposure on the Human Peripheral and Central Auditory System: A Literature Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 12, p. 1223, 2016.

CASTOLDI, A. F.; COCCINI, T.; MANZO, L. Neurotoxic and molecular effects of methylmercury in humans. **Reviews on environmental health**, v. 18, n. 1, p. 19-32, 2003.

CHAPMAN, L.; CHAN, H. M. The influence of nutrition on methyl mercury intoxication. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, p. 29–56, 2000.

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

CLARKSON, T. W.; LASZLO M. The Toxicology of Mercury and Its Chemical Compounds. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 36, n. 8, p. 609–62, 2006.

COSTA, B. G.; DE LACERDA, L. D. Concentração de mercúrio total em cavala, *Scomberomorus cavalla*, e serra, *Scomberomorus brasiliensis*, comercializadas nas bancas de pescado do Mucuripe, Fortaleza, Ceará. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 42, n. 1, p. 22-29, 2009.

CORTE, D. C. L et al. Effects of diphenyl diselenide on methylmercury toxicity in rats. **BioMed research international**, v. 1, p.1-12, 2013.

COUNTER, S. A; BUCHANAN, L. H. Mercury exposure in children: a review. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 198, n. 2, p. 209-230, 2004.

CRESPO-LÓPEZ, M. E., et al. Genotoxicity Of Mercury: Contributing For The Analysis Of Amazonian Populations. **Environment International**, v.37, p.136–141, 2011.

CROWE W et al. Mercury in hair is inversely related to disease associated damage in systemic lupus erythematosus. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 2016.

DA SILVA, W. J. M; FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 14, n. 3, p. 441-451, 2011.

DAVE M. H., et al. Expression of heteromeric amino acid transporters along the murine intestine. **The Journal of Physiology**.v. 558, p. 597–610, 2004.

DE FARIA, M. P. Mariana and Brumadinho: repercussion of mining disasters on environmental health. **Revista Brasileira de Medicina do Trabalho**, 2019.

DE LA SERRE, C. B., et al. Propensity to High-Fat Diet-Induced Obesity in Rats Is Associated with Changes in the Gut Microbiota and Gut Inflammation. **American journal of physiology - Gastrointestinal and liver physiology**, v. 299, n. 2, p. 440-448, 2010.

DIAS, A. C. L., et al. Mercúrio total em músculo de cação *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758) e de espadarte *Xiphias gladius* Linnaeus, 1758, na costa sul-sudeste do Brasil e suas implicações para a saúde pública. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 24, n. 9, p. 2063-2070, 2008.

DIETRICH, M. O. et al. Motor impairment induced by oral exposure to methylmercury in adult mice. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 19, n. 1, p. 169-175, 2005.

DUNCAN, M.; GRANT, G. Review article: oral and intestinal mucositis – causes and possible treatments. *Aliment. Pharmacology & Therapeutics.*, v. 18, p. 853-874, 2003.

EL KEBBAJ, R. Argan oil prevents down-regulation induced by endotoxin on liver fatty acid oxidation and gluconeogenesis and on peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1_α, (PGC-1_α), peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR_α) and estrogen related receptor α (ERR_α). **Biochimie Open**. v.1, p. 51–59, 2015.

EL-TANBOULY, D. M., et al. Pretreatment with magnesium ameliorates lipopolysaccharide induced liver injury in mice. **Pharmacological Reports**. v. 67, p. 914–920, 2015.

EPA. Method 1630, Methyl mercury in water by distillation, aqueous ethylation, purge and trap, and CVAFS. **US Environmental Protection Agency, Washington, DC**, 2002.

ESCOLA DE MEDICINA REGENTS DA UNIVERSIDADE DE MICHIGAN, 2012. Disponível em: <<https://courses.lumenlearning.com/cuny-kbcc-microbiologyhd/chapter/anatomy-and-normal-microbiota-of-the-digestive-system>>.

ESKDALE J, KUBE D, GALLAGHER G. A second polymorphic dinucleotide repeat in the 50-flanking region of the human IL-10 gene. **Immunogenetics**. 1996.

ESPORCATTE R., et al. Valor preditivo da mieloperoxidase na identificação de pacientes de alto risco admitidos por dor torácica aguda. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 89, n. 6, p. 377-84, 2007.

FARINA, M.; ASCHNER, M.; ROCHA, J. B. T. Special Issue: Environmental Chemicals and Neurotoxicity Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. **Toxicology Applied Pharmacological**, v. 256, n. 3, p. 405–417, 2011.

FERREIRA, A. L.; MATSUBARA L. S. Free Radicals: Concepts, Associated Diseases, Defense System and Oxidative Stress. **Revista Da Associação Médica Brasileira (1992)**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FONSECA-ALANIZ, M. H., et al. Adipose Tissue as an Endocrine Organ: From Theory to Practice. **The Journal of Pediatrics**, v. 83, p. 192–203, 2007.

FRANCO, J. L., et al. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 47, p. 449-457, 2009.

GANAPATHY, V.; GANAPATHY, M. E.; LEIBACH, F. H. Intestinal transport of peptides and amino acids. *In*: BARRETT K. E.; DONOWITZ M., **Gastrointestinal transport molecular physiology**, v. 50, p. 35-75, 2001.

GANONG, F. W. **Review of Medical Physiology**; McGraw –Hill Companies, USA; 21 ed. 2003.

GARDNER R. M et al. Mercury exposure, serum antinuclear/antinucleolar antibodies, and serum cytokine levels in mining populations in Amazonian Brazil: a cross-sectional study. **Environmental Research**, 2010.

GEORGE B.O., OSHARECHIREN O.I. Oxidative stress and antioxidant status in sportsmen two hours after strenuous exercise and in sedentary control subjects. **African Journal of Biotechnology**. v. 8, n. 3, p. 480-3, 2009.

GLASER, Viviane et al. Oxidative stress-mediated inhibition of brain creatine kinase activity by methylmercury. **Neurotoxicology**, v. 31, n. 5, p. 454-460, 2010.

GREEN, L. C., et al. Analysis of Nitrate, Nitrite, and [15N] Nitrate in Biological Fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–38, 1982.

GROSCWITZ, K. R.; HOGAN, S. P. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 124, n. 1, p. 3-20, 2009.

GSTRAUNTHALER, G.; PFALLER, W.; KOTANKO, P. Glutathione depletion and in vitro lipid peroxidation in mercury or maleate induced acute renal failure. **Biochemical pharmacology**, v. 32, n. 19, p. 2969-2972, 1983.

GUERRE-MILLO, MICHÈLE. “Animal Models of Obesity.” **Physiology and Physiopathology of Adipose Tissue** 9782817803: 255–66, 2013.

GUILLEMOT-LEGRIS, O.; MUCCIOLI, G. G. Obesity-induced neuroinflammation: beyond the hypothalamus. **Trends in Neurosciences**, v. 40, n. 4, p. 237-253, 2017.

HÄGGQVIST B et al. The immunosuppressive effect of methylmercury does not preclude development of autoimmunity in genetically susceptible mice. **Toxicology**, 2005.

HAMMERSCHMIDT, C. R.; SANDHEINRICH M. B. Maternal Diet during Oogenesis Is the Major Source of Methylmercury in Fish Embryos. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 10, p. 3580–84, 2005.

HAN, C. et al. The Role of Probiotics in Lipopolysaccharide-Induced Autophagy in Intestinal Epithelial Cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 2464–2478, 2016.

HARIRI, N.; THIBAUT, L. High-Fat Diet-Induced Obesity in Animal Models. **Nutrition Research Reviews**, v. 23, n. 2, p. 270–99, 2010.

HARRIS H. H.; PICKERING I. J.; GEORGE G. N. The chemical form of mercury in fish. **Science**, v. 301, n. 5637, p. 1203, 2003.

HARRIS, K., et al. Is the gut microbiota a new factor contributing to obesity and its metabolic disorders?. **Journal of Obesity**, 2012.

HOLLENBERG, Steven M.; CINEL, Ismail. Bench-to-bedside review: nitric oxide in critical illness—update 2008. **Critical Care**, v. 13, n. 4, p. 218, 2009.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860, 2006.

HUBER P.C.; ALMEIDA W. P.; FÁTIMA A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p.1170-9, 2008.

HWANG, Eun-Sun; KIM, Gun-Hee. RETRACTED: Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. **Toxicology**, v. 229, n. 1-2, p. 1-10, 2007.

ICHIHARA, S.; YAMADA, Y. Genetic Factors for Human Obesity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 7–8 p. 1086–98, 2008.

JADÁN-PIEDRA, C.; VÉLEZ, D.; DEVESA, V. In vitro evaluation of dietary compounds to reduce mercury bioavailability. **Food chemistry**, v. 248, p. 353-359, 2018.

JIANG, X. et al. Lactobacillus brevis 23017 relieves mercury toxicity in the colon by modulation of oxidative stress and inflammation through the interplay of MAPK and NF-κB signaling cascades. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2425, 2018.

JOHNSON, J. L.; et al. Increased Survival and Reduced Neutrophil Infiltration of the Liver in Rab27a- but Not Munc13-4-Deficient Mice in Lipopolysaccharide-Induced Systemic Inflammation. **Infection and immunity**, v. 79, n. 9, p. 3607-18, 2011.

JOSHI, D et al. Reversal of methylmercury-induced oxidative stress, lipid peroxidation, and DNA damage by the treatment of N-acetyl cysteine: a protective approach. **Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer**, 2014.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Unter Berücksichtigung der Histophysiologie**. Springer-Verlag, 2013.

KASPER, D., et al. Reservoir Stratification Affects Methylmercury Levels in River Water, Plankton, and Fish Downstream from Balbina Hydroelectric Dam, Amazonas, Brazil. **Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 1032–40, 2014.

KAWAKAMI, T et al. Differential effects of cobalt and mercury on lipid metabolism in the white adipose tissue of high-fat diet-induced obesity mice. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 258, n. 1, p. 32-42, 2012.

KHAN, H et al. Role of Glutathione in protection against mercury induced poisoning. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 25, n. 2, 2012.

KIM, K. H.; KABIR, E.; JAHAN, S. A. A Review on the Distribution of Hg in the Environment and Its Human Health Impacts. **Journal of Hazardous Materials**, v. 306, p. 376–85, 2016.

KLAASSEN, C. D. Heavy metals and the heavy metal antagonists. *In*: GOODMAN, R.; GILMANS, M. **The pharmacological basis of therapeutics**, v.9, p. 1592-614, 1990.

KOBAYASHI, A. et al. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 16, p. 7130-9, 2004.

KUWABARA, Wilson Mitsuo Tatagiba et al. Obesity and Type 2 Diabetes mellitus induce lipopolysaccharide tolerance in rat neutrophils. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 17534, 2018.

LACERDA, L. D.; PFEIFFER, W. C. Mercury from gold mining in the Amazon environment: an overview. **Química Nova**, v. 15, n. 2, p. 155-160, 1992.

LACY, P. Mechanisms of Degranulation in Neutrophils. **Allergy, Asthma, and Clinical Immunology**, v. 2, n. 3, p. 99-107, 2006.

LEMES, M.; WANG, F. Methylmercury speciation in fish muscle by HPLC-ICP-MS following enzymatic hydrolysis. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 24, p. 663–668, 2009,

LEY R. E. et al. Obesity alters gut microbial ecology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 31, p. 11070-75, 2005.

LIMA-JÚNIOR R. C., et al. Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. **Cancer Chemother Pharmacol.** v. 69, n. 4, p. 931-942, 2012.

LIMA-JÚNIOR R.C., et al. Targeted inhibition of IL-18 attenuates irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **British Journal of Pharmacology.** v. 171, n. 9, p. 2335-2350, 2014.

Lin et al, 2020. Acute oral methylmercury perturbs the gut microbiome and alters gut-brain axis related metabolites in rats. **Ecotoxicology and environmental safety,** 190, 2020.

LIU, C. B., et al. Tracing Aquatic Bioavailable Hg in Three Different Regions of China Using Fish Hg Isotopes. **Ecotoxicology and Environmental Safety,** v. 150, p. 327–34, 2018.

LIU, MINGLI et al. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. **Cytokine & growth factor reviews,** v. 22, n. 3, p. 121-130, 2011.

LIVAK, K. J., & SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$. **Method methods,** 25(4), 402-408, 2001.

LORIA, V., et al. Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. **Mediators Inflamm,** 2008.

LOWRY, O.H., et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry,** v. 193, n. 1, p. 265–75, 1951.

LUCK, H. et al. Regulation of Obesity-Related Insulin Resistance with Gut Anti-Inflammatory Agents. **Cell Metabolism,** v. 21, n. 4, p. 527–42, 2015.

LUND, B.; MILLER, D. M.; WOODS, J. S. Studies on Hg (II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. **Biochemical pharmacology,** v. 45, n. 10, p. 2017-2024, 1993.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification, **Chemico-Biological Interactions,** v. 224 p. 164–175. 2014.

MACEDO-JÚNIOR, S.J et al. Methylmercury exposure for 14 days (short-term) produces behavioral and biochemical changes in mouse cerebellum, liver, and serum. **Journal of Toxicology and Environmental Health,** 2017.

MAEDA, T et al. Oxidative stress and enhanced paracellular permeability in the small intestine of methotrexate-treated rats, **Cancer Chemother Pharmacol,** v. 65, p. 1117–1123, 2010.

MARTINEZ, M. C; ANDRIANTSITOHAINA, R. Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 3, p. 669-702, 2009.

MARTINS, S. J; SALDANHA, C. Dieta, aterosclerose e complicações aterotrombóticas [21]. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, 2007.

MASCARENHAS, A. F. S., et al. Avaliação Da Concentração de Mercúrio Em Sedimentos e Material Particulado No Rio Acre, Estado Do Acre, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 1, p. 61–68, 2004.

MELO M. L., et al. Role of cytokines (TNF-alpha, IL-1beta and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. **Cancer Chemother Pharmacol**. v. 61, n. 5, p. 775-784, 2008.

MOORE, K. L.; DALLEY, A. F.; AGUR, A. M. R. **Anatomia orientada para a clínica. 7ed.** Rio de Janeiro: Koogan, 2014.

MOREIRA, E. L et al. Does methylmercury-induced hypercholesterolemia play a causal role in its neurotoxicity and cardiovascular disease? **Toxicological Sciences**. v. 130, p. 373-382, 2012.

MOTTS, J. A. et al. Novel biomarkers of mercury-induced autoimmune dysfunction: A cross-sectional study in Amazonian Brazil. **Environmental research**, v. 132, p. 12-18, 2014.

MURUGAN, P; PARI, L. Influence of tetrahydrocurcumin on erythrocyte membrane bound enzymes and antioxidant status in experimental type 2 diabetic rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 113, n. 3, p. 479-486, 2007.

NI, M.; et al. Comparative study on the response of rat primary astrocytes and microglia to methylmercury toxicity. **Glia**, v. 59, p. 810–820, 2011.

NIELSEN J. B.; ANDERSEN O. A comparison of the lactational and transplacental deposition of mercury in offspring from methylmercury-exposed mice. Effect of seleno-L-methionine. **Toxicology Letters**, v. 76, p. 165-171, 1995.

NIELSEN, J. B; ANDERSEN, O; GRANDJEAN, P. Evaluation of mercury in hair, blood and muscle as biomarkers for methylmercury exposure in male and female mice. **Archives of toxicology**, v. 68, n. 5, p. 317-321, 1994.

NUSRAT, A., et al. Neutrophil Migration across Model Intestinal Epithelia: Monolayer Disruption and Subsequent Events in Epithelial Repair. **Gastroenterology**, v. 113, n. 5, p. 1489–1500, 1997.

NYLAND J.F et al. Biomarkers of methyl mercury exposure immunotoxicity among fish consumers in Amazonian Brazil. **Environmental Health Perspectives**, 2011.

OKTYABRSKY, O. N.; SMIRNOVA, G. V. Redox regulation of cellular functions. **Biochemistry (Moscow)**, v. 72, n. 2, p. 132-145, 2007.

OPAS/OMS Brasil. Alimentação e Nutrição: **Folhas informativas**. Disponível em: <>https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5439:alimentacao-e-nutricao-folhas-informativas&Itemid=820.

PAPAYANNOPOULOS, V., et al. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. **Journal of Cell Biology**, v. 191, n. 3, p. 677-91, 2010.

PATRICK, Lyn. Mercury toxicity and antioxidants: part I: role of glutathione and alpha-lipoic acid in the treatment of mercury toxicity.(Mercury Toxicity). **Alternative Medicine Review**, v. 7, n. 6, p. 456-472, 2002.

PEREIRA, V. B. M., et al. A new animal model of intestinal mucositis induced by the combination of irinotecan and 5 fluorouracil in mice. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 77, n. 2, p. 323-327, 2015.

PETTERSEN B.J., et al. Vegetarian diets and blood pressure among white subjects: results from the Adventist Health Study-2 (AHS-2). **Public Health Nutrition**, v. 15, n. 10, p. 1909-16, 2012.

PINTO, V. D. **Papel do metilmercúrio no estresse oxidativo no hipocampo, cerebelo e fígado e alterações metabólicas em camundongos C57BL/6J lactentes**. 2018. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

PIRES, A. L. G.; SILVEIRA, T. R. DA; SILVA, V. D. DA. Estudo morfológico e estereológico digital da mucosa do intestino delgado de crianças eutróficas e desnutridas com diarreia persistente and malnourished children with persistent diarrhea. **Jornal de Pediatria**, v. 79, n. 4, p. 329–336, 2003.

POOLE, R. K. Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in bacteria. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, n. 1, p. 176-180, 2005.

RANGAN U.; BULKLEY G. B. Prospects for treatment of free radicalmediated tissue injury. **British Medical Bulletin**, v. 49, p. 700-718, 1993.

RASOULI, N.; KERN, P. A. Adipocytokines and the Metabolic Complications of Obesity. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, p. 64–73. 2008.

REUBOLD, Thomas F.; ESCHENBURG, Susanne. A molecular view on signal transduction by the apoptosome. **Cellular signalling**, v. 24, n. 7, p. 1420-1425, 2012.

RIBEIRO, L. **Análises confirmam contaminação do Rio Paraopeba por metais pesados**. Estado de Minas. 2019. Disponível em: https://www.em.com.br/app/noticia/gerais/2019/01/31/interna_gerais,1026585/analises-confirmam-contaminacao-do-rio-paraopeba-por-metais-pesados.shtml.

RIVERA-MANCÍA, S., et al. The Transition Metals Copper and Iron in Neurodegenerative Diseases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 186, n. 2, p. 184–99, 2010.

RIZK, Pamela; BARKER, Nick. Gut stem cells in tissue renewal and disease: methods, markers, and myths. Wiley Interdisciplinary Reviews: **Systems Biology and Medicine**, v. 4, n. 5, p. 475-496, 2012.

RODRIGUES, S. S.; MENIN, E. Anatomia do tubo digestivo de *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1817) (Pisces, Characidae, Salmininae). **Biotemas**, v. 21, n. 2, p. 65-75, 2008.

ROMANO, M et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leucocyte recruitment. **Immunity**, v.6, p.315–25, 1997.

ROWLAND, I.R. et al. Effects of diet on mercury metabolism and excretion in mice given methylmercury: role of gut flora. **Arch. Environ. Health** 39, 401–408, 1984.

ROWLAND, I. R. et al. The effect of various dietary fibres on tissue concentration and chemical form of mercury after methylmercury exposure in mice. **Archives of toxicology**, v. 59, n. 2, p. 94-98, 1986.

ROWLAND, I. R.; ROBINSON, R. D.; DOHERTY, R. A. Effects of diet on mercury metabolism and excretion in mice given methylmercury: role of gut flora. **Archives of Environmental Health: An International Journal**, v. 39, n. 6, p. 401-408, 1984.

SAKAMOTO, M et al. Significance of fingernail and toenail mercury concentrations as biomarkers for prenatal methylmercury exposure in relation to segmental hair mercury concentrations. **Environmental Research**, v. 136, p. 289–294, 2015.

SANTOS, E. C. O. et al. Exposure to mercury in the urban population of Rio Branco city, State of Acre, Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 69, n. 3, p. 314-319, 2002.

SANTOS, F. A., et al. The triterpenoid alpha, beta-amyrin prevents the impaired aortic vascular reactivity in high-fat diet-induced obese mice. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 390, n. 10, p. 1029-1039, 2017.

SCALDAFERRI, F., et al. Gut microbial flora, prebiotics, and probiotics in IBD: their current usage and utility. **BioMed research international**, 2013.

SCHNEIDER, C. D.; DE OLIVEIRA, A.R. Oxygen Free Radicals and Exercise: Mechanisms of Synthesis and Adaptation to the Physical Training. **Revista Brasileira de Medicina Do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 314–18, 2004.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 192–205, 1968.

SEIDLER, U., et al. Molecular Mechanisms of Disturbed Electrolyte Transport in Intestinal Inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1072, p. 262–75, 2006.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European journal of biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SILBERGELD, E. K. et al. Mercury exposure and malaria prevalence among gold miners in Para, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 5, p. 421-429, 2002.

SILVA I. A et al. Mercury exposure, malaria, and serum antinuclear/antinucleolar antibodies in amazon populations in Brazil: a cross-sectional study. **Environmental Health**, 2004.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. Artmed editora, 2010.

SIQUEIRA, G. W.; APRILE, F. M. Distribuição de mercúrio total em sedimentos da Plataforma Continental Amazônica – Brasil. **Acta amazônica**, v. 42, n. 2, p. 259-268. 2012.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free radical biology and medicine**, v. 18, n. 2, p. 321-336, 1995.

STRINGARI, J., et al. Prenatal methylmercury exposure hampers glutathione antioxidant system ontogenesis and causes long-lasting oxidative stress in the mouse brain. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 227, p. 147–154, 2008.

TAGUCHI, K.; MOTOHASHI, H.; YAMAMOTO, M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. **Genes Cells**, v. 16, n. 2, p. 123-40, 2011.

TEHRANI, A. B. et al. Obesity and its associated disease: a role for microbiota?. **Neurogastroenterology and Motility**, v.24, n.4, p. 305-11, 2012.

TEIXEIRA, I.; BENNEMANN, S. T. Ecomorfologia refletindo a dieta dos peixes em um reservatório no sul do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 2, p. 67-76, 2007.

TONSTAD, S et al. Vegetarian diets and incidence of diabetes in the Adventist Health Study-2. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 23, n. 4, p. 292-9, 2013.

TRIVEDI, P. P. et al. Melatonin Modulated Autophagy and Nrf2 Signaling Pathways in Mice With Colitis-Associated Colon Carcinogenesis. **Molecular carcinogenesis**, v. 16, p. 1-13, 2015.

USUKI F.; FUJITA E.; SASAGAWA N. Methylmercury activates ASK1/JNK signaling pathways, leading to apoptosis due to both mitochondria- and endoplasmic reticulum (ER)-generated processes in myogenic cell lines. **Neurotoxicology**, v. 29, p. 22–30, 2008.

VASINA, V.; et al. Enteric neuroplasticity evoked by inflammation. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 30, p. 264-72, 2006.

VIGUERAS, R. M., et al. Histological characteristics of the intestinal mucosa of the rat during the first year of life. **Laboratory animals**, v. 33, n. 4, p. 393-400, 1999.

VIRTANEN, JYRKI K. et al. Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 18, n. 2, p. 75-85, 2007.

WANG, N et al. Expression and Activity of the TLR4/NF- κ B Signaling Pathway in Mouse Intestine Following Administration of a Short-Term High-Fat Diet. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 6, n. 3, p. 635–40, 2013.

WASSERMAN, J. C.; HACON, S. S.; WASSERMAN, M. A. O Ciclo do Mercúrio no Meio Ambiente Amazônico. **Mundo & Vida**, v. 2, p. 46-53, 2001.

WEISBERG, S. P., et al. Obesity Is Associated with Macrophage Accumulation in Adipose Tissue Find the Latest Version: Obesity Is Associated With. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 2003.

WHO-World health Organisation 2016. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em 02 de abril de 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure. **Mercury publications**, 1999.

WONG D. V. T., et al. The adaptor protein MyD88 is a key signaling molecule in the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis. **Plos One**. 2015.

WU, Q., et al. The Tibetan medicine Zuotai differs from HgCl₂ and MeHg in producing liver injury in mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 78, p.1–7, 2016.

YASUKAWA, K. et al. The detrimental effect of nitric oxide on tissue is associated with inflammatory events in the vascular endothelium and neutrophils in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis. **Free radical research**, v. 46, n. 12, p. 1427-1436, 2012.

YE, B., et al. Evaluation of mercury exposure level, clinical diagnosis and treatment for mercury intoxication. **Annals of occupational and environmental medicine**, v. 28, n. 1, p. 5, 2016.

ZHANG, B. B., et al. HgS and Zuotai Differ from HgCl₂ and Methyl Mercury in Intestinal Hg Absorption, Transporter Expression and Gut Microbiome in Mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 379, 2019.

ZINÖCKER, M. K.; LINDSETH, I. A. The Western diet–microbiome–host interaction and its role in metabolic disease. **Nutrients**, v. 10, n. 3, p. 365, 2018.



FUNDAÇÃO EDSON QUEIROZ
UNIVERSIDADE DE FORTALEZA
ENSINANDO E APRENDENDO

COMISSÃO DE ÉTICA
NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da toxicidade sistêmica induzida por metil-mercúrio e dieta hiperlipídica em camundongos C57BL6j e APOE nocautes", protocolada sob o CEUA nº 4831110618, sob a responsabilidade de **Ramon da Silva Raposo e equipe; Daniel Vieira Pinto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Fortaleza (CEUA/UNIFOR) na reunião de 09/08/2018.

We certify that the proposal "Study of systemic toxicity induced by methyl mercury and hyperlipidic diet in C57BL6j and APOE knockout mice", utilizing 120 Isogenics mice (120 males), 120 Transgenics mice (120 males), protocol number CEUA 4831110618, under the responsibility of **Ramon da Silva Raposo and team; Daniel Vieira Pinto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Fortaleza's University (CEUA/UNIFOR) in the meeting of 08/09/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de 09/2018 a 09/2020

Área: [Medicina Veterinária](#)

Origem:	Não aplicável biotério		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo: Machos	idade: 21 a 30 dias N: 120
Linhagem:	C57BL6j		Peso: 8 a 11 g
Origem:	Não aplicável biotério		
Espécie:	Camundongos transgênicos	sexo: Machos	idade: 21 a 30 dias N: 120
Linhagem:	C57BL6j APOE NOCAUTE		Peso: 8 a 11 g

Local do experimento: NÚCLEO DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL (NUBEX)

Fortaleza, 21 de agosto de 2018

Prof. Dr. Ramon da Silva Raposo
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade de Fortaleza

Prof. Dr. Saulo Ellery Santos
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade de Fortaleza