



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA
INSTITUTO DE SAÚDE COLETIVA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

JOHNNASSON DE MEDEIROS SOARES

**ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS EM GENES DA VIA
METABÓLICA DO ÁCIDO FÓLICO E A EXPOSIÇÃO AO MERCÚRIO EM
UMA POPULAÇÃO RIBEIRINHA DO BAIXO TAPAJÓS**

SANTARÉM-PA

2024

JOHNNASSON DE MEDEIROS SOARES

**ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS EM GENES DA VIA
METABÓLICA DO ÁCIDO FÓLICO E A EXPOSIÇÃO AO MERCÚRIO
EM UMA POPULAÇÃO RIBEIRINHA DO BAIXO TAPAJÓS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCSA), da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof.^a Dra. Heloísa do Nascimento de Moura Meneses.

SANTARÉM – PA

2024

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA

- S676a Soares, Johnnasson de Medeiros
 Associação entre polimorfismos em genes da via metabólica do ácido fólico e a
 exposição ao mercúrio em uma população ribeirinha do Baixo Tapajós / Johnnasson
 de Medeiros Soares. – Santarém, 2024.
 70 p.
 Inclui bibliografias.
- Orientação: Heloísa do Nascimento de Moura Meneses.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Saúde
 Coletiva, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
1. Mercúrio. 2. Toxicologia. 3. Baixo Tapajós (Santarém-PA). I. Meneses, Heloísa
 do Nascimento de Moura, *orient.* II. Título.

CDD: 23 ed. 615.925663



PROGRAMA DE
PÓS GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE SAÚDE COLETIVA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PPGCSA

ATA Nº 21

Aos 26 (vinte e seis) dias do mês de Março de 2024 (dois mil e vinte e quatro), às 9:00hs, na sala 212 (BMT1 – UFOPA) e por meio da tecnologia de comunicação à distância "Google Meet" sob o link <https://meet.google.com/xtp-obyq-unz> (defesa em formato híbrido), conforme orientação da CAPES - Portaria Nº36 de 19 de março de 2020, realizou-se a defesa de Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde de autoria de Johnnasson de Medeiros Soares, intitulada "Associação entre polimorfismos em genes da via metabólica do ácido fólico e a exposição ao mercúrio em uma população ribeirinha do Baixo Tapajós". A Banca Examinadora constituiu-se por: Profa. Dra. Márcia Amorim (UFF – Avaliador 1); Profa. Dra. Kenia El-Jaick (UNIRIO – Avaliador 2) e Profa. Dra. Sandra Sarrazin (UFOPA – Avaliador 3). Seguindo o regimento interno do curso, a presidente da banca Profa. Dra. Heloisa Meneses (Orientadora) abriu a sessão, passando a palavra para o mestrando, que fez a exposição da sua Dissertação. Findada a arguição, a banca examinadora e o orientador reuniram-se em outra sala virtual, sem a presença do candidato e do público, tendo a Banca Examinadora deliberado por sua: (X) APROVAÇÃO, condicionada às correções sugeridas pela Banca Examinadora e entrega da versão corrigida no prazo de 30 dias a contar da data da defesa; () REPROVAÇÃO, condicionada às correções sugeridas pela Banca Examinadora e reapresentação do Plano de Mestrado no prazo de 60 dias a contar da primeira defesa. Nada mais havendo por constar, lavrou-se e fez-se a leitura da presente ata que segue assinada pelos membros da Banca Examinadora, Presidente (orientadora) e mestrando.

Santarém-Pará. 26 de Março de 2024.

Documento assinado digitalmente
 **MARCIA RODRIGUES AMORIM**
Data: 04/04/2024 10:54:21-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>


Avaliador 1 – Profa. Dra. Marcia Amorim

Documento assinado digitalmente
 **KENIA BALBI EL JAICK**
Data: 04/04/2024 22:39:55-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>


Avaliador 2 – Profa. Dra. Kênia El-Jaick

Documento assinado digitalmente
 **SANDRA LAYSE FERREIRA SARRAZIN**
Data: 05/04/2024 16:13:48-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Avaliador 3 – Profa. Dra. Sandra Sarrazin

Documento assinado digitalmente
 **HELOISA DO NASCIMENTO DE MOURA MENESE**
Data: 07/05/2024 15:10:55-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Presidente (Orientadora) – Profa. Dra. Heloisa Meneses

Documento assinado digitalmente
 **JOHNNASSON DE MEDEIROS SOARES**
Data: 05/04/2024 16:27:17-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Mestrando – Johnnasson Medeiros

Aos meus pais Vanusa e Jonhson pelo amor e incentivo.

Aos meus irmãos e amigos, pelo carinho.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora professora Dr.^a Helóisa Meneses, excelente profissional e humana. Palavras não são suficientes para descrever a minha gratidão pelo incentivo, apoio e paciência. Sinto-me privilegiado e honrado por ter a oportunidade de estar sob sua orientação.

Aos meus pais e familiares que sempre apoiam as minhas escolhas e me fornecem o suporte que preciso para alcançar meus objetivos, minha eterna admiração, gratidão e amor.

Aos professores que contribuíram para a realização desse trabalho, o professor Dr. Ricardo Bezerra, do Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental (LAbBBEx), por disponibilizar o laboratório para as análises dos níveis de Hg e tirar as minhas dúvidas durante as análises.

Ao professor Dr. Marcos Prado, do Laboratório de Biologia Molecular (Labimol), por disponibilizar o laboratório para as genotipagens.

Aos meus colegas do Laboratório de Epidemiologia Molecular (LEpiMol) que contribuíram para a realização da coleta dos dados.

À professora Msc. Suelen Maria Santos por todo conhecimento que me proporcionou, pelo carinho e pela amizade.

À Marcela Poenna por me auxiliar principalmente na quantificação de Hg, nossas conversas e trocas de ideias deixavam os dias mais leves.

À Dr.^a Ana Sofia por me ajudar durante o desenvolvimento desse trabalho, principalmente durante a genotipagem das minhas amostras.

Ao Me. Rômulo Jorge pela disponibilidade e ajuda ao responder às minhas dúvidas.

À Universidade Federal do Oeste do Pará pelo apoio financeiro para a execução deste projeto através do Programa Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão (PEEX).

À FAPESPA pelo apoio financeiro através da concessão de bolsa de estudo.

À todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

Ao Criador.

RESUMO

O mercúrio (Hg) é considerado um dos metais mais perigosos para o ambiente e para a saúde humana. Altos níveis de Hg podem contribuir para o desenvolvimento de doenças e acarretar danos ao sistema nervoso central. A glutathione (GSH) tem papel importante na toxicocinética do Hg no organismo. A formação da GSH acontece a partir da via de transulfuração da via metabólica da homocisteína que utiliza o ácido fólico como fonte de grupamento metil para seu funcionamento adequado. Fatores como a deficiência no consumo de ácido fólico e polimorfismos em genes relacionados à sua via metabólica podem interferir indiretamente na síntese da GSH. Considerando a relação entre o ácido fólico e a GSH, e a relação da GSH na toxicocinética do Hg, o objetivo deste trabalho foi avaliar se existe associação entre os polimorfismos em genes da via metabólica do ácido fólico e a exposição ao Hg em moradores de comunidades ribeirinhas do Baixo Tapajós. Foram incluídos 166 moradores de comunidades ribeirinhas do Baixo Tapajós, em Santarém (PA). A dosagem de mercúrio foi feita por espectrometria de absorção atômica. Foram considerados expostos aqueles que apresentaram níveis de Hg total acima do recomendado pela OMS (>10 µL); A maioria dos participantes (85,5%), apresentou níveis de Hg acima do limite recomendado pela OMS, entre eles (59,9%) apresentaram níveis de Hg entre 10µg/L e 30 µg/L , 21,1% apresentaram níveis de Hg entre 31 µg/L e 50 µg/L e 19,0% apresentaram níveis superiores a 50µg/L, dos quais 6 eram acima de 100µg/L. A genotipagem dos polimorfismos rs1801133 677C>T e rs2236225 c.1958G>A foi realizada através da PCR em tempo real. Quanto ao gene *MTHFR*, no subgrupo dos expostos o genótipo homozigoto selvagem (CC) e homozigoto mutante (TT) as frequências foram 30,6%, e a mediana dos níveis de Hg foi 27,30 µg/L e 28,50 µg/L, respectivamente. No gene *MTHFD1*, os genótipos que apresentaram maior frequência foram: homozigoto selvagem (GG) (45%) e o homozigoto mutante (AA) (26%). Além disso, o genótipo GG apresentou maior mediana na concentração de Hg (29,98 µg/L). Ao avaliar conjuntamente os modelos dominantes e recessivos, observou-se que os níveis medianos de Hg foram mais altos entre aqueles que apresentaram modelo dominante para ambos os polimorfismos (19,09 µg/L) em comparação aos que eram do modelo recessivo para ambos os polimorfismos (13,2 µg/L). Foi observado associação entre os polimorfismos estudados e os níveis de Hg. O genótipo TT (rs1801133 c.677C> do gene *MTHFR*) e a combinação TT/AA (duplo mutantes)

demonstraram associação com níveis mais baixos de Hg, quando comparado aos genótipos duplo homocigoto selvagem e heterocigotos. Contudo, ainda são necessários mais estudos para entender melhor qual é o efeito destes e outros genes da via metabólica do ácido fólico sobre níveis de Hg.

Palavras-chave: Ácido fólico. MTHFR. MTHFD1. Mercúrio. Tapajós

ABSTRACT

Mercury (Hg) is considered one of the most dangerous metals for the environment and human health. High levels of Hg can contribute to the development of diseases and cause damage to the central nervous system. Glutathione (GSH) plays an important role in the toxicokinetics of Hg in the body. The formation of GSH occurs through the transsulfurization pathway of the homocysteine metabolic pathway, which uses folic acid as a source of methyl group for its proper functioning. Factors such as deficiency in folic acid consumption and polymorphisms in genes related to its metabolic pathway can indirectly interfere with GSH synthesis. Considering the relationship between folic acid and GSH, and the relationship of GSH in the toxicokinetics of Hg, the objective of this work was to evaluate whether there is an association between polymorphisms in genes of the folic acid metabolic pathway and exposure to Hg in residents of communities riverside of Baixo Tapajós. 166 residents of riverside communities in Baixo Tapajós, in Santarém (PA), were included. Mercury measurement was performed using atomic absorption spectrometry. Those who presented total Hg levels above those recommended by the WHO ($>10 \mu\text{g/L}$) were considered exposed; The majority of participants (85.5%) had Hg levels above the limit recommended by the WHO, among them (59.9%) had Hg levels between $10 \mu\text{g/L}$ and $30 \mu\text{g/L}$, 21.1% had levels of Hg between $31 \mu\text{g/L}$ and $50 \mu\text{g/L}$ and 19.0% had levels above $50 \mu\text{g/L}$, of which 6 were above $100 \mu\text{g/L}$. genotyping of the rs1801133 677C>T and rs2236225 c.1958G>A polymorphisms was performed using real-time PCR. The majority of individuals (85.5%) had Hg levels above those recommended by the WHO. As for the MTHFR gene, in the subgroup of those exposed to the homozygous wild genotype (CC) and homozygous mutant (TT), the frequencies were 30.6%, and the median Hg levels were $27.30 \mu\text{g/L}$ and $28.50 \mu\text{g/L}$, respectively. In the MTHFD1 gene, the genotypes that presented the highest frequency were: wild homozygous (GG) (45%) and mutant homozygous (AA) (26%). Furthermore, the GG genotype presented a higher median Hg concentration ($29.98 \mu\text{g/L}$). When jointly evaluating the dominant and recessive models, it was observed that the median Hg levels were higher among those who presented a dominant model for both polymorphisms ($19.09 \mu\text{g/L}$) compared to those who had the recessive model for both polymorphisms ($13.2 \mu\text{g/L}$). An association was observed between the studied polymorphisms and Hg levels. The TT genotype (rs1801133 c.677C> of the MTHFR

gene) and the TT/AA combination (double mutants) demonstrated an association with lower Hg levels, when compared to the wild-type double homozygous and heterozygous genotypes. However, more studies are still needed to better understand the effect of these and other genes in the folic acid metabolic pathway on Hg levels.

Keywords: Folic acid. MTHFR. MTHFD1. Mercury. Tapajós

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

| | |
|--|----|
| Figura 1: Atividades antrópicas que influenciam o ciclo do mercúrio | 5 |
| Figura 2 - O papel do mercúrio no status antioxidante | 9 |
| Figura 3. Forma química do pteroilglutâmico | 11 |
| Figura 4- Via metabólica do ácido fólico e da homocisteína..... | 16 |
| Figura 5- Mapa da localização por área de coleta..... | 19 |
| Figura 6- Genotipagem dos SNVs rs1801133 e rs2236225 | 23 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Frequência alélica do polimorfismo rs1801133 677C>T 3 gene MTHFR em diferentes populações. | 13 |
| Tabela 2. Frequência alélica do rs2236225 c.1958G>A do gene MTHFD1 em diferentes populações. | 14 |
| Tabela 3- Descrição dos SNVs estudados..... | 22 |
| Tabela 4- Análise descritiva dos níveis de Hg em amostras de populações ribeirinhas. | 25 |
| Tabela 5 -Perfil Sociodemográfico e níveis de Hg em uma amostra da população ribeirinha de Santarém. | 26 |
| Tabela 6- Frequência alélica e dos SNVs rs1801133 677C>T e rs2236225 c.1958G>A 27 | 27 |
| Tabela 7- Distribuição dos genótipos dos SNVs rs1801133 677C>T e rs2236225 c.1958G>A. | 27 |
| Tabela 8- Frequência genotípica em relação aos níveis de Hg..... | 28 |
| Tabela 9- Modelo dominante do SNV rs1801133 677C>T em relação a exposição mercurial. | 29 |
| Tabela 10- Modelo recessivo do SNV rs1801133 677C>T em relação a exposição mercurial. | 29 |
| Tabela 11- Modelo dominante do SNV rs2236225 c.1958G>A em relação a exposição mercurial. | 30 |
| Tabela 12- Modelo recessivo do SNV rs2236225 c.1958G>A em relação a exposição mercurial. | 30 |
| Tabela 13- Genótipos dos SNVs rs1801133 677C>T e rs2236225 c.1958G>A em relação às medianas dos níveis de Hg. | 30 |
| Tabela 14- Modelos dominantes e recessivos dos SNVs rs1801133 677C>T e rs2236225 c.1958G>A 31 | 31 |
| Tabela 15- Análise uni e multivariada dos níveis de Hg 31 | 31 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------------------|--|
| CAT | Catalase |
| CBS | Cistationina β sintase |
| Cys | Cisteína |
| DHF | Dihidrofolato |
| EROs | Espécies reativas de oxigenio |
| GCL | Glutamato cisteína ligase |
| GCL | glutamato cisteína ligase |
| GCPII | Glutamato carboxipeptidase 2 |
| GPx | Glutationa peroxidase |
| GSH | Glutationa |
| GSR | Glutationa redutase |
| GSS | Glutationa sintetase |
| GSSG | Glutationa oxidada |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrogenio |
| Hcy | Homocisteína |
| Hg | mercúrio |
| Hg ⁰ | Mercúrio metálico ou elementar |
| Hg ²⁺ | Mercúrio divalente |
| HOH• | Íon peroxil |
| HOO• | Radical perhidroxila |
| MAT | Metionina adenosiltransferase |
| MeHg | Metil mercurio |
| MT | Metil transferase |
| <i>MTHFD1</i> | Metilenotetrahydrofolato dehidrogenase e formiltetrafolato sintetase 1 |
| <i>MTHFR</i> | Metilenotetrahydrofolato redutase |
| MTHFR | 5,10 metilenotetrahydrofolato redutase |
| NADPH | Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina |
| NO | Óxido nítrico |
| O ₂ •- | Superóxido |
| OH• | Íon hidroxila |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PCR | Reação em cadeia polimerase |
| RFC1 | Proteína carreadora de folato reduzido |
| RO• | Alcoxila |
| SAH | S-adenosil homocisteína |
| SAM | S-adenosil metionina |
| SH | Grupo tiol |
| SNV | (do inglês single nucleotide variation) Variação em um único nucleotídeo |
| SOD | Superóxido dismutase |
| SOD-1 | Superóxido dismutase cobre-zinco dependente |
| SOD-2 | Superóxido dismutase manganês dependente |
| THF | Tetrahydrofolato |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1- INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 – Problematização | 2 |
| 1.2 – Justificativa | 2 |
| 1.3 – Hipótese | 3 |
| 1.4 - Objetivos | 3 |
| 1.4.1 - Objetivo geral..... | 3 |
| 1.4.2 - Objetivos específicos..... | 3 |
| 2- REFERENCIAL TEÓRICO | 4 |
| 2.1 – Mercúrio | 4 |
| 2.1.1 – Fontes de exposição ao Mercúrio | 5 |
| 2.1.2 – Toxicocinética do Mercúrio..... | 6 |
| 2.1.3 – Toxicodinâmica do Mercúrio..... | 6 |
| 2.1.4 – O Mercúrio e o Estresse Oxidativo..... | 7 |
| 2.2- A glutatona e seu papel na toxicocinética e toxicodinâmica do mercúrio | 9 |
| 2.2.1 – Glutationa | 9 |
| 2.2.2 – Papel antioxidante da GSH | 10 |
| 2.3 - O ácido fólico..... | 10 |
| 2.3.1 - Características do ácido fólico..... | 10 |
| 2.3.2- Polimorfismos genéticos no metabolismo do ácido fólico | 11 |
| 2.3.3- A via metabólica do ácido fólico e GSH..... | 15 |
| 2.4- A homocisteína | 17 |
| 2.4.1- Características da Homocisteína | 17 |
| 2.4.2- A relação entre o ácido fólico e a GSH | 17 |
| 3- Metodologia | 18 |
| 3.1- Caracterização da pesquisa | 18 |
| 3.2- Coleta de dados | 19 |
| 3.2.1- Critérios de inclusão e exclusão | 20 |
| 3.3- Quantificação de mercúrio | 20 |
| 3.4- Análises moleculares | 21 |
| 3.4.1- Genotipagem de SNVs | 22 |
| 3.5- Testes estatísticos | 23 |
| 4- RESULTADOS | 25 |

| | |
|--|-----------|
| 4.1- Caracterização da amostra..... | 25 |
| 4.2- Genotipagem e frequência dos SNVs..... | 27 |
| 4.2.1- Associação dos polimorfismos rs1801133 677C>T (gene <i>MTHFR</i>) e rs2236225 c.1958G>A (gene <i>MTHFD1</i>) e a exposição ao mercúrio | 27 |
| 5- DISCUSSÃO | 33 |
| 5.1- Perfil epidemiológico | 33 |
| 5.2- Perfil molecular..... | 34 |
| 6- CONSIDERAÇÕES FINAIS | 37 |
| Referências..... | 38 |

1- INTRODUÇÃO

O Mercúrio (Hg) é um metal naturalmente presente no ambiente. Embora seja de ocorrência natural, o seu efeito para a saúde humana gera grande preocupação em todo o mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) o listou como um dos dez xenobióticos de grande preocupação para a saúde pública (OMS, 2020). O Hg pode ser encontrado em três estados de oxidação na natureza (0, +1, +2), que podem ser interconvertíveis. Além disso, esse metal pode ser dividido em duas classes de compostos: inorgânicos e orgânicos. Os compostos inorgânicos abrangem a forma líquida, o vapor e os complexos formados pelas ligações com grupo tiol de diferentes moléculas. Ademais, os compostos de Hg que se ligam à pelo menos um átomo de carbono de outra molécula são denominados compostos orgânicos.

O metilmercúrio $[\text{CH}_3\text{Hg}]^+$ (MeHg) é a forma orgânica do Hg formada a partir da metilação do Hg por bactérias metanogênicas presentes na água. Após esse processo, o MeHg se torna biodisponível e entra na cadeia alimentar, podendo contaminar os peixes. Estudos demonstram que a população ribeirinha da Amazônia está exposta ao Hg devido o consumo do pescado (COSTA *et al.*, 2016).

No corpo humano, o MeHg possui grande mobilidade devido a sua afinidade com grupos tiol (-SH) que estão presentes em moléculas de pequeno peso molecular. Entre essas moléculas, a mais importante é a GSH. É com ela que o MeHg se conjuga e forma o complexo MeHgGSH (GS-HgCH₃), e a partir daí o MeHg é distribuído pelo organismo. No entanto, quando a ingestão de MeHg é superior a detoxicação, ocorre uma diminuição da GSH livre, não sendo suficiente para lidar com o Hg presente no organismo, favorecendo, assim, o estresse oxidativo (FARINA, 2011).

A GSH é um tripeptídeo importante para a proteção do organismo humano, pois atua na toxicocinética de agentes como o MeHg. Ela é formada a partir da via de transufuração da homocisteína, onde ocorrem diversas reações que estão relacionadas à biodisponibilidade do ácido fólico (FARINA, 2011).

O ácido fólico é uma vitamina (vitamina B9) presente em vegetais de cor verde-escura e alimentos como feijão e ovos. Contudo, o excesso de cozimento pode reduzir a disponibilidade do ácido fólico dos alimentos; além disso, fatores como polimorfismos genéticos podem alterar o seu mecanismo de absorção pelo organismo (VANNUCCHI; MONTEIRO, 2010). Em níveis adequados, o ácido fólico possui

importante papel protetor para o DNA e para o sistema nervoso central, atua em processos de oxirredução e transferência do radical metila, além de participar da produção de glutamato e cisteína - dois dos aminoácidos presentes na molécula da GSH (LUMLEY *et al.*, 2009).

Portanto, em níveis adequados, o ácido fólico favorece a biodisponibilidade da GSH no organismo e protege contra os efeitos nocivos do estresse oxidativo (LI *et al.*, 2017; CUI *et al.*, 2018).

1.1 – Problematização

Fatores genéticos podem influenciar a suscetibilidade individual e conseqüentemente o metabolismo do Hg (CHAN *et al.*, 2020). Considerando os estudos que demonstraram que a suplementação com ácido fólico aumentou os níveis plasmáticos da GSH e que ela é importante na toxicocinética do Hg, o problema desse estudo pode ser definido através da seguinte pergunta: Qual a relação entre os genes da via metabólica do ácido fólico com os níveis de Hg na população ribeirinha de Santarém, Pará?

1.2 – Justificativa

Sabe-se que a população da região amazônica está ambientalmente exposta ao Hg através do consumo de peixe, sendo esse a principal fonte proteica dela. Assim, considerando fatores culturais e econômicos, é inviável recomendar a interrupção do consumo desse alimento. Contudo, pode se recomendar a diminuição, principalmente das espécies de peixes que apresentam níveis mais elevados de Hg, além de podermos recomendar o consumo de peixes com menores concentrações de Hg, como os peixes não carnívoros. Entretanto, é importante destacar que a exposição crônica a baixas concentrações de Hg ainda é nociva a saúde. É, pois, importante considerar a suscetibilidade individual em casos de exposição à xenobióticos, então, cabe avaliar diferentes variáveis que possam explicar essas diferenças, como os fatores genéticos, por exemplo.

Dessa forma, considerando a importância da GSH na toxicocinética do Hg, pode se pensar que os genes que, de alguma forma, participam da via metabólica da GSH e do sistema antioxidante são possíveis fatores que influenciam os níveis de Hg

no organismo (BASU *et al.*, 2014).

Frente a isso, a via metabólica do ácido fólico é uma importante via para ser estudada, uma vez que os polimorfismos em genes presentes nessa via podem diminuir a capacidade de doação do grupamento metil para a conversão da homocisteína em metionina, dessa forma, o processo de remetilação da via da homocisteína é bloqueada, resultando no aumento da homocisteína (hiperhomocisteinemia) (VAN GULDENER, 2006). O acúmulo de homocisteína aumenta a produção de peróxido de hidrogênio (STARKEBAUM; HARLA, 1986), afeta os sistemas de defesa antioxidantes (BLUNDELL, *et al.*, 1996), inibe a GSH peroxidase (SHARMA *et al.*, 2015) e diminui os níveis plasmáticos de GSH (SENONER; WOLFGANG, 2019).

1.3 – Hipótese

Há a hipótese de que os genes MTHFR e MTHFD1 participem indiretamente no metabolismo do Hg.

1.4 - Objetivos

1.4.1 - Objetivo geral

Avaliar se há associação de polimorfismos nos genes da via metabólica do ácido fólico aos níveis de Hg em moradores de comunidades ribeirinhas do Baixo Tapajós.

1.4.2 - Objetivos específicos

- Determinar o nível da exposição mercurial dos participantes do estudo;
- Caracterizar o perfil epidemiológico molecular dos participantes;
- Verificar se há associação entre os genes da via metabólica (*MTHFR* e *MTHFD1*) do ácido fólico e os níveis de Hg.

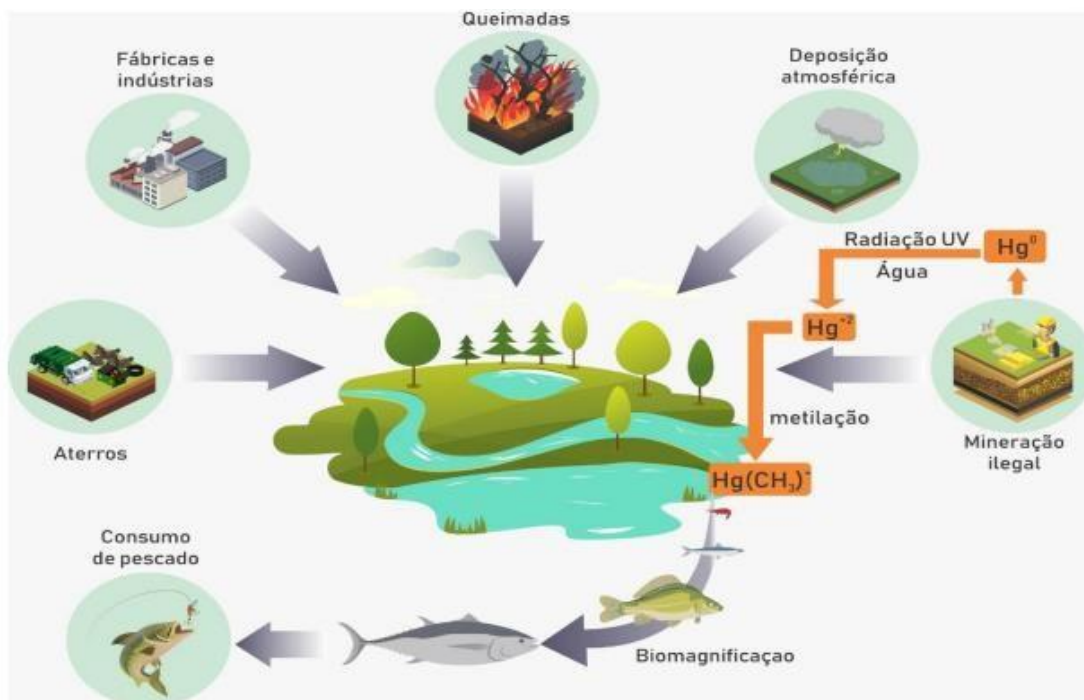
2- REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 – Mercúrio

O Mercúrio (Hg) é um elemento que está naturalmente presente no ambiente. Ele é originado da matéria geológica e pode ser liberado no meio ambiente em diversas formas químicas (RUIZ, 2015). A sua forma orgânica, MeHg, caracteriza a mais tóxica para a saúde humana e pode causar lesões no sistema nervoso central (CLARKSON, 1997; UNEP, 2013).

As fontes naturais de Hg consistem em incêndios florestais e vulcões, enquanto os antropogênicos incluem indústrias de ferro e aço (WANG *et al.*, 2016), indústrias de ouro (WU *et al.*, 2017) e indústrias de produção direta de Hg (BECKERS e RINKLEBE, 2017). Não é comum a presença do Hg elementar na atmosfera, a forma mais comum é o mercúrio divalente (Hg^{2+}); o Hg pode ser observado em outras duas formas, a inorgânica e a orgânica. O MeHg é a forma orgânica do Hg de maior interesse toxicológico, ele pode ser formado a partir da precipitação do Hg^{2+} e sulfeto de Hg na água, sendo necessário a presença de bactérias redutoras de sulfato e metanógenos. Assim, o MeHg pode ser acumulado na água e difundido pelas células de fitoplâncton e zooplâncton, estes serão consumidos por peixes pequenos seguidos por peixes maiores e assim incorporado na cadeia alimentar (figura 1), onde ocorre o processo de biomagnificação, que é a tendência do metal se acumular nos seres vivos à medida em que o nível trófico aumenta (CLARKSON, 1997).

Figura 1: Atividades antrópicas que influenciam o ciclo do mercúrio



Fonte: MOTA; VIEIRA, 2020

2.1.1 – Fontes de exposição ao Mercúrio

Existem diversas formas de exposição humana ao Hg, estão incluídas algumas formas de tratamentos médicos e odontológicos, contato dérmico com substâncias com esse metal, contato com vapores de Hg e ingestão de alimentos contaminados com esse metal. Contudo, há duas principais formas de exposição a esse agente: a ocupacional e a ambiental. A exposição ocupacional está associada ao ambiente de trabalho como em garimpos de ouro. Essa exposição ocorre através da inalação do vapor de Hg, atingindo, assim, a via respiratória. A segunda é a exposição ambiental, que ocorre através do consumo frequente de peixes contaminados com MeHg (UNEP, 2013). Frente a isso, as espécies carnívoras ou piscívoras podem apresentar elevada concentração de Hg, quando comparadas aos detritívoras e herbívoros (BASTOS, 2006; DOREA *et al.*, 2006).

2.1.2 – Toxicocinética do Mercúrio

O Hg pode ser rapidamente absorvido pela inalação e pelo trato gastrointestinal. Após ser ingerido, o MeHg é acumulado no fígado e pode ser distribuído para outros tecidos em um processo que dura entre 30 e 40 horas (CERNICHIARI *et al.*, 1995).

No sangue e em outros tecidos o MeHg pode se ligar a grupos tiol (-SH) e pode ser carregado por transportadores de aminoácido através da barreira hematoencefálica. O mesmo pode ocorrer na placenta, uma vez que o MeHg é altamente lipofílico, porém o mesmo não ocorre com a forma inorgânica do Hg, embora possa ser distribuído pelos órgãos, sua habilidade de penetração na barreira hematoencefálica e placentar é reduzida, visto que esse possui baixa lipofilicidade (GOYER, 1995).

O Hg pode sofrer interconversão metabólica no organismo, podendo deixar de ser Hg^0 e ser oxidado em Hg^{2+} pela catalase e peróxido de hidrogênio. A flora microbiana, as espécies reativas de oxigênio e interações com grupos sulfidrilas também podem converter o MeHg em Hg inorgânico. (NARAHASHI, 1996; YASUTAKE *et al.*, 1997).

No caso da exposição ambiental, após a ingestão do peixe, o MeHg segue para a via gastrointestinal onde é disponibilizado na corrente sanguínea e distribuído para diversas partes do corpo humano. Quando nas células hepáticas, o MeHg forma complexos com a cisteína e a GSH, os quais são então secretados na bile e reabsorvidos no trato gastrointestinal (AZEVEDO, 2003) e, por fim, eliminados pela mucosa intestinal, glândulas sudoríparas e salivares, fígado (via bile), pele, leite, sendo que as vias renais (urina) e gastrointestinal (fezes), são responsáveis pela maior eliminação do Hg (SWIFT, 1997).

2.1.3 – Toxicodinâmica do Mercúrio

No corpo humano, o MeHg possui grande mobilidade devido a sua afinidade com grupos tiol que estão presentes em moléculas de pequeno peso molecular e atuam no transporte do Hg para dentro das células. Entre essas moléculas, a mais importante é a GSH, um tripeptídeo (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina) que desempenha

um papel central no metabolismo do Hg e é a principal responsável pela alta mobilidade do MeHg, é com ela que o MeHg se conjuga formando o complexo MeHgGSH, e assim o MeHg é eliminado do organismo humano. No entanto, em situações de exposição crônica, como a que ocorre na região amazônica, a ingestão de MeHg é superior a detoxicação, causando uma diminuição na disponibilidade da GSH o que resulta no estresse oxidativo. Farina e colaboradores (2011) sugerem que a neurotoxicidade do Hg está relacionada com a redução dos níveis de GSH nas células, isso pode ocorrer devido a interação da GSH com o Hg, formando um complexo excretável GS-HgCH₃ (BALLATORI; CLARKSON 1982) e as espécies reativas de oxigênio geradas pelas mitocôndrias após a exposição ao MeHg, que são detoxificadas por sistemas dependentes de GSH e isso contribui para a menor disponibilidade da GSH (FRANCO et al, 2007).

Na Amazônia, principalmente em comunidades ribeirinhas, a principal fonte de proteína é o peixe. Estudos demonstram que a população dessa região está exposta ao MeHg através do consumo do pescado (COSTA *et al.*, 2016). A exposição crônica ao MeHg acarreta diversos males ao organismo, entre eles pode se destacar lesões orais, de estômago, de fígado e no intestino, além de tremores, alteração de coordenação motora e parksonismo (REBELO, 2016). Ademais, durante a gestação, o MeHg atravessa com facilidade a barreira hematoencefálica e pode causar danos como microcefalia, deficiência visual, mental, motora e auditiva no bebê (LUCENA et al 2010). Além disso, a literatura também indica que o Hg pode causar danos ao DNA e modificar as proteínas sintetizadas (CHEN, 1995).

O Hg pode gerar espécies reativa de oxigênio e radicais livres que acometem a célula causando, assim, o estresse oxidativo, que é um desequilíbrio redox da célula que pode causar destruição dos componentes celulares (GROTTO, 2010).

2.1.4 – O Mercúrio e o Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo consiste em uma alteração no equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e as defesas antioxidantes. O estresse oxidativo originado da exposição mercurial consiste no principal mecanismo molecular genotóxico.

Os radicais livres consistem em átomos ou moléculas que perderam um de seus pares de elétrons, as tornando reativas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). O próprio metabolismo celular pode produzir radicais livres, o entre eles as mais comuns são as EROs. O oxigênio (O_2) é importante para a produção de energia celular e reações de oxirredução (COMHAIR; ERZURUM, 2002). Esses processos são responsáveis por transformar uma parte do O_2 em intermediários reativos, como $OH\cdot$ (íon hidroxila), $HOH\cdot$ (íon peroxil), $HOO\cdot$ (radical perhidroxila), NO (óxido nítrico), $RO\cdot$ (alcoxila), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

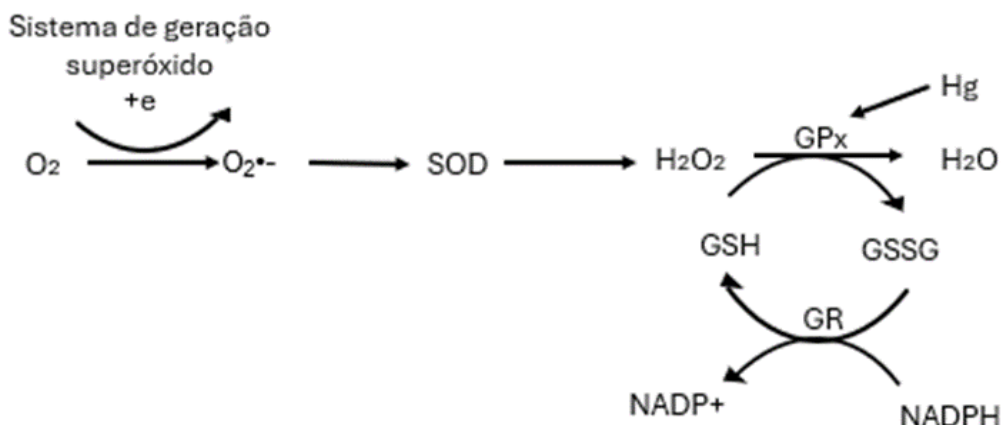
Seus efeitos incluem danos diretos às ligações duplas dos ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares, causando a peroxidação lipídica. Isso afeta principalmente as membranas celulares. Esse processo compromete a estrutura organizacional da célula pois prejudica a permeabilidade celular, levando à liberação de seu conteúdo interno, como enzimas hidrolíticas e lisossomos. Além disso, um alvo sucessível ao ataque dos radicais livres é o DNA, que pode sofrer mutações genéticas, podendo prejudicar a divisão celular e até mesmo o reparo do DNA (KEHRER, 2000).

As principais enzimas antioxidantes são superóxido dismutase (SOD), a SOD-1 (superóxido dismutase cobre-zinco dependente – CuZnSOD), que contém Cu^{2+} e Zn^{2+} , e a SOD-2 (superóxido dismutase manganês dependente – MnSOD), que contém Mn^{2+} catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx). A SOD funciona como um catalizador na quebra do superóxido ($O_2\cdot^-$) em H_2O_2 e a catalase quebra H_2O_2 em água e oxigênio.

O sistema que envolve a GSH é composto pela GPx e pela glutaciona redutase (GR). A GSH é utilizada como substrato para reduzir o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O), na presença da GPx, formando uma ponte dissulfeto, e posteriormente regenerando a GSH. (AZEVEDO *et al.*, 2012).

A exposição mercurial também pode causar estresse oxidativo (FERREIRA; ABREU, 2007). Sob essa perspectiva, o Hg pode inibir a atividade da SOD, catalase e GPx (WINARSIH, 2007), pois se liga ao grupo tiol de modo que interrompe atividade da enzima GPx e causa uma diminuição nos níveis de GSH e acúmulo H_2O_2 (figura 2) (ZULAIKHAH *et al.*, 2020). Além disso, a GSH é um dos alvos do Hg, de modo que uma molécula de Hg pode se ligar a duas moléculas de GSH, um dos motivos que leva a diminuição da disponibilidade de GSH e aumentando o H_2O_2 , resultando em estresse oxidativo (ZULAIKHAH *et al.*, 2018; MASLACHAH *et al.*, 2007)

Figura 2 - O papel do mercúrio no status antioxidante



Fonte: Adaptado de Barbosa (2006)

2.2- A glutatona e seu papel na toxicocinética e toxicodinâmica do mercúrio

2.2.1 – Glutatona

A GSH é um tripeptídeo composto por γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina e consiste de um tiol de baixo peso molecular que desempenha papel vital em todas as células, sendo essencial para a defesa celular contra os efeitos de EROs, além disso, atua na eliminação de xenobióticos como o Hg. A concentração de GSH varia entre as células, situando-se na faixa de 1 a 10mM, enquanto no plasma a sua concentração é em torno de 1 a 2 mM (MEISTER, 1988).

Entre suas funções, destaca-se seu papel na proteção celular contra a presença de radicais livres e proteção contra a radiação ultravioleta. Nas mitocôndrias, a GSH participa do processo de apoptose celular, além de sua defesa contra o estresse oxidativo. Ademais, auxilia na regulação da divisão celular desempenhando a função de controle do crescimento e desenvolvimento celular, reserva de cisteína, transporte e eliminação do MeHg (FORMA *et al.*, 2008).

A mobilidade do MeHg no organismo ocorre devido a formação do complexo MeHg-GSH, que se desloca para do fígado para outros órgãos ou é excretado. Alguns fatores podem influenciar a quantidade de GSH, como a disponibilidade de substratos necessários para a sua síntese, a exemplo o glutamato e a cisteína derivados da dieta

e do processo de transufuração da metionina no fígado (CLARKSON *et al.*, 2007). Fatores genéticos podem influenciar a concentração de GSH. Os genes que catalisam sua síntese, ou seja, GCL e a GS podem refletir a forma como o organismo reagirá durante a exposição ao Hg.

2.2.2 – Papel antioxidante da GSH

A GSH possui um papel muito importante no processo de desintoxicação do MeHg. O MeHg presente no organismo aumenta a produção de EROs, causando estresse oxidativo (GROTTO *et al.*, 2010).

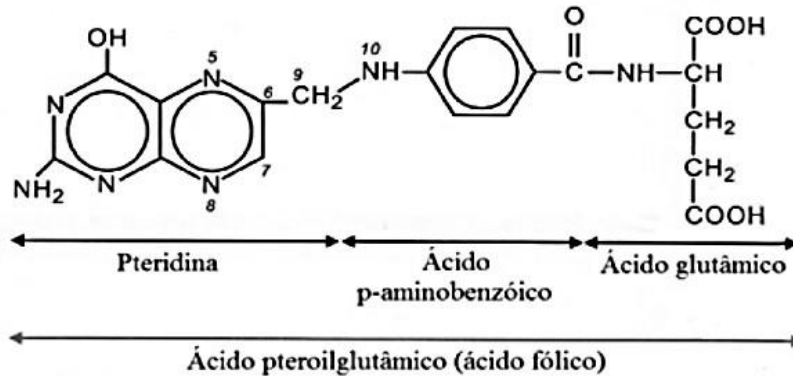
O sistema antioxidante da GSH é formado pela sua forma reduzida (a própria GSH), a forma oxidada (GSSG) e as enzimas GPx e GSR. A GPx catalisa a redução do H₂O₂ transformando-o em H₂O e O. Durante esse processo, a GSH doa elétrons à enzima GPx, sendo então oxidada a GSSG. Contudo, para manter os níveis normais de GSH, a enzima GSR regenera a GSSG em GSH, na presença de NADPH, dessa forma, se mantem o ciclo redox constante (LU, 2009; LU, 2013).

2.3 - O ácido fólico

2.3.1 - Características do ácido fólico

O ácido fólico é uma vitamina do complexo B (B9) isolada pela primeira vez em 1943 (MAHAN *et al.*, 1998). Alguns textos podem se referir ao ácido fólico e folato como sinônimos, porém o termo ácido fólico é utilizado para denominar a fórmula sintética do ácido pteroilglutâmico (figura 3) enquanto o termo folato é utilizado para se referir à forma poliglutamato, que é a forma naturalmente presente nos alimentos. No organismo, o folato pode ser encontrado em sua principal forma ativa, tetraidrofolato (THF), derivado da redução do ácido pteroilglutâmico nas posições 5 e 10 do núcleo pteridina (VANNUCCHI; MONTEIRO, 2010).

Figura 3. Forma química do pteroilglutâmico



Fonte: CONTRERAS (2005).

O ácido fólico consiste em uma vitamina que possui importante papel no desempenho cerebral, sendo um dos precursores da serotonina, neurotransmissor responsável pelo humor, fome e apetite. Além disso, o ácido fólico tem um papel protetor importante para as malformações congênitas, principalmente as do sistema nervoso central, como é o caso dos defeitos de tubo neural. Além disso, o ácido fólico influencia no metabolismo da GSH, pois participa da produção de glutamato e cisteína, dois dos aminoácidos presentes na molécula da GSH (LUMLEY *et al.*, 2010).

O ácido fólico também atua em processos de oxirredução e transferência de radical metila. Entretanto, fatores como o baixo consumo de ácido fólico, pouca ingestão das vitaminas B12, B6 e polimorfismos genéticos podem influenciar negativamente os processos metabólicos dependentes de ácido fólico (MARCHIORO *et al.*, 2009).

2.3.2- Polimorfismos genéticos no metabolismo do ácido fólico

Existem muitos genes envolvidos no metabolismo do ácido fólico, o *MTHFR* e o *MTHFD1* são alguns deles. Dessa forma, já é evidenciado que os polimorfismos presentes em genes que codificam enzimas importantes no metabolismo do ácido fólico podem alterar as concentrações de folato e homocisteína (SHI, CAPRAU *et al.*, 2003; TAMURA E PICCIANO, 2006).

O gene *MTHFR*, localizado no cromossomo 1 (p 36.3) é responsável por codificar a enzima 5,10 metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), que corresponde

à enzima chave no metabolismo do folato (FABRIS, TONIUTTO *et al.*, 2009; WILCKEN, 2012; MOLLOY, BRODY *et al.*, 2009). Sua ação é responsável pela remetilação da homocisteína em metionina, através da redução de 5,10- metilenoTHF a 5-metilTHF (CALLEJÓN, MAYOR-OLEA *et al.*, 2007; CARDONA, CARDONA-MAYA *et al.*, 2008; MOLLOY, BRODY *et al.*, 2009; WILCKEN, 2012). Assim, há disponibilidade do grupamento metil para a síntese de purina e pirimidina, bem como doação do grupamento metil para S adenosil metionina (MOLLOY, BRODY *et al.*, 2009; WILCKEN, 2012).

O polimorfismo rs1801133 677C>T do gene *MTHFR*, ocasiona a substituição da citosina por uma timina; isso resulta na troca da alanina (GCC) por uma valina (GTC) na posição 222 da proteína (MTHFR p.A222V), resultando em uma variante termolábil dessa enzima. Estudos evidenciam que esse polimorfismo ocasiona deficiência na função da enzima MTHFR (NAUSHAD E DEVI, 2010; FROSST, BLOM *et al.*, 1995; VAN DER PUT, STEEGERS-THEUNISSEN *et al.*, 1995; WILCKEN, 2012).

A homozigose 677TT está associada à atividade reduzida da MTHFR bem como a diminuição dos níveis plasmáticos de folato e elevadas concentrações plasmáticas da homocisteína (L MIRANDA-VILELA, 2012; SINTHUWIWAT *et al.*, 2012; GUENTHER *et al.*, 1999). Em homozigotos TT a atividade enzimática pode ser reduzida em até 70%, enquanto em heterozigotos CT varia de 30 a 40% (FROSST *et al.*, 1995, KANG *et al.*, 1988).

A diminuição da atividade enzimática da MTHFR resulta no acúmulo de 5,10 MTHF e diminuição da forma circulante do folato, o metil-tetrahidrofolato (metil-THF). Esse polimorfismo está associado a elevadas concentrações de Hcy, pois isso reduz capacidade de doação do grupamento metil para a homocisteína se tornar metionina (BOTTO e YANG, 2000; BARBOSA,2008; KNOWLES *et al.*, 2016). A tabela a seguir (Tabela 1) apresenta a frequência alélica do polimorfismo rs1801133 em diferentes populações. Observa-se que o alelo selvagem é o mais frequente em toda as amostras estudadas, contudo a maior frequência do alelo selvagem foi apresentada entre populações africanas e afro-americanas.

Tabela 1. Frequência alélica do polimorfismo rs1801133 677C>T 3 gene *MTHFR* em diferentes populações.

| População | n | Alelo selvagem | Alelo Mutante |
|--|---------|----------------|---------------|
| Africanos | 16.554 | C=0.9 | T=0.1 |
| Afro-americanos | 15.960 | C=0.9 | T=0.1 |
| Asiáticos | 3.984 | C=0.7 | T=0.3 |
| Leste-asiáticos | 3.184 | C=0.6 | T=0.4 |
| Europeus | 332.384 | C=0.7 | T=0.3 |
| Latino-americanos (ancestrais afro-caribenhos) | 1.488 | C=0.7 | T=0.3 |
| Latino-americanos (ancestrais europeus) | 7.238 | C=0.6 | T=0.4 |
| População geral | 388.968 | C=0.7 | T=0.3 |

Fonte: NCBI, 2024

O gene *MTHFD1* está localizado no cromossomo 14 (14q24), e é responsável por codificar a enzima metilenotetraidrofolatdesidrogenase 1 (MTHFD1), e atuar como 5,10-metilenoTHF desidrogenase, 5,10-metenilTHF ciclohidrolase e 10-formilTHF sintase. Além disso, atua doando três carbonos derivados de THF, e são utilizados como substratos para biossíntese de timidilato, purinas e metionina (WANG, KE *et al.*, 2007; KRUSZYNA, LIANERI *et al.*, 2010; NEAGOS, CRETU *et al.*, 2010).

O polimorfismo rs2236225 c.1958G>A do gene MTHFD1 é o polimorfismo mais estudado desse gene e consiste na troca da guanina por uma adenina no nucleotídeo 1958; como resultado, o aminoácido arginina é trocado por glutamato na posição 653 na proteína (MTHFD1 p.R653Q) (CARROLL, PANGILINAN *et al.*, 2009; NEAGOS, CRETU *et al.*, 2010) Esse polimorfismo é uma variante missense que resulta em uma proteína termolábil, com o tempo de meia vida e atividade enzimática reduzidas (SUTHERLAND *et al.*, 2014).

O papel do *MTHFD1* no ciclo da homocisteína consiste no fornecimento de 5,10MTHF, que é reduzido a 5-metilTHF pela enzima MTHFR. Assim, a 5-metilTHF

do grupo metil para a conversão de homocisteína a metionina (Hayashi *et al.*, 2007).

Entre os impactos desse polimorfismo estão o risco de má formação congênita e alguns tipos de câncer. Em algumas populações, é comum a presença do alelo A em crianças com defeitos de tubo neural (BRODY *et al.*, 2002; PARLE-MCDERMOTT *et al.*, 2006).

Há a hipótese de que esse polimorfismo esteja associado à diminuição da produção de 5,10-metilenoTHF e 10-formilTHF, levando à diminuição da disponibilidade de 5-metilTHF (IVANOV, N-BARBOZA *et al.*, 2009). Estudos demonstram que o polimorfismo rs2236225 c.1958G>A (*MTHFD1*) aumenta os níveis de Hcy ao mesmo tempo em que também diminui a disponibilidade da metionina e cistationina, o que indica problemas na regulação da Hcy (FIELD *et al.*, 2013; MACFARLANE *et al.*, 2009).

A tabela a seguir (Tabela 2) apresenta a frequência alélica do SNP rs2236225

Tabela 2. Frequência alélica do rs2236225 c.1958G>A do gene *MTHFD1* em diferentes populações.

| População | n | Alelo selvagem | Alelo Mutante |
|--|---------|----------------|---------------|
| Africano | 13.380 | G=0.8 | A=0.2 |
| Afro-americanos | 12.922 | G=0.8 | A=0.2 |
| Asiáticos | 366 | G=0.8 | A=0.2 |
| Leste-asiáticos | 268 | G=0.8 | A=0.2 |
| Europeus | 153.476 | G=0.6 | A=0.4 |
| Latino-americanos (ancestrais afro-caribenhos) | 702 | G=0.6 | A=0.4 |
| Latino-americanos (ancestrais europeus) | 3.338 | G=0.4 | A=0.6 |
| População geral | 189.944 | G=0.6 | A=0.4 |

Fonte: NCBI, 2024

Nota-se que o alelo G apresenta maior frequência entre as populações, exceto em latino americanos com ancestrais europeus, onde verificou-se que o alelo A é o mais frequente nessa amostra.

2.3.3- A via metabólica do ácido fólico e GSH

A absorção do ácido fólico inicia no jejuno, onde ocorre a hidrólise do poliglutamato para monoglutamato através da enzima glutamato carboxipeptidase 2 (GCP2), em seguida é transportado para dentro das células, onde será convertido a dihidrofolato (DHF) e em seguida a tetraidrofolato (THF). Após essa conversão, o THF pode seguir duas vias, através da enzima MTHFD1, expressa pelo gene *MTHFD1*, ser convertida a 10-formil-tetrahidrofolato, utilizado como cofator na síntese de purinas ou ser convertido a 5,10-metileno-tetrahidrofolato (5,10-MTHF).

O 5,10-MTHF pode também seguir duas vias, a primeira delas é para a doação de grupamento metil para o uracil para a síntese do nucleotídeo timina, utilizado na síntese e reparo do DNA; a segunda via envolve a enzima metileno-tetrahidrofolato-redutase (MTHFR), expressa pelo gene *MTHFR*. A MTHFR reduz o 5,10-MTHF a 5-MTHF, e esse é transportado para a corrente sanguínea (ZHAO, MATHERLY *et al.*, 2009; CARO, 2007). O 5-MTHF é a forma abundante na corrente sanguínea e possui alta afinidade por receptores de folato presentes na membrana celular, e a sua absorção ocorre por meio da proteína carreadora de folato reduzido 1 (RFC1) (PIETRZIK, BAILEY *et al.*, 2010). Após essas conversões, o 5-MTHF é utilizado na via de remetilação.

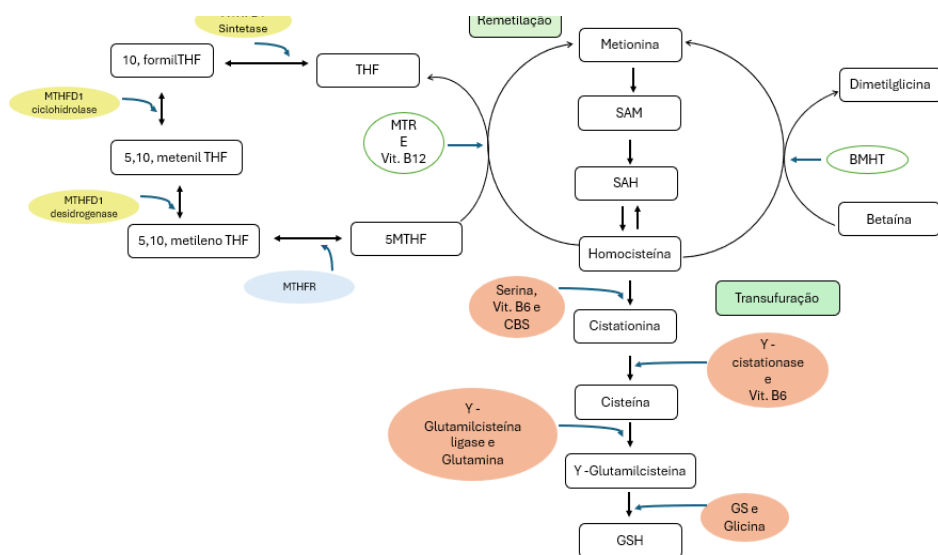
Para iniciar a via de remetilação, é necessário a formação de S-adenosilmetionina (SAM), em reação catalisada pela metionina adenosiltransferase (MAT) (FINKELSTEIN, 1990; MATO *et al.*, 2002). A SAM tem a função de doar grupamento metil para a transmetilação e transufuração (LU e MATO, 2008). Sob condições fisiológicas normais, a maior parte da SAM é utilizada na via de remetilação (FINKELSTEIN, 1990). Durante a remetilação, a SAM doa grupamento metil para diversas moléculas em reações catalisadas pela metiltransferase (MTs). Como resultado da remetilação, é formada a S-adenosilhomocisteína (SAH), que em seguida é hidrolisada e se torna homocisteína (Hcy) e adenosina, através da atividade de SAH hidrolase. A remetilação da Hcy em metionina via MS requer 5-MTHF, que doará

grupamento metil e voltará a forma THF. No fígado, a homocisteína também pode ser convertida em cisteína (cys) pela via de transufuração. Nessa via, a Hcy se condensa com serina para formar cistationina em uma reação catalizada pela cistationina β sintase (CBS), que utiliza vitamina B6 como cofator, por fim, a cistationina pode ser clivada, através da ação da cistationase e liberar cisteína para a síntese de GSH (FINKELSTEIN, 1990).

A GSH é sintetizada em duas etapas enzimáticas consecutivas que envolvem os aminoácidos cisteína, glutamato e glicina. A primeira etapa é catalisada pela enzima glutamato cisteína ligase (CGL) e consiste na combinação de cisteína e glutamato. Essa reação requer a hidrólise de ATP para formar uma ligação entre o grupo γ -carboxila do glutamato e o grupo amino da cisteína, resultando na formação do dipeptídeo γ -glutamilcisteína. Na segunda etapa a glutatona sintetase (GS) catalisa a ligação do aminoácido glicina ao dipeptídeo γ -glutamilcisteína, também na presença de ATP. Resultando na formação do γ -L-glutamil-L-cisteína-glicina (GSH). Após a sua síntese, a GSH é transportada para fora da célula (MEISTER, 1974).

A deficiência de folato impede a metilação da homocisteína, quando isso acontece ocorre a hiper-homocisteinemia; então, como mecanismo de regulação, a via de transufuração é favorecida (Figura 4) (CARDOSO, 2009).

Figura 4- Via metabólica do ácido fólico e da homocisteína



Fonte: Adaptado de Bala et al. (2023)

2.4- A homocisteína

2.4.1- Características da Homocisteína

A homocisteína é um aminoácido com grupo SH, formada a partir da metionina obtida através da dieta alimentar ou do catabolismo deste mesmo aminoácido (FONSECA. *et al.*, 1999).

O metabolismo da homocisteína envolve duas vias metabólicas diferentes: a via de transufuração e a via de remetilação (DUCE *et al.*, 1988).

A desmetilação da metionina ocorre em jejum e a doação do seu grupo metil auxilia a formação da S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosil- homocisteína (SAH) e homocisteína (Hcy). O grupamento metil pode ser utilizado como substrato para a formação de DNA e fosfolipídeos. Após formada, a Hcy pode seguir a via de remetilação, onde a enzima metionina sintase (MS) utilizando o tetrahidrofolato (THF) como doador metila e a vitamina B12 como cofator, realiza a metilação da Hcy, formando novamente a metionina; ou a Hcy pode seguir para a via de transufuração (ROBINSON, 2000).

Na via de transufuração, a Hcy reage com a cistationina β sintase (CBS) utilizando vitamina B6 para formar a cistationina; em seguida, utilizando piridoxal 5'-fosfato (forma ativa da vitamina B6), é catalisada pela enzima cistationina sintase. A cistationina é hidrolisada pela γ -cistationase, também dependente de vitamina B6, formando cisteína (Cys) em seguida a enzima Glutamato Cisteína Ligase (GCL) utiliza os aminoácidos glutamato e cys como substratos formando o dipeptídeo Glu-Cys, que, em seguida, combina com a glicina numa reação catalisada pela GSH Sintase (GS) para produzir a Glutathiona (GSH).

2.4.2- A relação entre o ácido fólico e a GSH

Henning e colaboradores, em 1997, demonstraram que a deficiência de folato acarreta danos ao sistema antioxidante do organismo e, corroborando com esse estudo, Racek *et al* (2003) realizaram um trabalho onde os participantes receberam por três meses 5mg de ácido folínico - um composto químico cuja função é semelhante à do ácido fólico e observaram um aumento de 36,9% nos níveis de GSH, indicando melhora na defesa antioxidante.

Em 2000, Mosharov e sua equipe evidenciaram que as células do hepatoma humano (HepG2), sob condições oxidativas, favorecem a via de transufuração com o intuito de formar cisteína e GSH. Assim, cresce a demanda de ácido fólico, pois o estresse oxidativo causa o aumento da transufuração para manter o pool intracelular de GSH. Joshi e colaboradores, em 2001, apresentaram um estudo que expôs o ácido fólico como potencial “limpador” de radicais livres, indicando que, em ambiente fisiológico, pode proteger bioconstituintes dos danos causados pelos radicais livres. Em 2015, Guo e colaboradores demonstraram que a fortificação de alimentos com ácido fólico está ligada de forma independente à redução do dano oxidativo ao DNA.

De forma análoga, alguns anos depois, Li et al (2017) evidenciaram que o esgotamento ou consumo insuficiente de folato e vitamina B12 pode diminuir a disponibilidade de GSH. Isso pode ocorrer, pois o ácido fólico é um fator importante no metabolismo do carbono, sendo este imprescindível na via metabólica da homocisteína, precursora da GSH. Em 2018, Cui e colaboradores apresentaram um estudo indicando que a deficiência de ácido fólico diminuiu significativamente a atividade antioxidante plasmática SOD, em comparação ao grupo que recebeu suplementação com ácido fólico. Diante disso, nota-se a importância do ácido fólico para a manutenção e fortificação do sistema antioxidante, além da sua contribuição para o aumento dos níveis de GSH.

No contexto da exposição mercurial, modelos *in vitro* já demonstraram que a exposição mercurial pode causar diversos danos ao organismo devido ao estresse oxidativo (GROTTO *et al.*, 2009), entre eles a diminuição da disponibilidade da GSH e consequente diminuição dos grupos sulfidrilas de proteínas (SHENKER *et al.*, 2002). Assim, considerando o efeito do ácido fólico sobre o estresse oxidativo, e como a sua deficiência, bem como a deficiência de outras vitaminas relacionadas a via metabólica do ácido fólico podem afetar a disponibilidade da GSH, surge a necessidade de avaliar o efeito do ácido fólico sobre os níveis de Hg.

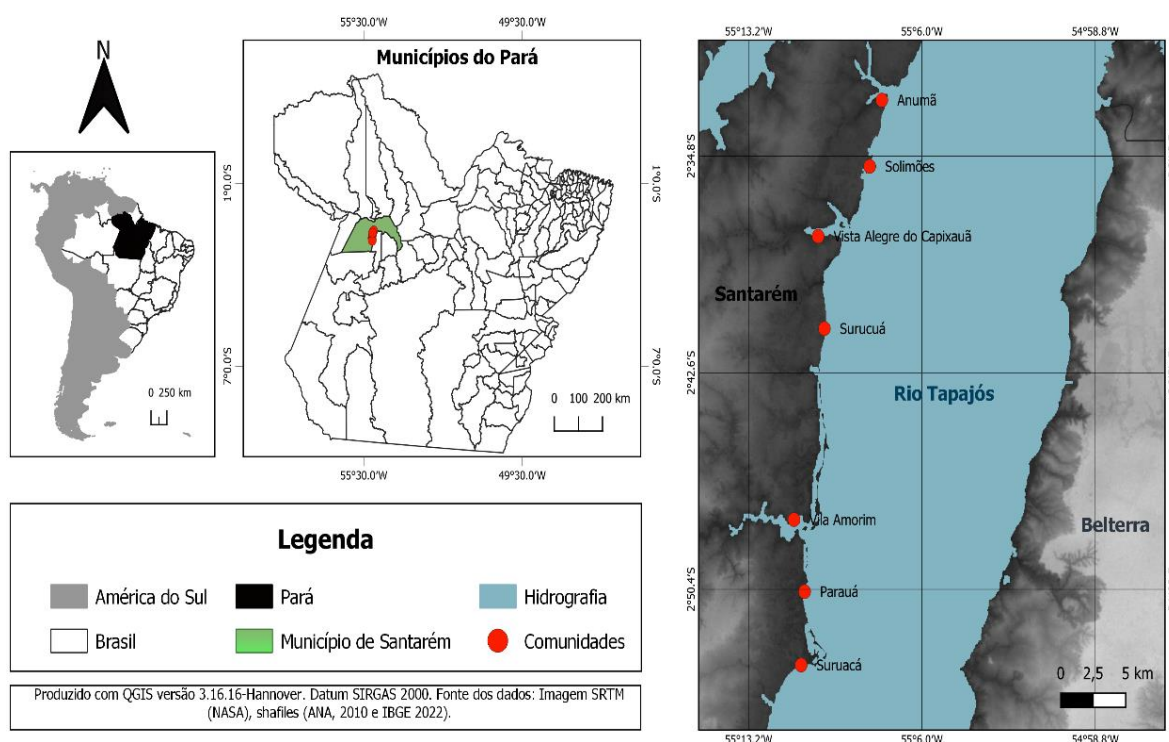
3- METODOLOGIA

3.1- Caracterização da pesquisa

Trata-se de uma pesquisa observacional do tipo transversal, descritiva e quantitativa, realizada entre julho e setembro de 2022, que incluiu 166 indivíduos

residentes em 7 comunidades ribeirinhas da bacia do Tapajós: Vista Alegre do Capixauã, Solimões, Anumã, Surucá, Parauá, Surucá e Vila Amorim (Figura 5). Esse trabalho teve aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, sob o parecer 5.964.823 e todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

Figura 5- Mapa da localização por área de coleta



Fonte: Dados da Pesquisa

3.2- Coleta de dados

Foi aplicado um questionário com questões socioeconômicas e epidemiológicas. O questionário foi elaborado baseado nos protocolos para avaliação ambiental e de saúde, de acordo com as orientações da OMS (UNEP, 2008). Em seguida foram colhidos por punção venosa de cada voluntário 10 mL de sangue venoso. Essa quantidade foi dividida em duas porções, 5 mL foram adicionados em tubo com anticoagulante do tipo EDTA foram destinados para a extração de DNA e outros 5 mL para a dosagem do Hg. Ambos os tubos foram acondicionados em caixas térmicas até o Laboratório de Epidemiologia Molecular (LEpiMol) da UFOPA. Os

procedimentos de coleta, acondicionamento e transporte seguiram todas as orientações preconizadas pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC).

3.2.1- Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos homens, mulheres, fumantes ou não-fumantes, com idades entre 18 e 81 anos, cuja dieta seja composta em sua maioria ou não de peixes. Foram excluídos os indivíduos menores de idade, os que não residam nas comunidades de forma contínua, indivíduos que não consentirem em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

3.3- Quantificação de mercúrio

As dosagens do Hg foram realizadas no Laboratório de Epidemiologia Molecular (LepiMol) da Universidade Federal do Oeste do Pará. O método utilizado através de espectrometria de absorção atômica, utilizando o Direct Mercury Analyser (DMA-80). A precisão dos resultados foi determinada usando uma curva de calibração com materiais de referência certificados (CRM) (Seronorm™ Trace Elements Whole Blood, Billingstad, Noruega). O limite de detecção do ensaio foi de 0,2 µg/L e as amostras foram analisadas em duplicata. Esse equipamento é dedicado à análise total de Hg em amostras tanto sólidas quanto líquidas, onde se utiliza a decomposição térmica, amalgamação e absorção atômica. Para quantificar Hg foi necessário pipetar 100µL de sangue total em cubetas de quartzo próprias do equipamento.

Na parte interna do analisador a temperatura que aquece a amostra é de aproximadamente 600 °C, então o oxigênio que está conectado ao analisador faz o carreamento de Hg para outra célula do equipamento. Deste modo, o Hg é quantificado através de raios ultravioletas lançados sobre os gases. Este método consiste no princípio de absorção de radiação ultravioleta. Todas as amostras foram dosadas em duplicatas para aumentar a confiabilidade do valor expressado. Para esta pesquisa foi utilizado o valor de referência estabelecido pela OMS (2000), sendo considerado baixa exposição valores de Hg total até 10µg/L e alta exposição as concentrações superiores a 10µg/L.

3.4- Análises moleculares

O DNA genômico foi isolado a partir do sangue total, seguindo o protocolo da Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, WI, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Após o descongelamento das amostras, foi adicionado 300µl do sangue em 900µl de Cell Lysis Solution, em um tubo 1,5ml esterilizado e cuidadosamente invertido 6 vezes, para misturar. Depois incubado por 10 minutos em temperatura ambiente, sendo o tubo cuidadosamente invertido 3 vezes durante a incubação. Essa solução foi centrifugada por 14.000RPM por 20 segundos em temperatura ambiente.

Foi descartado uma parte do sobrenadante, deixando no tubo aproximadamente 20µl e o pellet. Em seguida, foi levado ao vórtex por 15 segundos. Foi adicionado 300µl de Nuclei Lysis Solution e homogeneizado 6 vezes com a própria pipeta. Depois foi adicionado 100µl de Protein Precipitation Solution e levado ao vórtex por 20 segundos. Assim, essa solução foi centrifugada a 14.000 RPM por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo esterilizado, contendo 300µl de isopropanol em temperatura ambiente e em seguida gentilmente homogeneizado por inversão até que uma pequena massa branca fosse visualizada, após isso, centrifugada a 14.000 RPM por 1 minuto.

Foi decantado o sobrenadante e adicionado 300µl de etanol 70% no tubo e novamente centrifugado a 14.000 RPM por 1 minuto. Após esse procedimento, o etanol foi cuidadosamente aspirado do microtubo, e este foi invertido para secar em papel toalha em temperatura ambiente, por 10 minutos. Após esse período, foi adicionado 100µl de DNA Rehydration Solution e incubado em overnight a 4°C. Por fim, a amostra de DNA isolada foi congelada até a sua próxima utilização.

Foi determinada a concentração das amostras de DNA por quantificação em espectrofotômetro NanoDrop™ ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, EUA) pela absorbância em luz ultravioleta a 260 nm, utilizando-se como valor padrão 1 DO₂₆₀= 50µg/mL de DNA. O grau de pureza foi avaliado pela razão 260/280 nm, utilizando-se apenas os DNAs cuja razão esteja entre 1,8 e 2,0.

3.4.1- Genotipagem de SNVs

Os polimorfismos utilizados no presente estudo estão apresentados na Tabela 4. Foi utilizada a técnica de identificação da base com o uso de sondas marcadas com fluoróforos TaqMan® SNV GEnotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, EUA), amplificação em cadeia polimerase (PCR) e análise em tempo real.

Tabela 3- Descrição dos SNVs estudados

| Gene | Localização | ID ref (SNV) | Alteração |
|---------------|-------------|--------------|-----------|
| <i>MTHFR</i> | 1:11796321 | rs1801133 | 677C>T |
| <i>MTHFD1</i> | 14:64442127 | rs2236225 | c.1958G>A |

Fonte: Autor (2024)

Os kits TaqMan® contém primers (oligonucleotídeos) que flanqueiam a região polimórfica para a amplificação dos produtos de PCR, além de duas sondas complementares à sequência alvo, sendo cada uma delas específica para um dos alelos descritos (polimórfico e selvagem). Essa sonda apresenta na extremidade 5' um fluoróforo (dye reporter) e extremidade 3' um quencher.

Assim, enquanto intactas, a interação entre os dye reporters e os quenchers impede que a fluorescência seja emitida. Durante a atividade, a exonuclease 5'→3' da Taq DNA polimerase, a sonda ligada ao fragmento é clivada liberando o dye reporter e uma emissão de fluorescência. Cada sonda é específica para determinado alelo, assim como cada sonda é marcada por uma fluorescência diferente, dessa forma, através da leitura da fluorescência emitida é possível determinar o genótipo da amostra.

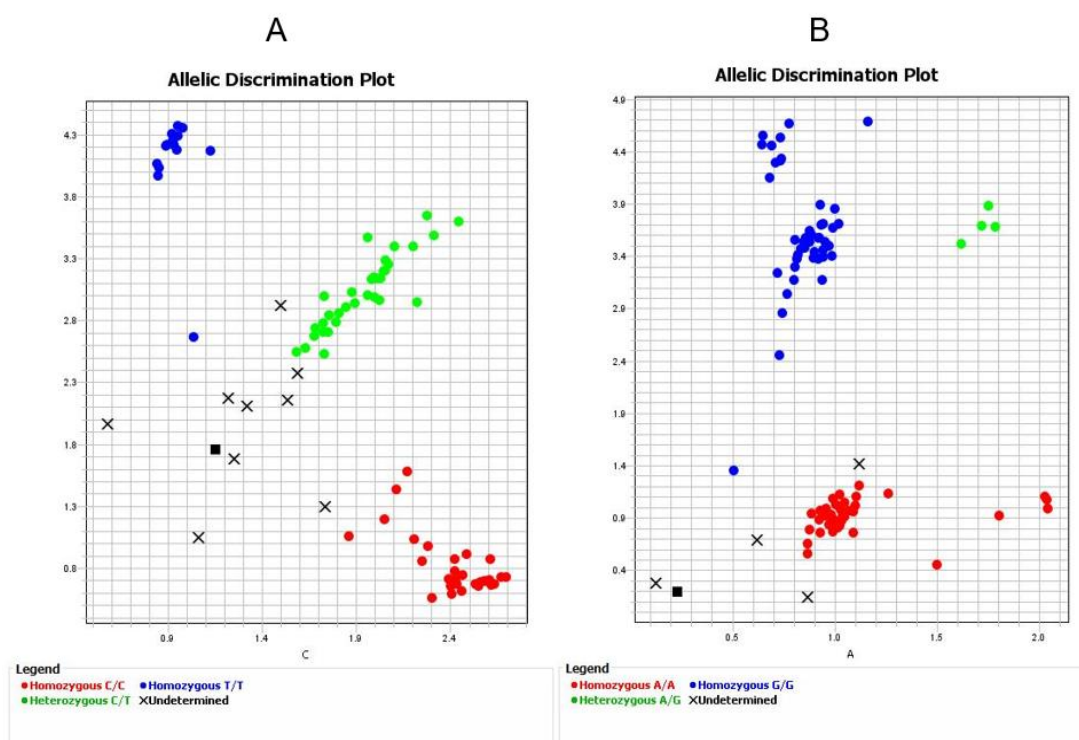
Além disso, uma molécula denominada pela sigla em inglês MGB (Minor Groove Binder) presente na sonda contribui para a elevação da temperatura de anelamento, possibilitando ligação mais específica, o que evita que ela se ligue inespecificamente a sequência correspondente em outro alelo.

A genotipagem dos polimorfismos dos genes *MTHFR* (figura 6A) e *MTHFD1* (figura 6B) foram determinados através dos kits TaqMan® SNV GEnotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Foram adquiridos os kits prontos para uso e validados pela TaqMan® Pre-designed SNV Genotyping Assay dos SNVs rs1801133 677C>T

do gene *MTHFR* e rs2236225 c.1958G>A do gene *MTHFD1* cujos códigos de identificação para compra são, respectivamente, “C_1202883_20” e “C_1376137_10”.

Os genótipos foram determinados de acordo com o perfil de emissão das fluorescências ao final da reação de PCR. Para a amplificação dos fragmentos desejados foi utilizado as seguintes condições de reação: 0,5 µl de Taqman genotyping 20x, 5,0 µl de master mix, 0,5 µl de água nuclease free e 4,0 µl contendo 30ng de DNA, somando 10 µl para cada reação. As amostras cujos resultados foram indeterminados na primeira reação foram submetidas a novam genotipagem.

Figura 6- Genotipagem dos SNPs rs1801133 677C>T e rs2236225 c.1958G>A



Fonte: Autor (2024)

3.5- Testes estatísticos

Para traçar o perfil epidemiológico, foi calculada a frequência relativa para cada uma das variáveis obtidas no questionário (sexo, raça, faixa etária, tempo de estudo,

tabagismo, elitismo, frequência do consumo de peixe). Foi realizada uma análise descritiva dos níveis de Hg em função das variáveis epidemiológicas estudadas. Por se tratar de uma variável quantitativa contínua, a distribuição dos níveis de mercúrio foi descrita por meio da média, mediana, desvio padrão, valor máximo e valor mínimo.

O perfil epidemiológico foi avaliado em função da frequência do consumo de peixe. Com isso, a amostra foi estratificada em dois subgrupos: alta frequência, para os que relataram consumir peixe mais de três vezes por semana; e baixa frequência os que relataram consumir peixe menos de duas vezes por semana. Foi calculada a frequência relativa das variáveis epidemiológicas em cada um dos subgrupos e foi verificado se estão homogeneamente distribuídas entre os subgrupos (alta ou baixa frequência de consumo de peixe). Para verificar a distribuição das variáveis categóricas entre os subgrupos do consumo de peixe e dos níveis de Hg (baixa exposição - Até 10µg/L e alta exposição - acima de 10µg/L) foi utilizado o teste qui-quadrado de Pearson.

Para o perfil genético, foi calculada a frequência alélica e genotípica de cada um dos SNVs estudados. Foi realizada uma avaliação de associação do perfil genético e os níveis de Hg.

Para analisar a associação dos polimorfismos e os níveis de Hg foi aplicado o teste Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados e o valor $P < 0,05$ (0,00), indicando distribuição não normal. Além disso, os genótipos foram classificados em modelo dominante e recessivo em função da classificação da exposição mercurial e foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para verificar as relações Modelo dominante e recessivo em relação aos níveis de Hg.

Foi realizada análise de regressão linear (uni e multivariada) para verificar a associação entre os níveis de Hg e os polimorfismos dos genes *MTHFR* e *MTHFD1*, para essa análise os níveis de Hg foram classificados em baixa exposição (Até 10 µg/L) e foi criado três subgrupos no grupo dos expostos: média exposição (10-30 µg/L), alta exposição (31-50 µg/L) exposição muito alta (acima de 50µg/L).

4- RESULTADOS

4.1- Caracterização da amostra

O nível de Hg total foi medido a partir de amostras de sangue para os 166 indivíduos estudados (Tabela 4). Os níveis de Hg nesta amostra variaram entre 0,9µg/L e 140,8µg/L. A maioria dos indivíduos (85,5%) apresentou níveis de Hg acima do recomendado pela OMS (10µg/L - exposição) e o nível mediano de Hg entre eles foi de 26,6µg/L. Nos demais (14,5%), os níveis de Hg estavam abaixo de 10µg/L (baixa exposição), com nível mediano de 5,8µg/L. Entre os 142 participantes que estavam expostos, 85 indivíduos (59,9%) apresentaram níveis de Hg entre 10µg/L e 30 µg/L (média exposição), 30 indivíduos (21,1%) apresentaram níveis de Hg entre 31 µg/L e 50 µg/L (alta exposição) e 27 indivíduos (19,0%) apresentaram níveis superiores a 50µg/L (exposição muito alta), dos quais 6 eram acima de 100µg/L.

Tabela 4- Análise descritiva dos níveis de Hg em amostras de populações ribeirinhas.

| | n | % | Níveis de Hg total no sangue (µg/L) | | | | |
|-----------------|-----|------|-------------------------------------|---------------|-------------|--------|--------|
| | | | Média | Desvio padrão | Mediana | Mínimo | Máximo |
| Até 10µg/L | 24 | 14,5 | 5,8 | 2,7 | 5,8 | 0,9 | 9,6 |
| Acima de 10µg/L | 142 | 85,5 | 35,3 | 27,0 | 26,6 | 10,0 | 140,8 |

Fonte: Autor (2024)

A tabela 5 apresenta a distribuição dos indivíduos estudados e a descrição dos níveis de Hg em relação às variáveis consideradas neste estudo. A maior parte dos participantes foram do sexo feminino (62%) e embora os homens representassem 38% dos participantes, apresentaram os níveis medianos de Hg mais elevados (26,6µg/L nos homens e 18,1 µg/L nas mulheres). A maioria dos indivíduos se autodeclarou indígena (46%), com tempo de escolaridade inferior a 12 anos de estudo (86,7%), declararam não fumar (92%), e não consumir bebida alcoólica (61%) e o nível mediano de Hg entre esses grupos foi de 22,0 µg/L, 25,1 µg/L, 21,9 µg/L, 25,2 µg/L, respectivamente. Em relação à frequência do consumo de peixe, 71% dos participantes relataram consumir peixe diariamente ou pelo menos três vezes por semana e o nível mediano de Hg neste subgrupo foi de 25,8 µg/L.

Tabela 5 -Perfil Sociodemográfico e níveis de Hg em uma amostra da população ribeirinha de Santarém.

| Variáveis Sociodemográficas | Níveis de Hg (µg/L) | | | | | | |
|---------------------------------------|---------------------|------|-------|---------------|-------------|--------|--------|
| | n | % | Média | Desvio padrão | Mediana | Máximo | Mínimo |
| Sexo (n=166) | | | | | | | |
| Masculino | 63 | 38 | 36,1 | 30,3 | 26,6 | 140,8 | 4,2 |
| Feminino | 103 | 62 | 27,9 | 24,5 | 18,1 | 124,4 | 0,9 |
| Raça (n=166) | | | | | | | |
| Negro | 4 | 2 | 27,4 | 26,6 | 19,2 | 65,4 | 5,7 |
| Branco | 14 | 8 | 51,6 | 39,6 | 36,8 | 140,8 | 13,2 |
| Parda | 72 | 43 | 26,8 | 24,4 | 20,2 | 137,8 | 0,9 |
| Indígena | 76 | 46 | 31,4 | 25,5 | 22,0 | 108,7 | 0,9 |
| Faixa etária (n=165) | | | | | | | |
| 18-20 anos | 4 | 2 | 30,3 | 32,3 | 17,3 | 77,7 | 9,1 |
| 21-40 anos | 48 | 29 | 29,1 | 26,8 | 22,1 | 108,7 | 4,3 |
| 41-60 anos | 75 | 45 | 28,8 | 25,0 | 20,5 | 137,8 | 0,9 |
| Mais de 60 anos | 38 | 23 | 37,9 | 31,0 | 27,2 | 140,8 | 5,6 |
| Escolaridade (n=166) | | | | | | | |
| Não estudou | 1 | 0,6 | - | - | - | 39,9 | - |
| Até 12 anos (Educação básica) | 144 | 86,7 | 33,3 | 28,0 | 25,1 | 140,8 | 0,9 |
| Acima de 12 anos (Ensino superior) | 21 | 12,7 | 14,8 | 10,7 | 13,1 | 41,2 | 0,9 |
| Tabagismo (n=166) | | | | | | | |
| Sim | 13 | 8 | 46,9 | 37,4 | 40,6 | 140,8 | 5,7 |
| Não | 153 | 92 | 29,7 | 25,7 | 21,9 | 137,8 | 0,9 |
| Elitismo (n=166) | | | | | | | |
| Sim | 65 | 39 | 27,9 | 25,0 | 20,5 | 137,8 | 3,2 |
| Não | 101 | 61 | 33,0 | 28,2 | 25,2 | 140,8 | 0,9 |
| Consumo de peixe (n=166) | | | | | | | |
| Baixa frequência | 48 | 29 | 22 | 18,6 | 16,9 | 96,2 | 0,9 |
| Alta frequência | 118 | 71 | 34,7 | 29,1 | 25,8 | 140,8 | 3,2 |

Fonte: Autor (2024)

Quanto ao consumo de peixe, notou-se que o grupo de participantes que relatou consumir peixe com maior frequência pertencia a faixa etária de 21-40 anos (46%), ao sexo feminino (60%), se autodeclarou indígena (47%), estudou até a educação básica (86%), não é fumante (94%), não consome bebida alcoólica (55%) e está exposta ao Hg (88%).

4.2- Genotipagem e frequência dos SNVs

Foi realizada a genotipagem de 160 amostras para o polimorfismo rs1801133 677C>T do gene *MTHFR* e 157 amostras para o polimorfismo rs2236225 c.1958G>A do gene *MTHFD1*. As frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos rs1801133 677C>T (*MTHFR*) e rs2236225 c.1958G>A (*MTHFD1*) estão descritas na tabela 6. No SNV rs1801133 c.677C>T, a frequência do alelo selvagem e do alelo mutante foi próxima, mas mesmo não ocorreu com a frequência alélica do rs2236225 c.1958G>A. Apesar disso, em ambos os SNVs o alelo selvagem foi o mais frequente.

Tabela 6- Frequência alélica e dos SNVs rs1801133 677C>T e rs2236225 c.1958G>A

| SNV | N | Alelo Selvagem | Alelo Mutante |
|-----------|-----|----------------|---------------|
| rs1801133 | 160 | C=0,51 | T=0,49 |
| rs2236225 | 157 | G=0,58 | A=0,42 |

Fonte: Autor (2024)

Foi verificada a distribuição dos genótipos, considerando os dois polimorfismos simultaneamente. 19,5% dos participantes eram duplo homocigotos selvagem (CC/GG) e 12,3% eram duplo homocigotos mutante (TT/AA) (Tabela 7).

Tabela 7- Distribuição dos genótipos dos SNVs rs1801133 677C>T e rs2236225 c.1958G>A.

| MTHFR | MTHFD1 | | | Total | χ^2 | P |
|--------------|----------|--------------|---------|-------|----------|-------|
| | Selvagem | Heterozigoto | Mutante | | | |
| Selvagem | 30 | 6 | 20 | 56 | 6.605 | 0,158 |
| Heterozigoto | 20 | 12 | 14 | 44 | | |
| Mutante | 29 | 5 | 19 | 53 | | |
| Total | 79 | 23 | 53 | 155 | | |

Fonte: Autor (2024)

4.2.1- Associação dos polimorfismos rs1801133 677C>T (gene *MTHFR*) e rs2236225 c.1958G>A (gene *MTHFD1*) e a exposição ao mercúrio

Os polimorfismos dos genes *MTHFR* e *MTHFD1* foram analisados nos participantes e suas frequências genotípicas foram distribuídas e categorizada em função da exposição mercurial (Tabela 8). Foi possível observar que no subgrupo dos

expostos, o genótipo homozigoto selvagem (CC) e homozigoto mutante (TT), para o gene *MTHFR*, apresentaram a mesma frequência de 30,6% cada e a mediana de Hg de 27,3 µg/L e 28,5 µg/L, respectivamente; contudo o nível mediano mais elevado de Hg foi encontrado entre os participantes com genótipo CT (26,2 µg/L). Em relação ao gene *MTHFD1*, ente os participantes expostos, os genótipos que apresentaram maior frequência foram: homozigoto selvagem (GG) (45%) e o homozigoto mutante (AA) (26%). Além disso, participantes com o genótipo GG apresentaram maior mediana de Hg (29,9 µg/L), enquanto os com genótipo AA apresentaram o menor nível mediano (21,4 µg/L). Quanto ao subgrupo de baixa exposição, o genótipo que apresentou maior frequência foi o CC (5,6%) e AA (7,6%) para os genes *MTHFR* e *MTHFD1*, respectivamente. O teste Kruskal-Wallis foi aplicado para comparar a mediana dos níveis de Hg entre os genótipos de cada polimorfismo. Não foi observada diferença significativa em relação os níveis de Hg entre os três genótipos do gene *MTHFR* ($\chi^2=3,694$; $p= 0,158$), contudo, foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os genótipos do gene *MTHFD1* ($\chi^2=11,932$; $p=0,0026$).

Tabela 8- Frequência genotípica em relação aos níveis de Hg.

| Níveis de Hg | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|-----|------|--------------|------|-------------|-----|-----------------|------------------|-------------------|-------|-----|----------|--------|
| Genótipo | N | % | > 10 µg/L | | ≤10 µg/L | | Média (µg/L) | Desvio Padrão | Mediana (µg/L) | Máx | Min | χ^2 | p |
| <i>MTHFR</i> | | | | | | | | | | | | | |
| CC | 58 | 36,3 | 49 | 30,6 | 9 | 5,6 | 31,2 | 24,6 | 27,3 | 137,8 | 0,9 | 3,694 | 0,1577 |
| CT | 47 | 29,4 | 40 | 25 | 7 | 4,4 | 34,8 | 26,6 | 26,2 | 108,7 | 4,2 | | |
| TT | 55 | 34,4 | 49 | 30,6 | 6 | 3,8 | 27,9 | 16,8 | 28,5 | 140,8 | 3,2 | | |
| Total | 160 | | | | | | | | | | | | |
| <i>MTHFD1</i> | | | | | | | | | | | | | |
| GG | 80 | 51,0 | 71 | 45,2 | 9 | 5,7 | 33,2 | 24,7 | 29,9 | 140,8 | 0,9 | 11,932 | 0,0026 |
| AG | 23 | 14,6 | 22 | 14 | 1 | 0,8 | 42,7 | 38,8 | 27,7 | 108,7 | 7,2 | | |
| AA | 54 | 34,4 | 42 | 26,7 | 12 | 7,6 | 23,6 | 17,2 | 21,4 | 101,6 | 1,9 | | |
| Total | 157 | | | | | | | | | | | | |

Fonte: Autor (2024)

Para verificar a associação entre a exposição mercurial e os polimorfismos, foi aplicado o teste qui-quadrado e o teste de Kruskal-Wallis considerando os modelos dominante (3 alelos mutantes) e recessivo (2 alelos mutantes) para cada um dos polimorfismos estudados.

Para o modelo dominante do SNV rs1801133 677C>T (Tabela 9), não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,624$) em relação a distribuição dos genótipos pelo tipo de exposição. Este resultado foi corroborado pelo teste do Kruskal-Wallis que não demonstrou diferença estatisticamente significativa ($\chi^2 = 0,081$, $p = 0,776$) entre os níveis medianos de Hg em relação aos genótipos (CC+TT x CC).

Tabela 9- Modelo dominante do SNV rs1801133 677C>T em relação a exposição mercurial.

| Variável | MTHFR rs1801133 c.677C>T | | | χ^2 | p |
|-----------------|--------------------------|-----|-------|----------|-------|
| | Modelo dominante | | | | |
| | CT+TT | CC | Total | | |
| Exposto | 49 | 89 | 138 | | |
| Baixa exposição | 9 | 13 | 22 | 0,239 | 0,624 |
| Total | 58 | 102 | 160 | | |

Fonte: Autor (2024)

A tabela 10 apresenta o resultado considerando o modelo recessivo do SNV rs1801133 677C>T em relação à exposição mercurial. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,45$) em relação à distribuição dos genótipos, assim como em relação aos níveis medianos de Hg ($\chi^2 = 3,055$, $p = 0,081$).

Tabela 10- Modelo recessivo do SNV rs1801133 677C>T em relação a exposição mercurial.

| Variável | MTHFR rs1801133 c.677C>T | | | χ^2 | p |
|-----------------|--------------------------|-------|-------|----------|------|
| | Modelo recessivo | | | | |
| | TT | CC+CT | Total | | |
| Exposto | 89 | 49 | 138 | | |
| Baixa exposição | 16 | 6 | 22 | 0,5704 | 0,45 |
| Total | 105 | 55 | 160 | | |

Fonte: Autor (2024)

Em relação ao SNV rs2236225 c.1958G>A, não houve diferença significativa ($p = 0,309$) considerando o modelo dominante (Tabela 11), assim como não houve diferença estatisticamente significativa em relação aos níveis medianos de Hg ($\chi^2 = 0,382$, $p = 0,537$).

Tabela 11- Modelo dominante do SNV rs2236225 c.1958G>A em relação a exposição mercurial.

| Variável | <i>MTHFD1</i> rs2236225 c.1958G>A | | | χ^2 | <i>p</i> |
|-----------------|-----------------------------------|----|-------|----------|----------|
| | Modelo dominante | | | | |
| | AG+AA | GG | Total | | |
| Exposto | 71 | 63 | 135 | | |
| Baixa exposição | 9 | 13 | 22 | 1,033 | 0,309 |
| Total | 80 | 77 | 157 | | |

Fonte: Autor (2024)

Diferentemente do modelo dominante, o modelo recessivo apresentou diferença significativa ($p = 0,032$) em relação a distribuição dos genótipos em função da exposição ao mercúrio, assim como em relação aos níveis de Hg ($p = 0,006$). Este resultado demonstra que o modelo recessivo está associado a menores níveis de Hg.

Tabela 12- Modelo recessivo do SNV rs2236225 c.1958G>A em relação a exposição mercurial.

| Variável | <i>MTHFD1</i> rs2236225 c.1958G>A | | | χ^2 | <i>p</i> |
|-----------------|-----------------------------------|-------|-------|----------|----------|
| | Modelo recessivo | | | | |
| | AA | GG+AG | Total | | |
| Exposto | 93 | 42 | 135 | | |
| Baixa exposição | 10 | 12 | 22 | 4,604 | 0,032 |
| Total | 103 | 54 | 157 | | |

Fonte: Autor (2024)

Foi aplicado novamente o teste de Kruskal-Wallis, mas agora considerando os dois polimorfismos juntos (Tabela 13). Os duplos heterozigotos ($n=12$) apresentaram a mediana mais elevada (44,15 $\mu\text{g/L}$) enquanto os duplos homozigotos mutantes ($n=19$) apresentaram os menores níveis medianos (13,2 $\mu\text{g/L}$). Ao comparar todas as combinações genótípicas foi observada uma diferença significativa em relação aos níveis medianos de Hg ($p= 0,018$).

Tabela 13- Genótipos dos SNVs rs1801133 677C>T e rs2236225 c.1958G>A em relação às medianas dos níveis de Hg.

| Gene | Genótipos | <i>MTHFD1</i> | | | χ^2 | <i>p</i> |
|--------------|-----------|---------------|-------------|-------------|----------|----------|
| | | GG | GA | AA | | |
| <i>MTHFR</i> | CC | 24,0 | 26,4 | 21,1 | 7,993 | 0,01 |
| | CT | 29,2 | 44,1 | 17,4 | | |
| | TT | 30,9 | 45,4 | 13,2 | | |

Fonte: Autor (2024)

Comparando as medianas dos níveis de Hg entre os modelos dominantes e recessivos, conjuntamente, dos genes estudados (Tabela 14), foi possível notar que os níveis medianos de Hg foram mais altos entre aqueles que apresentavam modelo dominante para ambos os polimorfismos (19,09 µg/L) em comparação aos que eram do modelo recessivo para ambos os polimorfismos (13,2 µg/L). Este resultado sugere que os níveis medianos de Hg são maiores entre aqueles que tem um número maior de alelos mutantes, o que resultaria em uma menor atividade enzimática.

Tabela 14- Modelos dominantes e recessivos dos SNVs rs1801133 677C>T e rs2236225 c.1958G>A

| | | Mediana dos níveis de Hg (µg/L) | |
|------------------|-------|---------------------------------|------------------------|
| | | Modelo dominante AG+AA | Modelo recessivo AA |
| Modelo dominante | CT+TT | 19,0 | 14,0 |
| Modelo recessivo | TT | 15,5 | 13,2 |

Fonte: Autor (2024)

Foi realizada uma análise de regressão linear uni e multivariada para verificar a associação dos polimorfismos e os níveis de Hg, considerando também as variáveis idade, sexo e consumo de peixe (se sim ou se não) (Tabela 15). Para esta análise foram considerados diferentes intervalos em relação aos níveis de Hg.

Tabela 15- Análise uni e multivariada dos níveis de Hg.

| <i>UNIVARIADA</i> | <i>Baixa Exposição</i> | <i>Expostos</i> | | |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | <i>Até 10 µg/L</i> | <i>10-30 µg/L</i> | <i>31-50 µg/L</i> | <i>Acima de 50 µg/L</i> |
| <i>MTHFR Dominante</i> | R ² = 0,2265 | R ² = 0,0344 | R ² = 0,0634 | R ² = 0,0008 |
| | p = 0,0252 | p = 0,0972 | p = 0,1796 | p = 0,8879 |
| <i>MTHFR Recessivo</i> | R ² = 0,1355 | R ² = 0,1156 | R ² = 0,0004 | R ² = 0,1001 |
| | p = 0,0918 | p = 0,0019 | p = 0,9217 | p = 0,1079 |
| <i>MTHFD1 Dominante</i> | R ² = 0,0221 | R ² = 0,0016 | R ² = 0,1113 | R ² = 0,0007 |
| | p = 0,5089 | p = 0,7286 | p = 0,0769 | p = 0,8966 |
| <i>MTHFD1 Recessivo</i> | R ² = 0,0077 | R ² = 0,0016 | R ² = 0,0228 | R ² = 0,0009 |
| | p = 0,6977 | p = 0,7247 | p = 0,4343 | p = 0,8847 |
| <i>MTHFR Dom + MTHFD1 Rec</i> | R ² = 0,2275 | R ² = 0,0239 | R ² = 0,1106 | R ² = 0,0012 |
| | p = 0,0861 | p = 0,4093 | p = 0,2179 | p = 0,9860 |

Tabela 15 - continuação

| UNIVARIADA | Baixa Exposição | Expostos | | |
|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Até 10 µg/L | 10-30 µg/L | 31-50 µg/L | Acima de 50 µg/L |
| <i>MTHFR</i> Dom + <i>MTHFD1</i> Dom | R ² = 0,2275 | R ² = 0,0233 | R ² = 0,1338 | R ² = 0,0016 |
| | p = 0,0861 | p = 0,4173 | p = 0,1546 | p = 0,9813 |
| <i>MTHFR</i> Rec + <i>MTHFD1</i> Dom | R ² = 0,1486 | R ² = 0,1145 | R ² = 0,1142 | R ² = 0,1101 |
| | p = 0,2168 | p = 0,0111 | p = 0,2068 | p = 0,2466 |
| <i>MTHFR</i> Rec + <i>MTHFD1</i> Rec | R ² = 0,1366 | R ² = 0,1148 | R ² = 0,0249 | R ² = 0,1029 |
| | p = 0,2477 | p = 0,0110 | p = 0,7204 | p = 0,2716 |
| MULTIVARIADA | Baixa Exposição | Expostos | | |
| | Até 10 µg/L | 10-30 µg/L | 31-50 µg/L | Acima de 50 µg/L |
| Sem os SNVs* | R ² = 0,3453 | R ² = 0,1157 | R ² = 0,0597 | R ² = 0,0775 |
| | p = 0,0498 | p = 0,0206 | p = 0,6526 | p = 0,5948 |
| <i>MTHFR</i> Dominante | R ² = 0,5388 | R ² = 0,1435 | R ² = 0,1271 | R ² = 0,0837 |
| | p = 0,0082 | p = 0,0180 | p = 0,4732 | p = 0,7341 |
| <i>MTHFR</i> Recessivo | R ² = 0,4796 | R ² = 0,2513 | R ² = 0,0601 | R ² = 0,1327 |
| | p = 0,0197 | p = 0,0002 | p = 0,8071 | p = 0,5138 |
| <i>MTHFD1</i> Dominante | R ² = 0,3487 | R ² = 0,1231 | R ² = 0,2579 | R ² = 0,0780 |
| | p = 0,1036 | p = 0,0430 | p = 0,1143 | p = 0,7605 |
| <i>MTHFD1</i> Recessivo | R ² = 0,3470 | R ² = 0,1221 | R ² = 0,0636 | R ² = 0,0781 |
| | p = 0,1055 | p = 0,0446 | p = 0,8012 | p = 0,7599 |
| <i>MTHFR</i> Dom + <i>MTHFD1</i> Rec | R ² = 0,5476 | R ² = 0,1402 | R ² = 0,1452 | R ² = 0,0875 |
| | p = 0,0172 | p = 0,0525 | p = 0,5735 | p = 0,8415 |
| <i>MTHFR</i> Dom + <i>MTHFD1</i> Dom | R ² = 0,5402 | R ² = 0,1402 | R ² = 0,2656 | R ² = 0,0846 |
| | p = 0,0193 | p = 0,0524 | p = 0,1834 | p = 0,8512 |
| <i>MTHFR</i> Rec + <i>MTHFD1</i> Dom | R ² = 0,4812 | R ² = 0,2450 | R ² = 0,2637 | R ² = 0,1351 |
| | p = 0,0441 | p = 0,0011 | p = 0,1875 | p = 0,6603 |
| <i>MTHFR</i> Rec + <i>MTHFD1</i> Rec | R ² = 0,4973 | R ² = 0,2468 | R ² = 0,0648 | R ² = 0,1335 |
| | p = 0,0356 | p = 0,0010 | p = 0,8964 | p = 0,6666 |

*consumo de peixe, sexo e idade.

Os resultados indicam que a associação entre os polimorfismos e a exposição mercurial foi observado em níveis de Hg até 30 µg/L. Para níveis de Hg elevados não foi possível demonstrar a associação. Além disso, foi possível observar que a associação dos polimorfismos com a exposição mercurial ficou mais forte quando se considerou conjuntamente as variáveis idade, sexo e consumo de peixe. No intervalo de exposição 10 a 30 µg/L todas as combinações testadas se mostraram estatisticamente significativa e o coeficiente R² foi mais alto quando o polimorfismo rs1801133 677C>T do gene *MTHFR*, modelo recessivo, estava presente.

5- DISCUSSÃO

5.1- Perfil epidemiológico

Embora o Hg seja um componente naturalmente presente no meio ambiente, o aumento da sua remobilização no ambiente tem, em parte, sido causada por ações antropogênicas, como a exploração do ouro. A questão problemática dos garimpos teve início a partir dos anos 70 e foi responsável pela emissão de mais de 200 mil toneladas de Hg no ambiente (LACERDA; SOLOMONS, 1998). Contudo, no período de 2016 a 2020 foi realizado um monitoramento de atividades ilegais na Amazonia e foi observado que os níveis de Hg têm aumentado não somente pelo garimpo, mas pelas invasões, grilagem de terras e a expansão agrícola (FELLOWS *et al.*, 2021)

Assim, os estudos sobre exposição humana ao Hg refletem a realidade a qual a população da Amazônia vive. Frente isso, essa pesquisa demonstrou que os participantes possuíam a concentração mediana de Hg cerca de três vezes superior ao limite recomendado pela OMS. Esse estudo reforça o que trabalhos anteriores já demonstraram, que as populações da Amazônia estão ambientalmente expostas ao Hg (AKS *et al.*, 1995; BOISCHIO *et al.*, 1996; PINHEIRO *et al.*, 2006; MARQUES *et al.*, 2016; COSTA JÚNIOR *et al.*, 2018; MENESES *et al.*, 2022).

A Amazônia dispõe de grande biodiversidade, principalmente em espécie aquática (JÉZÉQUEL *et al.*, 2020). E isso reflete também nos hábitos alimentares, a maioria dos participantes (71%) desse estudo relatou consumir peixe com frequência. Begossi (2019) já apresentou que a população dessa área se beneficia dos peixes para compor suas refeições, tornando-se assim um fator de exposição, visto que os peixes retêm MeHg nos músculos (CADAVID-MUÑOZ; ARANGO-RUIZ, 2020).

Nesse estudo, 71% dos participantes que relatou consumir peixe em alta frequência apresentou níveis de Hg >10 µg/L. O estudo de Basta e colaboradores (2021), em populações indígenas, demonstrou que as famílias consumiam peixe até três vezes por semana e o trabalho de Diaz *et al.* (2020), demonstrou que há associação entre o consumo de peixe e os elevados níveis de Hg. Nesse trabalho, as mulheres que consumiam peixe diariamente apresentaram nível 33 vezes maior de Hg no cabelo, em comparação às que informaram não consumir (DIAZ *et al.*, 2020). Um estudo de Mendes *et al.* (2021) em populações do rio Madeira também

demonstrou que os níveis médios de Hg eram maiores em populações que relataram consumir peixe frequentemente.

Nesse estudo, até quem relatou consumir peixe em baixa frequência apresentou níveis medianos de Hg acima do recomendado pela OMS (16,9 µg/L). Esse dado chama atenção porque mesmo a frequência desse consumo ser baixa, esses níveis de Hg já estão acima do limite de segurança relatado pela OMS e que essa exposição crônica ao Hg pode ser muito prejudicial à saúde, já que ainda pode desenvolver efeitos tóxicos para os indivíduos expostos (AMORIM *et al.*, 2000; CRESPO-LÓPEZ *et al.*, 2007; CRESPO-LÓPEZ *et al.*, 2009). Frente a isso, cabe ressaltar que diversos fatores podem influenciar a toxicocinética e os efeitos clínicos do Hg, e esses fatores são influenciados por fatores genéticos (TCHOUNWOU *et al.*, 2003).

5.2- Perfil molecular

Diversos fatores podem influenciar o efeito tóxico da exposição à xenobióticos, entre eles a dose, o tempo e duração da exposição, a forma química do agente. Além disso, outros fatores contribuem para a modulação da suscetibilidade individual, como a idade, sexo e dieta, mas além disso o genótipo possui um papel muito importante nessa modulação, pois ele pode constituir fenótipos desintoxicantes com função de regulação ou metabolizadores fracos, com baixa ou nenhuma atividade enzimática (GUNDANCKER, GENCIK, HENGSTSCHLÄGER, 2010).

Entre os genes presentes no metabolismo do ácido fólico, foi escolhido um gene envolvido nas conversões de THF (*MTHFD1*) para torná-lo substrato precursor da substância utilizada para a doação de grupamento metil e outro gene envolvido na redução dessa substância (*MTHFR*) para, enfim ser utilizada na via da remetilação. A via da remetilação é importante para converter a Hcy em metionina e, assim, evitar o seu acúmulo no organismo. O acúmulo de Hcy está associado a diversos problemas de saúde como cardiovascular e já foi demonstrado que os portadores do alelo T apresentaram níveis mais elevados de homocisteína no organismo.

O gene *MTHFR* é extensivamente estudado para avaliar a sua associação à diversas doenças e muitas dessas interações demonstram a possibilidade de os polimorfismos desse gene alterarem tanto os níveis plasmáticos de homocisteína como os metabolitos do folato (AUSTIN, 2014). Assim, devido a sua contribuição no

sistema redox-tiol, foi observado que alterações na concentração de Hcy podem alterar funções fisiológicas bem como prejudicar a função de enzimas antioxidantes como a glutatona peroxidase (LANGAMAN, 1999; STEHOUWER E JAKOBS, 1998).

Os participantes deste estudo que possuem o genótipo TT, apresentaram a mediana dos níveis de Hg mais elevada (28,50 µg/L) embora não tenha sido encontrado diferença estatística entre os níveis de Hg e os genótipos desse SNV. Apesar disso, pode se considerar que os polimorfismos podem influenciar não apenas os níveis dos metais no organismo, mas também a sensibilidade individual ou até mesmo a severidade dos efeitos dessa exposição, como no caso de pessoas portadoras do alelo T que apresentaram maior sensibilidade a metais pesados e outras toxinas presentes no ambiente (JONEIDI et al, 2019; WLODARCZYK *et al.*, 2014).

O gene *MTHFD1* expressa a enzima trifuncional MTHFD1 que também é importante para a via de remetilação da homocisteína e seu polimorfismo está associado a níveis de altos Hcy (HOL *et al.*, 1998). Na amostra estudada neste trabalho, houve associação estatística no modelo recessivo do *MTHFD1*, o que significa que o genótipo mutante (AA) apresentou menores níveis de Hg em relação ao modelo dominante. E quando considerado simultaneamente a homozigose mutante do *MTHFR* e *MTHFD1*, foi encontrado a menor concentração mediana de Hg (13,2 µg/L).

Uma hipótese para a explicação dos níveis de Hg serem mais baixos no duplo mutante e no modelo recessivo do SNV rs2236225 c.1958G>A do gene *MTHFD1* considera um dos efeitos da exposição mercurial no organismo: o estresse oxidativo. Assim, em as condições oxidativas o organismo aumenta o nível de EROs e induz feedback negativo na MTR (CHEN *et al.*, 1995) e betaina-homocisteína S-metiltransferase (BHMT)(CASTRO *et al.*, 2008), que são enzimas catalizadoras na regeneração da metionina a partir da homocisteína, ao mesmo tempo em que dá o feedback positivo para a CBS – primeira enzima na via de transufuração. Dessa forma, ocorre aumento no fluxo da via da transufuração para manter o *pool* intracelular de GSH (MOSHAROV, 2000 FINKELSTEIN, 1998).

Em outras palavras, como o polimorfismo do gene *MTHFD1* tem atividade enzimática reduzida, haveria menos disponibilidade de 5,10MTHF para a *MTHFR* reduzir a 5MTHF e doar grupamento metil para a remetilação da Hcy em metionina,

favorecendo o acúmulo de Hcy. De forma semelhante, a *MTHFR* com atividade enzimática reduzida tem o mesmo efeito sobre a via de remetilização. Assim, no caso da exposição mercurial, quando os indivíduos que possuem os polimorfismos e estão expostos apresentam necessidade de GSH, haveria maior síntese de GSH comparado aos que possuem os genótipos selvagens devido a diferença na disponibilidade de Hcy entre os genótipos.

Portanto, é possível afirmar, com esse trabalho, que o polimorfismo no gene *MTHFD1* desempenha um papel importante na exposição mercurial, mas além dele outros fatores também podem influenciar os níveis de Hg. E para comprovar o mecanismo de proteção desses genes na exposição mercurial, é necessário que sejam realizados mais estudos em diferentes pontos da via metabólica do ácido fólico, pois existem outros genes que podem agir em sinergia na toxicocinética do Hg, podendo impactar de forma diferente a eliminação do Hg, como alguns polimorfismos nos genes das GSTs ou das selenoproteínas, ABC s, LATs e OATs que podem interagir e influenciar conjuntamente o desfecho da exposição mercurial (ANDREOLI, SPROVIERI, 2017). Além disso, as vitaminas que são utilizadas como cofatores nas vias de remetilização e transufuração devem ser estudadas pois podem ter associação com os níveis de Hg.

Foi observado na análise de regressão linear, que a associação dos polimorfismos com a exposição mercurial foi forte e estatisticamente significativa ($R^2 = 0,1157$; $p = 0,0206$), quando considerados também as variáveis sexo, idade e consumo de peixe, que já comprovamos em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa que são fatores que sempre estão relacionadas com a exposição ao mercúrio. A associação foi ainda mais forte ($R^2 = 0,2513$; $p = 0,0002$) quando considerado o polimorfismo rs1801133 677C>T do gene *MTHFR*, corroborando a função do genótipo TT, seu efeito na síntese de cisteína e consequentemente na síntese de GSH. A redução da atividade enzimática nos portadores do genótipo TT, resulta em um aumento dos níveis da Hcy, que favorece a síntese da GSH. No contexto da exposição ao Hg, uma possível explicação para o resultado observado seria que o genótipo TT favorece a síntese de GSH, e, portanto, uma redução dos níveis de Hg pois estaria favorecendo a detoxicação do Hg, já que a GSH faz parte do sistema de defesa antioxidante.

Um resultado interessante, foi que a associação entre os polimorfismos e a exposição mercurial foi evidenciado em níveis de Hg até 30 μ g/L. Para níveis acima do

nível mediano observado, não foi possível comprovar a associação. Este resultado, corrobora um resultado anterior do nosso grupo de pesquisa, com genes da via da glutatona, que mostra que a associação existe, no entanto, quando os níveis de Hg são muito altos, o modelo estatístico não é suficiente para comprovar a associação. A presença do polimorfismo interfere na susceptibilidade individual em relação ao acúmulo de Hg no corpo humano (bioacumulação).

6- CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com a nossa revisão de literatura, este é o primeiro estudo com o objetivo de investigar a associação entre os polimorfismos dos genes *MTHFR* e *MTHFD1* e os níveis de Hg, com populações da região Amazônica. Frente a isso, esse estudo demonstrou, que todos os participantes da pesquisa estão expostos ao Hg e que o nível mediano de Hg está acima do recomendado pela OMS.

Em relação ao objetivo desse estudo, foi observado associação entre os polimorfismos estudados e os níveis de Hg, conforme a hipótese do estudo. O genótipo TT (677C>T gene *MTHFR*) e a combinação TT/AA (duplo mutantes) demonstraram associação com níveis mais baixos de Hg, quando comparado aos genótipos duplo homocigoto selvagem e heterocigotos. Contudo, ainda são necessários mais estudos para entender melhor qual é efeito destes e outros genes da via metabólica do ácido fólico sobre níveis de Hg, principalmente considerando os altos níveis de Hg observados nas populações amazônicas.

REFERÊNCIAS

A.A.P. BOISCHIO; D.S. HENSHEL. Risk assessment of mercury exposure through fish consumption by the riverside people in the Madeira Basin, Amazon, 1991. **PubMed**, v. 17, n. 1, p. 169–75, 1 jan. 1996.

AKS, S. E. et al. Fractional Mercury Levels in Brazilian Gold Refiners and Miners. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 33, n. 1, p. 1–10, jan. 1995.

ALMEIDA, M. D. et al. Mercury loss from soils following conversion from forest to pasture in Rondônia, Western Amazon, Brazil. **Environmental Pollution**, v. 137, n. 2, p. 179–186, set. 2005.

AMORIM, M. I. M. et al. Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 72, n. 4, p. 497–507, dez. 2000.

ANDREOLI, V.; SPROVIERI, F. Genetic Aspects of Susceptibility to Mercury Toxicity: An Overview. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 1, p. 93, 18 jan. 2017.

AUSTIN, D. et al. Genetic variation associated with hypersensitivity to mercury. **Toxicology International**, v. 21, n. 3, p. 236, 2014.

BALA, A. et al. Relationship of MTHFD1 G1958A and CBS 844ins68 polymorphism with congenital heart defects in North Indian population (Jammu and Kashmir): A case-control study. **Indian journal of medical sciences/Indian Journal of Medical Sciences (Print)**, v. 74, p. 126–133, 4 nov. 2022.

BALLATORI, N.; CLARKSON, T. W. Developmental Changes in the Biliary Excretion of Methylmercury and Glutathione. **Science**, v. 216, n. 4541, p. 61–63, 2 abr. 1982.

BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H. G. DE; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1352–1360, dez. 2006.

BARBOSA, P. R. et al. Association between decreased vitamin levels and MTHFR, MTR and MTRR gene polymorphisms as determinants for elevated total homocysteine concentrations in pregnant women. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 8, p. 1010–1021, 1 ago. 2008.

BASTOS, W. R. et al. Mercury in the environment and riverside population in the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 368, n. 1, p. 344–351, 1 set. 2006.

BECKERS, F.; RINKLEBE, J. Cycling of mercury in the environment: Sources, fate, and human health implications: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 9, p. 693–794, 3 maio 2017.

BLUNDELL, G. et al. Homocysteine mediated endothelial cell toxicity and its amelioration. **Atherosclerosis**, v. 122, n. 2, p. 163–172, maio 1996.

BOTTO, L. D.; YANG, Q. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variants and Congenital Anomalies: A HuGE Review. **American Journal of Epidemiology**, v. 151, n. 9, p. 862–877, 1 maio 2000.

BRODY, L. C. et al. A Polymorphism, R653Q, in the Trifunctional Enzyme Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase/Methenyltetrahydrofolate Cyclohydrolase/Formyltetrahydrofolate Synthetase Is a Maternal Genetic Risk Factor for Neural Tube Defects: Report of the Birth Defects Research Group. **The American Journal of Human Genetics**, v. 71, n. 5, p. 1207–1215, nov. 2002.

CADAVID-MUÑOZ, N.; ARANGO-RUIZ, Á. El mercurio como contaminante y factor de riesgo para la salud humana. **Revista Lasallista de Investigación**, v. 17, n. 2, p. 280–296, 31 mar. 2021.

CALLEJON, G. et al. Genotypes of the C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene as a cause of human spontaneous embryo loss. **Human Reproduction**, v. 22, n. 12, p. 3249–3254, 18 out. 2007.

CANDITO, M. et al. Nutritional and genetic determinants of vitamin B and homocysteine metabolisms in neural tube defects: A multicenter case–control study. **American Journal of Medical Genetics**, v. 146A, n. 9, p. 1128–1133, 1 jan. 2008.

CARDONA, H. et al. [Relationship between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and homocysteine levels in women with recurrent pregnancy loss: a nutrigenetic perspective]. **PubMed**, v. 23, n. 3, p. 277–82, 19 jun. 2008.

CARDOSO, I. L. **Homocisteína e a doença cardiovascular**. Dissertação—Revista da Faculdade de Ciências da Saúde: [s.n.].

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15–25, jan. 2013.

CARROLL, N. et al. Analysis of the MTHFD1 promoter and risk of neural tube defects. **Human Genetics**, v. 125, n. 3, p. 247–256, 8 jan. 2009.

CASTRO, C.; MILLIAN, N. S.; GARROW, T. A. Liver betaine-homocysteine S-methyltransferase activity undergoes a redox switch at the active site zinc. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 472, n. 1, p. 26–33, 1 abr. 2008.

CHAN, P. H. Y. et al. Association between genetic variations in GSH-related and MT genes and low-dose methylmercury exposure in children and women of childbearing age: a pilot study. **Environmental Research**, v. 187, p. 109703, ago. 2020.

CHEN, Z.; CHAKRABORTY, S.; BANERJEE, R. Demonstration That Mammalian Methionine Synthases Are Predominantly Cobalamin-loaded. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 33, p. 19246–19249, ago. 1995.

CHEN, Z., CHAKRABORTY, S., AND BANERJEE, R. (1995) **J. Biol. Chem.** 270, 19246- 1924

CLARKSON, T. W. The Toxicology of Mercury. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 34, n. 4, p. 369–403, jan. 1997.

COMHAIR SUZY A.A.; ERZURUM, S. C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **American Journal of Physiology-lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, n. 2, p. L246–L255, 1 ago. 2002.

CONTRERAS FSM. Tomo I – Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición. In: Hernández A(eds). Tratado de Nutrición 2005; 1294 p.

COSTA JUNIOR, J. M. F. et al. Teores de mercúrio em cabelo e consumo de pescado de comunidades ribeirinhas na Amazônia brasileira, região do Tapajós. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, n. 3, p. 805–812, mar. 2018.

CRESPO-LÓPEZ et al. Methylmercury genotoxicity: A novel effect in human cell lines of the central nervous system. **Environment International**, v. 33, n. 2, p. 141–146, 1 fev. 2007.

CRESPO-LÓPEZ, M. E. et al. Mercury and human genotoxicity: Critical considerations and possible molecular mechanisms. **Pharmacological Research**, v. 60, n. 4, p. 212–220, out. 2009.

CUI, S. et al. Folic acid modulates VPO1 DNA methylation levels and alleviates oxidative stress-induced apoptosis in vivo and in vitro. **Redox Biology**, v. 19, p. 81–91, out. 2018.

DIAZ, S. M. et al. Factors Associated with High Mercury Levels in Women and Girls from The Mojana Region, Colombia, 2013–2015. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 6, p. 1827, 11 mar. 2020.

DÓREA, J. G.; BARBOSA, A. C.; SILVA, G. S. Fish mercury bioaccumulation as a function of feeding behavior and hydrological cycles of the Rio Negro, Amazon. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 142, n. 3-4, p. 275–283, 1 mar. 2006.

DUCE et al. S-adenosyl-L-methionine synthetase and phospholipid methyltransferase are inhibited in human cirrhosis. **Hepatology**, v. 8, n. 1, p. 65–68, 1 jan. 1988.

E CERNICHIARI et al. Monitoring methylmercury during pregnancy: maternal hair predicts fetal brain exposure. **PubMed**, v. 16, n. 4, p. 705–10, 1 jan. 1995.

ERCAL, N.; GURER-ORHAN, H.; AYKIN-BURNS, N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 6, p. 529–539, 1 dez. 2001.

FABRIS, C. et al. MTHFR C677T Polymorphism and Risk of HCC in Patients With Liver Cirrhosis: Role of Male Gender and Alcohol Consumption. v. 33, n. 1, p. 102–107, 1 jan. 2009.

FARINA, M.; ASCHNER, M.; ROCHA, J. B. T. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 256, n. 3, p. 405–417, nov. 2011.

FELLOWS, M. et al. ipam.org.br ipam_amazonia IPAMamazonia ipam_amazonia IPAMclima **AMAZÔNIA EM CHAMAS: DESMATAMENTO E FOGO NAS TERRAS INDÍGENAS** **Resumo**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://ipam.org.br/wp-content/uploads/2021/03/Amazo%CC%82nia-em-Chamas-6-TIs-na-Amazo%CC%82nia.pdf>>.

FERNANDES AZEVEDO, B. et al. Toxic Effects of Mercury on the Cardiovascular and Central Nervous Systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, n. 949048, p. 1–11, 2012.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, mar. 1997.

FIELD, M. S. et al. Reduced MTHFD1 Activity in Male Mice Perturbs Folate- and Choline-Dependent One-Carbon Metabolism as Well as Transsulfuration. **The Journal of Nutrition**, v. 143, n. 1, p. 41–45, 28 nov. 2012.

FIELD, M. S. et al. Human mutations in methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1 impair nuclear de novo thymidylate biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 2, p. 400–405, 29 dez. 2014.

FINKELSTEIN, J. D. Methionine metabolism in mammals: The biochemical basis for homocystinuria. **Metabolism**, v. 23, n. 4, p. 387–398, abr. 1974.

FINKELSTEIN, J. D. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. **European journal of pediatrics**, v. 157 Suppl 2, p. S40-4, 1998.

FONSECA, V.; GUBA, S. C.; FINK, L. M. Hyperhomocysteinemia and the Endocrine System: Implications for Atherosclerosis and Thrombosis. **Endocrine Reviews**, v. 20, n. 5, p. 738–759, 1 out. 1999.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular aspects of medicine**, v. 30, n. 1-2, p. 1–12, 2009.

FRANCO et al. Mercurial-Induced Hydrogen Peroxide Generation in Mouse Brain Mitochondria: Protective Effects of Quercetin. **Chemical Research in Toxicology**, v. 20, n. 12, p. 1919–1926, 19 out. 2007.

FROESE, D. S. et al. Mutation Update and Review of Severe Methylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency. **Human Mutation**, v. 37, n. 5, p. 427–438, 1 maio 2016.

FROSST, P. et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nature Genetics**, v. 10, n. 1, p. 111–113, maio 1995.

GHODKE YOGITA et al. Profiling single nucleotide polymorphisms (SNPs) across intracellular folate metabolic pathway in healthy Indians. **PubMed**, 1 mar. 2011.

GOYER, R. A. TOXIC AND ESSENTIAL METAL INTERACTIONS. **Annual Review of Nutrition**, v. 17, n. 1, p. 37–50, jul. 1997.

GREEN, R.; MITRA, A. D. **Folate, Cobalamin, and Megaloblastic Anemias**. Disponível em: <<https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2962§ionid=252527441>>.

GROTTO, D. et al. Low level and sub-chronic exposure to methylmercury induces hypertension in rats: nitric oxide depletion and oxidative damage as possible mechanisms. **Archives of Toxicology**, v. 83, n. 7, p. 653–662, 1 jul. 2009.

GUENTHER et al. The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. **Nature Structural Biology**, v. 6, n. 4, p. 359–365, 1 abr. 1999.

GUNDACKER, C.; GENCIK, M.; HENGSTSCHLÄGER, M. The relevance of the individual genetic background for the toxicokinetics of two significant neurodevelopmental toxicants: Mercury and lead. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 705, n. 2, p. 130–140, out. 2010.

GUO, J. et al. The maternal folate hydrolase gene polymorphism is associated with neural tube defects in a high-risk Chinese population. **Genes & Nutrition**, v. 8, n. 2, p. 191–197, 24 ago. 2012.

GUO, X. et al. Protective Effect of Folic Acid on Oxidative DNA Damage. **Medicine**, v. 94, n. 45, p. e1872, nov. 2015.

HAYASHI, I. et al. Folate Deficiency Induces Cell-Specific Changes in the Steady-State Transcript Levels of Genes Involved in Folate Metabolism and 1-Carbon Transfer Reactions in Human Colonic Epithelial Cells. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 3, p. 607–613, 1 mar. 2007.

HENNING, S. M. et al. Vitamins C, E and A and Heme Oxygenase in Rats Fed Methyl/Folate-Deficient Diets¹¹This work was supported by NIH grant CA42710-10 and Westreco Inc., Van Nuys, CA. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 23, n. 6, p. 936–942, 1 jan. 1997.

HERNÁNDEZ JULIA ÁLVAREZ ; ANGEL GIL FERNÁNDEZ; CULEBRAS, M. **Tratado de nutrición : nutrición clínica**. Madrid: Medica Panamericana, 2010.

HOL, F. A. et al. Molecular genetic analysis of the gene encoding the trifunctional enzyme MTHFD (methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase, methenyltetrahydrofolate-cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase) in patients with neural tube defects. **Clinical genetics**, v. 53, n. 2, p. 119–125, 1 fev. 1998.

IVANOV, A. et al. Genetic Variants in Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase and Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase Influence Biomarkers of Choline Metabolism When Folate Intake Is Restricted. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 109, n. 2, p. 313–318, fev. 2009.

JÉZÉQUEL, C. et al. A database of freshwater fish species of the Amazon Basin. **Scientific Data**, v. 7, n. 1, p. 96, 19 mar. 2020.

JONEIDI, Z. et al. The impact of genetic variation on metabolism of heavy metals: Genetic predisposition? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 113, p. 108642, maio 2019.

KANG, S. S. et al. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. **PubMed**, v. 43, n. 4, p. 414–21, 1 out. 1988.

KEHRER, J. P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, v. 149, n. 1, p. 43–50, 14 ago. 2000.

KNOWLES, L.; MORRIS, A. A. M.; WALTER, J. H. Treatment with mefolinate (5-methyltetrahydrofolate), but not folic acid or folinic acid, leads to measurable 5-methyltetrahydrofolate in cerebrospinal fluid in methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **JIMD Reports**, Volume 29, 2016, 103-107.

KONNO, M. et al. The one-carbon metabolism pathway highlights therapeutic targets for gastrointestinal cancer (Review). **International Journal of Oncology**, v. 50, n. 4, p. 1057–1063, 20 fev. 2017.

KRUSZYNA, Ł. et al. Polymorphic variants of folate metabolism genes and the risk of laryngeal cancer. **Molecular Biology Reports**, v. 37, n. 1, p. 241–247, 1 ago. 2009.

LACERDA, L. D.; SOLOMONS, W. Mercury from gold and silver mining: a chemical time bomb? 1. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1998.

LANGMAN, L. J.; DAVID E.C. COLE. Homocysteine: cholesterol of the 90s? **Clinica chimica acta (Print)**, v. 286, n. 1-2, p. 63–80, 1 ago. 1999.

LI, Q. et al. S-Adenosylmethionine Attenuates Oxidative Stress and Neuroinflammation Induced by Amyloid- β Through Modulation of Glutathione Metabolism. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 58, n. 2, p. 549–558, 11 maio 2017.

LU, N. et al. Molecular cloning and expression analysis of glutathione peroxidase and glutathione reductase from *Gracilaria lemaneiformis* under heat stress. **Journal of applied phycology**, v. 25, n. 6, p. 1925–1931, 23 mar. 2013.

LU, S. C.; MATO, J. M. S-Adenosylmethionine in cell growth, apoptosis and liver cancer. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 23, n. s1, p. S73–S77, mar. 2008.

LUCENA, G. M. et al. Interação álcool e metilmercúrio: um fator de risco na gravidez. **Brasília méd**, 2010.

LUMLEY, J. et al. Periconceptional supplementation with folate and/or multivitamins for preventing neural tube defects. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 13 abr. 2011.

MACFARLANE, A. J. et al. Mthfd1 Is an Essential Gene in Mice and Alters Biomarkers of Impaired One-carbon Metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 3, p. 1533–1539, 1 jan. 2009.

MAHAN, LK, ESCOTT-SUTMP S. Krause, Alimentos Nutrição e Dietoterapia. 9ª ed. São Paulo, Editora Roca, 1998.

MARCHIORO, A. A.; SÁ-NAKANISHI, A. B.; CAMPANERUT, P. A. Z. Consequências da deficiência de ácido fólico. **Revista Uningá**, v. 22, n. 1, 21 dez. 2009.

MARQUES, R. C. et al. Traditional living in the Amazon: Extended breastfeeding, fish consumption, mercury exposure and neurodevelopment. **Annals of Human Biology**, v. 43, n. 4, p. 360–370, 21 jun. 2016.

MASLACHAH, L.; SUGIHARTUTI, R.; KURNIASANTI, R. The Inhibition of Vitamin E (α -tocopherol) Antioxidant to Superoxide Radical Reactive Oxygen Species ($O_2^{\cdot-}$) Production on the White Rat (*Rattus norvegicus*) Stressed by an Electric Shock. **Media Kedokt. Hewan**, 2008, 24.1: 21-26

MATO, J. M. et al. S-Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function. **The FASEB Journal**, v. 16, n. 1, p. 15–26, jan. 2002.

MEISTER, A. Glutathione; Metabolism and function via the γ -glutamyl cycle. **Life Sciences**, v. 15, n. 2, p. 177–190, jul. 1974.

MEISTER, A. Glutathione metabolism and its selective modification. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 33, p. 17205–17208, nov. 1988.

MENDES, V. A. et al. Mercury in blood, hair, and feces from subsistence fish-eating riverines of the Madeira River Basin (Western Amazon). **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 67, p. 126773, 1 set. 2021.

MIRANDA-VILELA, A. Role of Polymorphisms in Factor V (FV Leiden), Prothrombin, Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 (PAI-1), Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) and Cystathionine β -Synthase (CBS) Genes as Risk Factors for Thrombophilias. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 997–1006, 1 set. 2012.

MENESES, H. N. M. et al. Mercury Contamination: a growing threat to riverine and urban communities in the Brazilian Amazon. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 5, p. 2816, 2022.

MOLLOY, A. M. et al. The search for genetic polymorphisms in the homocysteine/folate pathway that contribute to the etiology of human neural tube defects. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 85, n. 4, p. 285–294, abr. 2009.

MOSHAROV, E.; CRANFORD, M. R.; BANERJEE, R. The Quantitatively Important Relationship between Homocysteine Metabolism and Glutathione Synthesis by the Transsulfuration Pathway and Its Regulation by Redox Changes. **Biochemistry**, v. 39, n. 42, p. 13005–13011, 23 set. 2000.

MOTA, Amanda Luyta Monteiro; VIEIRA, Thaian Felipe. Laboratório de Epidemiologia da Universidade Federal do Pará-UFOPA, 2020

NARAHASHI T. Effects of metals on ion channels. Boca Raton, FL: CRC Press; 1996. p. 677–98

NATIONS, U. Global Mercury Assessment 2013: Sources, emissions, releases, and environmental transport. **Unep.org**, 2013.

NAUSHAD, S. M.; RAMA DEVI, A. R. Role of parental folate pathway single nucleotide polymorphisms in altering the susceptibility to neural tube defects in South India. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 38, n. 1, 1 jan. 2010.

NEAGOS D et al. Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (MTHFD) enzyme polymorphism as a maternal risk factor for trisomy 21: a clinical study. **Journal of medicine and life**, v. 3, n. 4, p. 454–457, 15 nov. 2010.

PARLE-MCDERMOTT, A. et al. Confirmation of the R653Q polymorphism of the trifunctional C1-synthase enzyme as a maternal risk for neural tube defects in the Irish population. **European Journal of Human Genetics**, v. 14, n. 6, p. 768–772, 22 mar. 2006.

PASSOS, C. J. et al. Eating tropical fruit reduces mercury exposure from fish consumption in the Brazilian Amazon. **Environmental Research**, v. 93, n. 2, p. 123–130, out. 2003.

PETROVA, M. V. et al. Human mercury exposure levels and fish consumption at the French Riviera. **Chemosphere**, v. 258, p. 127232, nov. 2020.

PIETRZIK, K.; BAILEY, L.; SHANE, B. Folic Acid and L-5-Methyltetrahydrofolate. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 49, n. 8, p. 535–548, ago. 2010.

PINHEIRO, M. C. N. et al. Comparative study of human exposure to mercury in riverside communities in the Amazon region. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 3, p. 411–414, mar. 2006.

POWERS, R. W. et al. Plasma homocysteine concentration is increased in preeclampsia and is associated with evidence of endothelial activation. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 179, n. 6, p. 1605–1611, 1 dez. 1998.

PRASAD, P. D. et al. Molecular Cloning of the Human Placental Folate Transporter. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 206, n. 2, p. 681–687, jan. 1995.

RACEK, J. et al. The influence of folate and antioxidants on homocysteine levels and oxidative stress in patients with hyperlipidemia and hyperhomocysteinemia. **Physiological Research**, p. 87–95, 2005.

RAMÍREZ, Augusto V. Intoxicación ocupacional por mercurio. In: Anales de la Facultad de Medicina. UNMSM. Facultad de Medicina, 2008. p. 46-51

REBELO, Rita de Sousa. Toxicidade do mercúrio e seus efeitos neurodegenerativos. 2016. Tese de Doutorado.

ROBINSON, K. Homocysteine, B vitamins, and risk of cardiovascular disease. **Heart**, v. 83, n. 2, p. 127–130, 1 fev. 2000.

ROULET, M. et al. The geochemistry of mercury in central Amazonian soils developed on the Alter-do-Chão formation of the lower Tapajós River Valley, Pará state, Brazil¹The present investigation is part of an ongoing study, the CARUSO project (IDRC-UFPa-UQAM), initiated to determine the sources, fate, and health effects of MeHg in the Lower Tapajós area.1. **Science of The Total Environment**, v. 223, n. 1, p. 1–24, 3 nov. 1998.

ROULET, M. et al. Effects of recent human colonization on the presence of mercury in Amazonian ecosystems. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 112, n. 3/4, p. 297–313, 1999.

rs2236225 RefSNP Report - dbSNP - NCBI. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2236225#seq_hash>. Acesso em: 9 mar. 2024.

rs1801133 RefSNP Report - dbSNP - NCBI. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1801133>>.

RUIZ, C. M. V. Interações mercúrio-selênio: uma abordagem integrada de Avaliação de Exposição ao Mercúrio em populações ribeirinhas no município de Porto Velho, Rondônia. Doctoral Theses, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

SÁ LIMA, A. et al. Exposição humana ao mercúrio na região Oeste do Estado do Pará. **Revista Paraense de Medicina**, v. 20, n. 1, 1 mar. 2006.

SENONER, T.; DICHTL, W. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? **Nutrients**, v. 11, n. 9, p. 2090, 4 set. 2019.

SHANE, B. Folate and Vitamin B12 Metabolism: Overview and Interaction with Riboflavin, Vitamin B6, and Polymorphisms. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 29, n. 2_suppl1, p. S5–S16, jun. 2008.

SHARMA, M.; TIWARI, M.; TIWARI, R. K. Hyperhomocysteinemia: Impact on Neurodegenerative Diseases. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 117, n. 5, p. 287–296, 19 jun. 2015.

SHARP, L.; LITTLE, J. Polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism and Colorectal Neoplasia: A HuGE Review. **American Journal of Epidemiology**, v. 159, n. 5, p. 423–443, 1 mar. 2004.

SHENKER, B. J. et al. Mercury-Induced Apoptosis in Human Lymphocytes: Caspase Activation Is Linked to Redox Status. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 4, n. 3, p. 379–389, jun. 2002.

SHI, M. et al. Genotype frequencies and linkage disequilibrium in the CEPH human diversity panel for variants in folate pathway genes *MTHFR*, *MTHFD*, *MTRR*, *RFC1*, and *GCP2*. **Birth Defects Research**, v. 67, n. 8, p. 545–549, 31 jul. 2003.

SHIVKAR, R. R. et al. Association of MTHFR C677T (rs1801133) and A1298C (rs1801131) Polymorphisms with Serum Homocysteine, Folate and Vitamin B12 in

Patients with Young Coronary Artery Disease. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 224–231, 18 maio 2021.

SINTHUWIWAT, T. et al. Association of MTHFR Polymorphisms and Chromosomal Abnormalities in Leukemia. **Disease Markers**, v. 32, n. 2, p. 115–121, 2012.

STARKEBAUM, G.; HARLAN, J. M. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. **Journal of Clinical Investigation**, v. 77, n. 4, p. 1370–1376, 1 abr. 1986.

STEHOUWER, A.; JAKOBS, C. Abnormalities of vascular function in hyperhomocysteinaemia: relationship to atherothrombotic disease. **European journal of pediatrics**, v. 157, n. S2, p. S107–S111, 24 mar. 1998.

SU, J.; LI, Z. Analysis of MTR and MTRR Gene Polymorphisms in Chinese Patients With Ventricular Septal Defect. **Applied immunohistochemistry & molecular morphology**, v. 26, n. 10, p. 769–774, 1 nov. 2018.

SUTHERLAND, H. G. et al. Association Study of MTHFD1 Coding Polymorphisms R134K and R653Q With Migraine Susceptibility. **Headache**, v. 54, n. 9, p. 1506–1514, 18 jul. 2014.

SWIFT, H. R.; WILLIAMS, D. L. H. Decomposition of S-nitrosothiols by mercury(II) and silver salts. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n. 10, p. 1933–1935, 1997.

TAMURA, T.; PICCIANO, M. F. Folate and human reproduction. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 5, p. 993–1016, 1 maio 2006.

TCHOUNWOU, P. B. et al. Review: Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. **Environmental Toxicology**, v. 18, n. 3, p. 149–175, 2003.

UNEP Chemicals and WHO Department of Food Safety. Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure. 2008; 170p.

United Nations Environment Programme Global Mercury Assessment 2013 Sources, Emissions, Releases and Environmental Transport [Internet].

Available from:

<https://wedocs.unep.org/handle/20.500.11822/7984;jsessionid=B418565243A4CF7143A83041ED2BCA00>

VAN DER PUT, N. M. J. et al. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. **The Lancet**, v. 346, n. 8982, p. 1070–1071, out. 1995.

VAN DER PUT, N. M. J. et al. A Second Common Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene: An Additional Risk Factor for Neural-Tube Defects? **The American Journal of Human Genetics**, v. 62, n. 5, p. 1044–1051, maio 1998.

VAN GULDENER, C.; ROBINSON, K. Homocysteine and renal disease. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 26, n. 3, p. 313–324, 2000.

VANNUCCHI H, MONTEIRO T. Funções plenamente reconhecidas de nutrientes: ácido fólico. São Paulo: International Life Sciences Institute do Brasil (ILSI Brasil); 2010.

VIEIRA, F. et al. Mercury Distribution in Organs of Two Species of Fish from Amazon Region. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 87, n. 4, 28 ago. 2011.

WANG, L. et al. Polymorphisms of MTHFD, Plasma Homocysteine Levels, and Risk of Gastric Cancer in a High-Risk Chinese Population. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 8, p. 2526–2532, 15 abr. 2007.

WHO. 10 Chemicals of Public Health Concern. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/photo-story/photo-story-detail/10-chemicals-of-public-health-concern>. Acessado em 24 de outubro de 2023.

WILCKEN, B. Leukoencephalopathies Associated with Disorders of Cobalamin and Folate Metabolism. **Seminars in Neurology**, v. 32, n. 01, p. 068–074, fev. 2012.

Winarsih H. Natural Antioxidant and Free Radical Potential and its Application in Health. Yogyakarta: Kanisius; 2007. p. 20-7

WLODARCZYK, Bogdan J.; ZHU, Huiping; FINNELL, Richard H. Mthfr gene ablation enhances susceptibility to arsenic prenatal toxicity. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 275, n. 1, p. 22-27, 2014.

YALIWAL, Laxmi V.; DESAI, Rathnamala M. Methylene tetrahydrofolate reductase mutations, a genetic cause for familial recurrent neural tube defects. **Indian journal of human genetics**, v. 18, n. 1, p. 122, 2012.

YASUTAKE, Akira, et al. Chronic effects of methylmercury in rats. I. Biochemical aspects. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, 1997, 182.3: 185-196.

ZETTERBERG, Henrik et al. Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos. **European Journal of Human Genetics**, v. 10, n. 2, p. 113-118, 2002.

ZHAO, R; MATHERLY, L. H.; GOLDMAN, I.D. Membrane transporters and foliate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. **Expert Rev Mol Med**, v. 11, p.e4, 2009.

ZUHRA, Karim et al. Cystathionine- β -synthase: Molecular regulation and pharmacological inhibition. **Biomolecules**, v. 10, n. 5, p. 697, 2020.

ZULAIKHAH, Siti Thomas; WAHYUWIBOWO, Joko; PRATAMA, Arrizki Azka. Mercury and its effect on human health: a review of the literature. **International Journal of Public Health Science**, 2020, 9.2: 103-114.

ZULAIKHAH, Siti Thomas; WIBOWO, Joko Wahyu. The Effect of Tender Coconut Water on Free Radical Due to Mercury **Exposure**. **International Journal of Public Health Science (IJPHS)**, 2018, 7.2: 102-106.