



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SOCIEDADE NATUREZA E
DESENVOLVIMENTO (PPGSND)

EFEITO DE GENES DA FAMÍLIA GLUTATIONA
S-TRANSFERASE EM UMA POPULAÇÃO DO BAIXO
AMAZONAS AMBIENTALMENTE EXPOSTA AO
MERCÚRIO

HELOISA DO NASCIMENTO DE MOURA MENESES

Santarém, PA
Novembro/2016



HELOISA DO NASCIMENTO DE MOURA MENESES

EFEITO DE GENES DA FAMÍLIA GLUTATIONA
S-TRANSFERASE EM UMA POPULAÇÃO DO BAIXO
AMAZONAS AMBIENTALMENTE EXPOSTA AO MERCÚRIO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Sociedade Natureza e Desenvolvimento da Universidade Federal do Oeste do Pará, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

Orientador: Dr. Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues

Co-orientadora: Dra. Delaine Sampaio da Silva

Santarém, PA

Novembro/2016

HELOISA DO NASCIMENTO DE MOURA MENESES

EFEITO DE GENES DA FAMÍLIA GLUTATIONA S-TRANSFERASE EM UMA
POPULAÇÃO DO BAIXO AMAZONAS AMBIENTALMENTE EXPOSTA AO
MERCÚRIO

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós Graduação em Sociedade Natureza e Desenvolvimento da Universidade Federal do Oeste do Pará, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

Banca Examinadora

Dr. Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues (UFOPA)

Dr. Waldiney Pires de Moraes (UFOPA)

Dr. Celson Lima Pantoja (UFOPA)

Dr. Sergio de Melo (UFOPA)

Dr. Carlos José Sousa Passos (UnB)

Dr. Jorge Ivan Rebelo Porto (INPA)

Santarém, PA

Novembro/2016

Dedico esta tese à minha filha Gabriela,
ao meu marido Anderson,
aos meus pais Heli e Iracema e
à minha sogra Arynéia (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por me guiar, me segurar em Seus braços nos meus piores momentos e me permitir chegar até aqui.

Gostaria de agradecer à minha filha Gabriela a quem tanto amo, por fazer parte da minha vida, por entender minha ausência e meu cansaço principalmente neste último ano.

Gostaria de agradecer ao meu marido Anderson, por ser meu companheiro de vida. Obrigada por estar 23 anos ao meu lado. Você é o amor da minha vida e eu simplesmente não sei viver sem você.

Gostaria de agradecer aos meus pais Heli e Iracema por todo o amor e dedicação que tiveram por mim durante toda a minha vida. Obrigada por terem compreendido minha decisão de morar em outro estado e ainda assim estarem presentes na minha vida. Amo vocês.

Gostaria de agradecer à minha sogra Arynéia (*in memorian*), por ter sido uma segunda mãe para mim e que em uma dessas artimanhas da vida nos deixou tão precocemente. Uma ausência que está sendo muito difícil de superar.

Gostaria de agradecer à minha família por torcer por mim mesmo estando a quilômetros de distância. Em especial ao meu sobrinho Daniel, meu sonho realizado de ser tia, minha paixão.

Gostaria de agradecer às minhas amigas Paula, Aline, Marisa e Cláudia pela amizade verdadeira que sobrevive ao tempo e a longas distâncias.

Gostaria de agradecer aos meus amigos da UFRJ: Marcelo, Márcia, Kênia, Renata, Viviane, Clarice e Camilla pelos vários momentos agradáveis que compartilhamos juntos dentro e fora da universidade.

Gostaria de agradecer ao Prof. Pablo Lapunzina por ter me orientado durante o doutorado sanduíche e por ter sido o primeiro a me tratar como pesquisadora. Sem dúvida o ano que passei em seu laboratório sob sua orientação foi um dos mais importantes da minha vida profissional.

Gostaria de agradecer à Dra. Valeria Romanelli por todo o ensinamento compartilhado durante os 10 meses que passamos juntas em Madrid. Obrigada por ter se tornado uma amiga tão especial em tão pouco tempo e por ser até hoje minha principal referência na área da Genética Molecular.

Gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues por ter me recebido em seu laboratório assim que cheguei a Santarém e por me presentear com um tema de tese tão apaixonante. Obrigada por sua disponibilidade em me atender sempre que precisei e por acompanhar de perto todo o desenvolvimento desta tese.

Gostaria de agradecer à minha co-orientadora Profa. Delaine Sampaio da Silva por seu apoio científico principalmente às questões referentes ao contexto amazônico.

Gostaria de agradecer ao Prof. Jorge Ivan Rebelo Porto por ter acreditado no potencial deste trabalho e por ter apoiado o projeto.

Gostaria de agradecer ao Prof. Ricardo Bezerra de Oliveira por ter disponibilizado seu laboratório para as análises de quantificação de mercúrio e à Dra. Sandra Sarrazin pelo apoio nos experimentos de PCR em tempo real.

Gostaria de agradecer aos alunos Amanda, Roseane e Felipe que participaram da execução deste projeto, e também à Ellen Araújo e ao Christian Lima pelo apoio técnico durante as coletas.

Gostaria de agradecer a todos os colegas do LGBio, em especial à Maria Beatriz Viana (Bia) e àqueles que frequentam o laboratório do Campus Rondon, pelo convívio do dia-a-dia.

Gostaria de agradecer ao secretário do PPGSND Euclides Araújo Ribeiro pelo apoio administrativo e a todos os professores do Programa por contribuírem com minha formação, em especial aos professores Dr. Celson Lima, Dr. Troy Beldini e Dra. Tereza Ximenes.

Gostaria de agradecer a FAPESPA e a CAPES pelo apoio financeiro para a execução deste projeto e a todos os voluntários que dele aceitaram participar.

RESUMO

O mercúrio (Hg) é considerado um dos metais tóxicos mais perigosos para o ambiente e para a saúde humana. Altos níveis de Hg podem induzir diferentes tipos de efeitos tóxicos sobre a saúde humana e o principal alvo é o sistema nervoso central (SNC). Um dos principais mecanismos envolvidos na neurotoxicidade causada por Hg é o estresse oxidativo e o seu efeito sobre os sistemas antioxidantes. Na Amazônia, a exposição ao Hg é principalmente devido à ingestão de peixe contaminado com metilmercúrio (MeHg), e esta exposição pode ser avaliada pela quantificação do nível de concentração de Hg no sangue. Atualmente sabe-se que o desmatamento é uma das principais razões para os altos níveis de Hg nos ecossistemas aquáticos na Amazônia, porém não há pesquisas recentes que avaliem a exposição ao Hg em uma população humana da região do Baixo Amazonas. Assim, este estudo teve como objetivo caracterizar o perfil epidemiológico de 144 indivíduos residentes no município de Santarém e investigar o efeito de polimorfismos nos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* (rs1695A> G e rs1138272 C> T) sobre os níveis de concentração de Hg no sangue de indivíduos desta população. Dentre os indivíduos estudados, 77,8% consomem peixe frequentemente e foram os que apresentaram maiores níveis de Hg (média = $25 \pm 23,9$ µg/L; mediana = 20,5 µg/L; mínimo = 3,7 µg/L; máximo = 181,3 µg/L), dos quais 68,8% apresentam níveis de Hg entre 10-50µg/L. Além disso, foi possível observar que os níveis de Hg aumentam com a idade ($r_s = 0,40$; $p = 0,0000$) e que homens apresentam níveis de Hg mais alto que as mulheres ($\chi^2 = 17,45$; $p = 0,0001$). A análise de dados por regressão linear sugere que o consumo de peixe ($\beta = 14,69$; $p = <0,001$), sexo ($\beta = 11,55$; $p = 0,001$), deleção do gene *GSTM1* ($\beta = 6,42$; $p = 0,06$) e idade ($\beta = 0,26$; $p = 0,04$) são mais relevantes para a previsão do nível de Hg no sangue do que os polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTP1*. Neste contexto, concluiu-se que a população de Santarém está exposta ao Hg através do consumo frequente de peixe e que fatores como sexo, idade e polimorfismo do gene *GSTM1* estão contribuindo para a manutenção dos níveis elevados deste metal no sangue dos indivíduos avaliados.

Palavras-chave. Interação gene-ambiente. Saúde ambiental. *GSTM1*. *GSTT1*. *GSTP1*.

ABSTRACT

Mercury (Hg) is considered one of the most dangerous toxic metals to the environment and to humans. High Hg levels may induce different types of toxic effects on human health, and the main target is the central nervous system (CNS). One of the main mechanisms involved in neurotoxicity caused by Hg is the oxidative stress and its effect on antioxidant systems. In the Amazon, Hg exposure is primarily due to the intake of fish contaminated with methylmercury (MeHg), and this exposure can be evaluated by the Hg level quantification in blood. It is currently known that deforestation is one of the main reasons for the high levels of Hg in the aquatic ecosystems in the Amazon. However, to the best of our knowledge, there are no recent investigations that evaluate the Hg exposure in a human population of the Lower Amazon region. Therefore, this study aimed to characterize the epidemiological profile of 144 residents of the Santarém municipality, and to investigate the interaction between *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* (rs1695A>G and rs1138272 C>T) polymorphisms and blood Hg in this population. Higher Hg level was found in individuals with frequently fish intake habits (mean = 25 ± 23.9 $\mu\text{g/L}$; median = 20.5 $\mu\text{g/L}$; minimum = 3.7 $\mu\text{g/L}$; maximum = 181.3 $\mu\text{g/L}$), of which 68.8% reached Hg levels varying between 10-50 $\mu\text{g/L}$. In addition was also observed that Hg levels increase with age ($r_s = 0.40$; $p = 0.0000$) and that men had Hg levels higher than women ($\chi^2 = 17.45$; $p = 0.0001$). The linear regression analysis of our data suggests that fish intake ($\beta = 14.69$; $p = <0.001$), sex ($\beta = 11.55$; $p = 0.001$), *GSTM1* deletion ($\beta = 6.42$; $p = 0.06$) and age ($\beta = 0.26$; $p = 0.04$) are more relevant for prediction of Hg level in blood than the polymorphisms of *GSTT1* and *GSTP1* genes. In this context, it was concluded that the Santarém population is exposed to Hg through to frequently fish intake habit and factors like sex, age and *GSTM1* polymorphism are contributing with the high Hg levels found in the blood of analyzed individuals.

Keywords: Gene-environment interaction. Environmental health. *GSTM1*. *GSTT1*. *GSTP1*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 – Ciclo do Hg no ambiente amazônico -----	09
Figura 2.2 – Esquema da toxicocinética do MeHg em uma mulher grávida -----	12
Figura 2.3 – Esquema de como os fatores genéticos podem modificar a toxicocinética e toxicodinâmica do Hg -----	19
Figura 2.4 - Exemplo de SNP: Substituição de um C por um G (C>G) em uma posição específica da sequência de DNA -----	21
Figura 2.5 – Visão geral dos principais genes envolvidos nas vias metabólicas do ácido fólico, da metionina e da síntese de GSH -----	23
Figura 2.6 - Principais enzimas envolvidas com a regeneração da glutatona à sua forma reduzida (GSH)-----	24
Figura 2.7 - Principais genes envolvidos no metabolismo da GSH e associados com aumento dos níveis de Hg -----	26
Figura 3.1 – Visualização de PCR multiplex em gel de agarose 3% -----	30
Figura 3.2 – Sequência de primers utilizados no HRM -----	31
Figura 3.3 – Padrão de curvas do HRM confirmado por sequenciamento -----	32
Figura 4.1 - <i>Box plot</i> referente à relação níveis de Hg total no sangue e consumo de peixe -----	42
Figura 4.2 - <i>Box plot</i> referente à relação níveis de Hg total no sangue e sexo -----	43
Figura 4.3 - Níveis de Hg total no sangue e idade, no subgrupo de alta frequência -	44
Figura 4.4 - Níveis de Hg total no sangue e idade, no subgrupo de alta frequência, para o sexo feminino -----	44
Figura 4.5 - níveis de Hg total no sangue e idade, no subgrupo de alta frequência, para o sexo masculino -----	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Atribuição de valores 0 e 1 para variáveis categóricas utilizadas na análise de regressão linear -----	34
Tabela 4.1 - Análise descritiva dos níveis de Hg em amostra da população de Santarém -----	36
Tabela 4.2 - Perfil Sócio-Demográfico e níveis de Hg em amostra da população de Santarém -----	37
Tabela 4.3 - Perfil Sócio-Demográfico em função do consumo de peixe em amostra da população de Santarém -----	38
Tabela 4.4 - Frequência de ocorrência dos sintomas relacionados a exposição por Hg em amostra da população de Santarém -----	39
Tabela 4.5 - Frequência de ocorrência dos sintomas relacionados a exposição por Hg em função dos níveis de Hg em amostra da população de Santarém -----	40
Tabela 4.6 - Distribuição dos genótipos dos genes <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> e <i>GSTP1</i> em função dos subgrupos de alta e baixa frequência de consumo de peixe em amostra da população de Santarém -----	41
Tabela 4.7 - Níveis de Hg e gene <i>GSTM1</i> em amostra da população de Santarém ----	45
Tabela 4.8 - Níveis de Hg e gene <i>GSTT1</i> em amostra da população de Santarém ----	46
Tabela 4.9 - Níveis de Hg e gene <i>GSTP1</i> (rs1695A>G) em amostra da população de Santarém -----	47
Tabela 4.10 - Níveis de Hg e gene <i>GSTP1</i> (rs1138272C>T) em amostra da população de Santarém - -----	47
Tabela 4.11 - Efeito dos genes <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> e <i>GSTP1</i> sobre os níveis de Hg em amostra da população de Santarém -----	48
Tabela 5.1 – Comparação de resultados obtidos para os genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> ----	59
Tabela 5.2 – Comparação de resultados obtidos para os SNPs rs1695 e rs1138272 do gene <i>GSTP1</i> -----	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância

ASTDR – Agência de Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças

CAT - Catalase

CBS - Cistationina B-Sintase

CGL - Cistationina Gama Ligase

CuZnSOD - Superóxido Dismutase Cobre-Zinco Dependente (SOD-1)

dbSNP - Single Nucleotide Polymorphism Database

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

ESF – Equipe Saúde da Família

FAO - Food and Agriculture Organization (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)

GCL - Glutamato Cisteína Ligase

GPX - Glutathione Peroxidase

GR - Glutathione Redutase

GSH – Glutathione reduzida

GSSG – Glutathione oxidada

GS - Glutathione sintetase

GST – Glutathione S-Transferase

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

Hg – Mercúrio

HRM – High Resolution Melting (Dissociação de Alta Resolução)

MeHg – Metilmercúrio

MnSOD – Superóxido Dismutase Manganês Dependente (SOD-2)

MS - Metionina Sintetase

MTHFD1 - Metileno-THF Desidrogenase 1

MTHFR - 5-Metil-Tetra-Hidro-Folato Redutase

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NRC – National Research Council (Conselho Nacional de Pesquisa dos EUA)

NCBI – National Center for Biotechnology Information

OMS – Organização Mundial de Saúde

RfD - Dose de Referencia

SeH – Grupamento Selenol

SH – Grupamento Tiol

SNP - Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de Único Nucleotídeo)

SOD - Superóxido Dismutase

SUS – Sistema Único de Saúde

UBSF - Unidade Básica de Saúde Fluvial

US EPA – US Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental dos EUA)

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	01
1.1 – SAÚDE E AMBIENTE -----	01
1.2 – CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA DE TESE -----	02
1.3 – JUSTIFICATIVA -----	03
1.4 – PROBLEMA DE TESE -----	04
1.5 – HIPÓTESE -----	04
1.6 – OBJETIVOS -----	05
1.6.1 – Objetivo Geral -----	05
1.6.2 – Objetivos Específicos -----	06
1.7 – ORIGINALIDADE -----	06
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -----	07
2.1 – TOXICOLOGIA DO MERCÚRIO -----	07
2.1.1 – Características químicas do Mercúrio -----	07
2.1.2 – Ciclo do Mercúrio no ambiente amazônico -----	08
2.1.3 – Fontes de exposição humana ao Mercúrio -----	09
2.1.4 – Biomarcadores de exposição ao Mercúrio -----	10
2.1.5 – Toxicocinética do Mercúrio -----	11
2.1.6 – Efeitos adversos à saúde humana -----	12
2.2 – EXPOSIÇÃO MERCURIAL NA AMAZÔNIA -----	13
2.3 – EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MERCURIAL PARA A SAÚDE HUMANA: ESTRESSE OXIDATIVO -----	16
2.3.1- Estresse Oxidativo -----	16
2.3.2 - Sistema de defesa antioxidante -----	16
2.4 – INTERAÇÃO GENE-AMBIENTE -----	18
2.4.1 – Papel central da Glutathione (GSH) na toxicocinética e toxicodinâmica do mercúrio -----	21
2.4.2 – Glutathione S-Transferase (GST) -----	25
CAPÍTULO 3 – METODOLOGIA -----	28
3.1 – CASUÍSTICA -----	28
3.2 – QUANTIFICAÇÃO NÍVEIS DE MERCÚRIO -----	28
3.3 – PERFIL EPIDEMIOLÓGICO -----	29
3.4 – ANÁLISES MOLECULARES -----	29
3.4.1 – Genotipagem <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> -----	30
3.4.2 – Genotipagem <i>GSTP1</i> -----	30
3.5 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS -----	33
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS -----	35
4.1 – QUANTIFICAÇÃO NÍVEIS DE MERCÚRIO -----	35
4.2 – PERFIL EPIDEMIOLÓGICO -----	36
4.3 – ANÁLISES MOLECULARES -----	40
4.3.1 – Frequência Genotípica -----	40
4.4 – EFEITO DAS VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS SOBRE OS NÍVEIS DE MERCÚRIO -----	41
4.4.1- Níveis de Hg x consumo de peixe -----	41
4.4.2- Níveis de Hg x sexo -----	42
4.4.3- Níveis de Hg x idade -----	43
4.5 – EFEITO DOS GENES <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> , <i>GSTP1</i> SOBRE OS NÍVEIS DE	

MERCÚRIO (INTERAÇÃO GENE-AMBIENTE) -----	45
CAPÍTULO 5 – DISCUSSÃO -----	49
5.1 – SOBRE O PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA POPULAÇÃO DE SANTAREM AMBIENTALMENTE EXPOSTA AO MERCÚRIO ATRAVÉS DO CONSUMO DE PEIXE -----	49
5.2 – SOBRE OS EFEITOS DE POLIMORFISMOS NOS GENES <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> e <i>GSTP1</i> EM RELAÇÃO AOS NÍVEIS DE MERCÚRIO NA POPULAÇÃO DE SANTARÉM -----	55
5.3 – SOBRE OS FATORES DETERMINANTES RESPONSÁVEIS PELOS ALTOS NÍVEIS DE MERCÚRIO ENCONTRADOS NA POPULAÇÃO DE SANTARÉM -----	61
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÃO -----	65
BIBLIOGRAFIA -----	68
ANEXOS -----	80
ANEXO I – Parecer do Comitê de Ética -----	81
ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) -----	84
ANEXO III – Questionário -----	87
ANEXO IV - Resumo do artigo submetido à Revista Brasileira de Epidemiologia (RBEPID-2016-0048) -----	92
ANEXO V - Resumo apresentado no 9th Congress of Toxicology in Developing Countries / XIX Congresso Brasileiro de Toxicologia (2015) -----	94
ANEXO VI - Artigo publicado no SM Journal of Public Health and Epidemiology - Special Article: Heavy Metals and Health (2016)-----	96

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO

1.1 – SAÚDE E AMBIENTE

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a saúde é um estado de completo bem-estar físico, mental e social, e não consiste apenas na ausência de doença ou de qualquer outro tipo de agravo. A Lei Orgânica da Saúde (8.080/90) que regulamenta o Sistema Único de Saúde do Brasil (SUS) define que o processo saúde-doença está relacionado a determinantes sociais, tais como a alimentação, a moradia, o saneamento básico, o meio ambiente, o trabalho, a renda, a educação, o transporte, o lazer e o acesso aos bens e serviços essenciais.

O ambiente é um dos principais responsáveis pela saúde e bem-estar humanos. Apesar da relação entre o ambiente e a saúde ser conhecida desde a Antiguidade, somente após a 1ª Conferência Mundial sobre o Meio Ambiente (Suécia -1972) se intensificou a discussão a respeito da necessidade de identificar e controlar as atividades e os agentes responsáveis pela poluição ambiental e seus efeitos tóxicos à saúde humana e ambiental (WRIGHT & WELBOURN, 2002), e a área de conhecimento que trata da relação entre saúde e ambiente foi denominada de Saúde Ambiental. Segundo definição estabelecida pela OMS: “Saúde ambiental são todos aqueles aspectos da saúde humana, incluindo a qualidade de vida, que estão determinados por fatores físicos, químicos, biológicos, sociais e psicológicos no meio ambiente. Também se refere à teoria e prática de valorar, corrigir, controlar e evitar aqueles fatores do meio ambiente que, potencialmente, possam prejudicar a saúde de gerações atuais e futuras” (OMS, 1993).

Nos últimos anos, tem se observado uma crescente degradação dos recursos naturais, em consequência das atividades humanas, principalmente na região Amazônica (FEARNSIDE, 2005) e esta degradação tem resultado em diversos tipos de problemas para a saúde humana (PIGNATI, 2003). Visando garantir às gerações futuras um ambiente mais saudável, uma das principais ações do governo brasileiro na área da saúde foi a implantação da Vigilância Ambiental em Saúde (Portaria n.º. 410/MS de 10.10.2000) e neste contexto, a Epidemiologia oferece os instrumentos metodológicos para orientar o processo da vigilância ambiental em saúde, que é definida como “um conjunto de ações que proporciona o conhecimento e a detecção ou prevenção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes do meio ambiente que interferem na saúde humana, com a finalidade de

recomendar e adotar medidas de promoção da saúde ambiental, prevenção e controle dos fatores de riscos relacionados às doenças e outros agravos à saúde”, tais como contaminantes ambientais e substâncias químicas, nos quais se inclui o mercúrio (Hg), elemento chave nesta pesquisa (WRIGHT & WELBOURN, 2002).

1.2 – CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA DE TESE

O Hg é considerado um dos metais tóxicos mais perigosos para o ambiente e para a saúde humana devido à sua alta toxicidade e sua mobilidade em diferentes ecossistemas (NRC, 2000). O metal é liberado no ambiente através de fontes naturais e/ou de ações antropogênicas, sofre transformações complexas e circula entre a atmosfera, oceanos e terra (WRIGHT & WELBOURN, 2002). Existem três formas químicas de mercúrio: (1) mercúrio elementar ou metálico (Hg^0); (2) mercúrio inorgânico (Hg_2^{2+} e Hg^{2+}); e (3) mercúrio orgânico, sendo o metilmercúrio (MeHg) a forma mais comum de Hg orgânico encontrado na cadeia alimentar (NORDBERG *et al.*, 2015).

Todas as formas de Hg podem induzir efeitos tóxicos em mamíferos, incluindo os seres humanos (ATSDR, 1999). A extensão destes efeitos depende da forma química de Hg presente no momento da exposição, da duração da exposição, e da via de exposição. Para os seres humanos, o MeHg é o mais tóxico visto que seu alvo principal é o sistema nervoso central, embora o fígado, rins, e os sistemas cardiovascular, gastrointestinal e imune também possam ser afetados (AKAGI *et al.*, 1995; MALM, 1998; HARADA *et al.*, 2001; GRANDJEAN *et al.*, 2010). A exposição humana ao Hg pode ser ocupacional, em função do ambiente de trabalho, ou ambiental, através da ingestão de peixes contaminados com MeHg (NRC, 2000).

A política de ocupação da Amazônia no início dos anos 1970 facilitou a instalação de atividades de garimpagem do ouro, responsáveis por liberar Hg no ambiente neste período (SANTOS *et al.*, 2003). Desde então, muitos dos dados obtidos sobre os níveis de Hg acumulado em peixes e populações humanas na região Amazônica focaram na atividade garimpeira como a principal responsável pela contaminação do meio ambiente por mercúrio (NEVADO *et al.*, 2010). No entanto, além da garimpagem, atividades relacionadas à mudança no uso do solo, como desmatamento e queimadas, e a construção de barragens hidroelétricas estão contribuindo com a contaminação dos ecossistemas aquáticos e terrestres na região (FEARNSIDE, 2003).

Atualmente, o desmatamento relacionado à conversão de floresta em pastagens para a criação de gado e para agricultura de corte-e-queima encontra-se dentre os principais responsáveis pela manutenção dos níveis de Hg^{+2} no ambiente amazônico (FEARNSIDE, 2005). A conversão do solo de floresta em solo de pastagem através das queimadas aumenta a remobilização do Hg acumulado no solo (LACERDA *et al.*, 2004) e intensifica o processo de erosão que acelera o transporte do Hg para os ambientes aquáticos (FOSTIER *et al.*, 2000), onde pode ser transformado em MeHg, que tem a capacidade de se bioacumular nos organismos e se biomagnificar ao longo da cadeia trófica contaminando assim a biota aquática e o Homem.

O município de Santarém (PA) pertence à mesorregião do Baixo Amazonas e está localizado na confluência dos rios Tapajós e Amazonas. Apesar de sofrer atualmente com os impactos da degradação ambiental, a questão da contaminação ambiental por Hg acabou sendo negligenciada na região, por esta ser considerada de baixo risco devido ao fato de estar afastada das áreas de garimpo (MALM, 1995). No entanto, em função do histórico de contaminação mercurial dos peixes do rio Tapajós, a exposição ao Hg e seus efeitos para a saúde humana da população local torna-se uma questão de saúde ambiental e por este motivo deve ser investigada.

1.3 – JUSTIFICATIVA

Existem diferentes trabalhos na literatura científica sobre exposição mercurial, no entanto, na maioria deles o enfoque é apenas ambiental, avaliando os níveis de Hg (peixes e seres humanos) a fim de determinar se uma determinada região ou população está ou não exposta ao Hg (NEVADO *et al.*, 2010). Por outro lado, existem poucos trabalhos sobre as consequências desta exposição para a saúde humana, principalmente na região do Baixo Amazonas (PINHEIRO *et al.*, 2011). Além disso, poucos trabalhos relatam sobre as consequências celulares e moleculares da exposição por Hg mesmo sabendo-se que o MeHg é um agente teratogênico e neurotóxico (GROTTO *et al.*, 2010).

Embora a ASTDR (Agência de Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças) estabeleça que o nível limiar para os sintomas de toxicidade no sangue seja de $50\mu\text{g/L}$, já foi demonstrado que níveis baixos de Hg (menores que $50\mu\text{g/L}$) podem causar efeitos tóxicos adversos à saúde humana, entre os quais se destaca o estresse oxidativo e seu efeito sobre as enzimas antioxidantes (GROTTO *et al.*, 2010). Estudos sugerem que o Hg reduz a capacidade

antioxidante e aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês, Reactive Oxygen Species), desencadeando assim o estresse oxidativo, que seria um evento central na neurotoxicidade causada pelo MeHg, do qual se destaca o sistema antioxidante da glutathiona (GSH) (FRANCO *et al.*, 2006; ASCHNER *et al.*, 2007; SHANKER *et al.*, 2005; FARINA *et al.*, 2011).

Neste sentido, faz-se necessário um estudo para avaliar as consequências da exposição mercurial não apenas do ponto de vista ambiental mas também considerando os aspectos econômicos, sociais e biológicos da população que está sendo acometida pelos efeitos desta exposição. Desta forma, considerando-se que esta tese foi desenvolvida em um Programa de Pós Graduação em Sociedade, Natureza e Desenvolvimento, foi proposto um estudo interdisciplinar e integrativo da saúde ambiental e humana que visa estabelecer grupos mais vulneráveis ou suscetíveis aos efeitos da exposição mercurial (SOCIEDADE), avaliar a exposição mercurial (NATUREZA) e identificar possíveis fatores responsáveis pela exposição mercurial e as consequências desta exposição para a população estudada (DESENVOLVIMENTO).

1.4 – PROBLEMA DE TESE

Em suma, o problema central foi explicar o papel de genes envolvidos na toxicocinética do Hg e os possíveis efeitos adversos da exposição mercurial para saúde humana. A presença ou ausência de genes relacionados com o estresse oxidativo podem influenciar na susceptibilidade dos indivíduos à exposição mercurial, de modo que é de grande importância a compreensão da influência destes fatores genéticos na toxicocinética do Hg a fim de se determinar se o estresse oxidativo é ou não um efeito tóxico da exposição mercurial na população estudada (BASU *et al.*, 2014).

1.5– HIPÓTESE

A Glutathiona (GSH) é um tripeptídeo que desempenha um papel central na toxicocinética do Hg, sendo a principal responsável pela alta mobilidade do MeHg dentro do meio intracelular, através do complexo MeHg-GSH. Além disso, a GSH também participa da toxicodinâmica do Hg ao fazer parte de um dos principais sistemas antioxidantes responsáveis por combater o estresse oxidativo. Genes que codificam enzimas que participam direta ou

indiretamente da via metabólica da GSH e do sistema de defesa antioxidante são possíveis candidatos a estarem envolvidos no aumento dos níveis de Hg no sangue e nos efeitos tóxicos adversos para a saúde humana decorrentes desta exposição (BASU *et al.*, 2014).

Genes da família GST (*Glutathione S-Transferase*) têm papel importante na detoxificação do Hg: catalisam a reação de conjugação do complexo MeHg-GSH e promovem a eliminação do MeHg via sistema biliar (BALLATORI & CLARKSON, 1985). Assim, polimorfismos em genes da família GST (*GSTM1* e *GSTT1* e *GSTP*) podem resultar em perda de atividade enzimática e por isso têm sido relacionados a um aumento nos níveis de Hg (BASU *et al.*, 2014).

Além disso, não é possível afirmar que existe um nível exato de Hg que seja responsável pelo aparecimento de sintomas ou problemas de saúde. Essa perda de homogeneidade entre os indivíduos em relação ao nível mínimo de Hg no sangue e/ou cabelo necessário para desencadear efeitos tóxicos pode ser explicado por fatores externos e/ou biológicos que afetem tanto a toxicocinética quanto a toxicodinâmica do Hg (LLOP *et al.*, 2015), de modo que é importante avaliar diferentes tipos de variáveis que possam explicar as diferenças de susceptibilidade de alguns subgrupos.

Sendo assim, considerando que a exposição mercurial é um evento multifatorial, a principal hipótese deste estudo é que existem diferentes fatores (ambientais, epidemiológicos e/ou genéticos) afetando a toxicocinética do Hg e provocando efeitos tóxicos adversos à saúde de indivíduos residentes na região urbana e de várzea de Santarém.

1.6- OBJETIVOS

1.6.1 - Objetivo geral

Investigar a exposição ao Hg sob os aspectos da saúde ambiental e humana, buscando compreender o perfil epidemiológico-molecular da população do município de Santarém, a fim de se determinar os efeitos tóxicos da exposição ao Hg para a saúde da população local, de modo a minimizar os danos.

1.6.2 - Objetivos Específicos

- Avaliar os níveis de concentração de Hg no sangue de indivíduos residentes na área urbana e de várzea do município de Santarém.
- Caracterizar o perfil epidemiológico de indivíduos residentes na área urbana e de várzea do município de Santarém.
- Verificar se existe associação entre os dados do perfil epidemiológico e os níveis de Hg;
- Verificar se existe associação entre polimorfismos existentes em genes que regulam o sistema de defesa antioxidante (*GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*) e os níveis de Hg.
- Verificar se existe associação entre a ocorrência de polimorfismos nos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*, idade, sexo e os níveis de Hg (análise multivariada).

1.7 – ORIGINALIDADE

A originalidade deste trabalho está principalmente na mudança de enfoque de um tema que tem sido bastante discutido que é a questão da exposição mercurial. Enquanto a maioria dos trabalhos tem como objetivo avaliar se uma determinada população está ou não exposta ao Hg, o presente trabalho se preocupou em identificar quais os principais fatores associados à exposição mercurial, com destaque para o papel dos fatores genéticos, e qual o efeito de cada um deles sobre os níveis de Hg nos indivíduos estudados. Outra vertente que contribui para a originalidade diz respeito ao tipo de população estudada, visto que enquanto a maioria dos trabalhos avalia populações ribeirinhas do rio Tapajós, o presente estudo avaliou uma comunidade da área de várzea de Santarém, localizada às margens do rio Amazonas, que até o presente momento não tinha sido estudada.

Além disto, este trabalho também inova na metodologia utilizada para avaliar o papel dos efeitos genéticos na toxicocinética do Hg em seres humanos. Para a genotipagem dos polimorfismos do gene *GSTP1* foi utilizada a técnica de HRM (do inglês, High Resolution Melting). Esta técnica é muito utilizada por pesquisadores internacionais e pela primeira vez está sendo aplicada em uma pesquisa realizada na UFOPA e em estudos com populações da região do Baixo Amazonas.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma breve revisão dos principais assuntos relacionados ao problema central deste trabalho. Por se tratar de um problema complexo foi necessária a integração de diferentes áreas de conhecimento.

Segundo Klein (1990), interdisciplinaridade é a “comunicação de ideias para a integração mútua para organizar conceitos, metodologia, procedimentos, epistemologia, terminologia, informações, assim como organização de pesquisa e educação em um vasto campo”. Em outras palavras, a Interdisciplinaridade promove a produção de conhecimento novo a partir de duas ou mais áreas do conhecimento (disciplinas), com o objetivo de resolver um problema complexo. Para o presente estudo, o conhecimento produzido por três disciplinas foram necessárias para explicar o problema principal desta tese: Toxicologia, Epidemiologia e Genética.

2.1 – TOXICOLOGIA DO MERCÚRIO

2.1.1 – Características químicas do Mercúrio

O mercúrio (Hg) é considerado um dos metais pesados mais perigosos para o ambiente e para a saúde humana devido à sua alta toxicidade e sua mobilidade em diferentes ecossistemas. O Hg é liberado no ambiente através de fontes naturais e/ou de ações antropogênicas, sofre transformações complexas e circula entre a atmosfera, oceanos e terra (WRIGHT & WELBOURN, 2002). Existem três formas químicas de mercúrio: (1) mercúrio elementar ou metálico (Hg^0); (2) mercúrio inorgânico (Hg_2^{2+} e Hg^{2+}); e (3) mercúrio orgânico, sendo o metilmercúrio (MeHg) a forma mais comum de mercúrio orgânico encontrado na cadeia alimentar (NORDBERG *et al.*, 2015).

Em condições normais de temperatura e pressão, o Hg em sua forma elementar é um metal líquido denso e prateado que oferece pouco risco à saúde. À temperatura ambiente, parte do Hg metálico evapora e forma um vapor de Hg que é um gás inodoro e incolor. Na forma de vapor, o Hg rapidamente é absorvido pelos pulmões e devido sua característica solúvel pode atravessar membranas celulares e assim atingir órgãos alvos. Uma vez na corrente sanguínea, o Hg sofre oxidação e se transforma em Hg inorgânico (Hg^+ e Hg^{+2}) que tem uma capacidade reduzida ao atravessar as membranas celulares (NORDBERG *et al.*,

2015). Quando o Hg inorgânico se liga covalentemente a um átomo de carbono origina o MeHg, a forma mais comum de Hg orgânico e também a mais perigosa para seres humanos e animais.

Todas as formas de Hg podem induzir efeitos tóxicos adversos nos seres humanos. A extensão destes efeitos depende da forma de Hg presente no momento da exposição, da duração da exposição, e da via de exposição. Para os seres humanos, o MeHg é o mais tóxico visto que seu alvo principal é o sistema nervoso central, embora o fígado, rins, e os sistemas cardiovascular, gastrointestinal e imune também possam ser afetados (NRC, 2000). O MeHg atravessa a placenta e a barreira hematoencefálica, podendo resultar em diferentes tipos de anormalidades fetais (neurológicas e motoras), inclusive em crianças cujas mães apresentavam mínimos sintomas. Além disso, baixos níveis de MeHg são suficientes para causar efeitos tóxicos adversos em adultos e crianças (KARAGAS *et al.*, 2012).

2.1.2 – Ciclo do Mercúrio no ambiente amazônico

A Bacia do Rio Tapajós foi responsável por grande parte do ouro produzido no Brasil nos anos 1980 e por este motivo os elevados níveis de Hg nos ecossistemas amazônicos foram atribuídos às atividades garimpeiras da região (MALM *et al.*, 1997 ; HARADA *et al.*, 2001). No entanto, o garimpo não é o único responsável pelo aporte de Hg no ambiente amazônico. Na atmosfera, o vapor de Hg (Hg^0) liberado por diferentes tipos de atividades antrópicas (mineração de ouro, atividades industriais, queimadas e desmatamento) sofre oxidação (Hg^{+2}) e retorna junto com a água da chuva para o solo. Além disso, ROULET & LUCOTTE (1995, 1998) demonstraram que os solos amazônicos são naturalmente ricos em Hg, o que os torna fontes naturais de Hg para o ambiente.

O ciclo do Hg no ambiente amazônico envolve: (1) a remobilização do Hg através dos incêndios florestais que lançam o Hg presente no solo e na biomassa vegetal para a atmosfera, tornando-o disponível para contaminar o ambiente (2) uma vez na atmosfera, o vento se encarrega de transportar esse Hg, podendo atingir áreas afastadas (3) o desmatamento e a exploração do uso da terra para fins agrícolas intensificam os processos de erosão e lixiviação, facilitando a contaminação dos ecossistemas aquáticos e terrestres; e (4) no ecossistema aquático, o Hg sofre metilação, se transforma em MeHg, que tem capacidade de bioacumulação e biomagnificação, podendo então atingir os peixes e o homem (Figura 2.1).

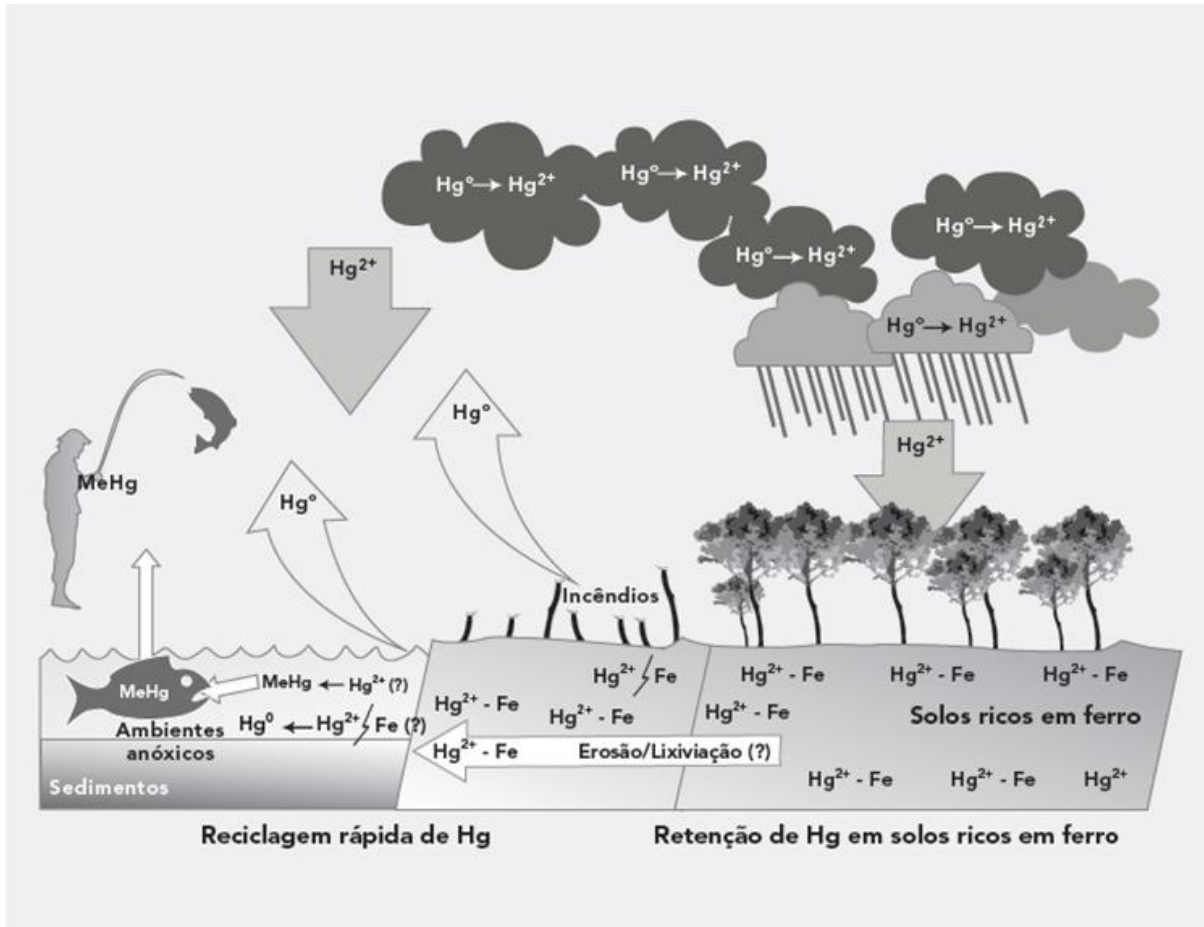


Figura 2.1 – Ciclo do Hg no ambiente amazônico (WASSERMAN *et al.*, 2001)

2.1.3 – Fontes de exposição humana ao Mercúrio

As fontes potenciais de exposição humana ao Hg incluem a inalação de vapores de Hg, a ingestão de água potável e alimentos contaminados com Hg e a exposição ao Hg através de tratamentos médicos e odontológicos. De um modo geral, existem duas maneiras de exposição ao Hg no homem: ocupacional e ambiental. A primeira está ligada ao ambiente de trabalho, geralmente associada aos garimpos de ouro. Trata-se de uma exposição pela inalação de vapores de Hg, que atinge o pulmão e o trato-respiratório. A exposição ambiental, por sua vez, ocorre pela ingestão de peixes contaminados com MeHg (UNEP, 2008).

No peixe, o Hg acumulado se encontra principalmente na forma de MeHg e alguns dos fatores que determinam a sua concentração são: o teor de Hg na água e nos sedimentos de fundo, o pH da água, idade e tamanho do peixe. Como dito anteriormente, o MeHg tem a capacidade de se bioacumular nos organismos e se biomagnificar ao longo da cadeia trófica

de modo que peixes predadores tendem a apresentar níveis mais elevados de Hg em comparação aos peixes não predadores (SAMPAIO DA SILVA *et al.*, 2006).

2.1.4 – Biomarcadores de exposição ao Mercúrio

A avaliação precoce da exposição ambiental ao Hg através da quantificação de biomarcadores de exposição permite prever possíveis efeitos adversos para a saúde humana em função dos níveis de Hg encontrados (UNEP, 2008). Uma das formas mais comuns de se avaliar esta exposição em humanos é através da quantificação dos níveis de Hg (biomarcadores de exposição) no cabelo, sangue e urina. Existe uma relação bem estabelecida entre diferentes biomarcadores de exposição ao Hg e efeitos adversos à saúde (NRC, 2000).

A presença de Hg no sangue indica uma exposição recente ou atual ao Hg, que está diretamente relacionada com o consumo de peixe contaminado com MeHg. Porém em casos de exposição crônica, a taxa de eliminação do Hg pelo sangue é semelhante à taxa de absorção, de modo que o nível de Hg medido pode ser utilizado para indicar uma exposição de longa duração. Como o MeHg é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal e distribuído para o corpo através da corrente sanguínea, em geral, o que se observa em populações com alto consumo de peixe, é que 95% do Hg total medido no sangue corresponde a MeHg. A OMS considera como aceitável uma concentração de 5 a 10 µg/L de Hg total no sangue para indivíduos que não consomem peixe contaminado (UNEP, 2008).

Outro biomarcador de exposição ao Hg bastante utilizado é o nível de Hg total no cabelo. O Hg é incorporado ao couro cabeludo durante a sua formação, e depois disso não retorna para o sangue, sendo por isso um bom marcador de exposição de longa duração. Cerca de 80% da quantidade de Hg total medida no cabelo corresponde a MeHg (US EPA, 2001) e fatores como idade, etnia e coloração do cabelo parecem influenciar na incorporação do Hg ao cabelo, de modo que os mesmos devem ser considerados quando se optar por usar este biomarcador de exposição (YAMAGUCHI *et al.*, 1975). Existe uma proporção de aproximadamente 250:1 entre a quantidade de Hg incorporada no couro cabeludo e a quantidade de Hg no sangue, que significa que a quantidade de Hg total no cabelo é cerca de 250 vezes mais alta que a quantidade de Hg no sangue no momento em que o cabelo é formado (US EPA 2001). Considera-se aceitável um nível de 1-2 ppm (ou 1-2 µg/g) de Hg total no cabelo (OMS, 1990).

2.1.5 – Toxicocinética do Mercúrio

Cerca de 95% do MeHg ingerido através do peixe é absorvido pelo trato gastrointestinal (CLARKSON *et al.*, 2007). Após a ingestão, o MeHg é acumulado no fígado até ser distribuído para os demais tecidos em um processo que leva aproximadamente de 30 a 40 horas (Figura 2.2). No sangue, 90% do MeHg se encontra nas hemácias, com uma concentração vinte vezes maior em relação ao plasma sanguíneo. A concentração de Hg no cérebro é cerca de cinco vezes a concentração encontrada no sangue. MeHg tem capacidade de atravessar a placenta e a barreira hematoencefálica. Os níveis de MeHg no sangue do cordão umbilical são proporcionais aos níveis do sangue materno. No entanto, os níveis em um cérebro em desenvolvimento (fetal) são aproximadamente cinco a sete vezes mais altos do que os níveis encontrados no sangue materno (CERNICHIARI *et al.*, 1995).

A alta mobilidade do Hg no corpo é favorecida pela sua afinidade com grupos tiol (-SH) presentes em moléculas de pequeno peso molecular que atuam como transportadoras do Hg para dentro das células (CLARKSON *et al.*, 2007). Uma das principais moléculas responsáveis por esse transporte é a Glutathione (GSH), que forma um complexo com o MeHg (MeHg-GSH) e o transporta para todos os órgãos do corpo, inclusive para o sistema nervoso central (FARINA *et al.*, 2011).

A meia-vida do MeHg no corpo é cerca de 50 dias, podendo variar entre 20 e 70 dias. No cabelo, essa meia-vida é de aproximadamente 65 dias variando de 35 a 100 dias, o que significa que o MeHg é eliminado lentamente (CLARKSON *et al.*, 2003). O MeHg é eliminado do corpo via demetilação e excreção da forma inorgânica através das fezes ou pela bile através do complexo MeHg-GSH e apenas 10% ou menos é eliminado via urina. Os fetos não excretam MeHg devido sua incapacidade de realizar estes dois processos metabólicos (BALLATORI & CLARKSON, 1985).

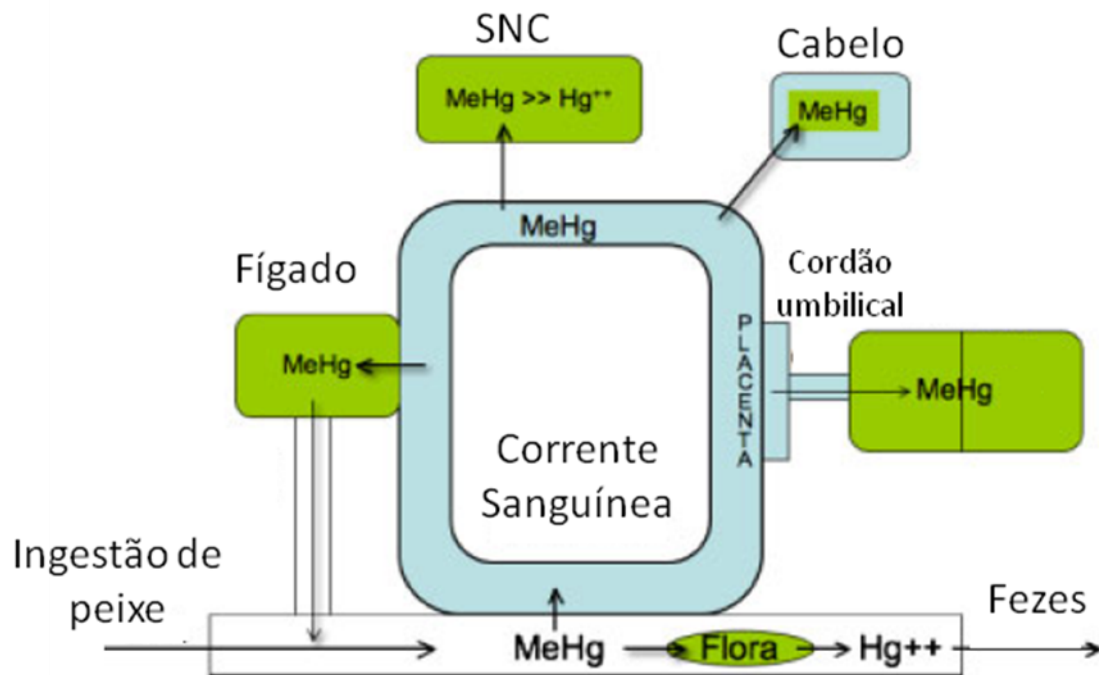


Figura 2.2 – Esquema da toxicocinética do MeHg em uma mulher grávida (Adaptado de CLARKSON *et al.*, 2007).

2.1.6 – Efeitos adversos à saúde humana

O Hg causa uma variedade de efeitos tóxicos adversos para a saúde humana, principalmente para o sistema nervoso em desenvolvimento. No entanto, a exposição ao Hg não resulta obrigatoriamente em efeitos adversos para a saúde humana. Os efeitos surgem em função do tempo de exposição: aguda (14 dias ou menos), intermediária (15-364 dias) e crônica (365 dias ou mais), do estado químico do Hg (metálico, inorgânico ou orgânico) e da via de exposição (inalação ou oral) (NORDBERG *et al.*, 2015). Como dito anteriormente, o MeHg é a forma mais tóxica de Hg e pode causar danos neurológicos severos aos seres humanos (GRANDJEAN *et al.*, 2010). Os principais sintomas neurológicos relacionados à exposição crônica ao MeHg incluem: tremores, insônia, perda de memória, alterações neuromusculares, dores de cabeça, e déficits de desempenho em testes de função cognitiva (FILLION *et al.*, 2011).

Em adultos, os primeiros efeitos são sintomas não específicos, tais como parestesia (formigamento), mal-estar e visão turva. Com o aumento da exposição, sinais mais específicos aparecem, tais como: constrição concêntrica do campo visual, surdez, disartria,

ataxia, e, finalmente, coma e morte (HARADA, 1995). Além disso, este composto atravessa facilmente a barreira placentária e a barreira hematoencefálica, de modo que exposições durante a gravidez são de grande preocupação.

O sistema nervoso central em desenvolvimento é mais sensível ao MeHg que o adulto. Níveis elevados de MeHg em recém nascidos podem resultar numa perda de neurônios em cada um dos lóbulos do cérebro, e os efeitos sobre o desenvolvimento pode incluir reflexos hiperativos, surdez, cegueira, paralisia cerebral e paralisia geral. Em níveis baixos de exposição, os efeitos no desenvolvimento neurológico podem ser sutis e incluem déficits de linguagem, de aprendizado e de atenção, retardo mental, redução do desenvolvimento motor fino e deficiências organizacionais visual-espaciais (COUNTER AND BUCHANAN, 2004; TRASANDE *et al.*, 2006). Estudos sugerem também uma associação do MeHg com o aumento da incidência de doenças cardiovasculares (SALONEN *et al.*, 1995, RISSANEN *et al.*, 2000).

Nos últimos anos, vários estudos defendem a ideia de que a exposição crônica a concentrações relativamente baixas de MeHg pode desencadear processos genotóxicos em seres humanos (AMORIM *et al.*, 2000; CRESPO-LÓPEZ *et al.*, 2005, 2007 e 2009). A genotoxicidade provocada pelo MeHg é causada por quatro mecanismos moleculares principais: (i) ação direta no DNA, (ii) produção de radicais livres e estresse oxidativo, (iii) inibição do fuso mitótico e (iv) influência sobre os mecanismos de reparo do DNA, que pode causar alterações no material genético, resultando no desenvolvimento de processos cancerígenos, teratogênicos e/ou mutagênicos (CRESPO-LÓPEZ *et al.*, 2009).

2.2 – EXPOSIÇÃO MERCURIAL NA AMAZÔNIA

A política de ocupação da Amazônia no início dos anos 1970, facilitou a instalação de atividades de garimpagem do ouro, responsáveis por liberar Hg no ambiente. A presença de Hg em peixes e seres humanos foi observada pela primeira vez no início dos anos 1990 (AKAGI *et al.*, 1995), e desde então, muitos dos dados obtidos sobre os níveis de Hg acumulado em peixes e populações humanas na região amazônica focaram a atividade garimpeira como a principal responsável pela contaminação mercurial do meio ambiente (MALM, 1998).

A Bacia do Rio Tapajós foi responsável por grande parte do ouro produzido no Brasil nos anos 1980 e por este motivo os elevados níveis de Hg nos ecossistemas amazônicos foram

atribuídos às atividades garimpeiras da região (NIAGRU, 1992; AKAGI *et al.*, 1995; VILLAS BÔAS, 1997). Embora o garimpo tenha contribuído com um aporte excessivo de Hg para o ambiente amazônico naqueles anos (PFEIFFER & LACERDA, 1988) estima-se que menos de 3% do Hg depositado nos solos amazônicos são provenientes da atividade garimpeira (ROULET *et al.*, 1999).

Outras atividades humanas como expansão da pecuária e da agricultura e construção de usinas hidrelétricas têm provocado diferentes tipos de degradação ambiental, como por exemplo desmatamento, incêndios florestais e inundações, que também têm contribuído com a contaminação mercurial dos ecossistemas amazônicos (GUIMARÃES *et al.*, 2000; FEARNSSIDE, 2003). O desmatamento na Amazônia está relacionado principalmente à conversão de floresta em pastagens para a criação de gado, mas também à queima da floresta para cultivos anuais pela agricultura familiar, e à implantação de cultivos de grãos pela agroindústria (MARGULIS, 2003), contribuindo assim com a remobilização do Hg naturalmente acumulado nos solos e sua reemissão para a atmosfera (ROULET *et al.*, 1999). Além disso, a instalação de usinas hidrelétricas provoca a inundação dos solos dos reservatórios que se tornam ambientes adequados para a metilação do Hg (FEARNSSIDE, 2003).

Na região Amazônica, até o presente momento, na maioria dos estudos epidemiológicos realizados, as populações ribeirinhas das bacias do Rio Tapajós (NEVADO *et al.*, 2010), Rio Madeira (BOISCHIO & HENSEL, 2000) e do Rio Negro (BARBOSA *et al.*, 2001) sempre são as mais estudadas por serem consideradas áreas de risco devido à proximidade com o garimpo, e os níveis de Hg total no cabelo constitui o principal bioindicador de exposição ao Hg utilizado (MALM *et al.*, 1997; LEBEL *et al.*, 1997; HARADA *et al.*, 2001; PINHEIRO *et al.*, 2006; PASSOS *et al.*, 2008).

Na Bacia do Rio Tapajós, as populações mais estudadas foram as de São Luis do Tapajós, Brasília Legal e Jacareacanga, localizadas no estado do Pará, e em todas elas foi confirmada uma exposição crônica ao Hg através do consumo de peixe, cujos níveis médios de concentração no cabelo chegaram a 20 µg/g, o que significa que indivíduos destas populações podem vir a apresentar um ou mais dos efeitos tóxicos previstos para este nível de exposição (NEVADO *et al.*, 2010). Por outro lado, populações de municípios pertencentes à mesorregião do Baixo Amazonas, localizada na região noroeste do estado do Pará e entrecortada pelos Rios Tapajós e Amazonas, foram pouco estudadas por estarem localizadas

em uma área considerada afastada das áreas de garimpo (PASSOS *et al.*, 2008; NEVADO *et al.*, 2010).

Estudos com peixes da Bacia do Rio Tapajós demonstraram que espécies consideradas de hábito carnívoro, como *Plagioscion squamosissimus* (pescada branca), *Cichla ocellaris* (tucunaré), *Brachyplatystoma filamentosum* (filhote), *Brachyplatystoma fravicans* (dourada) e *Pseudoplatystoma corruscans* (surubim), possuem níveis de Hg acima do limite recomendável para consumo humano pela Organização Mundial da Saúde, isto é, superiores a 0,5µg/g (OMS, 1990). Organizações internacionais em diferentes países, como por exemplo: FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura), US EPA (Agência de Proteção Ambiental dos EUA), WHO (Organização Mundial de Saúde) e ASTDR (Agência de Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças, são responsáveis por desenvolver regulamentos que protegem a saúde humana dos efeitos de substâncias tóxicas. Em relação à ingestão de Hg através do consumo de peixe, a FAO/OMS recomenda uma ingestão diária de até 0,5 mg de Hg total por pessoa (adulto) por semana, dos quais a ingestão de MeHg seja de no máximo 0,2 mg (UNEP, 2008).

Considerando que populações ribeirinhas da região amazônica consomem em média 8-9 refeições de peixes por semana (NEVADO *et al.*, 2010) e que os peixes carnívoros são os mais consumidos estima-se que nestas populações, o consumo médio diário de peixe por pessoa é de 340g/dia, podendo chegar a 600g/dia nos períodos de cheia (LEBEL, 1997; SAMPAIO DA SILVA *et al.*, 2005; PASSOS *et al.*, 2008). Neste contexto, o que se observa é que a população Amazônica está sofrendo uma exposição crônica a níveis elevados de MeHg devido a sua dieta rica em peixe (de SÁ *et al.*, 2006; PINHEIRO *et al.*, 2006; PINHEIRO *et al.*, 2008). Quando comparada com populações de outras regiões, as populações ribeirinhas da Amazônia sempre apresentam os maiores níveis de Hg, mesmo aquelas afastadas das áreas de mineração de ouro (SANTOS *et al.*, 2003). Estes resultados indicam que a exposição ocupacional e ambiental ao Hg continua sendo um grave problema de saúde coletiva para as populações na região Amazônica (KHOURY *et al.*, 2013).

2.3 – EFEITOS DA EXPOSIÇÃO MERCURIAL PARA A SAÚDE HUMANA: ESTRESSE OXIDATIVO

2.3.1- Estresse Oxidativo

Um dos primeiros mecanismos moleculares descritos a explicar possíveis consequências genotóxicas causadas pelo MeHg foi o estresse oxidativo, um distúrbio no equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (radicais livres) e as defesas antioxidantes. Os radicais livres são espécies químicas altamente reativas que podem causar danos ao DNA e nas células (HALLIWEL, 2007). Espécies reativas de oxigênio (EROs), constituem o principal tipo de radicais livres implicados em mecanismos patogênicos e o MeHg tem a capacidade de induzir dano celular através de um aumento dos níveis de EROs (ERCAL *et al.*, 2001) sendo, portanto, um mecanismo molecular envolvido na genotoxicidade provocada pelo Hg.

Os radicais livres podem causar mutações ao DNA e induzir alterações conformacionais nas proteínas envolvidas no processo de produção e manutenção do DNA, tais como as enzimas de reparo e DNA polimerase. Para evitar esses efeitos deletérios, as células desenvolveram mecanismos antioxidantes que atuam para evitar e corrigir uma produção excessiva de radicais livres, transformando os radicais livres em compostos estáveis. Sistemas de defesas antioxidantes incluem superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), catalase (CAT), glutathione (GSH), beta-caroteno, vitamina A, ácido ascórbico (vitamina C) e alfa-tocoferol (vitamina E). Existe um equilíbrio entre as atividades e os níveis intracelulares destes antioxidantes que são essenciais para a saúde e sobrevivência dos organismos (LIMÓN-PACHECO & GONSEBATT, 2009).

2.3.2 - Sistema de defesa antioxidante

São conhecidos três sistemas antioxidantes:

- O primeiro sistema enzimático antioxidante é composto por dois tipos de enzimas Superóxido dismutase (SOD), a SOD-1 (superóxido dismutase cobre-zinco dependente – CuZnSOD), que contém Cu^{2+} e Zn^{2+} como centros redox e ocorre no citosol, sendo que sua atividade não é afetada pelo estresse oxidativo; e a SOD-2 (superóxido dismutase manganês dependente – MnSOD), que contém Mn^{2+} como centro redox, ocorre na mitocôndria e sua

atividade aumenta com o estresse oxidativo. A Superóxido Dismutase é uma das principais enzimas utilizadas no combate ao dano oxidativo das espécies reativas de oxigênio. O substrato da superóxido dismutase é o radical superóxido gerado normalmente nos organismos aeróbicos, durante o processo de oxidação. O mecanismo de reação se inicia com a redução da enzima pelo superóxido, resultando na formação de oxigênio. A enzima reduzida reage novamente com outro íon superóxido formando como produto, o peróxido de hidrogênio, que na sequência, sofre dismutação pela catalase ou outra peroxidase, originando água e oxigênio molecular (DAVIES, 2000; BIRBEN *et al.*, 2012).

- O segundo sistema de defesa é muito mais simples, sendo formado pela enzima catalase (CAT) que é produzida nos peroxissomos e tem função antioxidante, sendo responsável pela dismutação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água ($H_2O + O_2$). Reações de degradação de compostos orgânicos, ocasionadas pelo estresse oxidativo, produzem radicais livres e peróxidos de hidrogênio, que podem danificar a maquinaria celular (DAVIES, 2000; BIRBEN *et al.*, 2012).

- O terceiro sistema é composto pela GSH (glutationa reduzida) em conjunto com duas outras enzimas: Glutationa Peroxidase (GPx) e Glutationa Redutase (GR). Esse sistema também catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, sendo que a glutaciona opera em ciclos entre sua forma oxidada e sua forma reduzida. A GSH reduz o H_2O_2 a H_2O em presença de GPx, formando uma ponte dissulfeto e, em seguida, a GSH é regenerada (DAVIES, 2000; BIRBEN *et al.*, 2012).

Alguns estudos têm sido realizados nos últimos anos a fim de explicar os principais eventos moleculares que norteiam a neurotoxicidade induzida pelo MeHg. Estes eventos são dependentes das propriedades eletrofilicas do MeHg, que permitem sua interação com grupos nucleofilicos (principalmente tiols e selenols) de outras moléculas de alto e/ou baixo peso molecular. Esta interação é responsável, em parte, pela redução da capacidade antioxidante e aumento da produção de EROs, desencadeando assim o estresse oxidativo, que seria um evento central na neurotoxicidade induzida pelo MeHg (FARINA *et al.*, 2011).

Diferentes trabalhos indicam que o sistema antioxidante da GSH está diretamente relacionado com a neurotoxicidade causada pelo MeHg (FARINA *et al.*, 2009; FRANCO *et al.*, 2006; ASCHNER *et al.*, 2007; SHANKER *et al.*, 2005). O que se observa tanto *in vitro* como *in vivo* é que o nível de GSH é reduzido após uma intoxicação por MeHg e como foi mencionado anteriormente, o MeHg pode alterar as propriedades tiol (-SH) e selenol (-SeH) de algumas moléculas de baixo e/ou alto peso molecular. Considerando que estes grupos são

críticos para a atividade catalítica de várias enzimas, entre elas as GSH-relacionadas envolvidas nos processos antioxidantes, é possível afirmar que o MeHg é capaz de afetar a atividade destas enzimas. A exposição ao MeHg provoca também um aumento na produção de H₂O₂, levando a um aumento nos níveis de EROs (FRANCO *et al.*, 2006) e isto pode ser devido ao fato do MeHg reduzir os níveis de GSH e conseqüentemente alterar o processo de detoxicação pela GPx (FARINA *et al.*, 2011).

Neste contexto, Pinheiro *et al.* (2008) realizaram um estudo no qual analisaram os níveis de GSH e CAT no sangue de mulheres que moram em áreas consideradas de risco quanto aos níveis de Hg na região amazônica. Seus resultados sugerem que a exposição humana ao Hg pode diminuir a atividade do sistema de defesa antioxidante e que estas enzimas podem ser utilizadas como biomarcadores. Outro estudo foi realizado para avaliar possíveis associações entre biomarcadores de estresse oxidativo e exposição ao Hg em populações ribeirinhas da Bacia do Rio Tapajós que se alimentam de peixes. Os altos níveis de Hg encontrados apresentaram uma relação inversa estatisticamente significativa com os níveis de GSH, confirmando assim a associação positiva entre exposição ao Hg e estresse oxidativo (GROTTO *et al.*, 2010).

2.4 – INTERAÇÃO GENE-AMBIENTE

A variabilidade genética que ocorre entre populações pode explicar as discrepâncias observadas em relação aos níveis de Hg em indivíduos de diferentes populações (LLOP *et al.*, 2015). Uma determinada combinação de genótipos pode, por exemplo, oferecer uma eliminação mais rápida do MeHg e/ou diferenças na capacidade de eliminar os EROs induzidos pela presença do MeHg. Indivíduos que possuem essa combinação genotípica serão capazes de tolerar níveis mais elevados de Hg, podendo não apresentar sintomas ou problemas de saúde decorrentes desta exposição.

Um comitê formado por pesquisadores do Conselho Nacional de Pesquisa dos EUA concluiu que até 25% dos efeitos neurotóxicos provocados pelo Hg é resultado de uma interação gene-ambiente (NRC, 2000). Isso acontece porque existem diferentes fatores influenciando a absorção, biotransformação, distribuição e a eliminação do Hg (Figura 2.3). Em relação aos fatores genéticos, matematicamente existem várias combinações genotípicas possíveis entre esses genes, das quais algumas combinações podem influenciar mais que outras na susceptibilidade dos indivíduos aos efeitos tóxicos do Hg. Neste contexto, estudos

de interação gene-ambiente em diferentes populações são de fundamental importância para avaliar quais combinações genotípicas são mais frequentemente associadas aos efeitos tóxicos decorrentes da exposição.

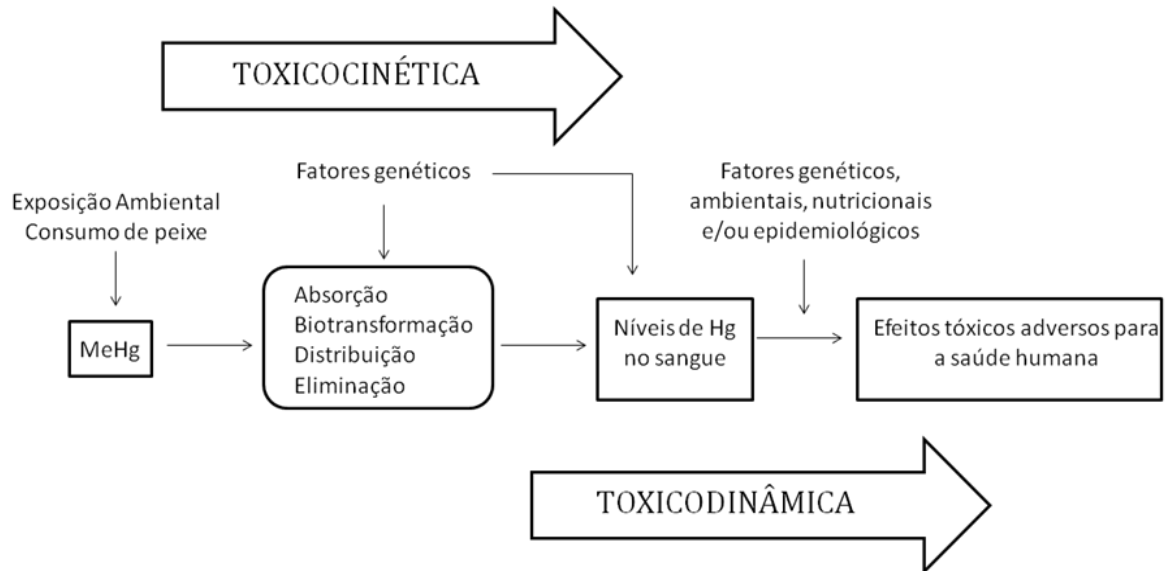


Figura 2.3 – Esquema de como os fatores genéticos podem modificar a toxicocinética e a toxicodinâmica do Hg (Adaptado de LLOP *et al.*, 2015).

O sistema de defesa antioxidante é regulado por uma complexa rede que envolve diferentes genes. Variantes genéticas (polimorfismos) presentes nestes genes podem diminuir a atividade enzimática do produto gênico correspondente e isso pode ser em parte explicado pela ampla variabilidade observada na suscetibilidade individual ao estresse oxidativo induzido por um fator de exposição ambiental. Em função do impacto do estresse oxidativo para a saúde humana e da variedade de fatores capazes de induzi-lo, é de fundamental importância entender o que determina a suscetibilidade individual ao estresse oxidativo. Neste contexto, os estudos de interação gene-ambiente têm sido utilizados nos últimos anos para avaliar o efeito do fator genético sobre o sistema de defesa antioxidante em casos de exposição ambiental. Os estudos de interação gene-ambiente ajudam a detectar efeitos genéticos que não seriam detectados apenas com uma análise genética (BASU *et al.*, 2014).

Do ponto de vista biológico, interação é definida como uma situação em que o efeito de um fator é modificado na presença de outro e o interesse principal é entender o modo de ação de um dos fatores. No caso de uma interação gene-ambiente, o interesse principal pode ser o fator ambiental ou o fator genético. Quando o interesse é avaliar o fator ambiental deve-se investigar o mecanismo patogênico pelo qual a exposição ambiental pode causar dano

celular através do estudo de sua interação com um gene de uma via metabólica específica e/ou determinar se o efeito do fator ambiental está relacionado a um subgrupo de indivíduos com um genótipo específico. Por outro lado, se o interesse é avaliar o fator genético deve-se explicar a heterogeneidade observada entre as populações, demonstrando como este efeito é modificado pela presença de um fator ambiental específico ou detectar efeitos genéticos que só se manifestam na presença de um determinado fator ambiental (MINELLI & GÖGELE, 2011).

Sendo assim, se por um lado o interesse principal é a exposição ambiental ao Hg e as consequências do estresse oxidativo resultantes desta exposição, o estudo de interação gene-ambiente pode ser utilizado para explicar como polimorfismos presentes em genes que regulam o sistema de defesa antioxidante podem influenciar a toxicocinética do Hg. Além disso, o estudo de interação gene-ambiente pode avaliar se algum genótipo em específico está influenciando as variações observadas entre os indivíduos de populações expostas ao Hg no que diz respeito aos níveis de Hg e aos efeitos tóxicos à saúde humana resultantes desta exposição.

A análise de polimorfismos é uma das principais metodologias empregadas em estudos de interação gene-ambiente. Diferentes versões de uma mesma sequência de DNA em um determinado local cromossômico (locus gênico) são chamadas de alelos. Quando os alelos são tão comuns que são encontrados em mais de 1% dos cromossomos na população em geral, eles são chamados de polimórficos. Sendo assim, um polimorfismo genético é definido como uma sequência de DNA que varia com uma frequência de pelo menos 1% entre os indivíduos de uma população. Alguns destes polimorfismos ocorrem em sequências de DNA situadas entre os genes ou dentro dos íntrons e não alteram a expressão do gene. Por outro lado, aqueles polimorfismos que ocorrem dentro da sequência codificante do gene (éxons) podem resultar em variantes proteicas diferentes que podem levar a fenótipos nitidamente distintos.

O tipo mais comum de variação no genoma humano é a substituição de uma base por outra em uma posição específica do gene (Figura 2.4). Esta variação é chamada de Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) e ocorre em todo genoma (região promotora, exons e íntrons) com uma frequência de aproximadamente 1 em cada 1000 pares de base (BROOKES, 1999). Os SNPs variam em tipo e em número entre regiões de um mesmo cromossomo e entre cromossomos diferentes, resultando assim em uma enorme variabilidade genética dentro de uma mesma espécie.

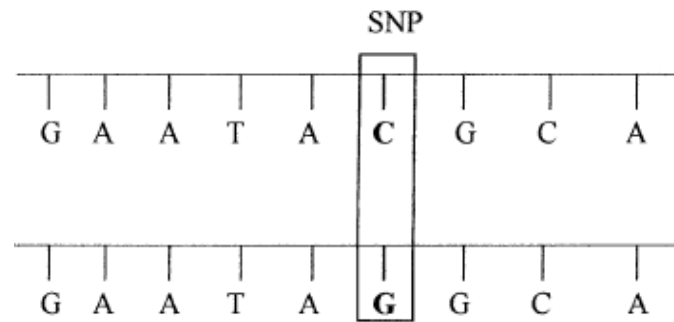


Figura 2.4 – Exemplo de SNP: Substituição de um C por um G (C>G) em uma posição específica da sequência de DNA.

2.4.1 – Papel central da Glutathione (GSH) na toxicocinética e na toxicodinâmica do mercúrio

Como mencionando anteriormente nesta revisão bibliográfica, a GSH é 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 dentro do meio intracelular. Com o auxílio da GSH, o MeHg pode facilmente atravessar as membranas celulares sendo transportado para diferentes tecidos através do complexo MeHg-GSH, desempenhando assim um papel fundamental na toxicocinética do Hg. Além disso, a GSH também participa da toxicodinâmica do Hg ao fazer parte de um dos principais sistemas antioxidantes responsáveis por combater o estresse oxidativo, um dos efeitos genotóxicos da exposição por Hg (GROTTO *et al.*, 2010).

Um dos primeiros efeitos celulares após a absorção do MeHg no fígado é a depleção dos níveis de GSH como consequência da conjugação do complexo MeHg-GSH. A formação do complexo MeHg-GSH irá então depender da disponibilidade de GSH no meio intracelular. Fatores genéticos e/ou nutricionais que estejam envolvidos com o metabolismo da GSH podem regular essa disponibilidade que será ou não suficiente para distribuir todo o MeHg absorvido. Somado a isso, sabe-se que a meia-vida do MeHg no corpo é cerca de 50 dias, podendo variar entre 20 e 70 dias (CLARKSON *et al.*, 2003) e que as consequências da exposição para a saúde humana dependem, entre outros fatores, do tempo de duração desta exposição.

No caso de uma exposição ambiental crônica através do consumo de peixe, como a que acontece na região amazônica, a quantidade de MeHg ingerida e absorvida diariamente

supera a quantidade eliminada o que provoca um aumento nos níveis de MeHg no corpo humano (no inglês, *body burden*). Em geral, 90% do MeHg ingerido através do peixe é encontrado nas hemácias e é demetilado lentamente antes de ser excretado pelo sistema biliar e/ou fezes, sendo um excelente biomarcador de exposição recente e uma das formas mais confiáveis de avaliar a exposição mercurial em humanos (CLARKSON *et al.*, 2007).

Neste contexto, uma possível explicação para os altos níveis de Hg encontrados no sangue de indivíduos expostos cronicamente ao MeHg seria que a quantidade de moléculas de GSH disponíveis intracelularmente seja inferior à quantidade de Hg absorvido de modo que este Hg vai “sobrar” e vai ficar se acumulando no sangue. Vários são os fatores que regulam o metabolismo da GSH dentre os fatores genéticos, destacam-se os genes que participam da síntese da GSH, entre eles a Cistationina Gama Liase (*CGL*), a Glutamato Cisteína Ligase (*GCL*), e a glutatona sintetase (*GS*). A GSH é sintetizada em duas etapas consecutivas e qualquer alteração na atividade enzimática codificada por um ou mais destes genes pode refletir na quantidade de GSH sintetizada e pode contribuir com uma maior carga corporal de Hg entre os indivíduos.

Para a síntese de GSH, a enzima GCL usa os aminoácidos glutamato e cisteína como substratos formando o dipeptídeo Glu-Cis, que se combina com a glicina numa reação catalisada pela GS para produzir a GSH. A síntese da GSH ocorre no interior das células e é controlada principalmente pela biodisponibilidade da cisteína e embora sejam estudados separadamente, os ciclos metabólicos do ácido fólico e da metionina estão relacionados com a síntese da GSH, visto que a cisteína utilizada na síntese da GSH é derivada da reação de transulfuração da homocisteína (Figura 2.5).

A concentração plasmática da homocisteína é influenciada tanto por fatores nutricionais (deficiência de ácido fólico, vitamina B6 e B12) quanto por genes envolvidos no seu metabolismo. A homocisteína é formada exclusivamente a partir da desmetilação da metionina, principal fonte de átomos enxofre para proteínas e pode seguir duas vias metabólicas possíveis: a via de remetilação da metionina, um processo que utiliza folato e vitamina B12 como cofator, e a via da transulfuração em cistationa, usando a vitamina B6 como um cofator. Duas enzimas principais estão envolvidas na remetilação da metionina: a metionina sintetase (MS) e a 5-metil-tetrahidrofolato redutase (MTHFR), enquanto a enzima cistationina b-sintase (CBS) está envolvida na via de transulfuração. Essas enzimas, juntamente com as vitaminas B6, B12 e o ácido fólico, mantêm baixa a concentração intracelular de homocisteína, mesmo que os níveis plasmáticos variem consideravelmente.

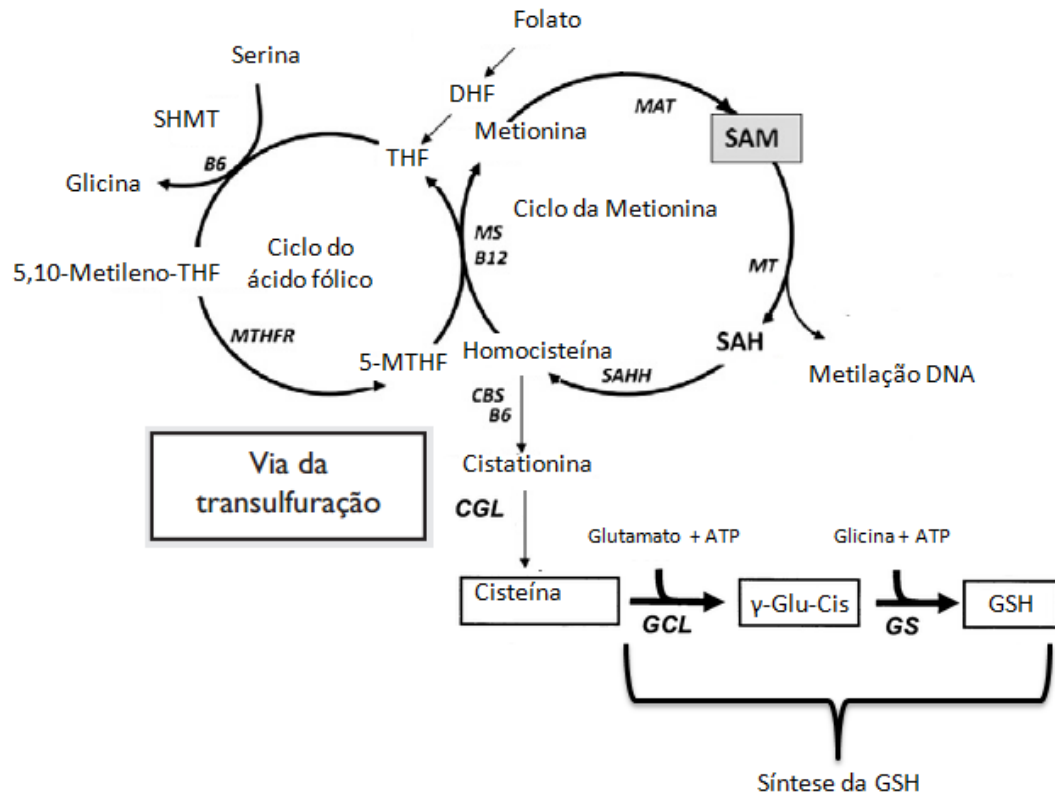


Figura 2.5 – Visão geral dos principais genes envolvidos nas vias metabólicas do ácido fólico, da metionina e da síntese de GSH.

É importante ressaltar que alterações nos genes da via metabólica do ácido fólico e metionina e/ou uma deficiência alimentar de vitaminas B6, B12 e ácido fólico podem interferir indiretamente na síntese da GSH e acabar afetando a susceptibilidade de alguns indivíduos aos níveis de Hg. Em outras palavras, as variações observadas em relação aos níveis de Hg entre diferentes indivíduos podem não estar diretamente relacionadas à via metabólica da GSH. Por exemplo, um estudo recente demonstrou que o MeHg afeta a ciclo de metilação da metionina inibindo a expressão de enzimas fundamentais para o ciclo, incluindo a MS e a MTHFD1 (Metileno-THF Desidrogenase) (CABEZAS-SANCHEZ *et al.*, 2015). Essa situação é apenas mais uma entre várias possíveis explicações para a diferença de susceptibilidade aos níveis de Hg observada entre indivíduos de diferentes populações, haja visto a complexidade da via metabólica da GSH e do importante papel que esse tripeptídeo desempenha nas células, o que corrobora a ideia que pouco se sabe ainda a respeito do efeito destes genes na toxicidade causada pelo Hg.

Além de sua participação na toxicocinética do Hg, a GSH é um dos principais antioxidantes encontrados no meio intracelular. A glutatona pode ser encontrada na forma

reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG). (Figura 2.6). A enzima Glutationa Peroxidase (GPx) é uma das enzimas antioxidantes que catalisam a remoção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) combinando-o com a glutatona para formar glutatona oxidada. A enzima Glutationa Redutase (GR) é a principal responsável pela regeneração da glutatona à sua forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutatona (Figura 2.63).

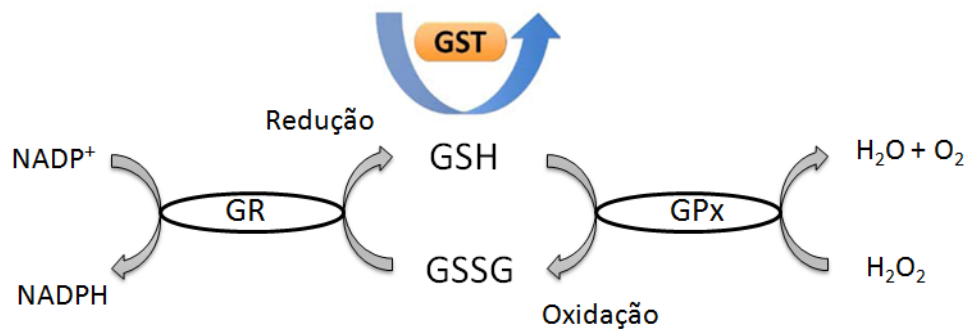


Figura 2.6 - Principais enzimas envolvidas com a regeneração da glutatona à sua forma reduzida (GSH)

Assim como o que acontece na via metabólica da síntese de GSH, os fatores genéticos e/ou nutricionais que estejam envolvidos no sistema antioxidante da GSH também poderão influenciar o aumento dos níveis de Hg no sangue de indivíduos expostos. Polimorfismos nos genes *GPx* ou *GR* podem reduzir os níveis da GSH visto que o ciclo de oxiredução responsável por manter os níveis de GSH estará comprometido em função de uma deficiência e/ou ausência de atividade das enzima GPx e GR. Além disso, alguns estudos têm demonstrado que o Hg ao reduzir a capacidade de defesa antioxidante (em função da depleção nos níveis de GSH causada pelo aumento dos níveis de MeHg no sangue) provoca um aumento na produção de EROs, podendo induzir o estresse oxidativo, que seria um evento central na neurotoxicidade causada pelo MeHg (FRANCO *et al.*, 2006; ASCHNER *et al.*, 2007; SHANKER *et al.*, 2005; FARINA *et al.*, 2011).

Uma possível explicação seria que na ausência e/ou níveis reduzidos da GSH, a enzima GPx não catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), provocando assim um aumento nos níveis deste ERO no meio intracelular. Além disso, a enzima GPx apresenta selenocisteína no seu sítio ativo e portanto a ingestão de selênio (Se) pode influenciar tanto a síntese quanto a atividade das selenoproteínas, incluindo a GPx. Em relação ao Hg, alguns trabalhos têm demonstrado o efeito protetivo do selênio nos efeitos neurotóxicos do MeHg, de

modo que alterações nos genes que codificam as selenoproteínas e/ou uma dieta deficiente em selênio pode ter efeito tanto sobre os níveis de Hg quanto sobre a função antioxidante da GPx.

Na interseção de tudo que foi discutido até o momento, existe uma família de genes que está envolvida tanto na toxicocinética do Hg quanto na detoxificação de radicais livres responsáveis pela peroxidação lipídica das membranas celulares e por este motivo o efeito destes genes sobre os níveis de Hg tem sido estudado. Alguns trabalhos encontraram uma relação entre os genes da família Glutationa S-Transferase (GST) e um aumento nos níveis de MeHg. As enzimas *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* são as principais responsáveis pela conjugação e eliminação do complexo MeHg-GSH. Alterações nestes genes podem resultar em perda ou redução da atividade enzimática o que vai impedir a eliminação do MeHg através do complexo MeHg-GSH e conseqüentemente vai manter os níveis de MeHg elevados no sangue. Ou seja, mesmo que a GSH esteja sendo sintetizada em quantidades suficientes para se ligar a todo o MeHg absorvido, se as GSTs não estiverem funcionando corretamente, o MeHg não será eliminado e se manterá em níveis elevados no sangue.

2.4.2 - Glutationa S-Transferase (GST)

No contexto da exposição mercurial e do ponto de vista da interação gene-ambiente, todos os genes que codificam enzimas que participam direta ou indiretamente da via metabólica da GSH e do sistema de defesa antioxidante são possíveis candidatas a estarem envolvidas no aumento dos níveis de Hg no sangue e nos efeitos tóxicos adversos para a saúde humana decorrentes desta exposição. No entanto, apenas alguns deles têm sido estudados devido seu potencial papel em modificar a resposta individual a diferentes fatores ambientais e assim causar o estresse oxidativo.

Polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo da GSH (Figura 2.7) têm sido associados com níveis elevados de MeHg (BASU *et al.*, 2014) dos quais se destacam os genes Cistationina Gama Liase (*CGL*), a Glutamato Cisteína Ligase (*GCL*), Glutationa Sintetase (*GS*), Glutationa Redutase (*GSR*), Glutationa S-Transferase (*GST*) e Glutationa Peroxidase (*GPX*).

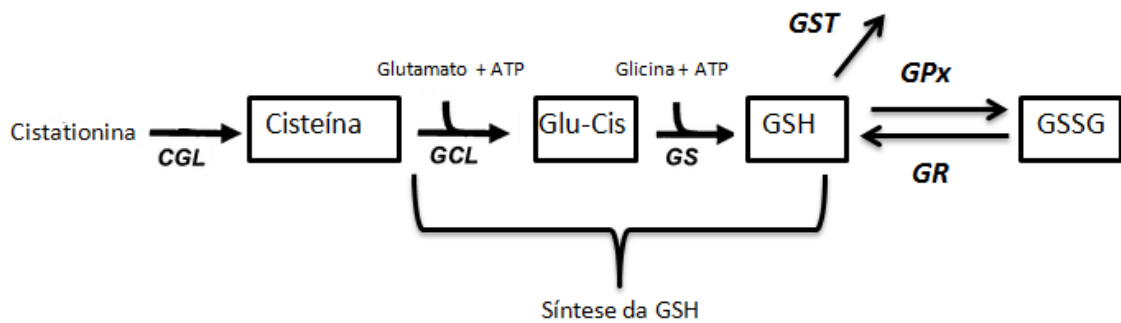


Figura 2.7 - Principais genes envolvidos no metabolismo da GSH e associados com aumento dos níveis de MeHg (BASU *et al.*, 2014).

A Glutathione S-Transferase (*GST*) é uma família multigênica altamente polimórfica envolvida no metabolismo de diferentes tipos de xenobióticos e substâncias carcinogênicas. Existem sete classes (designadas pelas letras do alfabeto grego) descritas de glutathione transferases (*GSTs*) citossólicas em humanos: Alpha (cromossomo 6p; *GSTA1-GSTA4*), Mu (cromossomo 1p; *GSTM1-GSTM5*), Pi (cromossomo 11q; *GSTP1*), Sigma (cromossomo 4q; *GSTS1*), Theta (cromossomo 22q; *GSTT1* e *GSTT2*), Omega (cromossomo 10q; *GSTO1*) e Zeta (cromossomo 14q; *GSTZ1*) (STRANGE *et al.*, 2001). Polimorfismos tem sido descritos em vários destes genes, mas os mais estudados são os genes da família Mu, Theta e Pi.

O gene *GSTM1* possui 8 éxons, está localizado no cromossomo 1 (1p13.3) e é conhecido por ser altamente polimórfico. O gene *GSTM1* possui quatro alelos diferentes: os alelos *GSTM1**A e *GSTM1**B, que codificam a enzima *GSTM1* funcional com atividade normal; o alelo *GSTM1**0, onde ocorre a deleção do gene, e, portanto a enzima não é expressa; e o alelo *GSTM1**1x2, onde se observa uma superexpressão da enzima *GSTM1* devida à duplicação do gene (HAYES *et al.*, 2005).

O gene *GSTT1* possui 6 éxons e está localizado no cromossomo 22q11.23. Para o gene *GSTT1* foram descritos três alelos: o *GSTT1**A, e o *GSTT1**B, nos quais a enzima tem atividade normal e um alelo nulo denominado *GSTT1**0, que representa a deleção do gene e consequentemente a ausência de produção da enzima *GSTT1* (HAYES *et al.*, 2005).

Em ambos os genes o genótipo nulo é polimórfico, e ocorre com frequência entre indivíduos saudáveis, apesar desta frequência variar conforme a etnia. De um modo geral, o genótipo *GSTM1* nulo ocorre em 49-55% dos indivíduos de origem europeia e em 27-35% dos de origem afroamericana. Já para o genótipo *GSTT1* nulo, a frequência é de 15-19% entre os descendentes europeus e 24% em afroamericanos (HAYES *et al.*, 2005). Em populações de todo o mundo deleções nos genes *GSTM1* e *GSTT1* têm sido associadas a diferentes tipos de

problemas de saúde relacionados ao estresse oxidativo (HAYES & STRANGE, 2000), como por exemplo, câncer de mama de pulmão e de fígado.

O gene *GSTP1* está localizado no cromossomo 11 (11q13) e possui 7 éxons. Dois polimorfismos foram identificados neste gene: uma substituição de uma base adenina por uma base guanina na posição 313 do éxon 5 (rs1695; c.313A>G), que resulta na substituição de uma Isoleucina por uma Valina no códon 105 (p.Ile105Val) e uma substituição de uma base citosina por uma base timina na posição 341 do éxon 6 (rs1138272; c.341C>T), que resulta na substituição de uma Alanina por uma Valina no códon 114 (p.Ala114Val). O códon 105 compreende parte do sítio ativo da enzima GSTP1, de modo que a substituição de um aminoácido nesta posição pode alterar a atividade enzimática. Já a presença da Valina na posição 114 parece ter pouco impacto sobre a atividade da enzima GSTP1 (ALI-OSMAN *et al.*, 1997).

As enzimas GSTs têm papel importante na detoxificação do Hg: catalisam a reação de conjugação do complexo MeHg-GSH e promovem a eliminação do MeHg via sistema biliar (BALLATORI & CLARKSON, 1985). Polimorfismos nos genes *GSTM1* e *GSTT1* e *GSTP1* descritos anteriormente podem resultar em perda de atividade enzimática e por isso têm sido relacionados a um aumento nos níveis de Hg, o que significa que indivíduos que possuem genótipo nulo para os genes *GSTM1* e/ou *GSTT1* e/ou o genótipo mutante para os polimorfismos rs1695 e rs1138272 do gene *GSTP1* podem ser mais suscetíveis aos efeitos tóxicos da exposição por Hg.

CAPÍTULO 3 - METODOLOGIA

Trata-se de um estudo observacional, descritivo e quantitativo que foi realizado no período de 2013 a 2016 no Laboratório de Genética e Biodiversidade (LGBio), da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA). O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Pará (UEPA) (Parecer 1.127.108 – Anexo I) e todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Anexo II).

3.1 – CASUÍSTICA

Participaram do estudo 144 indivíduos de ambos os sexos, com idades entre 18 e 81 anos residentes na área urbana e de várzea em Santarém (PA).

O Município de Santarém situa-se ao norte do Brasil, na Mesorregião do Baixo Amazonas, microrregião de Santarém, é o centro polarizador da Região Oeste do Pará – área que abrange 722.358 km² e abrange 27 Municípios. É considerado um centro polarizador visto que oferece a melhor infraestrutura econômica e social da região, além de possuir um setor de serviços mais desenvolvido. O Censo IBGE 2010, divulgado em abril de 2011, estimou a população de Santarém em 294.580 habitantes (Prefeitura Municipal de Santarém, 2013).

As coletas foram realizadas na UFOPA, no INCRA e na comunidade do Tapará Grande durante o período de Maio a Agosto de 2015. As coletas realizadas na área urbana incluíram universitários, servidores e funcionários terceirizados residentes em diferentes bairros de Santarém enquanto as coletas realizadas na área de várzea incluíram famílias ribeirinhas. As coletas foram previamente divulgadas de modo que os indivíduos compareceram no dia e local agendados para as coletas e se disponibilizaram voluntariamente para participar do estudo.

3.2 – QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE MERCÚRIO

Foi coletado sangue periférico de todos os indivíduos e os níveis de Hg total (em inglês, Ery-Hg) foram medidos, a fim de se determinar a dose efetiva da exposição na população estudada. 95% do Hg total medido no sangue corresponde a MeHg (UNEP, 2008).

Cada amostra foi medida em duplicata. As medidas foram feitas no equipamento DMA-80 Direct Mercury Analyzer (Milestone).

Embora o Conselho Nacional de Pesquisa dos Estados Unidos da América (NRC, do inglês *National Research Council*) recomende um limite de exposição de 5,8 µg/L de Hg total no sangue (NRC, 2000), para o presente trabalho foram considerados os limites estabelecidos pela OMS que preconiza como normal (sem efeito tóxico) uma concentração de 5 a 10µg/L de Hg total no sangue para indivíduos que não consomem peixe contaminado (OMS, 1990). Sendo assim, foram considerados expostos os indivíduos que apresentaram os níveis de Hg total no sangue acima de 10µg/L.

De acordo com a Agência de Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças (ASTDR, do inglês *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*), possíveis efeitos tóxicos podem ocorrer em indivíduos com níveis entre 50 e 200µg/L de Hg total no sangue, sendo que em indivíduos com níveis acima de 200µg/L aumenta a probabilidade de ocorrência destes efeitos assim como sua severidade (UNEP, 2008).

3.3 – PERFIL EPIDEMIOLÓGICO

Foi aplicado um questionário (Anexo III) a todos os participantes do estudo. O questionário foi elaborado baseado nos Protocolos para avaliação ambiental e de saúde, de acordo com as orientações da OMS (UNEP, 2008). Para este estudo foram consideradas informações referentes à idade (em anos), sexo, raça/etnia (autodeclarada), escolaridade (educação básica: até 12 anos de estudo e ensino superior: mais de 12 anos de estudo), tabagismo, etilismo, frequência de consumo de peixe, níveis de Hg no sangue e presença de sintomas relacionados à exposição por mercúrio (autodeclarada).

3.4 – ANÁLISES MOLECULARES

As amostras de sangue periférico (5mL) foram coletadas e armazenadas em tubo Vacutainer® com EDTA. Após a coleta de material, foi realizada extração de DNA de todos os 144 indivíduos que participaram do presente trabalho utilizando o *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen), de acordo com especificações técnicas do fabricante. Após a extração, o material foi armazenado a -20°C para análises posteriores.

3.4.1 – Genotipagem *GSTM1*, *GSTT1*

A genotipagem de polimorfismo nos genes *GSTM1* e *GSTT1* foi realizada através de PCR multiplex. Para a reação de PCR foi utilizado 3 μ L de DNA (20-50ng), 1 μ L de cada primer (10mM), 10 μ L de PCR Master Mix 2X (Promega) (50 unidades/mL de Taq DNA Polimerase, buffer (pH 8,5), 400 μ M de cada dNTP, 3 μ M de MgCl₂) e 1 μ L água livre de nuclease, em um volume final de 20 μ L.

Os primers usados foram: *GSTM1* Forward 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3' e Reverso 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3' e *GSTT1* Forward 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3' e Reverso 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3'. O gene constitutivo da β -globin foi utilizado como controle interno da reação de PCR multiplex e amplificado com os primers: Forward 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3' (GH20) e Reverso 5'-CAACTTCATCCACGTTACCC-3' (PC04). A reação foi incubada a 94°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação de 1 minuto a 94°C, anelamento de 1 minuto a 65°C e extensão de 1 minuto a 72°C, com uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 3%, com fragmentos de tamanho: 268pb (gene β -globin), 215pb (*GSTM1* genótipo normal) e 459pb (*GSTT1* genótipo normal) (Figura 3.1).

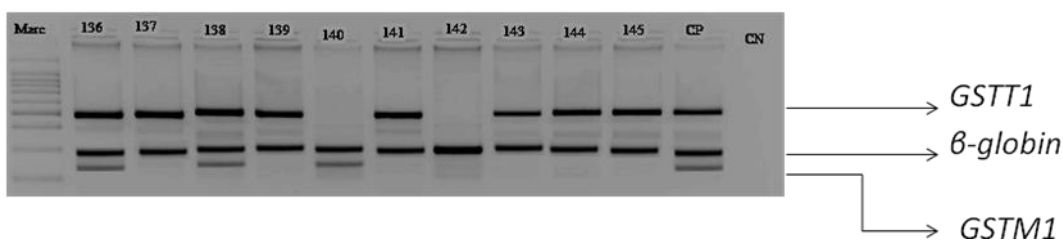


Figura 3.1 – Visualização de PCR multiplex em gel de agarose 3%

3.4.2 – Genotipagem *GSTP1*

(A) High Resolution Melting (HRM)

Para a genotipagem dos SNPs foi utilizado a técnica High Resolution Melting (HRM). A Análise de Melting de alta resolução é uma técnica pós-PCR moderna baseada em análises

de dissociação do DNA (*melting*) utilizada para caracterizar amostras de DNA em função dos seus comportamentos de dissociação (Wittwer et al., 2003).

Em uma análise por HRM, a região de interesse é amplificada por PCR na presença de um fluoróforo que se liga ao DNA de dupla fita. Inicialmente, a fluorescência é alta e conforme a temperatura aumenta, o DNA de dupla fita se dissocia. A fluorescência diminui até que todo o DNA de fita dupla esteja dissociado e então não seja mais emitida fluorescência. Esta mudança na fluorescência é específica para cada sequência de DNA e pode ser monitorada por PCR em tempo real. Durante a PCR, quando ocorre a dissociação do DNA fita dupla para DNA fita simples, a fluorescência desaparece originando a curva de melting. Diferenças na composição de bases dos SNPs podem ser detectadas e comparadas através da curva e da temperatura de melting. Heterozigotos começam a se separar em temperaturas mais baixas e por isso apresentam um perfil de curva característico já os homozigotos são mais difíceis de diferenciar porque suas curvas de melting são muito similares com pequenas diferenças nas suas temperaturas de melting (Wittwer et al., 2003). Por este motivo, para cada reação de PCR-HRM devem ser incluídas amostras cujos genótipos foram anteriormente confirmados por sequenciamento.

(B) Genotipagem de SNPs

Para o presente trabalho foram selecionados dois SNPs no gene *GSTP1*: rs1695 A>G e rs1138272 C>T. Para o desenho dos primers foram utilizados os programas: Primer3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) e Primer BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Figura 3.2).

ID	Gene	Tamanho (pb)	Sequencia Foward	Sequencia Reverso
rs1138272	<i>GSTP1</i>	107	5' TCTCAGGGCTGGGAGGGATGAGAGTA 3'	5' AAAAGGCTTCAGTTGCCCGGGCAGT 3'
rs1695	<i>GSTP1</i>	120	5' GACATGGTGAATGACGGCGTGG 3'	5' GAAGCCCTTTCTTTGTTTCAGCCC 3'

Figura 3.2 – Sequência de primers utilizados no HRM.

A reação de PCR foi realizada em um volume total de 10µL de reação: 5,0µL de *Fast Plus EvaGreen qPCR Master Mix* (Biotium - Uniscience), 1,0µL de DNA genômico (30ng), 0,5µL de cada primer (10mM cada) e 3,0µL de água. Foi utilizado um controle negativo para avaliar uma possível contaminação da reação de PCR. A análise de HRM foi realizada em um *RealTime PCR System* (Illumina – Uniscience).

Os SNPs rs1695 e rs1138272 foram amplificados nas seguintes condições: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 61°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto; A reação de melting variou de 65°C a 95°C em intervalos (rampas) de 0,1°C/segundo. A análise de resultados foi realizada utilizando o *EcoStudy Software* (Illumina).

Para verificar a eficiência da técnica de HRM, assim como confirmar os genótipos referentes aos padrões de curva obtidos pela curva de melting, foi realizado o sequenciamento direto de algumas amostras para cada um dos SNPs analisados (Figura 3.3). Os produtos de PCR foram purificados com *ExoSAP-IT For PCR Product Cleanup* (Affimetrix). Para a reação de sequenciamento foi utilizado o *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). As amostras foram purificadas com o *BigDye Xterminator Purification Kit* (Applied Biosystems) e sequenciadas em um *3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). As análises foram realizadas com o auxílio dos programas *Sequencher* (Versão 5.3 – Gene Codes Corporation) e *Chromas* (versão 2.6 – Technelysium).

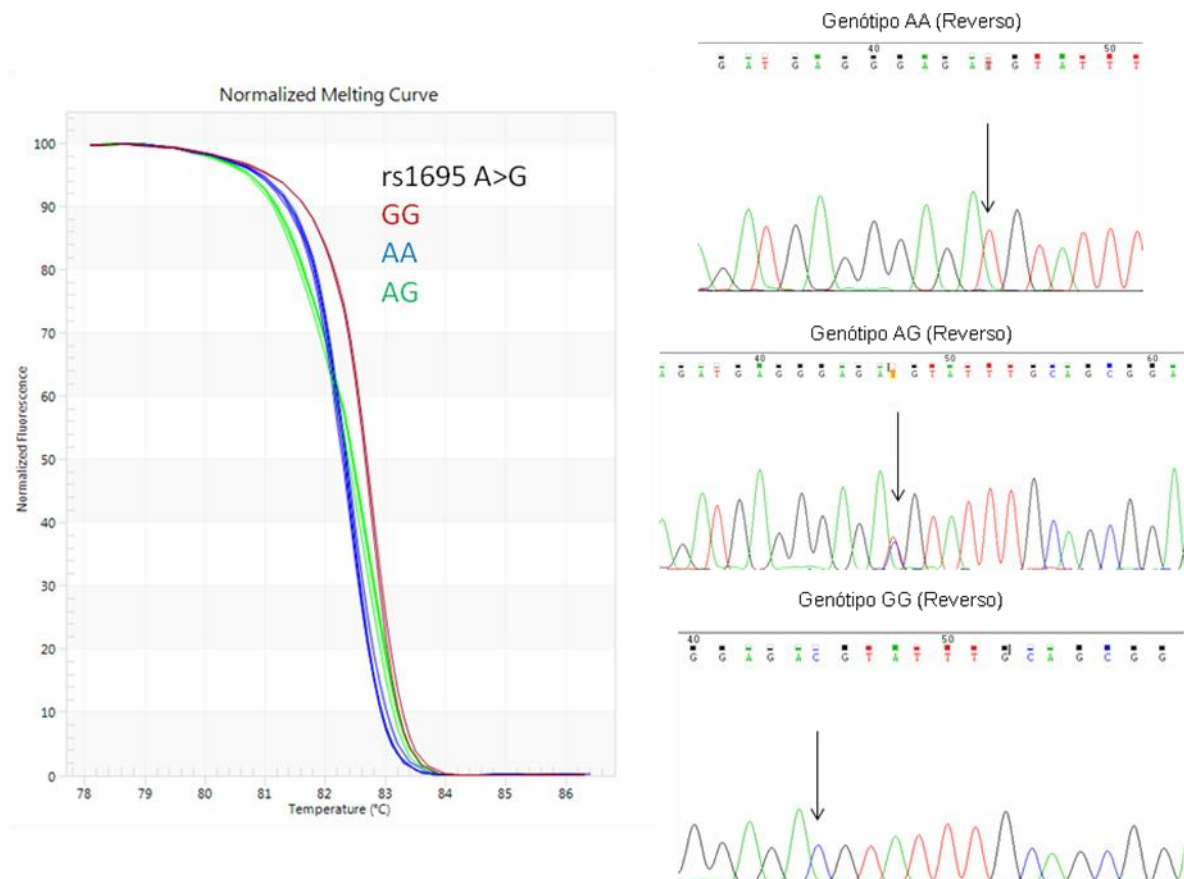


Figura 3.3 – Padrão de curvas do HRM confirmado por sequenciamento.

3.5 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para traçar o perfil epidemiológico da população de Santarém, foi calculada a frequência relativa para cada uma das variáveis categóricas obtidas com o questionário. Além disso, 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 Hg entre as variáveis epidemiológicas foram descritas através das medidas: média, mediana, desvio padrão e dos valores máximo e mínimo. Considerando que nesta população, a principal fonte de exposição ao Hg é a ingestão de peixe contaminado com MeHg, o perfil epidemiológico também foi avaliado em função da frequência do consumo de peixe. Para isso a amostra foi estratificada em dois subgrupos: o de alta frequência, com um consumo de peixe diário ou semanal; e o de baixa frequência, com um consumo quinzenal, mensal ou ausente. Foi calculada a frequência relativa das variáveis epidemiológicas em cada um dos subgrupos e foi verificada se estas variáveis estavam homoganeamente distribuídas entre os subgrupos. Ainda dentro do perfil epidemiológico, foi verificada a frequência de ocorrência (sempre ou raramente/nunca) de 20 sintomas e/ou problemas de saúde relacionados à exposição mercurial. A informação a respeito destes sintomas e/ou problemas de saúde foram relatados pelos próprios voluntários através do questionário. Ainda em relação aos sintomas foi verificada a distribuição dos mesmos em função dos níveis de Hg. Para verificar a distribuição das variáveis categóricas entre os subgrupos de consumo de peixe (alta e baixa frequência) ou dos níveis de Hg (até 10µg/L e acima de 10µg/L) foi aplicado o teste de qui-quadrado de Pearson.

Além do perfil epidemiológico desta população, foram analisadas quatro possíveis relações: (1) níveis de Hg e frequência de consumo de peixe, (2) níveis de Hg e sexo, (3) níveis de Hg e idade, sendo que para as relações 2 e 3 foram considerados apenas os indivíduos do subgrupo de alta frequência e (4) níveis de Hg e os genes *GSTM1*, *GSST1* e *GSTP1* (interação gene-ambiente).

Para as análises referentes às relações 1 e 2 foi aplicado o teste Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados. Uma vez que as variâncias dentro dos subgrupos não foram aproximadamente iguais, a análise de variância (ANOVA) não foi utilizada, de modo que foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para verificar as relações (1) e (2). Para a relação (3) foi realizada uma análise de correlação de Spearman.

Para avaliar a relação (4) foi realizada uma análise de regressão linear (univariada e multivariada). Foi avaliado o efeito das variáveis idade, consumo de peixe, sexo e polimorfismos nos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* sobre os níveis de Hg. Para esta análise, as variáveis categóricas foram dicotomizadas em 0 e 1, conforme apresentado na tabela 3.1. Somente a variável idade não foi dicotomizada por se tratar de uma variável quantitativa. Os testes estatísticos foram realizados no software STATA 7.0, com um nível de significância de 5%. Os gráficos foram construídos utilizando-se o software ORIGIN 8.0.

Tabela 3.1: Atribuição de valores 0 e 1 para as variáveis categóricas utilizadas na análise de regressão linear

Variável	Categoria (0)	Categoria (1)
Consumo de peixe	Baixa frequência	Alta frequência
Sexo	Feminino	Masculino
<i>GSTM1</i>	Genótipo Normal	Genótipo Deleção
<i>GSTT1</i>	Genótipo Normal	Genótipo Deleção
* <i>GSTP1</i> rs1695 A>G	Genótipos AA ou AG	Genótipo GG
* <i>GSTP1</i> rs1138272 C>T	Genótipos CC ou CT	Genótipo TT

*Modelo genético recessivo

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos no presente trabalho. No item 4.1 será apresentada uma análise descritiva dos resultados da quantificação dos níveis de Hg no sangue; o item 4.2 refere-se a uma análise descritiva dos níveis de Hg em função das variáveis epidemiológicas estudadas e à aplicação do teste de Qui-quadrado de Person para verificar a homogeneidade na distribuição das variáveis epidemiológicas entre os subgrupos de alta frequência e o de baixa frequência (consumo de peixe). Neste item também foi verificado a frequência de ocorrência de 20 sintomas relacionados à exposição mercurial e a distribuição destes sintomas em função dos níveis de Hg. No item 4.3 estão apresentados os resultados referentes à distribuição dos genótipos de cada polimorfismo estudado em função dos subgrupos de alta frequência e o de baixa frequência. No item 4.4 estão os resultados referentes às análises de Kruskal-Wallis e Correlação para avaliar as possíveis relações: (1) níveis de Hg e frequência de consumo de peixe, (2) níveis de Hg e sexo, (3) níveis de Hg e idade entre os indivíduos do subgrupo de alta frequência, conforme explicado no item 3.5 do capítulo Metodologia. No item 4.5 estão os resultados de interação gene-ambiente. Para cada polimorfismo estudado foi realizada uma análise descritiva dos níveis de Hg em função dos genótipos e foi verificada a distribuição dos genótipos em função dos níveis de Hg através do teste de Qui-quadrado de Person. Neste item estão apresentados também os resultados referentes ao efeito dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* sobre os níveis de Hg obtidos através de uma análise de regressão linear univariada e multivariada.

4.1 – QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE MERCÚRIO

O nível de Hg total foi medido a partir de amostras de sangue para todos os indivíduos estudados (n = 144). A maioria dos indivíduos (63,2%) apresentou níveis de Hg acima de 10µg/L, que é o limite recomendado pela OMS e o nível médio de Hg entre estes indivíduos foi de 29,4µg/L. Nos demais indivíduos (36,8%) os níveis de Hg foram abaixo de 10µg/L e o nível médio de Hg entre eles foi de 6,6µg/L. Na população estudada, os níveis de Hg variaram de 2,9µg/L a 181,3µg/L. Dos 91 indivíduos com nível de Hg acima de 10 µg/L, 83 indivíduos

(91,2%) apresentaram níveis de Hg entre 10-50µg/L, 5 indivíduos (5,5%) entre 50-100µg/L e 3 indivíduos (3,3%) acima de 100 µg/L¹.

Tabela 4.1: Análise descritiva dos níveis de Hg em amostra da população de Santarém.

	n	%	Níveis de Hg total no sangue (µg/L)				
			Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
<i>Até 10µg/L</i>	53	36,8	6,6	2,0	6,7	2,9	10,0
<i>Acima de 10µg/L</i>	91	63,2	29,4	24,5	25,4	10,2	181,3

4.2 – PERFIL EPIDEMIOLÓGICO

Participaram do estudo 144 indivíduos residentes na área urbana (n=72) e de várzea (n=72) de Santarém (PA), com idade média de 37,3 anos. A tabela 4.2 apresenta a distribuição dos indivíduos estudados e a descrição dos níveis de Hg em função das variáveis utilizadas na elaboração do perfil epidemiológico. A maioria dos indivíduos apresentou idade entre 21 e 40 anos (53,8%) com nível médio de Hg de 18,5µg/L. Em relação à idade foi possível observar que os níveis médios de Hg aumentaram com a idade. Embora a maioria dos indivíduos (63,2%) seja do sexo feminino, foram os homens que apresentaram o nível médio de Hg mais alto (30,4µg/L nos homens e 15,6µg/L nas mulheres). A maioria dos indivíduos se declarou pardo (65,3%), com nível de escolaridade inferior a 12 anos de estudo (53,2%), não fumante (93%) e que não consome bebida alcoólica (58,4%) e o nível médio de Hg entre eles foi de 24,2µg/L, 31,5µg/L, 21,0µg/L e 22,4µg/L, respectivamente. Em relação aos hábitos alimentares, 77,8% dos indivíduos relataram o hábito de consumir peixe diariamente ou pelo menos três vezes por semana e o nível médio de Hg entre eles foi de 25,0µg/L. Em função das diferenças observadas nos níveis médios de Hg, o efeito das variáveis idade, sexo e consumo de peixe sobre os níveis de Hg foram avaliadas separadamente (ver item 4.4 deste capítulo).

¹ Os níveis encontrados foram: 121,84µg/L (40 anos), 181,29µg/L (31 anos) e 113,20µg/L (43 anos). Todos os indivíduos são do sexo masculino, residentes da área de várzea de Santarém e relataram um consumo frequente de peixe.

Tabela 4.2: Perfil Sócio-Demográfico e níveis de Hg em amostra da população de Santarém.

Variáveis Sócio-Demográficas	n	%	Níveis de Hg total no sangue (µg/L)					
			Média	Desvio Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	
Idade (n=143)								
<i>18-20 anos</i>	11	7,7	10,2	8,2	6,9	3,2	27,6	
<i>21 a 40 anos</i>	77	53,8	18,5	24,9	10,5	2,9	181,3	
<i>41 a 60 anos</i>	48	33,6	27,0	20,0	23,3	4,1	113,2	
<i>Mais de 60 anos</i>	07	4,9	24,6	14,9	23,2	7,3	45,2	
Sexo (n=144)								
<i>Feminino</i>	91	63,2	15,6	10,9	10,9	3,7	54,5	
<i>Masculino</i>	53	36,8	30,4	32,2	22,9	2,9	181,3	
Raça (n=144)								
<i>Pardo</i>	94	65,3	24,2	25,9	15,9	2,9	181,3	
<i>Negro</i>	04	2,8	12,2	8,6	11,1	3,2	23,3	
<i>Branco</i>	46	31,9	15,2	11,9	11,2	3,7	59,4	
Escolaridade (n=143)								
<i>Até 12 anos de estudo (educação básica)</i>	76	53,1	31,5	26,5	27,6	4,1	181,3	
<i>Acima de 12 anos de estudo (ensino superior)</i>	67	46,9	9,2	4,7	8,3	2,9	25,8	
Tabagismo (n=142)								
<i>Sim</i>	10	7,0	19,6	15,2	12,6	3,9	44,2	
<i>Não</i>	132	93,0	21,0	22,9	13,7	2,9	181,3	
Etilismo (n=142)								
<i>Sim</i>	59	41,6	18,8	22,0	11,2	2,9	121,8	
<i>Não</i>	83	58,4	22,4	22,8	17,4	3,2	181,3	
Consumo de peixe (n=144)								
<i>Alta frequência</i>	112	77,8	25,0	23,9	20,5	3,7	181,3	
<i>Baixa frequência</i>	32	22,2	7,16	3,2	6,3	2,9	14,9	
Residência (n=144)								
<i>Área urbana</i>	72	50,0	8,7	4,3	8,1	2,9	25,8	
<i>Várzea</i>	72	50,0	33,3	26,2	28,5	7,7	181,3	

A Tabela 4.3 apresenta a distribuição dos indivíduos estudados em função dos subgrupos de consumo de peixe: no subgrupo de alta frequência, a maioria dos indivíduos possui de 21 a 40 anos (50,4%), é do sexo feminino (63,4%) e possui até 12 anos de estudo (64,9%); no subgrupo de baixa frequência, a maioria possui entre 21 e 40 anos (65,5%) e o sexo feminino também é o mais frequente (62,5%). No entanto, ao contrário do subgrupo de alta frequência, a maioria dos indivíduos deste subgrupo possui mais de 12 anos de estudo (87,5%). Os níveis de Hg total estão acima do recomendado pela OMS em 75% dos indivíduos do subgrupo de alta frequência e em 21,9% do subgrupo de baixa frequência. Em relação à residência: 63,4% dos indivíduos do subgrupo de alta frequência vivem na área de várzea e 36,6% vivem na área urbana, enquanto que todos do subgrupo de baixa frequência vivem na área urbana.

Foi aplicado o teste de Qui-quadrado de Pearson para verificar se a distribuição das variáveis era homogênea entre os subgrupos de alta e baixa frequência. Apenas três variáveis

não apresentaram uma distribuição homogênea: nível de escolaridade, que apresentou uma maior ocorrência de indivíduos com educação básica no subgrupo de alta frequência ($\chi^2 = 27,35$; $p < 0,001$); níveis de Hg, com um maior número de indivíduos com níveis de Hg total acima de $10\mu\text{g/L}$ no subgrupo de alta frequência ($\chi^2 = 30,20$; $p < 0,001$); e residência, no qual a maioria dos indivíduos do subgrupo de alta frequência reside na área de várzea enquanto todos os indivíduos do subgrupo de baixa frequência residem na área urbana de Santarém ($\chi^2 = 40,02$; $p < 0,001$).

Tabela 4.3: Perfil Sócio-Demográfico em função do consumo de peixe em amostra da população de Santarém.

Variáveis Sócio-Demográficas	Consumo de Peixe				χ^2	P
	Alta Frequência		Baixa Frequência			
	n	%	n	%		
Idade					3,16	0,37
<i>18- 20 anos</i>	08	7,2	03	9,4		
<i>21 a 40 anos</i>	56	50,5	21	65,6		
<i>41 a 60 anos</i>	41	36,9	07	21,9		
<i>Mais de 60 anos</i>	06	5,4	01	3,1		
Total	111		32			
Sexo					0,0085	0,93
<i>Feminino</i>	71	63,4	20	62,5		
<i>Masculino</i>	41	36,6	12	37,5		
Total	112		32			
Raça					5,05	0,08
<i>Pardo</i>	78	69,6	16	50,0		
<i>Negro</i>	02	1,8	02	6,3		
<i>Branco</i>	32	28,6	14	43,7		
Total	112		32			
Escolaridade					27,35	<0,001
<i>Até 12 anos de estudo (educação básica)</i>	72	64,9	04	12,5		
<i>Acima de 12 anos de estudo (ensino superior)</i>	39	35,1	28	87,5		
Total	111		32			
Tabagismo						
<i>Sim</i>	08	7,3	02	6,2	0,03	0,84
<i>Não</i>	102	92,7	30	93,8		
Total	110		32			
Etilismo					3,67	0,06
<i>Sim</i>	41	37,3	18	56,2		
<i>Não</i>	69	62,7	14	43,8		
Total	110		32			
Níveis de Mercúrio (n=144)					30,20	<0,001
<i>Até $10\mu\text{g/L}$</i>	28	25,0	25	78,1		
<i>Acima de $10\mu\text{g/L}$</i>	84	75,0	07	21,9		
Residência					40,02	<0,001
<i>Área urbana</i>	41	36,6	32	100,0		
<i>Várzea</i>	71	63,4	00	0,0		
Total	112		32			

A tabela 4.4 apresenta a frequência de ocorrência de 20 sintomas relacionados à exposição por Hg, segundo informação declarada pelos próprios voluntários ao responder os

questionários. Em relação à ocorrência frequente, os cinco sintomas mais citados (em negrito na tabela) foram dor de cabeça (54,2%), dores musculares e articulares (53,5%), câimbras musculares (31%), desconforto gastrointestinal (31%) e distúrbio do sono (30,3%).

Tabela 4.4: Frequência de ocorrência dos sintomas relacionados à exposição por Hg em amostra da população de Santarém.

Sintomas	Frequência de ocorrência dos sintomas			
	Sempre		Raramente/Nunca	
	n	%	n	%
Distúrbios do sono	43	30,3	99	69,7
Dor de cabeça	77	54,2	65	45,8
Fadiga	42	29,6	100	70,4
Dificuldade de concentração	39	27,5	103	72,5
Depressão	09	6,3	133	93,7
Perda de memória	22	15,5	120	84,5
Diminuição da coordenação motora fina	12	8,5	130	91,5
Dores musculares e articulares	76	53,5	66	46,5
Câimbras musculares	44	31	98	69
Desconforto gastrointestinal	44	31	98	69
Frequência cardíaca alterada	14	9,9	128	90,1
Hipertensão	12	8,5	130	91,5
Tremor	07	4,9	135	95,1
Dormência ou formigamento em torno da boca	04	2,8	138	97,2
Dormência ou formigamento nas mãos e pés	27	19	115	81
Dificuldade para caminhar	09	6,3	133	93,7
Dificuldade na fala	03	2,1	139	97,9
Diminuição da acuidade visual	36	25,4	106	74,6
Movimento anormal dos olhos	21	14,8	121	85,2
Diminuição da audição	07	4,9	135	95,1

Foi realizada também uma avaliação da distribuição destes sintomas em função dos níveis de Hg (Tabela 4.5). Entre os indivíduos com níveis de Hg acima de 10 μ g/L, os 05 sintomas mais citados foram: dores musculares e articulares (n=52), dor de cabeça (n=52), câimbras musculares (n=33), diminuição da acuidade visual (n=29) e desconforto gastrointestinal (n=27). Não foi observada diferença estatisticamente significativa para a maioria dos sintomas, em relação aos níveis de Hg. Os únicos sintomas que não apresentaram uma distribuição homogênea foram perda de memória ($\chi^2 = 15,33$; p <0,001) e diminuição da acuidade visual ($\chi^2 = 1,25$; p = 0,02).

Tabela 4.5: Frequência de ocorrência dos sintomas relacionados à exposição por Hg em função dos níveis de Hg em amostra da população de Santarém.

Sintomas	Níveis de Hg				χ^2	P
	Até 10 μ g/L		Acima de 10 μ g/L			
	Sempre	Raramente/ Nunca	Sempre	Raramente/ Nunca		
n	n	n	n			
Distúrbios do sono	17	34	26	65	0,35	0,55
Dor de cabeça	25	26	52	39	0,87	0,35
Fadiga	17	34	25	66	0,54	0,46
Dificuldade de concentração	18	33	21	70	2,45	0,12
Depressão	03	48	06	85	0,03	0,87
Perda de memória	16	35	06	85	15,33	<0,001
Diminuição da coordenação motora fina	07	44	05	86	2,86	0,09
Dores musculares e articulares	22	29	54	37	3,45	0,06
Câimbras musculares	11	40	33	58	3,30	0,07
Desconforto gastrointestinal	17	34	27	64	0,20	0,65
Frequência cardíaca alterada	03	48	11	80	1,42	0,23
Hipertensão	02	49	10	81	2,11	0,15
Tremor	02	49	05	86	0,17	0,68
Dormência ou formigamento em torno da boca	02	49	02	89	0,36	0,55
Dormência ou formigamento nas mãos e pés	08	43	19	72	0,57	0,45
Dificuldade para caminhar	03	48	06	85	0,03	0,87
Dificuldade na fala	02	49	01	90	1,25	0,27
Diminuição da acuidade visual	07	43	29	63	5,25	0,02
Movimento anormal dos olhos	04	47	17	74	3,04	0,08
Diminuição da audição	03	48	02	87	0,15	0,70

4.3 – ANÁLISES MOLECULARES

4.3.1 – Frequência Genotípica

Foram genotipados os polimorfismos dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* para os 144 indivíduos analisados neste trabalho (Tabela 4.6). Em relação ao gene *GSTM1*, foram genotipados 139 indivíduos e o genótipo normal foi mais frequente (61,2%) do que o genótipo deleção (38,8%). O mesmo ocorreu para o gene *GSTT1*, dos 139 indivíduos genotipados, 84,9% apresentaram genótipo normal e 15,1% genótipo deleção. Apenas 5,7% apresentaram dupla deleção. Para o SNP rs1695A>G do gene *GSTP1*, o genótipo mais frequente foi o AG (44,5%) e para o SNP rs1138272 C>T o genótipo CC foi o mais frequente (70,2%). Todos os polimorfismos analisados apresentaram distribuição homogênea entre os subgrupos de alta e baixa frequência, exceto o SNP rs1138272 ($\chi^2 = 7,13$; p=0,03).

Tabela 4.6: Distribuição dos genótipos dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* em função dos subgrupos de alta e baixa frequência de consumo de peixe em amostra da população de Santarém.

Genótipo	Frequência Genotípica		χ^2	P	
	Alta frequência	Baixa frequência			
<i>GSTM1</i> (n=139)	Normal (n=85)	64 (59,8%)	21 (65,6%)	0,35	0,56
	Deleção (n=54)	43 (40,2%)	11 (34,4%)		
<i>GSTT1</i> (n=139)	Normal (n=118)	90 (84,1%)	28 (87,5%)	0,22	0,64
	Deleção (n=21)	17 (15,9%)	04 (12,5%)		
<i>GSTP1</i> rs1695 A>G (n=144)	AA (n=52)	43 (38,4%)	09 (28,1%)	1,14	0,56
	AG (n=64)	48 (42,9%)	16 (50,0%)		
	GG (n=28)	21 (18,7%)	07 (21,9%)		
<i>GSTP1</i> rs1138272 C>T (n=144)	CC (n=101)	84 (75,0%)	17 (53,2%)	7,13	0,03
	CT (n=27)	16 (14,3%)	11 (34,3%)		
	TT (n=16)	12 (10,7%)	4 (12,5%)		

4.4 – EFEITOS DAS VARIÁVEIS EPIDEMIOLÓGICAS SOBRE OS NÍVEIS DE MERCÚRIO

4.4.1- Níveis de Hg x consumo de peixe

Para aplicar o teste Análise de Variância (ANOVA), dois requisitos foram previamente comprovados: os dados devem apresentar distribuição normal e a variância entre os subgrupos deve ser aproximadamente igual. Para testar a normalidade foi aplicado o teste Shapiro-Wilk e o resultado do teste mostrou que os níveis de Hg não apresentavam uma distribuição normal nos subgrupos de alta ($W = 0,92$, $p = 0,02$) e baixa ($W = 0,67$, $p = 0,00$) frequência. Além disso, a variância entre os níveis de Hg nos dois subgrupos não foi igual ($F = 17,54$, $p = 0,000$). Com estes resultados não foi possível aplicar o teste ANOVA.

Sendo assim, para verificar se a população de Santarém está ambientalmente exposta ao Hg através do consumo de peixe, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para comparar os níveis de Hg total entre os subgrupos de alta frequência (n=112) e de baixa frequência (n=32).

Os resultados demonstraram que os indivíduos que consomem peixe frequentemente possuem níveis de Hg total mais elevados em comparação aos do subgrupo de baixa frequência ($\chi^2 = 41,68$; $p = 0,0001$). Para fins de visualização, os *box plots* relativos a estes subgrupos podem ser observados na Figura 4.1.

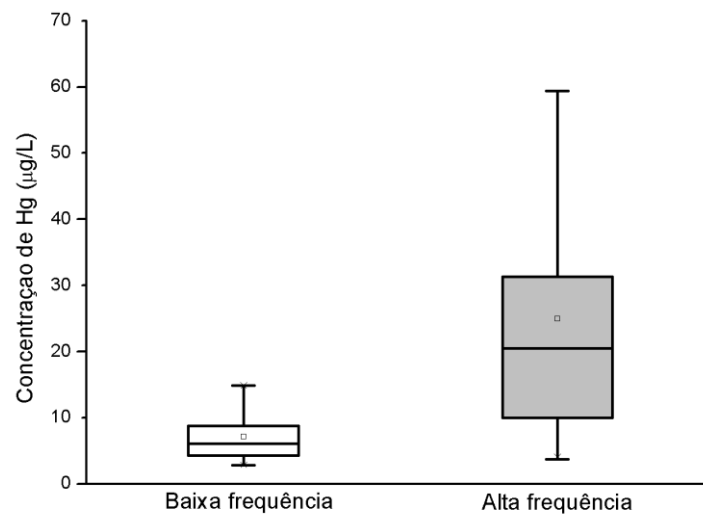


Figura 4.1: *Box plot* referente à relação níveis de Hg total no sangue e consumo de peixe.

4.4.2- Níveis de Hg x sexo

Para a esta relação também não foi possível aplicar o teste ANOVA visto que os níveis de Hg não apresentavam uma distribuição normal entre os indivíduos do sexo feminino ($W = 0,91$, $p = 0,0001$) e do sexo masculino ($W = 0,72$, $p = 0,0000$). A variância entre os níveis de Hg nos indivíduos do sexo feminino e masculino não foi igual ($F = 19,49$, $p = 0,000$).

Portanto o teste de Kruskal-Wallis foi novamente aplicado, desta vez para verificar a relação entre níveis de Hg total e sexo no subgrupo de alta frequência. Os resultados indicam que os homens possuem níveis mais elevados de Hg quando comparado com as mulheres ($\chi^2 = 17,45$; $p = 0,0001$). Para fins de visualização, os *box plots* relativos ao sexo masculino e feminino no subgrupos de alta frequência podem ser observados na Figura 4.2.



Figura 4.2: *Box plot* referente à relação: níveis de Hg total no sangue e sexo.

4.4.3- Níveis de Hg x idade

Para verificar uma possível relação entre a idade e os níveis de Hg total para os indivíduos do subgrupo de alta frequência foi realizada uma análise de correlação. Como os níveis de Hg não apresentaram uma distribuição normal foi utilizado a Correlação de Spearman. Os resultados demonstraram uma correlação positiva entre idade e níveis de Hg neste grupo ($r_s = 0,40$; $p = 0,0000$) (Figura 4.3). Ao se estratificar a amostra por sexo foi encontrado uma correlação positiva para o sexo feminino ($r_s = 0,42$; $p = 0,0003$) (Figura 4.4) e para o sexo masculino ($r_s = 0,30$; $p = 0,067$) (Figura 4.5).

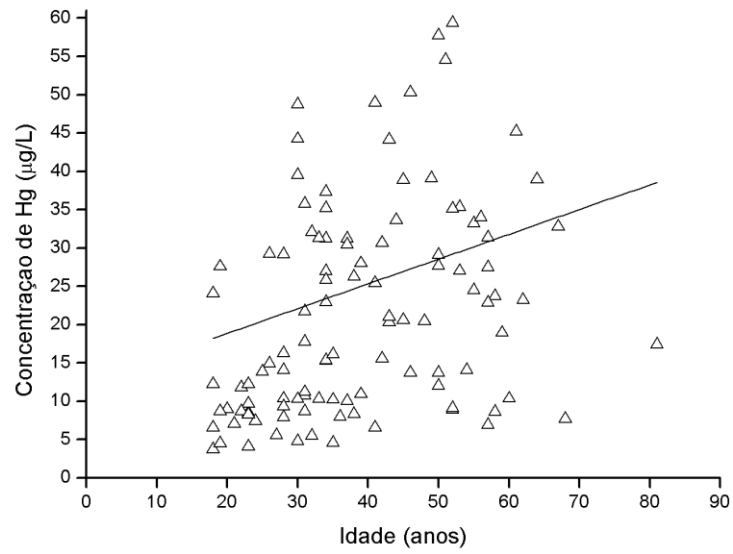


Figura 4.3: Níveis de Hg total no sangue e idade, no subgrupo de alta frequência.

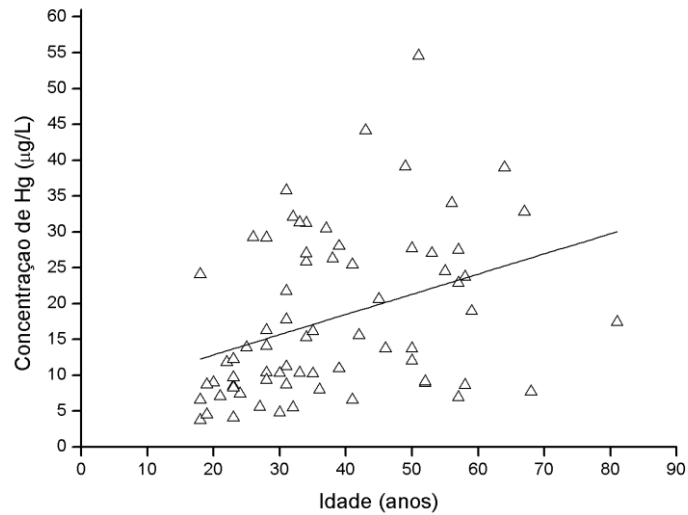


Figura 4.4: Níveis de Hg total no sangue e idade, no subgrupo de alta frequência, para o sexo feminino.

No gene *GSTT1*, a maioria dos indivíduos em ambos os subgrupos de alta e baixa frequência de consumo de peixe apresentaram genótipo normal, com níveis médios de Hg de 25,0 $\mu\text{g/L}$ e 7,2 $\mu\text{g/L}$, respectivamente (Tabela 4.8). Novamente, a distribuição dos genótipos em função dos níveis de Hg foi homogênea nos subgrupos de alta frequência ($n = 107$, $\chi^2 = 0,19$, $p = 0,66$) e baixa frequência ($n = 32$; $\chi^2 = 0,03$, $p = 0,87$).

Tabela 4.8: Níveis de Hg e gene *GSTT1*

<i>GSTT1</i> Genótipos	n	Níveis de Hg – Alta frequência							χ^2	P
		Média ($\mu\text{g/L}$)	Desvio Padrão	Mediana ($\mu\text{g/L}$)	Máximo ($\mu\text{g/L}$)	Mínimo ($\mu\text{g/L}$)	Até 10 $\mu\text{g/L}$	Acima 10 $\mu\text{g/L}$		
<i>Normal</i>	90	25,0	23,8	20,8	181,3	3,7	22	68	0,19	0,66
<i>Deleção</i>	17	16,8	9,2	14,0	32,8	5,4	05	12		
Total	107						27	80		
<i>GSTT1</i> Genótipos	n	Níveis de Hg – Baixa frequência							χ^2	P
		Média ($\mu\text{g/L}$)	Desvio Padrão	Mediana ($\mu\text{g/L}$)	Máximo ($\mu\text{g/L}$)	Mínimo ($\mu\text{g/L}$)	Até 10 $\mu\text{g/L}$	Acima 10 $\mu\text{g/L}$		
<i>Normal</i>	28	7,2	3,2	6,3	14,9	2,9	22	06	0,03	0,87
<i>Deleção</i>	04	6,7	3,9	6,1	12,3	3,2	03	01		
Total	32						25	07		

Para o SNP rs1695 A>G do gene *GSTP1*, o genótipo AG foi o mais frequente em ambos os subgrupos de alta e baixa frequência de consumo de peixe (Tabela 4.9). No subgrupo de alta frequência, a maioria dos indivíduos (75,9%) apresentou níveis de Hg acima de 10 $\mu\text{g/L}$ mas a distribuição dos genótipos em função dos níveis de Hg foi homogênea ($n = 112$, $\chi^2 = 0,47$ $p = 0,79$). Para o subgrupo de baixa frequência a maioria dos indivíduos (78,1%) apresentou níveis de Hg abaixo de 10 $\mu\text{g/L}$ e a distribuição dos genótipos em função dos níveis de Hg não foi homogênea ($n = 32$, $\chi^2 = 14,8$, $p = 0,001$).

Para avaliar os efeitos dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* nos níveis de Hg foi realizada uma análise de regressão linear univariada e multivariada. Para a análise de regressão linear multivariada, cada polimorfismo foi analisado em conjunto com as variáveis consumo de peixe, idade e sexo (Tabela 4.11). Para os SNPs do gene *GSTP1* foi considerado o modelo recessivo: AA ou AG x GG para o SNP rs1695A>G e CC ou CT x TT para o SNP rs1138272C>T, conforme explicado no item 3.5 do capítulo de Metodologia.

Tabela 4.11 – Efeito dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* sobre os níveis de Hg

Variável	Análise Univariada			Análise Multivariada ($R^2 = 0,2579$)	
	β	p	R^2	β_i	p
Consumo de Peixe	17,82	<0,001	0,1099	14,69	<0,001
Idade	0,39	0,004	0,0560	0,26	0,040
Sexo	14,83	<0,001	0,1024	11,55	0,001
<i>GSTM1</i>	8,31	0,034	0,0323	6,42	0,060
<i>GSTT1</i>	-5,80	0,240	0,0101	-6,47	0,150
<i>GSTP1</i> rs1695 A>G	6,98	0,140	0,0153	5,68	0,170
<i>GSTP1</i> rs1138272 C>T	3,32	0,560	0,0022	-7,78	0,160

Os genes *GSTT1* ($\beta = -5,80$; $R^2 = 0,101$; $p = 0,24$) e *GSTP1*(rs1695 $\beta = 6,98$; $R^2 = 0,0153$; $p = 0,14$ e rs1138272 $\beta = 3,32$; $R^2 = 0,0022$; $p = 0,56$) não apresentaram efeito sobre os níveis de Hg quando analisados separadamente. Por outro lado, em relação ao gene *GSTM1* os resultados mostraram que indivíduos com genótipo deleção apresentam níveis de Hg mais altos quando comparados com os que possuem genótipo normal ($\beta = 8,31$; $R^2 = 0,0323$; $p = 0,034$). Os resultados de regressão obtidos para consumo de peixe, idade e sexo corroboram os resultados apresentados anteriormente.

Na análise multivariada, os fatores que mais tiveram efeito nos níveis de Hg foram o consumo de peixe ($\beta = 14,69$; $p = <0,001$), sexo ($\beta = 11,55$; $p = 0,001$), deleção do gene *GSTM1* ($\beta = 6,42$; $p = 0,06$) e idade ($\beta = 0,26$; $p = 0,04$). No entanto, o resultado para o gene *GSTM1* não foi estatisticamente significativo. Com estes resultados foi possível observar que apesar do gene *GSTM1* ter efeito sobre os níveis de Hg existem outros fatores (consumo de peixe e sexo) que estão influenciando mais que a presença do genótipo deleção. Além disso, com esse conjunto de dados não foi possível demonstrar o efeito dos genes *GSTT1* e *GSTP1* sobre os níveis de Hg, de modo que mais estudos são necessários para determinar se estes genes estão de fato influenciando os níveis de Hg nesta população.

CAPÍTULO 5 – DISCUSSÃO

Para melhor organização textual a discussão será dividida em duas seções visando-se contemplar os resultados obtidos no presente estudo.

Os resultados que serão discutidos na primeira seção (5.1) fazem parte do artigo submetido à Revista Brasileira de Epidemiologia (RBEPID-2016-0048, resumo no anexo IV) e se referem à análise do perfil epidemiológico da população de Santarém exposta ambientalmente ao Hg através do consumo frequente de peixe. Serão discutidas questões referentes a fatores que contribuem para a contaminação mercurial do ambiente amazônico, aos níveis de Hg observados em indivíduos participantes do presente trabalho em comparação com outros trabalhos, aos grupos mais susceptíveis aos efeitos da exposição mercurial nesta população em função de suas características epidemiológicas e como os resultados obtidos podem auxiliar na tomada de decisões em questões referentes à saúde ambiental desta região.

Parte dos resultados que serão discutidos na seção 5.2 foram apresentados no 9th Congress of Toxicology in Developing Countries / XIX Congresso Brasileiro de Toxicologia (resumo no anexo V) e publicados recentemente no SM Journal of Public Health and Epidemiology – ISSN 2473-0661 (resumo no anexo VI). Nesta seção serão discutidos os efeitos de polimorfismos em genes da família GST sobre os níveis de Hg na população de Santarém. Os resultados obtidos com o presente trabalho serão comparados com os resultados apresentados por outros autores a fim de se destacar as semelhanças e diferenças entre eles. Por fim será discutido a relevância dos resultados encontrados no contexto da exposição mercurial e seus efeitos tóxicos para a saúde humana, em relação ao estresse oxidativo.

5.1 – SOBRE O PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA POPULAÇÃO DE SANTAREM AMBIENTALMENTE EXPOSTA AO MERCÚRIO ATRAVÉS DO CONSUMO DE PEIXE

A atividade de garimpo no rio Tapajós foi responsável por grande parte do ouro produzido no Brasil na década de 1980-1990 e por este motivo elevados níveis de Hg encontrados em ecossistemas amazônicos foram atribuídos às atividades garimpeiras da região (NIAGRU, 1992; MALM, 1998). No entanto, o garimpo não é o único responsável pelo aporte de Hg no ambiente amazônico. Apesar de uma boa parte do Hg presente na atmosfera ser proveniente de atividades antrópicas, que inclui a mineração de ouro, atividades industriais, queimadas e desmatamento (GUIMARÃES *et al.*, 2000), os solos amazônicos são

naturalmente ricos em Hg, o que os torna fontes naturais de Hg para o ambiente (ROULET *et al.*, 2001).

O ciclo do Hg no ambiente amazônico envolve: (1) a remobilização do Hg através dos incêndios florestais que lançam o Hg presente no solo e na biomassa vegetal para a atmosfera, tornando-o disponível para contaminar o ambiente (VEIGA *et al.*, 1994; LACERDA, 1995); (2) uma vez na atmosfera, o vento se encarrega de transportar Hg, podendo atingir áreas afastadas do ponto focal de emissão; (3) o desmatamento e a exploração do uso da terra para fins agrícolas intensificam os processos de erosão e lixiviação, facilitando a contaminação dos ecossistemas aquáticos e terrestres (ROULET *et al.*, 1998); e (4) no ecossistema aquático, o Hg sofre metilação, se transforma em MeHg, forma orgânica que tem capacidade de bioacumulação e biomagnificação, podendo então atingir os peixes e o homem.

Atualmente, um dos impactos ambientais de maior gravidade na região amazônica refere-se ao desmatamento ilegal causado pela expansão da fronteira agrícola. De acordo com o último boletim do desmatamento da Amazônia Legal, o desmatamento somou 24km² no estado do Pará (FONSECA *et al.*, 2015). No entanto, ao todo nos 40 últimos anos (1970-2010), o desmatamento destruiu 632.433km² do território amazônico (RAISG, 2015). Neste contexto, a região Amazônica, e consequentemente o estado do Pará, continua sendo uma área sob risco de contaminação ambiental ao Hg, em função das práticas de desmatamento.

Apesar de estar localizado às margens do rio Tapajós, o município de Santarém não é considerado uma área de risco, por estar distante 800 km das áreas de garimpo (MALM, 1995). Neste contexto, a maioria dos trabalhos que avaliaram a contaminação ambiental por Hg na região Amazônica foi realizado em áreas como Jacareacanga, Brasília Legal, São Luis do Tapajós e/ou Itaituba, por serem consideradas de risco devido à presença de atividade garimpeira nestas regiões (NEVADO *et al.*, 2010). As populações ribeirinhas da Amazônia sempre são as mais estudadas e os níveis de Hg total no cabelo é utilizado como principal bioindicador de exposição ao Hg (LEBEL, 1997; MALM *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 2000; HARADA *et al.*, 2001; PINHEIRO *et al.*, 2006; PASSOS *et al.*, 2008).

Para se avaliar se uma determinada população está ou não exposta ambientalmente ao Hg e quais os riscos desta exposição para a saúde humana é recomendado a realização de um estudo epidemiológico a fim de se determinar dentro da população geral quais os grupos mais vulneráveis a essa exposição (FUNASA, 2002; UNEP, 2008).

No presente trabalho foi avaliado o perfil epidemiológico da população de Santarém, município localizado no Baixo Amazonas, na confluência dos rios Tapajós e Amazonas e que,

embora tenha sido pouco estudada até o momento, está sujeita às consequências da exposição mercurial provocada por diferentes tipos de ações antrópicas que ocorrem na região (VEIGA, 1994; LACERDA, 1995; FEARNSSIDE, 2015).

Dos 144 indivíduos estudados, 77,8% (n=112) possuem o hábito de consumir peixe diariamente ou pelo menos três vezes por semana. Este resultado corrobora um padrão alimentar previamente evidenciado, visto que o peixe é a principal fonte de proteína para as populações da região amazônica (SANTOS & SANTOS, 2005). Para confirmar a possível relação entre os níveis de Hg e o consumo de peixe na população de Santarém, os níveis de Hg total foram comparados entre os dois subgrupos de consumo de peixe e os resultados mostraram claramente que os indivíduos do subgrupo de alta frequência possuem níveis de Hg mais elevados em comparação aos do subgrupo de baixa frequência ($\chi^2 = 41,68$; $p = 0,0001$).

Até a elaboração deste artigo quatro trabalhos foram realizados com a população de Santarém: (1) Em 1995, foram avaliadas amostras de cabelo de 10 indivíduos e os autores encontraram um nível médio de Hg de $2,7\mu\text{g/g}$ (MALM, 1995); (2) Em 2000, foi avaliada a urina de 50 trabalhadores urbanos e o nível médio de Hg encontrado foi de $57,5\mu\text{g/L}$ (JESUS *et al.*, 2001); (3) em 2003, foi avaliado em amostras capilares de 44 indivíduos e o nível médio de Hg encontrado foi de $3,1\mu\text{g/g}$ entre os moradores do bairro do Mapiri e de $0,8\mu\text{g/g}$ entre os universitários (PASSOS *et al.*, 2003); e (4) em 2010, foram avaliadas amostras de cabelo de 70 indivíduos e encontraram um nível médio de Hg de $1,5\mu\text{g/g}$ em mulheres e de $2,52\mu\text{g/g}$ em homens (BOURDINEAUD *et al.*, 2010). Não obstante, o presente trabalho é o primeiro a incluir residentes da área de várzea de Santarém, localizada às margens do rio Amazonas.

Os resultados encontrados no presente trabalho permitem concluir que a população de Santarém está ambientalmente exposta ao Hg, através do consumo frequente de peixe. Foi possível observar de acordo com o que foi informado no questionário, que as espécies de peixes mais consumidas pelos participantes da pesquisa foram, nesta mesma ordem: *Cichla sp.* (Tucunaré), *Colossoma macropomum* (Tambaqui), *Arapaima gigas* (Pirarucu), *Mylossoma sp.* (Pacu), *Pterygoplichthys sp.* (Acari), *Plagisocion squamosissimus* (Pescada Branca) e *Pseudoplatystoma sp.* (Surubim).

De Souza Lima *et al* (2000) avaliaram os níveis de Hg de diferentes espécies de peixe coletados no município de Santarém, e encontraram um nível médio de Hg de $0,22\mu\text{g/g}$ em peixes carnívoros, dos quais o Tucunaré apresentou níveis acima de $0,5\mu\text{g/g}$, que é o limite

máximo estabelecido pela OMS (WHO, 1972). Dos peixes avaliados por Passos *et al* (2003) os maiores níveis de Hg encontrados foram em tucunarés, no entanto, estes níveis de Hg estavam abaixo do limite de 0,5µg/g. Outros peixes carnívoros também apresentaram níveis de Hg acima do limite de 0,5µg/g em Santarém: pescada branca (1,44 µg/g) e apapá (1,66 µg/g) (BOURDINEAUD *et al.*, 2015).

Segundo a Agência de Proteção Ambiental (EPA, do inglês *Environmental Protection Agency*), sabendo-se os níveis de Hg é possível estimar a quantidade máxima diária de MeHg que está sendo ingerido (EPA, 1997). Sendo assim, para um nível médio de Hg total no sangue de 21,00µg/L, estima-se uma ingestão de 0,44 µg/g/dia de MeHg que está mais de 4 vezes acima da dose de referencia (RfD) adotada pela EPA em 2001, que é de 0,1 µg/g/dia. Tendo em vista que a população estudada apresenta uma estimativa de ingestão diária de MeHg acima da RfD de 0,1 µg/g/dia e que os trabalhos já realizados na região indicam que peixes do rio Tapajós estão contaminados com MeHg (SAMPAIO DA SILVA *et al.*, 2006; NEVADO *et al.*, 2010), os resultados obtidos no presente estudo são importantes por fornecer dados epidemiológicos recentes a respeito de uma população pouco estudada e considerada livre de risco de exposição ao Hg devido estar situada distante das áreas garimpeiras do rio Tapajós. A constatação de elevados níveis de Hg em residentes de Santarém, assim como em diversas espécies de peixes utilizados como alimento por esta população são indicadores suficientes para caracterizar a população de Santarém como ambientalmente exposta ao Hg via ingestão de peixe contaminado.

A fim de se determinar possíveis subpopulações mais susceptíveis a essa exposição foi realizada uma análise descritiva da amostra, através da observação de indicadores socioeconômicos e de saúde, obtidos através dos questionários. Considerando que o consumo de peixe é a principal fonte de exposição ao Hg nesta população, a amostra foi estratificada em dois subgrupos (alta e baixa frequência): primeiramente, verificou-se a distribuição dos indivíduos em função dos indicadores socioeconômicos e de saúde em cada subgrupo. Entre os indicadores socioeconômicos, não foi observada uma distribuição homogênea em relação ao nível de escolaridade: maior ocorrência de indivíduos com educação básica no subgrupo de alta frequência e maior ocorrência de indivíduos com nível superior no subgrupo de baixa frequência ($\chi^2 = 27,35$; $p < 0,001$). Este resultado pode ser explicado pelo fato que 63,4% dos indivíduos do subgrupo de alta frequência vivem na área de várzea, onde o acesso ao primeiro ciclo da educação fundamental é garantido pela prefeitura na maioria das comunidades, mas para as séries seguintes é necessário o deslocamento da criança, ou até mesmo de toda a

família, para áreas mais distantes, o que nem sempre é possível. Foi observado também uma maior ocorrência de indivíduos com níveis de Hg total acima de 10µg/L no subgrupo de alta frequência ($\chi^2 = 30,20$; $p < 0,001$). O indicador residência também apresentou um desequilíbrio na sua distribuição, visto que todos os indivíduos do subgrupo de baixa frequência residem na área urbana de Santarém ($\chi^2 = 40,02$; $p < 0,001$), com uma dieta alimentar mais diversificada, que inclui outras fontes proteicas além do peixe. Estes dois últimos resultados corroboram a ideia que esta população está ambientalmente exposta ao Hg através do consumo frequente de peixe e que tanto indivíduos que residem na área urbana quanto na área de várzea de Santarém estarão sob risco de exposição ao Hg desde que tenham um consumo frequente de peixe. Em outras palavras, indivíduos residentes na região da várzea acabam sendo considerados mais expostos ao Hg devido a sua dieta quase que exclusivamente baseada em peixe, mas na realidade eles não são os únicos, de modo que qualquer indivíduo residente em Santarém com hábito de consumir peixe semanalmente estará sob risco de exposição ao Hg.

Uma possível explicação para os altos níveis de Hg encontrados na população do Baixo Amazonas seria que o aumento do desmatamento que tem ocorrido nesta região nos últimos anos devido à expansão da pecuária estaria contribuindo com o aumento do aporte de Hg⁺² para o ambiente aquático. Além disso, por se tratar de uma planície de inundação, a várzea é alagada sazonalmente tornando-se assim um ambiente propício para a metilação do Hg, principalmente no período das chuvas (GUIMARÃES *et al.*, 2000; SAMPAIO DA SILVA *et al.*, 2008), o que estaria favorecendo a contaminação dos peixes também no Rio Amazonas.

A OMS considera exposto aquele indivíduo que apresenta níveis de Hg no sangue acima de 10µg/L. No presente trabalho, foi avaliada a frequência de ocorrência de 20 sintomas relacionados à exposição por Hg, dos quais os 5 mais citados na literatura são: tremor, perda de memória, distúrbios do sono, diminuição da audição e dor de cabeça (HARADA, 1995; GRANDJEAN *et al.*, 2010). Entre os indivíduos com níveis de Hg acima de 10µg/L, os 5 sintomas que ocorreram como maior frequência foram: dores musculares e articulares, dor de cabeça, câimbras musculares, diminuição da acuidade visual e desconforto gastrointestinal. No entanto, os dados obtidos a partir dos questionários acabaram não sendo tão informativos como era o esperado, de modo que se faz necessário uma abordagem mais eficiente para se avaliar quais são os sintomas e/ou problemas de saúde relacionados à exposição por Hg que de fato estão acometendo estes indivíduos. Para isso, para os próximos

estudos, além dos questionários serão aplicados testes específicos para averiguar a ocorrência de sintomas (UNEP, 2008).

Embora a Agência de Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças (ASTDR, do inglês *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*) estabelece que o nível limiar de Hg no sangue necessário para a manifestação de sintomas de toxicidade seja de 50µg/L (ATSDR, 1999), já foi demonstrado que níveis baixos de Hg (menores que 50µg/L) podem causar efeitos tóxicos adversos à saúde humana (KARAGAS *et al.*, 2012). Apesar de 68% dos indivíduos estudados neste trabalho estarem apresentando níveis de Hg entre 10-50µg/L, não foi possível estabelecer uma associação positiva entre a ocorrência de sintomas e os níveis de Hg com os dados aqui apresentados. Já, o Conselho Nacional de Pesquisa dos Estados Unidos da América (NRC, do inglês *National Research Council*) recomenda um limite de exposição de 5,8 µg/L de Hg total no sangue (NRC, 2000), um limite ainda menor do que o recomendado pela OMS e adotado no presente trabalho, o que corrobora a ideia de que mais estudos são necessários para determinar as reais condições de saúde desta população. Sendo assim, é possível que parte da população estudada neste trabalho esteja sofrendo com os danos celulares e moleculares provocados pelo Hg, dos quais se destaca o estresse oxidativo e seu efeito sobre as enzimas antioxidantes (GROTTO *et al.*, 2010).

Não se conhece claramente um nível exato de Hg que seja responsável pelo aparecimento de sintomas ou problemas de saúde decorrentes deste tipo de exposição. Essa perda de homogeneidade entre os indivíduos em relação ao nível mínimo de Hg no sangue e/ou cabelo necessário para desencadear efeitos tóxicos pode ser explicado por fatores externos e/ou biológicos que afetem tanto a toxicocinética (a movimentação do agente tóxico no organismo, desde a sua entrada até a sua eliminação) quanto à toxicodinâmica (alterações bioquímicas, morfológicas e funcionais que caracterizam o processo de intoxicação) do Hg (LLOP *et al.*, 2015).

Nesta perspectiva, é importante avaliar diferentes tipos de variáveis (ambientais, epidemiológicas e/ou genéticas) que possam explicar as diferenças de susceptibilidade de alguns subgrupos. No presente trabalho, por exemplo, foi possível observar que os homens apresentam níveis médios de Hg mais alto que as mulheres (30,4µg/L e 15,6µg/L, respectivamente) e que os níveis de Hg aumentam com a idade ($r=0,35$; $p = 0,0002$). Outros autores também relataram que os homens apresentam níveis de Hg mais altos que as mulheres (GROTTO *et al.*, 2010; BOURDINEAUD *et al.*, 2015) e que os níveis de Hg aumentam com a idade. Esses resultados corroboram a ideia de que o sexo e a idade são variáveis que de

alguma forma estão influenciando a excreção e/ou retenção do Hg. Já foi relatado na literatura que ratos tratados com Hg (orgânico e inorgânico) apresentam diferenças na toxicocinética do Hg. Ratos machos excretam Hg através das fezes mais lentamente que as fêmeas (THOMAS *et al.*, 1987). Em relação à idade, a correlação positiva encontrada entre o aumento dos níveis de Hg e o aumento da idade pode ser explicada pela capacidade bioacumuladora do Hg.

A variabilidade genética que ocorre entre populações pode explicar as discrepâncias observadas em relação aos níveis de Hg em indivíduos de diferentes populações. Uma determinada combinação de genótipos pode, por exemplo, oferecer uma eliminação mais rápida do MeHg e/ou diferenças na capacidade de eliminar os EROs induzidos pela presença do MeHg. Indivíduos que possuírem essa combinação genotípica serão capazes de tolerar níveis mais elevados de Hg, podendo não apresentar sintomas ou problemas de saúde decorrentes desta exposição. Por este motivo, não é possível afirmar que mesmo com a ausência de sintomas os indivíduos expostos não estejam sofrendo com danos celulares e/ou moleculares causados pelo Hg.

Sendo assim, além de avaliar os níveis de Hg e o perfil epidemiológico de populações residentes em áreas sob risco de contaminação ambiental e/ou ocupacional ao Hg, é importante também analisar possíveis fatores genéticos e/ou nutricionais que possam estar interagindo com o ambiente e influenciando na suscetibilidade destes indivíduos ao Hg (PASSOS *et al.*, 2003; GROTTTO *et al.*, 2010; BARCELLOS *et al.*, 2013).

Desta forma, podemos concluir que os resultados discutidos nesta seção fornecem informações epidemiológicas atualizadas a respeito de uma população ambientalmente exposta ao Hg, podendo auxiliar a Secretaria Municipal de Saúde a planejar ações de saúde voltadas para a promoção e prevenção da saúde desta população, no que diz respeito à ocorrência de possíveis efeitos tóxicos decorrentes da exposição ao Hg. Diante do que foi exposto, fica claro também a necessidade da continuidade deste estudo a fim de contribuir não só com a produção de conhecimento, mas também com informações para ações de vigilância em saúde ambiental.

5.2 – SOBRE OS EFEITOS DE POLIMORFISMOS NOS GENES *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* EM RELAÇÃO AOS NÍVEIS DE MERCÚRIO NA POPULAÇÃO DE SANTARÉM

Entre os vários genes envolvidos com o metabolismo da GSH e com o sistema de defesa antioxidante, foram escolhidos para o presente estudo os genes envolvidos na conjugação do complexo MeHg-GSH e na eliminação do Hg. Polimorfismos presentes nos genes *GSTM1* (deleção), *GSTT1* (deleção) e *GSTP1* (SNPs rs1695A>G e rs1138272C>T) foram avaliados a fim de se determinar o efeito desses genes nos níveis do Hg.

A partir dos resultados obtidos com a genotipagem dos polimorfismos (Tabela 4.6, capítulo Resultados) é possível observar que entre os indivíduos estudados o genótipo normal foi mais frequente que o genótipo deleção para os genes *GSTM1* e *GSTT1* e que a distribuição dos genótipos nos subgrupos de alta e baixa frequência foi homogênea ($n = 139$; $\chi^2 = 0,35$; $p = 0,56$ e $n = 139$ *GSTM1*; $\chi^2 = 0,22$; $p = 0,64$ *GSTT1*). Em relação ao gene *GSTM1*, quando os genótipos foram estratificados em função dos níveis de Hg (tabela 4.7, capítulo Resultados), a distribuição foi homogênea entre os dois subgrupos ($n = 107$; $\chi^2 = 0,005$; $p = 0,95$ subgrupo de alta frequência; $n = 32$; $\chi^2 = 0,13$; $p = 0,71$ subgrupo de baixa frequência). Para o gene *GSTT1*, 12 dos indivíduos com deleção no subgrupo de alta frequência apresentaram níveis de Hg acima de $10\mu\text{g/L}$ enquanto apenas 01 indivíduo com deleção teve níveis de Hg acima de $10\mu\text{g/L}$ no subgrupo de baixa frequência (tabela 4.8, capítulo Resultados). Ainda assim a distribuição dos genótipos foi homogênea entre os indivíduos que apresentaram níveis de Hg acima de $10\mu\text{g/L}$ e até $10\mu\text{g/L}$ ($n = 107$; $\chi^2 = 0,19$; $p = 0,66$ subgrupo de alta frequência; $n = 32$; $\chi^2 = 0,03$; $p = 0,87$ subgrupo de baixa frequência).

Em relação ao SNP rs1695A>G do gene *GSTP1*, o genótipo AG foi o mais frequente (44,5%) na população de Santarém e os três genótipos apresentaram distribuição homogênea entre os subgrupos de alta e baixa frequência ($n = 144$; $\chi^2 = 1,14$; $p = 0,56$). A distribuição dos genótipos entre os níveis de Hg foi homogênea ($n = 112$; $\chi^2 = 0,47$; $p = 0,79$). No subgrupo de baixa frequência, os genótipos apresentaram uma distribuição homogênea visto que apenas sete indivíduos apresentaram níveis acima de $10\mu\text{g/L}$, dos quais 06 tinham genótipo AA, 01 genótipo AG e nenhum apresentou genótipo GG (tabela 4.10, capítulo Resultados). Para o SNP rs1138272C>T do gene *GSTP1* o genótipo CC foi o mais frequente mas a distribuição dos genótipos entre os subgrupos de alta e baixa frequência não foi homogênea ($n = 144$; $\chi^2 = 7,13$; $p = 0,03$). No entanto, a distribuição dos genótipos do SNP rs1138272C>T entre os níveis

de Hg foi homogênea nos subgrupos de alta ($n = 112$; $\chi^2 = 2,03$, $p = 0,36$) e baixa frequência ($n = 32$; $\chi^2 = 3,06$, $p = 0,22$). Dos 85 indivíduos com nível de Hg acima de $10\mu\text{g/L}$ no subgrupo de alta frequência, 65 (75,9%) apresentavam genótipo CC. No subgrupo de baixa frequência a maioria dos indivíduos com até $10\mu\text{g/L}$ apresentaram genótipo CC (60%).

Estes resultados mostram que as frequências dos genótipos estão homogêneas distribuídas entre os subgrupos de alta e de baixa frequência, exceto para o SNP rs1138272C>T, provavelmente devido à baixa frequência do alelo T observada em diferentes populações (NCBI - dbSNP). Desse modo, os resultados de associação obtidos com a análise de regressão linear (univariada e multivariada) não são devido ao fato dos genótipos deleção (*GSTM1* e *GSTT1*), GG (rs1695) ou CC (rs1138272) serem mais frequentes no subgrupo de alta frequência que é o subgrupo que apresenta os níveis mais altos de Hg e sim devido ao efeito destes genótipos sobre a toxicocinética do Hg.

Os coeficientes obtidos com a análise de regressão linear univariada indicaram que os níveis de Hg são maiores em indivíduos portadores do genótipo deleção no gene *GSTM1* ($\beta = 8,31$; $R^2 = 0,0323$; $p = 0,034$) enquanto no gene *GSTT1* este mesmo tipo de efeito não foi observado ($\beta = -5,80$; $R^2 = 0,101$; $p = 0,24$). Uma possível explicação para o mesmo não ter sido observado com o gene *GSTT1* é que como a frequência do genótipo deleção nesta população é baixa (15,1%) talvez o número de indivíduos estudados não tenha sido suficiente para demonstrar o efeito deste gene sobre os níveis de Hg. Isso foi observado anteriormente com o gene *GSTM1*: com número menor de indivíduos ($n=98$) não possível observar efeito do genótipo deleção sobre os níveis de Hg (MENESES *et al.*, 2016). Isso acontece porque existem vários fatores afetando a toxicocinética do Hg de modo que para alguns destes fatores a sua influência só fica evidente em amostras maiores e/ou quando analisada em conjunto com outros fatores.

Em relação ao SNP rs1695A>G do gene *GSTP1*, o coeficiente de regressão linear univariada obtido indicou que o genótipo GG (modelo genético recessivo) não tem efeito sobre os níveis de Hg na população estudada ($\beta = 6,98$; $R^2 = 0,0153$; $p = 0,14$). Para o SNP rs1138272C>T deste mesmo gene, a avaliação do efeito dos genótipos GG (modelo genético recessivo) sobre os níveis de Hg mostrou que este polimorfismo também não está relacionado com um aumento dos níveis de Hg na população estudada ($\beta = 3,32$; $R^2 = 0,0022$; $p = 0,56$).

Com os resultados obtidos através da análise de regressão linear univariada foi possível observar que nenhuma das variáveis genéticas apresentou um coeficiente de determinação (R^2) maior que 11% (Tabela 4.11, Capítulo Resultados). A variável deleção do

gene *GSTM1* mesmo sendo estatisticamente significativa apresentou um R^2 de apenas 3%, menor que o R^2 das variáveis consumo de peixe (11%), sexo (10%) e idade (5,6%) que foram as que apresentaram os maiores valores de R^2 . Além disso, quando comparado com o R^2 de 25,8% obtido na análise de regressão linear multivariada, o efeito isolado de cada uma dessas variáveis sobre os níveis de Hg é baixo.

Ao avaliar o efeito dos polimorfismos nos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* sobre os níveis de Hg através de análise de regressão multivariada, os resultados mostraram que as variáveis consumo de peixe ($\beta = 14,69$; $p = <0,001$), sexo ($\beta = 11,55$; $p = 0,001$), deleção do gene *GSTM1* ($\beta = 6,42$; $p = 0,06$) e idade ($\beta = 0,26$; $p = 0,04$) foram as que tiveram mais efeito sobre os níveis de Hg entre os indivíduos estudados. No entanto, nesta análise o resultado para o gene *GSTM1* não foi estatisticamente significativo, o que corrobora a ideia da interação gene-ambiente, na qual um mesmo fator genético pode influenciar mais ou menos os níveis de Hg dependendo a que outra variável ele está associado. No caso da população de Santarém a influencia do gene *GSTM1* sobre os níveis de Hg está relacionada principalmente com o consumo frequente de peixe, sexo e idade.

Outros autores já publicaram resultados semelhantes no que diz respeito a encontrar uma associação positiva entre o genótipo deleção do gene *GSTM1* e o aumento dos níveis de Hg. No entanto, a comparação é difícil visto que existem diferenças entre o tipo de biomarcador de exposição utilizado e análise estatística realizada. A Tabela 5.1 apresenta uma comparação dos resultados obtidos nesta tese para os genes *GSTM1* e *GSTT1* com os resultados de cinco trabalhos encontrados na literatura, incluindo os resultados de MENESES *et al* (2016), que também avaliaram os níveis de Hg em sangue e realizaram uma análise de regressão linear multivariada como o que foi utilizado no presente trabalho.

Para o gene *GSTM1*, os resultados aqui apresentados estão de acordo com o que foi encontrado por Barcelos *et al.* (2013 e 2015). Os resultados destes dois trabalhos são provenientes da mesma amostra: 355 ribeirinhos da Bacia do Tapajós. Embora a frequência genotípica do gene *GSTM1* encontrada por estes autores seja semelhante ao que foi encontrado entre os indivíduos analisados nesta tese, Barcelos *et al.* (2013 e 2015) encontraram uma relação entre o genótipo deleção e um aumento dos níveis de Hg estatisticamente significativa ao realizar uma análise de regressão multivariada enquanto que no presente trabalho o efeito deste mesmo genótipo foi estatisticamente significativo apenas na análise univariada. Oliveira *et al.* (2014) estudaram 88 dos indivíduos da amostra estudada por Barcelos *et al.* (2013 e 2015) e com uma amostra reduzida não conseguiram demonstrar

efeito do gene *GSTM1* sobre os níveis de Hg. Algo parecido aconteceu com a população estudada no presente trabalho. Com uma amostra de 98 indivíduos não foi possível demonstrar o efeito do gene *GSTM1* sobre os níveis de Hg (MENESES *et al.* 2016). No entanto, ao analisar a amostra completa (n=144) o efeito aumentou o suficiente para se tornar estatisticamente significativo nesta população. Lee *et al.* (2010) também encontraram um efeito do gene *GSTM1* sobre os níveis de Hg. No entanto, estes autores estudaram o efeito dos genes *GSTM1/GSTT1* sobre os níveis de Hg em recém nascidos com baixo peso ao nascer e em suas mães.

Tabela 5.1 – Comparação de resultados obtidos para os genes *GSTM1* e *GSTT1* através de análise multivariada

N	<i>GSTM1</i>		<i>GSTT1</i>		Referencia
	% deleção	Resultado	% deleção	Resultado	
144	38,8	$\beta = 6,42$ $p = 0,06$	15,1	$\beta = -6,47$ $p = 0,15$	Presente trabalho
98	30,5	$\beta = 3,38$ $p = 0,12$	15,3	$\beta = 2,58$ $p = 0,35$	MENESES <i>et al.</i> , 2016
355	36,0	$\beta = 0,17$ $p = 0,028$	40,0	$\beta = 0,004$ $p = 0,96$	BARCELOS <i>et al.</i> , 2015
88	34,0	$\beta = 0,21$ $p = 0,13$	40,0	$\beta = 0,14$ $p = 0,31$	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2014
355	36,0	$\beta = 0,20$ $p = 0,017$	40,0	$\beta = 0,06$ $p = 0,47$	BARCELOS <i>et al.</i> , 2013
417	59,5	$\beta = 243,8$ $p = 0,06$	53,2	$\beta = -154,9$ $p = 0,27$	LEE <i>et al.</i> , 2010

Em relação ao gene *GSTT1*, a população de Santarém foi a que apresentou a menor frequência do genótipo deleção em comparação com os demais trabalhos e o efeito do gene *GSTT1* sobre os níveis de Hg não foi encontrado em nenhum destes trabalhos (Tabela 5.1). Como a frequência do genótipo deleção é muito baixa entre os indivíduos estudados talvez não seja possível demonstrar um efeito deste genótipo sobre os níveis de Hg nesta população. Mas considerando que os demais trabalhos também não encontraram uma relação entre o gene *GSTT1* e os níveis de Hg, é possível que outros fatores genéticos tenham mais influencia sobre os níveis de Hg do que o gene *GSTT1*.

Em relação ao gene *GSTP1*, as variantes GG (SNP rs1695A>G) e TT (SNP rs1138272 C>T) têm sido associadas a um aumento nos níveis de Hg (ENGSTRÖM *et al.*, 2008; GOODRICH *et al.*, 2012). No entanto, estes resultados ainda são contraditórios e necessitam

de mais investigações visto que alguns autores encontram associação entre essas mesmas variantes e uma redução nos níveis de Hg (CUSTODIO *et al.*, 2004). Essas discrepâncias podem ser devido ao tipo de biomarcador avaliado, ao tipo de metodologia estatística aplicada, a fonte de exposição ao Hg e a frequência do polimorfismo na população estudada. De qualquer modo, independente do resultado obtido já está bem documentado que da família GST a enzima GSTP1 é a que mais se expressa, sendo encontrada nas hemácias, na placenta, no cérebro, no pulmão, no fígado e em vários outros tecidos, e que os dois SNPs rs1695A>G e rs1138272 C>T influenciam diretamente a atividade enzimática (STRANGE *et al.*, 2000).

Em termos comparativos foram selecionados 04 trabalhos cujos autores utilizaram o mesmo tipo de biomarcador (sangue) e aplicaram o mesmo tipo de análise estatística usada no presente trabalho (regressão linear multivariada) (Tabela 5.2) A maioria dos trabalhos estudou o SNP rs1695A>G, provavelmente porque o SNP rs1138272C>T é pouco polimórfico e portanto menos informativo. Segundo o banco de dados dbSNP do NCBI a MAF (do inglês, *Minor Allele Frequency*) da variante T é igual a 0,0335 (1000 Genomes Project). No entanto, como a frequência dos polimorfismos pode variar entre as populações e como não se tinha dados anteriores sobre a frequência destes polimorfismos para a população de Santarém, o SNP rs1138272C>T foi incluída no estudo.

Em relação ao SNP rs1695A>G, assim como no presente trabalho, apenas Barcelos *et al.* (2013; 2015) e Engström *et al.* (2008) avaliaram o modelo recessivo, porém, em nenhum deles foi encontrada um efeito do genótipo GG sobre os níveis de Hg. O SNP rs1138272C>T foi avaliado por Engström *et al.* (2008) que considerou o modelo dominante (CC x CT + TT) em função da baixa frequência do genótipo TT, mas o resultado também não foi estatisticamente significativo.

Tabela 5.2 – Comparação de resultados obtidos para os SNPs rs1695 e rs1138272

<i>GSTP1</i> rs1695 A>G		<i>GSTP1</i> rs1138272 C>T		Referencia	
n	% GG	Resultado	% TT	Resultado	
144	19,4	$\beta = 5,68$ $p = 0,17$	11,1	$\beta = -7,78$ $p = 0,16$	Presente trabalho
355	19,0	$\beta = -0,10$ $p = 0,39$			BARCELOS <i>et al.</i> , 2015, 2013
88	*63	* $\beta = -0,10$ $p = 0,49$			OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2014
292	9,0	$\beta = 1,8$ $p = 0,077$	1,0	* $\beta = 1,3$ $p = 0,061$	ENGSTRÖM <i>et al.</i> , 2008

*Os resultados se referem ao modelo dominante e não ao recessivo como utilizado no presente trabalho

Gundacker *et al.* (2009) encontraram evidências de que algumas combinações entre alelos de diferentes genes podem estar associadas com o metabolismo do Hg, de modo que não se pode descartar a hipótese de que combinações alélicas específicas entre os genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* ou entre eles e outros genes que não foram analisados no presente trabalho possam também ter efeito sobre os níveis de Hg nesta população. No entanto, a análise destas combinações genéticas não foi avaliada visto que é necessária uma metodologia analítica diferente do que foi proposto para o presente trabalho.

Sendo assim, em função de tudo que foi discutido nesta seção, fica claro que ao se avaliar a exposição por Hg mais importante do que o efeito individual de cada variável é o efeito conjunto delas. No caso da população de Santarém, é possível afirmar com base nos 144 indivíduos analisados neste estudo, que o consumo frequente de peixe é o principal responsável pelos altos níveis de Hg encontrados nesta população e que esse efeito sobre os níveis de Hg é ainda maior quando as variáveis sexo, idade e deleção do gene *GSTM1* são consideradas simultaneamente.

5.3 – SOBRE OS FATORES DETERMINANTES RESPONSÁVEIS PELOS ALTOS NÍVEIS DE MERCÚRIO ENCONTRADOS NA POPULAÇÃO DE SANTARÉM

Como discutido nas sessões anteriores, diferentes fatores ambientais, epidemiológicos e genéticos foram avaliados. O que se pode destacar é que entre os indivíduos da área urbana e de várzea de Santarém estudados no presente trabalho, os fatores determinantes para os altos

níveis de Hg foram: hábito frequente de consumo de peixe, nível de escolaridade, sexo e a deleção do gene *GSTM1*. A identificação destes fatores é importante para planejar ações de prevenção de doenças e promoção de saúde, no que se refere às consequências da exposição mercurial para a saúde humana.

O presente trabalho é o primeiro a incluir residentes de uma área de várzea de Santarém localizada às margens do rio Amazonas (comunidade de Tapará Grande). Este resultado é importante visto que por muito tempo a população de Santarém deixou de ser estudada por não ser considerada uma área sob risco da exposição mercurial. No entanto, com o que foi encontrado no presente trabalho é possível afirmar que a população do município de Santarém está sim sob risco dos efeitos tóxicos da exposição mercurial incluindo as comunidades de várzea do rio Amazonas, que até então não era considerada uma área de risco ambiental.

Embora não tenha sido objetivo do trabalho avaliar os fatores responsáveis pela contaminação dos rios e conseqüentemente dos peixes, uma possível explicação para os altos níveis de Hg encontrados na população urbana e de várzea de Santarém seria o aumento do desmatamento que tem ocorrido nesta região nos últimos anos devido à expansão da pecuária. Não se pode negar que o garimpo contribuiu com um grande aporte de Hg para os ambientes aquáticos amazônicos nos anos 70, no entanto esta prática foi amplamente reduzida nas últimas décadas. Atualmente, o Hg disponível para o processo de metilação no ambiente aquático se deve à remobilização do Hg acumulado nos solos devido à erosão provocada pelo desmatamento e pelas queimadas.

Considerando que a prática do desmatamento continua crescendo no estado do Pará é lógico supor que este processo de remobilização do Hg tende a se intensificar ainda mais nos próximos anos, de modo que a identificação precoce de fatores determinantes relacionados aos efeitos tóxicos da exposição mercurial para a saúde humana é de extrema importância. Neste contexto, os resultados aqui apresentados fornecem informações atualizadas sobre o perfil dos indivíduos expostos ao Hg nesta população.

O hábito frequente de consumo de peixe já era um fator determinante esperado nesta população. O que chamou a atenção foi o fato que indivíduos da área urbana também estão apresentando níveis altos de Hg em função deste hábito alimentar. A maioria dos trabalhos encontrados na literatura foca na população ribeirinha, que historicamente tem um hábito alimentar quase que exclusivamente baseado em consumo de peixe. Neste sentido, o resultado deste trabalho destaca a importância de avaliar diferentes subgrupos populacionais, visto que

não é necessário ter um consumo diário de peixe para estar exposto. A maioria dos indivíduos da população urbana de Santarém que apresentou níveis altos de Hg relatou um consumo de peixe de 1 a 3 vezes por semana.

Outro fator determinante identificado no presente trabalho foi o nível de escolaridade. Indivíduos com menor nível de escolaridade apresentaram níveis mais altos de Hg. Esse resultado, observado principalmente entre os residentes na área de várzea, sugere uma vulnerabilidade social relacionada à exposição mercurial: indivíduos com menor escolaridade possuem menos acesso ao conhecimento, e conseqüentemente possuem menor renda. Neste contexto, possuem pouca informação sobre os riscos para a saúde relacionados ao consumo frequente de peixe contaminado com MeHg, sobre a importância da alimentação diversificada e balanceada e principalmente não possuem condições econômicas para consumir outro tipo de alimento que não seja o peixe.

Este é um tipo de determinante social que uma vez identificado precisa ser cuidadosamente tratado, visto suas implicações principalmente em termos de saúde. A longo prazo este tipo de vulnerabilidade irá refletir no estado de saúde dos indivíduos. A perspectiva de mudança é baixa, o que significa dizer que esses indivíduos tendem a continuar consumindo peixe, estando cada vez mais sob risco de desenvolver sintomas e/ou problemas de saúde relacionados à exposição mercurial. Uma vez que estes sintomas aparecem podem reduzir sua capacidade de trabalho, comprometendo ainda mais a sua situação financeira, por exemplo. Além disso, em geral estes indivíduos são usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), através das Unidades Básicas de Saúde Fluvial (UBSF), de modo que as Equipes de Saúde da Família (ESF) destinadas a trabalhar nestas UBSFs devem estar capacitadas para identificar os sintomas e/ou problemas de saúde relacionados à exposição mercurial.

O sexo e o fator genético são características biológicas relacionadas com a suscetibilidade dos indivíduos portadores de tais características a apresentarem níveis mais altos ou mais baixos de Hg em relação aos que não possuem. No caso da população de Santarém, foi identificado na amostra estudada que ser do sexo masculino e portador do genótipo nulo para o gene *GSTM1* aumenta a suscetibilidade dos indivíduos a apresentar níveis altos de Hg. Como visto anteriormente nesta discussão, os dados referentes às diferenças de gênero e à ocorrência da deleção do gene *GSTM1* ainda são conflitantes. Em relação ao sexo, ainda não há um consenso se os homens são de fato mais suscetível aos níveis altos de Hg do que as mulheres e no que diz respeito à deleção do gene *GSTM1*, embora este polimorfismo tenha papel central reconhecido na toxicocinética do Hg, a

frequência deste gene varia entre os diferentes grupos étnicos, o que resulta em associações ora positivas ora negativas entre este gene e o aumento dos níveis de Hg.

Sendo assim, uma vez identificados os principais fatores determinantes responsáveis pelos altos níveis de Hg nesta população, a próxima etapa esperada planejamento de estratégias voltadas para a promoção da saúde destes indivíduos. Neste sentido, através desta tese foi produzido conhecimento que pode ser utilizado, por exemplo, no planejamento de ações por parte das ESF que atuam nas UBSFs. Uma vez que os profissionais atuantes nas ESFs saibam identificar os fatores determinantes e/ou os sintomas e problemas de saúde relacionados com a exposição mercurial aumenta a possibilidade de oferecerem aos indivíduos uma assistência integral, minimizando assim as consequências da vulnerabilidade social a qual estão expostos.

CAPÍTULO 6 - CONCLUSÃO

Foi avaliado o perfil epidemiológico-molecular de uma amostra da população do município de Santarém e foram identificados fatores ambientais, epidemiológicos e genéticos relacionados à toxicocinética do Hg e ao estresse oxidativo que podem estar afetando a susceptibilidade de alguns indivíduos aos efeitos tóxicos da exposição ao Hg nesta população. Em relação aos objetivos específicos apresentados no Capítulo 1 (item 1.3), os resultados obtidos foram:

- Os níveis de Hg foram medidos em 144 indivíduos residentes na área urbana e de várzea de Santarém. A maioria dos indivíduos (63,2%) apresentou níveis de Hg acima de 10µg/L, limite recomendado pela OMS, cujo nível mediano de Hg neste subgrupo foi de 25,4µg/L.
- Participaram do estudo 72 indivíduos residentes na área urbana e 72 residentes na área de várzea de Santarém, com idade média de 37,3 anos, dos quais 63,2% eram do sexo feminino e 36,8% do sexo masculino. Em relação ao consumo de peixe, a maioria dos indivíduos (77,8%) consome peixe frequentemente (diariamente ou até 3x por semana) enquanto os demais (22,2%) consomem peixe uma vez por mês ou não consomem peixe. Dos sintomas relacionados à exposição mercurial, os 5 sintomas mais citados entre os indivíduos com níveis de Hg acima de 10µg/L foram: dores musculares e articulares (n=52), dor de cabeça (n=52), câimbras musculares (n=33), diminuição da acuidade visual (n=29) e desconforto gastrointestinal (n=27).
- Indivíduos que consomem peixe frequentemente possuem níveis de Hg total mais elevados em comparação aos do subgrupo de baixa frequência ($\chi^2 = 41,68$; $p = 0,0001$); Homens possuem níveis mais elevados de Hg quando comparado com as mulheres ($\chi^2 = 17,45$; $p = 0,0001$); Foi observada uma correlação positiva entre idade e níveis de Hg entre indivíduos que consomem peixe frequentemente ($r = 0,35$; $p = 0,0002$).
- Os genes *GSTT1* ($\beta = -5,80$; $R^2 = 0,101$; $p = 0,24$) e *GSTP1* (rs1695 $\beta = 6,98$; $R^2 = 0,0153$; $p = 0,14$ e rs1138272 $\beta = 3,32$; $R^2 = 0,0022$; $p = 0,56$) não apresentaram efeito sobre os níveis de Hg quando analisados separadamente. Por outro lado, em relação ao gene *GSTM1* os resultados mostraram que indivíduos com genótipo deleção

apresentam níveis de Hg mais altos quando comparados com os que possuem genótipo normal ($\beta = 8,31$; $R^2 = 0,0323$; $p = 0,034$).

- Na análise multivariada, os fatores que mais tiveram efeito nos níveis de Hg foram o consumo de peixe ($\beta = 14,69$; $p = <0,001$), sexo ($\beta = 11,55$; $p = 0,001$), deleção do gene *GSTMI* ($\beta = 6,42$; $p = 0,06$) e idade ($\beta = 0,26$; $p = 0,04$). No entanto, com esse conjunto de dados não foi possível demonstrar o efeito dos genes *GSTT1* e *GSTP1* sobre os níveis de Hg, de modo que mais estudos são necessários para determinar se estes genes estão de fato influenciando os níveis de Hg nesta população.

O ambiente é um dos principais responsáveis pela saúde e bem-estar humanos. Nos últimos anos, tem se observado uma crescente degradação do ambiente, comprometendo a biodiversidade e a sustentabilidade dos recursos naturais. Na Amazônia o desmatamento é um dos principais responsáveis pela degradação ambiental, com destaque para contaminação mercurial dos ambientes aquáticos e conseqüentemente dos peixes e seres humanos. Neste contexto, as principais contribuições científicas desta tese considerando que a mesma foi desenvolvida no Programa de Pós Graduação Sociedade, Natureza e Desenvolvimento são:

- Existem grupos mais susceptíveis e vulneráveis à exposição mercurial e portanto sob risco de apresentarem problemas de saúde decorrentes desta exposição (SOCIEDADE).
- A população de Santarém está ambientalmente exposta ao Hg através do consumo de peixe contaminado (NATUREZA).
- Desmatamento resultante da mudança do uso da terra (agricultura e pecuária) está contribuindo para a degradação do ambiente amazônico, provocando sérios problemas de saúde para a população local (DESENVOLVIMENTO).

Vale a pena ressaltar também que com os resultados obtidos através desta tese vários outros novos questionamentos surgiram, como por exemplo:

- Que outros fatores genéticos, além do gene *GSTMI*, estão associados como o aumento do nível de Hg nesta população?
- As diferenças de níveis de Hg observadas entre os indivíduos são devidos a que outros fatores?
- Qual o nível de Hg necessário para desencadear sintomas ou problemas de saúde nos indivíduos desta população?

Uma importante questão que surgiu após a análise dos resultados diz respeito ao limite de exposição recomendado pela OMS: O limite de exposição de 10 μ g/L no sangue se aplica

na população estudada? Os critérios utilizados para estabelecer este limite atende as particularidades da população amazônica, principalmente das populações ribeirinhas que possuem hábitos alimentares quase que exclusivamente baseado no consumo de peixe? As condições econômicas, sociais, ambientais, climáticas e de saúde das populações que serviram de base para o estabelecimento deste limite são as mesmas da população amazônica?

Neste sentido, em relação a trabalhos futuros, é de extrema importância estabelecer um limite de exposição que esteja de fato relacionado com as condições sócio-ambientais e de saúde da população amazônica. Para isso se faz necessário uma avaliação clínica mais específica a fim de se determinar os sintomas e/ou problemas de saúde que estão acometendo os indivíduos desta população e qual o nível de Hg necessário para desencadear tais sintomas. Além disso, é importante avaliar outros genes envolvidos no estresse oxidativo e outras variáveis, tais como hábitos alimentares (consumo de frutas e alimentos antioxidantes) e níveis enzimáticos que possam estar contribuindo para a diferença de suscetibilidade aos níveis de Hg encontrados nesta população.

Em suma, com o presente trabalho foi possível demonstrar que a população de Santarém está ambientalmente exposta ao Hg através do consumo frequente de peixe e que fatores como sexo, idade e a deleção do gene *GSTM1* estão contribuindo para a manutenção dos níveis elevados deste metal no sangue dos indivíduos avaliados. Considerando que a região do Baixo Amazonas não é uma área de garimpo (onde em geral espera-se que a população local esteja exposta), os resultados obtidos com esta tese destacam que a exposição mercurial nesta região é uma questão de saúde coletiva visto que existem vários possíveis efeitos tóxicos para a saúde humana decorrentes desta exposição.

No entanto mais estudos são necessários para determinar quais os sintomas e/ou problemas de saúde estão acometendo a população de Santarém em decorrência desta exposição mercurial e para determinar se existem outros genes e/ou combinações genéticas que possam estar influenciando a toxicocinética do Hg desta população na região do Baixo Amazonas.

BIBLIOGRAFIA

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Mercury. 1999; 617p.

Akagi H, Malm O, Branches FJP, Kinjo Y, Kashima Y, Guimaraes JRD, Oliveira RB, Haraguchi K, Pfeiffer WC, Takizawa Y, Kato H. Human exposure to mercury due to gold mining in the Tapajos river basin, Amazon, Brazil: Speciation of mercury in human hair, blood and urine. 1995; *Water Air and Soil Pollution* 80 (1-4):85-94.

Ali-Osman, F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Buolamwini J. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants: evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 10004-10012.

Amorim MI, Mergler D, Bahia MO, Dubeau H, Miranda D, Lebel J, et al. Cytogenetic damage related to low levels of methylmercury contamination in the Brazilian Amazon. *An Acad Bras Ciênc.* 2000; 72:497–507.

Aschner M, Syversen T, Souza DO, Rocha JB, Farina M. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40(3):285-91.

Ballatori N, Clarkson TW. Biliary secretion of glutathione and of glutathione-metal complexes. *Fundam Appl Toxicol.* 1985; 5: 816-831.

Barbosa AC, Jardim W, Dórea JG, Fosberg B, Souza J. Hair Mercury Speciation as a Function of Gender, Age, and Body Mass Index in Inhabitants of the Negro River Basin, Amazon, Brazil. *Arch Environ Contam Toxicol* 2001; 40 (3): 439–44.

Barcelos GR, Grotto D, de Marco KC, Valentini J, Lengert Av, de Oliveira AÁ, Garcia SC, Braga GÚ, Schläwicke Engström K, Cólus IM, Broberg K, Barbosa F Jr. Polymorphisms in glutathione-related genes modify mercury concentrations and antioxidant status in subjects

environmentally exposed to methylmercury. *Science of the Total Environment*. 2013; 463–464: 319–325

Barcelos GR, Souza MF, Oliveira AÁ, Lengert Av, Oliveira MT, Camargo RB, Grotto D, Valentini J, Garcia SC, Braga GÚ, Cólus IM, Adeyemi J, Barbosa F Jr. Effects of genetic polymorphisms on antioxidant status and concentrations of the metals in the blood of riverside Amazonian communities co-exposed to Hg and Pb. *Environ Res*. 2015; 138:224–232.

Basu N, Goodrich JM, Head J. Ecogenetics of mercury: from genetic polymorphisms and epigenetics to risk assessment and decision-making. *Environ Toxicol Chem*. 2014; 33(6):1248–58.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J*. 2012 Jan; 5(1): 9–19.

Boischio AA, Henshel D. Fish Consumption, Fish Lore, and Mercury Pollution Risk - Communication for the Madeira River People. *Environ Res* 2000; 84(2): 108 -26.

Bourdineaud JP, Durrieu G, Sarrazin SLF, da Silva WCR, Mourão RHV, Oliveira RB. Mercurial exposure of residents of Santarém and Oriximiná cities (Pará, Brazil) through fish consumption. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2015; 22 (16): 12150–12161.

Brookes SJ. The essence of SNPs. *Gene* 1999; 234: 177–186.

Cernichiari E, Brewer R, Myers GJ, Marsh DO, Lapham LW, Cox C, Shamlaye CF, Berlin M, Davidson PW, Clarkson TW. Monitoring methylmercury during pregnancy. Maternal hair predicts fetal brain exposure. *Neurotoxicology* 1995; 16:705–710.

Clarkson TW, Magos L, Myers GJ. The toxicology of mercury-current exposures and clinical manifestations. *N Engl J Med*. 2003;349(18):1731–7.

Clarkson TW, Vyas JB, Ballatori N. Mechanisms of mercury disposition in the body. *Am J Ind Med.* 2007; 50(10):757-64.

Counter SA, Buchanan LH. Mercury exposure in children: a review. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004; 198:209–230.

Crespo-López ME, Herculano AM, Corvelo TC, do Nascimento JLM. Mercurio y neurotoxicidad. *Rev Neurol.* 2005; 40:441–447 .

Crespo-López ME, de Sá AL, Herculano AM, Burbano RR, do Nascimento JLM. Methylmercury genotoxicity: a novel effect in human cell lines of the central nervous system. *Environ Int.* 2007; 33:141–146.

Crespo-López ME, Macêdo GL, Pereira SID, Arrifano GPF, Picanço-Diniz DLW, do Nascimento JLM, et al. Mercury and human genotoxicity: critical considerations and possible molecular mechanisms. *Pharmacol Res.* 2009; 60:212–220.

Custodio HM, Broberg K, Wennberg M, Jansson JH, Vessby B, Hallmans G, Stegmayr B, Skerfving S. Polymorphisms in glutathione-related genes affect methylmercury retention. *Arch Environ Health.* 2004; 59(11): 588 - 595.

Davies KJA. Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems. *IUBMB Life*, 2000; 50: 279–289.

de Sá AL, Herculano AM, Pinheiro MC, Silveira LCL, Do Nascimento JLM, Crespo-López ME. Human exposure to mercury in the west region of Pará State. *Revista Paraense de Medicina*, 2006; 20(1):19–25.

Engström KS, Strömberg U, Lundh T, Johansson I, Vessby B, Hallmans G, Skerfving S, Broberg K. Genetic variation in glutathione-related genes and body burden of methylmercury. *Environ Health Perspect.* 2008; 116(6):734-9.

Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxicmetals and oxidative stress. Part I: Mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem*. 2001; 1:529–539.

Farina M, Aschner M, Rocha JB. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011; 256(3):405-17.

Fearnside PM. A floresta amazônica nas mudanças globais. 1ª edição. INPA; 2003.

Fearnside PM. Desmatamento na Amazônia brasileira: história, índices e consequências. *Megadiversidade*. 2005; 1:113-121.

Fearnside PM. Hidrelétricas na Amazônia: impactos ambientais e sociais na tomada de decisões sobre grandes obras. INPA. 2015; Vol.1.

Fillion M, Philibert A, Mertens F, Lemire M, Passos CJS, Frenette B, Guimarães JRD e Mergler D. Neurotoxic sequelae of mercury exposure: an intervention and follow-up study in the Brazilian amazon. *Ecohealth* 2011; 8: 210-222.

Fonseca A, Souza Júnior C e Veríssimo A. Boletim do desmatamento da Amazônia Legal (dezembro de 2015) SAD p.10. Belém: IMAZON.

Disponível em:
http://imazon.org.br/PDFimazon/Portugues/transparencia_florestal/SAD%20Dezembro%202015.pdf

Fostier AH, Forti MC, Guimarães JR, Melfi AJ, Boulet R, Espirito Santo CM e Krug FJ. Mercury fluxes in a natural forested Amazonian catchment (Serra do Navio, Amapá State, Brazil). *Science of the Total Environment* 2000; 260(1-3):201-11.

Franco JL, Teixeira A, Meotti FC, Ribas CM, Stringari J, Garcia Pomblum SC, Moro AM, Bohrer D, Bairros AV, Dafre AL, Santos AR, Farina M. Cerebellar thiol status and motor deficit after lactational exposure to methylmercury. *Environ Res*. 2006; 102(1):22-8.

Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Textos de Epidemiologia para Vigilância Ambiental em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde. 2002;132p.

Goodrich JM, Wang Y, Gillespie B, Werner R, Franzblau A, Basu N. Glutathione enzyme and selenoprotein polymorphisms associate with mercury biomarker levels in Michigan dental professionals. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011; 257(2): 301 - 308.

Grandjean P, Satoh H, Katsuyuki K, Eto K. Adverse Effects of Methylmercury: Environmental Health Research Implications Perspect. 2010; 118:1137–1145.

Grotto D, Valentini J, Fillion M, Passos CJ, Garcia SC, Mergler D e Barbosa Jr. F. Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon. *Science of the Total Environment.* 2010; 408:806–811.

Guimarães JR, Meili M, Hylander LD, de Castro e Silva E, Roulet M, Mauro JB, et al. Mercury net methylation in five tropical flood plain regions of Brazil: high in the root zone of floating macrophyte mats but low in surface sediments and flooded soils. *Sci Total Environ.* 2000 Oct 16; 261 (1-3): 99-107.

Gundacker C, Wittmann KJ, Kukuckova M, Komarnicki G, Hikkel I, Gencik M. Genetic background of lead and mercury metabolism in a group of medical students in Austria. *Environ Res.* 2009; 109(6): 786 - 796.

Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J.* 401:1–11 (2007).

Harada M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit Rev Toxicol* 1995; 25(1):1-24.

Harada H, Nakanishi J, Yasoda E, Pinheiro MDN, Oikawa T, Guimarães GD, Cardoso BS, Kizakid T e Ohno H. Mercury pollution in the Tapajos River basin, Amazon: Mercury level of head hair and health effects. *Environmental International*, 2001; 27:285–90.

Hayes JD, Flanagan JU, Ian R. Jowsey. Glutathione Transferases. *Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005; 45:51–88.

Hayes JD, Strange RC. Glutathione S-Transferase Polymorphisms and Their Biological Consequences. *Pharmacology* 2000;61:154–166.

Jesus IM, Santos ECO, Brabo ES, Loureiro ECB, Câmara VM, Mascarenhas AFS, da Silva DF e Cleary D. Exposure to elemental mercury in urban workers and gold miners from the Tapajós Region, Pará, Brazil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2001; 67(3): 317–323.

Karagas MR, Choi AL, Oken E, Horvat M, Schoeny R, Kamai E, et al. Evidence on the human health effects of low-level methylmercury exposure. *Environ Health Perspect* 2012; 120(6):799-806.

Khoury EDT, Souza GS, Silveira LCL, Costa CA, Araújo AA e Pinheiro MCN. Neurological manifestations in riverine populations from áreas exposed to Mercury in the Brazilian Amazon. *Cad. Saúde Pública* 2013; 29 (11): 2307-2318.

Lacerda LD. Amazon mercury emissions. *Nature* 1995; 374:20–1.

Lacerda LD, Souza M e Ribeiro MG. The effects of land use change on Mercury distribution in soils of Alta Floresta, Southern Amazon. *Environmental Pollution* 2004; 129: 247–255.

Lebel J, Roulet M, Mergler D, Lucotte M, Larribe F. Fish diet and mercury exposure in a riparian Amazonian population. *Water Air Soil Pollut*, 1997; 97: 31–44.

Lee BE, Hong YC, Park H, Ha M, Koo BS, Chang N, Roh YM, Kim BN, Kim YJ, Kim BM, Jo SJ, Ha EH. Interaction between GSTM1/GSTT1 polymorphism and blood mercury on birth weight. *Environ Health Perspect*. 2010; 118(3):437 - 443.

Limón-Pacheco J, Gonsebatt ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research* 2009; 674: 137–147.

Llop S, Ferran Ballester F, Karin Broberg K. Effect of Gene-Mercury Interactions on Mercury Toxicokinetics and Neurotoxicity. *Curr Envir Health Rpt* 2015; 2:179–194.

Mailman M, Stepnuk L, Cicek N, Bodaly RA. Strategies to lower methyl mercury concentrations in hydroelectric reservoirs and lakes: A review. *Science of the Total Environment*. 2006; 368(1):224-35.

Malm O, Branches FJP, Akagi H, Castro, MB, Pfeiffer WC, Harada M, et al. Mercury and methylmercury in fish and human hair from the Tapajós river basin, Brazil. *Sci Total Environ* 1995; 175(2): 141-50.

Malm O, Guimaraes JRD, Castro MG, Bastos WR, Viana JP, Branches FJP, Silveira EG e Pfeiffer WC. Follow-up of mercury levels in fish, human hair and urine in the Maderia and Tapajós basins, Amazon, Brazil. *Water Air and Soil Pollution*, 1997; 97:45–51.

Malm O. Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon. *Environmental Research*, 1998; 77:73-78.

Margulis S. *Causas do desmatamento da Amazônia Brasileira*. 1ª edição. Brasília: Banco Mundial; 2003.

Meneses HNM, Neves AC, Costa FAA, Oliveira RB, Meneses AAM, Rodrigues LRR, Sampaio da Silva D. Mercury Levels and Glutathione S-Transferase Polymorphisms Evaluation in a Population of the Low Amazon, Brazil. *SM J Public Health Epidemiol*. 2016; 2(2): 1027-1031.

Minelli C, Gögele M. The role of antioxidant gene polymorphisms in modifying the health effects of environmental exposures causing oxidative stress: a public health perspective. *Free Radical BiolMed* 2011; 51(5):925-30.

National Research Council (NRC). *Toxicological Effects of Methylmercury*. National Academy Press, 2000; 344p.

Nevado JJB, Rodríguez Martín-Doimeadios RC, Guzmán Bernardo FJ, Jiménez MorenoM, Herculano AM, do Nascimento JL, Crespo-López ME. Mercury in the Tapajós river basin, Brazilian amazon: a review. *Environment International*, 2010; 36: 593–608.

Niagru JO. Mercury pollution in Brazil. *Nature*, 1992; 356:389.

Nordberg GF, Fowler BA e Nordberg M. *Handbook on the toxicology of metals*. Elsevier, 2015; 4ª edição: 1385p.

National Research Council. *Scientific frontiers in developmental toxicology and risk assessment*. 2nd ed; 2000

Oliveira AÁ, de Souza MF, Lengert Av, de Oliveira MT, Camargo RB, Braga GÚ, Cólus IM, Barbosa F Jr, Barcelos GR. Genetic polymorphisms in glutathione (GSH-) related genes affect the plasmatic Hg/whole blood Hg partitioning and the distribution between inorganic and methylmercury levels in plasma collected from a fish-eating population. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 940 - 952.

Organização Mundial de Saúde (OMS). *Environmental Health Criteria Document 101 - Methylmercury*. Geneva. World Health Organization, 1990.

Organização Mundial de Saúde (OMS). *Definition of Environmental Health developed at WHO consultation in Sofia, Bulgaria*. World Health Organization, 1993.

Passos CJ, Lucotte M, Queiroz A, Mergler D, Peleja R, Goch Y, et al. Condições sócio-econômicas e exposição ao mercúrio (Hg) através do consumo de peixe: um estudo de caso em Santarém, Pará, Brasil. *Revista Saúde Ambiente* 2003a; 6:3–11.

Passos CJS, Mergler D, Gaspar E, Morais S, Lucotte M, Larribe F, Davidson R e de Grosbois S. Eating tropical fruit reduces mercury exposure from fish consumption in the Brazilian Amazon. *Environmental Research*. 2003b; 93:123–130.

Passos CJS, Silva DS, Lemire M, Fillion M, Guimarães JRD, Lucotte M e Merger D. Daily Mercury intake in fish-eating populations in the Brazilian Amazon. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 2008;18:76–87.

Pfeiffer WC, Lacerda LD. Mercury inputs into the Amazon Region, Brazil. *Environmental Technology Letters* 1988; 9(4): 325-30.

Pignatti MG. Saúde e Ambiente: as doenças emergentes no Brasil. *Ambiente & Sociedade* 2004; 7(1): 133-147.

Pinheiro MCN, Oikawa T, Vieira JLF, Gomes MSV, Guimarães GA, Crespo-López ME, Müller RCS, Amoras WW, Ribeiro DRG, Rodrigues AR, Côrtes MIT. Comparative study of human exposure to mercury in riverside communities in the Amazon region. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39 (3):411–14.

Pinheiro MCN, Macchi BM, Vieira JLF, Oikawa T, Amoras WW, Guimarães GA, Costa CA, Crespo-López ME, Herculano AM, Silveira LC, do Nascimento JL. Mercury exposure and antioxidant defenses in women: a comparative study in the Amazon. *Environ Res* 2008; 107 (1): 53–59.

Red Amazónica de Información Socioambiental Georeferenciada (RAISG). Deforestación en la Amazonía (1970-2013). 2015; 48 p.

Rissanen T, Voutilainen S, Nyssönen K, Lakka TA and Salonen JT. Fish-oil derived fatty acids, docosahexaenoic acid, and the risk of acute coronary events. *Circulation*. 2000; 102: 2677-2679..

Roulet M, Lucotte M. Geochemistry of mercury in pristine and flooded ferralitic soils of a tropical rain forest in French Guiana, South America. *Water Air Soil Pollut*. 1995; 80 (1): 1079-1088.

Roulet M, Lucotte M, Saint-Aubin S, Reault, Farella I, Silva EJ. The geochemistry of mercury in central Amazon soils developed on the Alter do Chão formation of the lower Tapajós River Valley, Pará State, Brazil. *Sci Total Environ*. 1998; 223 (1), 1 – 24.

Roulet M, Lucotte M, Farella N, Serique G, Coelho H, Passos CJS, et al. Effects of recent human colonization on the presence of mercury in Amazonian ecosystems. *Water Air Soil Pollut* 1999;112 (3):297-313.

Roulet M, Lucotte M, Canuel R, Farella N, Goch YGF, Peleja JRP, et al. Spatio-temporal geochemistry of mercury in waters of the Tapajós and Amazon rivers Brazil. *Limnology and Oceanography*, 2001; 46 (5): 1141-57.

Salonen JT, Seppanen K, Nyssonen K, Korpela H, Kauhanen J, Kantola M, Tuomilehto J, Esterbauer H, Tatzber F and Salonen R. Intake of mercury from fish, lipid peroxidation, and the risk of myocardial infarction and coronary, cardiovascular, and any death in eastern Finnish men. *Circulation*. 1995; 91:645-655.

Sampaio da Silva D, Lucotte M, Roulet M, Poirier H, Mergler D, Santos OE e Crossa M. Trophic structure and bioaccumulation of mercury in fish of three natural lakes of the Brazilian Amazon. *Water Air Soil Pollutio*, 2005;165:77-94.

Sampaio da Silva D, Lucotte M, Roulet M, Poirier H, Mergler D, Crossa M. Mercúrio nos peixes do rio Tapajós, Amazônia Brasileira. *Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente*, 2006; 1(1): 1-31.

Sampaio da Silva D, Lucotte M, Paquet S, Davidson R. Influence of ecological factors and of land use on mercury levels in fish in the Tapajós River basin, Amazon. *Environmental Research*, 2009; 109: 432-446.

Santos ECO, de Jesus IM, Brabo ES, Fayal KF, Filho GCS, Lima ML, Miranda AMM, Mascarenhas AS, de Sá LLC, da Silva AP, Câmara VM. Exposure to mercury and arsenic in Amazon States: a summary of studies by Evandro Chagas Institute/FUNASA. *Rev Bras Epidemiol*. 2003; 6(2): 171-185.

Santos GM, Santos ACM. Sustentabilidade da pesca na Amazônia. *Estudos Avançados* 2005; 19(54): 165-82.

Shanker G, Syversen T, Aschner JL, Aschner M. Modulatory effect of glutathione status and antioxidants on methylmercury-induced free radical formation in primary cultures of cerebral astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005; 137(1-2):11-22

Souza Lima AP, Muller RCS, de Souza JES, Alves CN, da Silva MHB, Brabo E, de Oliveira SE. Mercury contamination in fish from Santarém, Pará, Brazil. *Environmental Research*. 2000; 83:117–122.

Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione-S transferase family of enzymes. *Mutat Res*. 2001; 482(1-2):21-6.

Trasande L, Schechter CB, Haynes KA, Landrigan PJ. Mental retardation and prenatal methylmercury toxicity. *Am J Ind Med*. 2006; 49:153–158.

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

US Environmental Protection Agency (US EPA). Mercury Study Report to Congress, Volume V: Health Effects of Mercury and Mercury Compounds. 1997; 349p.

US Environmental Protection Agency (US EPA). Water Quality Criterion for the Protection of Human Health: Methylmercury Final. 2001; 306p.

Veiga MM, Meech JA e Onate N. Mercury pollution from deforestation. *Nature* 1994; 368:816-7.

Villas Bôas RC. The mercury problem in the Amazon due to gold extraction. *Journal of Geochemical Exploration*, 1997; 58:217-22.

Yamaguchi S, Matsumoto H, Kaku S, Tateishi M, Shiramizu M. Factors affecting the amount of mercury in human scalp hair. *American Journal of Public Health*, 1975; 65(5): 484-488.

Wasserman JC, Hacon SS, Wasserman MA. O ciclo do mercúrio no ambiente amazônico. *Mundo & Vida*. 2001; 2:46-53.

Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem*. 2003; 49: 853- 860.

Wright DA, Welbourn P. Environmental Toxicology. 1ª Edição. Cambridge University Press; 2002.

ANEXOS

ANEXO I

CENTRO DE CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS E DA SAÚDE -
CAMPUS XII-TAPAJÓS/UEPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de marcadores moleculares do estresse oxidativo para avaliar a contaminação por mercúrio na região do Baixo Amazonas

Pesquisador: Heloisa do Nascimento de Moura Meneses

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 38962714.0.0000.5168

Instituição Proponente: Universidade Federal do Oeste do Pará

Patrocinador Principal: Universidade Federal do Oeste do Pará

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.127.108

Data da Relatoria: 01/07/2015

Apresentação do Projeto:

Na região amazônica muitos estudos já comprovaram a presença de mercúrio metálico e formas orgânicas deste metal no meio físico e em diversos compartimentos dos ecossistemas aquáticos. A biodisponibilidade do mercúrio no meio ambiente predispõe as populações humanas dessa região ao risco de contaminação. Dentre os principais mecanismos envolvidos na intoxicação causada pelo mercúrio está o estresse oxidativo e seu efeito sobre enzimas antioxidantes. Se o dano for severo demais as enzimas responsáveis pelo sistema de defesa antioxidante deixarão de funcionar ou irão funcionar de forma inadequada. Diante disso, toma-se necessário um estudo sobre os efeitos deste metal, ao nível de DNA, e suas consequências para a saúde humana.

Sendo assim, este projeto tem como objetivo principal investigar os efeitos danosos de exposição ao mercúrio sob os aspectos da saúde humana buscando compreender o perfil epidemiológico-molecular de populações afetadas com vistas à ações mitigatórias para a diminuição dos riscos potenciais a saúde coletiva humana. A população de estudo consiste em 100 a 200 indivíduos, residentes no município de

Endereço: Av. Plácido de Castro, 1399

Bairro: Aparecida

CEP: 68.040-090

UF: PA

Município: SANTAREM

Telefone: (93)3512-8013

Fax: (91)3276-8052

E-mail: mgotystf@gmail.com

**CENTRO DE CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS E DA SAÚDE -
CAMPUS XII-TAPAJÓS/UEPA**



Continuação do Parecer: 1.127.108

Santarém-Pará. Será realizada extração de DNA e RNA de todos os indivíduos (casos e controles) e em cada grupo será realizada genotipagem de SNPs (HRM) e quantificação de mRNA (RT-qPCR). Os dados de genotipagem e expressão gênica serão correlacionados, através de análise de Covariância (ANCOVA), a fim de se determinar se existe associação entre genótipo e fenótipo. Ou seja, verificar se alterações nos níveis de expressão gênica das enzimas antioxidantes (aumento ou redução dos níveis de mRNA) estão associadas a SNPs presentes nos genes que codificam estas mesmas enzimas. Será elaborado ainda um questionário a fim de se obter dados que permitam traçar um perfil sócio-econômico dos indivíduos participantes da pesquisa, além de dados

referentes a sua saúde com a finalidade de traçar um perfil epidemiológico. Assim poderão ser obtidos informações e subsídios que possam promover a saúde e o bem-estar desses indivíduos. Desse modo, as informações levantadas a partir deste projeto permitirão o avanço do conhecimento sobre os mecanismos genético-moleculares envolvidos nas respostas fisiológicas de combate ao estresse oxidativo provocado pelo mercúrio.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar os efeitos danosos de exposição ao mercúrio sob os aspectos da saúde humana por meio de abordagem interdisciplinar buscando compreender o perfil epidemiológico-molecular de populações afetadas com vistas à proposição de estratégias para a diminuição dos riscos potenciais a saúde coletiva humana.

Objetivo Secundário:

- Caracterizar o perfil epidemiológico e identificar possíveis efeitos da exposição ao mercúrio em três populações da bacia do rio Tapajós;
- Verificar se existe associação entre SNPs em genes que codificam as enzimas do sistema antioxidante e a contaminação mercurial;
- Verificar se existe associação entre atividade das enzimas do sistema antioxidante (quantificação do mRNA) e contaminação mercurial;
- Verificar se existe e como se dá a correlação entre os níveis de mRNA (expressão gênica) e SNPs;
- Verificar se existe e como se dá.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: na punção venosa, há a possibilidade de dor ou edema local. Tais riscos serão minimizados pela coleta realizada por profissionais especializados. Benefícios: informar se houver alguma atividade enzimática ou expressão gênica anormal, ou nível do mercúrio fora dos padrões estipulados pela OMS, para fazer investigação médica a critério do participante.

Endereço: Av. Plácido de Castro, 1399		
Bairro: Aparecida		CEP: 68.040-090
UF: PA	Município: SANTAREM	
Telefone: (93)3512-8013	Fax: (91)3276-8052	E-mail: mgotyst@gmail.com

**CENTRO DE CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS E DA SAÚDE -
CAMPUS XII-TAPAJÓS/UEPA**



Continuação do Parecer: 1.127.108

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

pesquisa de grande relevância social e científica necessitando ainda de aprimoramento na apresentação da proposta.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios foram apresentados.

Recomendações:

Todas as pendências apontadas pelo relator foram atendidas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

A pesquisadora deve anexar na Plataforma Brasil os relatórios parcial e final do projeto.

SANTAREM, 26 de Junho de 2015

**Assinado por:
Maria Goreth Silva Ferreira
(Coordenador)**

Endereço: Av. Plácido de Castro, 1399
 Bairro: Aparecida CEP: 68.040-090
 UF: PA Município: SANTAREM
 Telefone: (93)3512-8013 Fax: (91)3276-8052 E-mail: mgotyst@gmail.com

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com os critérios da resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde)

Caro(a) senhor(a), você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa: Estudo de marcadores moleculares do estresse oxidativo para avaliar a contaminação por mercúrio na região do Baixo Amazonas.

JUSTIFICATIVA, OBJETIVOS E PARTICIPAÇÃO DO VOLUNTÁRIO

Na região amazônica muitos estudos já comprovaram a presença de mercúrio metálico e formas orgânicas deste metal no meio físico e em diversos compartimentos dos ecossistemas aquáticos. A biodisponibilidade do mercúrio no meio ambiente predispõe as populações humanas dessa região ao risco de contaminação. Dentre os principais mecanismos envolvidos na intoxicação causada pelo mercúrio está o estresse oxidativo e seu efeito sobre enzimas antioxidantes. Se o dano for severo demais as enzimas responsáveis pelo sistema de defesa antioxidante deixarão de funcionar ou irão funcionar de forma inadequada. Diante disso, torna-se necessário um estudo sobre os efeitos deste metal, ao nível de DNA, e suas consequências para a saúde humana. Sendo assim, este projeto tem como objetivo principal investigar os efeitos danosos de exposição ao mercúrio sob os aspectos da saúde humana buscando compreender o perfil epidemiológico-molecular de populações afetadas com vistas à ações mitigatórias para a diminuição dos riscos potenciais a saúde coletiva humana. A população de estudo consiste em até 700 indivíduos, residentes no município de Santarém-Pará. A participação do voluntário consiste em responder ao questionário e fornecer amostra de sangue para as análises de atividade enzimática, expressão gênica e quantificação de mercúrio.

RISCOS E BENEFÍCIOS

Riscos: na punção venosa, há a possibilidade de dor ou edema local. Tais riscos serão minimizados pela coleta realizada por profissionais especializados. Benefícios: informar se houver alguma atividade enzimática ou expressão gênica anormal, ou nível do mercúrio fora dos padrões estipulados pela OMS, para fazer investigação médica a critério do participante.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO

Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. O TCLE será aplicado em duas vias e se tiver mais de uma página todas deverão ser rubricadas. Uma cópia deste consentimento informado será fornecida a você.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS

A participação no estudo não acarretará custos para o(a) senhor(a). Todos os exames serão realizados pelo Laboratório de Genética e Biodiversidade da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA) e o(a) senhor(a) poderá receber ressarcimento ou indenização, segundo as normas legais, para qualquer situação que se sinta lesado(a).

DECLARAÇÃO DA PARTICIPANTE

Eu, _____ fui informada (o) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sendo assim, autorizo a coleta, depósito, armazenamento e utilização do material biológico coletado que está atrelado ao projeto de pesquisa a que se refere este TCLE, segundo Resolução CNS 441/11 e Portaria MS 2.201/11. Estou ciente que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar.

Em caso de dúvidas poderei contatar a doutoranda Heloísa do Nascimento de Moura Meneses no telefone (93) 9140-9627 ou no Laboratório de Genética e Biodiversidade – UFOPA - Campus Tapajós - Av. Vera Paz, s/nº - Santarém – Pará - CEP: 68.040-060 - Fone: (93) 2101-4943 ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/UEPA/STM.

Universidade do Estado do Pará - UEPA, Av. Plácido de Castro, 1399 - Bairro de Aparecida, CEP: 68040-090, fone: (93) 3512- 8000 e 3512-8013.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome	Assinatura do Participante	Data
Nome	Assinatura do Pesquisador	Data

ANEXO III

QUESTIONÁRIO

- *Identificação*

Nome: _____ Amostra n° _____

Coleta de material: Sangue () Saliva ()

Data de Nascimento: ___/___/___

Sexo: Masculino () Feminino ()

Cor: Branco () Pardo () Negro () Índio ()

Local de nascimento: _____

Estado civil: Solteiro () Casado () Viúvo () Divorciado () União Estável ()

Grau de escolaridade:

Ensino Fundamental Incompleto ()

Ensino Fundamental Completo ()

Ensino Médio Incompleto ()

Ensino Médio Completo ()

Superior Completo ()

Superior Incompleto ()

Pós-graduação () _____

Não estudou ()

Endereço Atual: _____

Bairro: _____ **Município:** _____

Tempo de permanência no local atual: _____

Morava antes em outro lugar: Não () Sim ()

Onde? _____

Quantas pessoas moram na casa: _____ Adultos _____ Crianças

Dessas quantas exercem trabalho remunerado: _____

Quantos filhos: _____

- *Apenas para Mulheres com filhos*

Tipo do Parto: Normal () Cesárea ()

Fez pré-natal? Não () Sim () Onde? _____

Teve algum aborto espontâneo: Não () Sim () Quantas vezes? _____

Tipo de gravidez: () gravidez *pré-termo* (menos de 37 semanas de gestação)
 () gravidez *a termo* (37 a 41 semanas de gestação)
 () gravidez *pós termo* (com 42 ou mais semanas de gestação)

Fumou durante a gravidez? Não () Sim () Frequência: _____

Consumiu bebida alcoólica durante a gravidez? Não () Sim () Frequência: _____

Consumiu drogas durante a gravidez? Não () Sim () Frequência: _____

Teve algum problema de saúde durante a gravidez? Não () Sim ()

Qual? _____

A criança nasceu com alguma doença congênita? Não () Sim ()

Qual? _____

Peso da criança ao nascer: () baixo peso (>2500g)
 () peso adequado
 () excesso de peso (<4000g)

- *Histórico Ocupacional*

Profissão: _____

Trabalhou com Mercúrio? Não () Sim ()

Quando? _____

Trabalhou com queima de ouro (garimpo)? Não () Sim ()

Por quanto tempo? _____ **Quando?** _____

Onde? _____

Outras atividades Anteriores: _____

- *Hábitos Alimentares*

Consome peixe habitualmente? Não () Sim ()

Consome: () Todo dia () 3x por semana () 1x por semana () a cada 15 dias
() uma vez por mês () raramente

Você sabe a procedência do peixe? Não () Sim ()

Qual? _____

Da lista a seguir quais peixes você consome com mais frequência?

() Pescada () Aracu () Tucunaré

() Branquinha () Piranha () Surubim

() Caratinga () Charuto () Matrinchá

() Pacu () Tambaqui () Traira

() Curimatã () Sardinha () Acari

() Mapará () Dourada () Pirapitinga

() Piaba () Tilápia () Pirarucu

() Atum () Sardinha () Salmão

Outros _____

Da lista a seguir quais alimentos você consome frequentemente (pelo menos uma vez por semana)?

() Abóbora () Beterraba () Brócolis

() Cenoura () Couve () Ervilha

() Espinafre () Tomate () Gérmen de trigo

() Nozes () Berinjela () Aveia

() Lentilha () Amêndoa () Castanha do pará

Qual outro alimento consome além de peixe e em que frequência?							
	Todo dia	3 x por semana	2 x por semana	1 x por semana	15 dias	Raramente	Nunca
Farinha							
Feijão							
Arroz							
Ovos							
Carne							
Frango							
Café							
Leite							
Legumes							
Vegetais							
Cereais							

Que frutas e/ou suco de frutas consome e em que frequência?							
	Todo dia	3 x por semana	2 x por semana	1 x por semana	15 dias	Raramente	Nunca
Laranja							
Maçã							
Fruta do conde (Ata)							
Banana							
Tangerina							
Carambola							
Muruci							
Goiaba							
Cupuaçu							
Acerola							
Taperebá							
Cajú							
Jambo							
Ameixa							
Açaí							
Romã							
Limão							
Morango							
Melão							
Manga							
Uva roxa							
Cacau							
Mamão papaia							

• *Saúde*

É fumante? Não () Sim ()

Quantos cigarros por dia? _____

Há quanto tempo? _____

Consome bebidas alcoólicas? Não () Sim ()

Que bebidas alcoólicas consome, em que frequência e quantidade?						
	Todo dia	3 x por semana	1 x por semana	15 dias	1x por mês	Quantidade (Dose, Tulipa, Lata, Copo, Taça, Garrafa ou Lata)
Cerveja						
Cachaça						
Vinho						
Outros						

Já fez tratamento dentário com amalgama? Não () Sim () Quando? _____

Por quanto tempo utilizou e/ou usa amalgama? _____

A família recebe visita de agente comunitário de saúde? Não () Sim ()

Com que frequência? _____

Quando um adulto ou criança fica doente onde procuram assistência? _____

Você faltou no trabalho por problemas de saúde este ano? Não () Sim ()

Qual? _____

Das doenças abaixo, quais você já teve e/ou tem?

- | | | |
|---------------------------|-----------------------------|-------------------|
| () AIDS | () Amebíase | () Ascaridíase |
| () Catapora | () Caxumba | () Cólera |
| () Coqueluche | () Dengue | () Difteria |
| () Doença de Chagas | () Encefalite | () Enterite |
| () Esquistossomose | () Febre amarela | () Febre tifoide |
| () Filariose | () Giardíase | () Hanseníase |
| () Hantavirose | () Hepatite A | () Hepatite B |
| () Hepatite C | () Hepatite D | () Herpes |
| () Leshimaniose Visceral | () Leshimaniose Tegumentar | |
| () Leptospirose | () Malária | () Meningite |
| () Raiva | () Rubéola | () Sarampo |
| () Tétano | () Toxoplasmose | () Tuberculose |

Você já teve algum tipo de doença crônica?

- | | | |
|-------------------------|------------------------|--------------------------|
| () Asma | () AVC (trombose) | () Bronquite |
| () Cirrose | () Câncer | () Diabetes |
| () Doenças do coração | () Esclerose Múltipla | () Hipertensão arterial |
| () Insuficiência Renal | Outros: _____ | |

Você já teve algum tipo de doença do sistema nervoso e/ou motor?

- | | |
|-----------------------------------|---------------|
| () Esclerose Lateral Amiotrófica | () Alzheimer |
| () Distrofia | |

Outros: _____

Possui algum destes sintomas e em que frequência?						
	Todo dia	3 x por semana	1 x por semana	15 dias	Raramente	Nunca
Distúrbios do sono						
Dor de cabeça						
Fadiga						
Dificuldade de concentração						
Depressão						
Perda de memória						
Diminuição da coordenação motora fina						
Dores musculares e articulares						
Câimbras musculares						
Desconforto gastrointestinal						
Frequência cardíaca alterada						
Hipertensão						
Tremor						
Dormência ou formigamento em torno da boca						
Dormência ou formigamento nas mãos e pés						
Dificuldade para caminhar						
Dificuldade na fala						
Diminuição da acuidade visual						
Movimento anormal dos olhos						
Diminuição da audição						

ANEXO IV

Resumo do artigo submetido à Revista Brasileira de Epidemiologia (RBEPID-2016-0048)

**PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE UMA POPULAÇÃO AMBIENTALMENTE EXPOSTA
AO MERCÚRIO NA REGIÃO DO BAIXO AMAZONAS**

**EPIDEMIOLOGIC ASSESSMENT OF A POPULATION ENVIRONMENTALLY
EXPOSED TO MERCURY IN THE LOW AMAZON REGION**

Heloisa do Nascimento de Moura Meneses^{1,2}

Amanda Chianca Neves^{2,3}

Roseane Batista Costa^{2,4}

Ricardo Bezerra de Oliveira^{5,6}

Anderson Alvarenga de Moura Meneses^{1,7,8}

Delaine Sampaio da Silva^{9,10}

Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues^{1,2,6,8}

1. Programa de Pós Graduação em Sociedade Natureza e Desenvolvimento (PPGSND) – Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)
2. Laboratório de Genética e Biodiversidade (LGBio/UFOPA)
3. Bacharelado em Biotecnologia - Instituto de Biodiversidade e Florestas (IBEF/UFOPA)
4. Bacharelado em Farmácia, Instituto de Saúde Coletiva (ISCO/UFOPA)
5. Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental (LaBex/UFOPA)
6. Programa de Pós Graduação em Biociências (PPGBIO – UFOPA)
7. Laboratório de Inteligência Computacional (LabIC/UFOPA)
8. Programa de Pós Graduação em Recursos Naturais da Amazônia (PPGRNA - UFOPA)
9. Centro de Formação Interdisciplinar (CFI/UFOPA)
10. Programa de Pós-graduação em Sociedade, Ambiente e Qualidade de Vida (PPGSAQ - UFOPA)

RESUMO

Introdução: O mercúrio (Hg) é considerado um dos metais pesados mais tóxicos para o ambiente e para a saúde humana. Na Amazônia a exposição ao Hg é diretamente relacionada ao consumo de peixe e uma das formas de se avaliar os efeitos desta exposição é através da quantificação dos níveis de Hg no sangue. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar o perfil epidemiológico de uma população da mesorregião do Baixo Amazonas (PA) e determinar se a mesma está ambientalmente exposta ao Hg. **Metodologia:** Participaram do estudo 144 indivíduos residentes na área urbana e de várzea de Santarém (PA). Foi realizada uma análise descritiva de informações socioeconômicas e de saúde obtidas através de questionário e uma avaliação da relação entre os níveis de Hg e frequência de consumo de peixe. **Resultados:** Os indivíduos que consomem peixe frequentemente apresentaram maiores níveis de Hg em relação aos que não consomem frequentemente ($\chi^2 = 41,68$; $p = 0,0001$) e esses níveis aumentam com a idade ($r = 0,35$; $p = 0,0002$). Também foi possível observar que os homens possuem níveis mais elevados de Hg quando comparado com as mulheres ($\chi^2 = 17,45$; $p = 0,0001$). **Discussão:** Poucos estudos anteriores foram realizados na região do Baixo Amazonas e nossos resultados demonstraram que não é preciso morar em uma área próxima ao garimpo para estar exposto ao Hg. **Conclusão:** A população de Santarém está exposta ao Hg através do consumo frequente de peixe e os níveis de Hg encontrados são suficientes para desencadear efeitos tóxicos adversos à saúde humana.

Palavras-chave: Mercúrio, Exposição ambiental, Saúde ambiental, Baixo Amazonas

ANEXO V

Resumo submetido ao 9th Congress of Toxicology in Developing Countries / XIX Congresso Brasileiro de Toxicologia

OXIDATIVE STRESS MOLECULAR MARKERS EVALUATION AND EPIDEMIOLOGIC ASSESSMENT OF SUBJECTS ENVIRONMENTALLY EXPOSED TO MERCURY IN THE EASTERN AMAZON

Meneses H.N.M.^{1,2}, Neves A.C.², da Costa F.A.A.², Silva C.D.L.^{2,3}, Oliveira R.B.^{1,4}, Meneses A.A.M.^{1,5}, Sampaio da Silva D.⁶, Rodrigues L.R.R.^{1,2,3}

¹Postgraduate Program in Society, Nature and Development, Federal University of Western Pará (UFOPA); ²Laboratory of Genetics and Biodiversity (UFOPA); ³Postgraduate Program in Biosciences (UFOPA); ⁴Laboratory of Bioprospection and Experimental Biology (UFOPA); ⁵Laboratory of Computational Intelligence (UFOPA); ⁶Center of Interdisciplinary Formation (UFOPA)

Introduction: In the present study we report mercury (Hg) levels, evaluate polymorphisms related to the oxidative stress genes and perform an epidemiologic assessment in a population sample from Santarém municipality, located in the lower Amazonas river region. The subjects are environmentally exposed to Hg contamination by the intake of fish.

Objective: Evaluation of the total Hg levels, in sample populations from urban and riverside (Santa Maria do Tapará) communities, in association to factors such as age, sex, and the frequency of fish intake, as well as the occurrence of deletions in oxidative stress-related genes (*GSTM1* e *GSTT1*).

Materials and Methods: Volunteer subjects were recruited (n = 98; 30 male and 68 female), 18 – 81 years old, living in the urban area (64.3%) and at a riverside community (35.7%). The study was approved by the Ethics Committee of Pará State University and all the participants gave written consent. The study subjects filled out a health/lifestyle questionnaire. Blood samples were collected and total Hg blood concentration was determined in the DMA-80 Direct Mercury Analyzer (Milestone). *GSTM1* and *GSTT1* deletions were genotyped using multiplex PCR. Two subgroups were determined by the frequency of fish intake (high and

low frequency) and three possible relationships were investigated: (a) Hg levels and frequency of fish intake; (b) Hg levels and genotypes; and (c) Hg level and age only for subjects with higher frequencies of fish intake. Respectively, for each assessment: (a) since the variances within the subgroups were not approximately equal, the ANOVA could not be used, then a Kruskal-Wallis test was performed; (b) the ANOVA was performed; and (c) an analysis of correlation was performed.

Results and Discussion: (a) In relation to the fish intake, a significant statistical difference between the Hg level was observed ($\chi^2 = 30.167$; $p = 0.0001$); (b) in relation to *GSTM1* and *GSTT1* deletions, no statistical difference between Hg level was observed (respectively: $F = 2.00$, $p = 0.1624$ and $F = 1.14$, $p = 0.2896$) within the high fish intake frequency subgroup; (c) for the 66 individuals within the high frequency subgroup, a positive correlation between age and Hg level was calculated ($r = 0.39$; $p = 0.0014$), and the correlation coefficients were also positive for stratified groups of 46 females ($r = 0.36$; $p = 0.0141$) and 19 males ($r = 0.54$; $p = 0.0180$).

Conclusion: Our results demonstrate that individuals at the eastern Amazon are environmentally exposed to Hg due to high fish intake frequency, reaching high levels of Hg in blood (above $10\mu\text{g/L}$). Within the high level frequency group, the *GSTM1* and *GSTT1* deletions were not related to the Hg levels however a positive correlation between age and Hg levels was found.

Acknowledgment: The present research is funded by FAPESPA (Project no. 170/2014), CAPES (Project CSF-PVE's no. 88881.030472/2013-01 and Project CSF-PVE's no. 88881.030.467/2013-01), and PPGSND-UFOPA.

ANEXO VI

Resumo do artigo aceito na SM Journal of Public Health and Epidemiology - Special Article:
Heavy Metals and Health

MERCURY LEVELS AND GLUTATHIONE S-TRANSFERASE POLYMORPHISMS EVALUATION IN A POPULATION OF THE LOW AMAZON, BRAZIL

Heloisa do Nascimento de Moura Meneses^{1,2}

Amanda Chianca Neves^{2,3}

Felipe Afonso dos Anjos da Costa^{2,4}

Ricardo Bezerra de Oliveira^{5,6}

Anderson Alvarenga de Moura Meneses^{1,4,7}

Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues^{1,2,4,5}

Delaine Sampaio da Silva^{7,8}

1- Postgraduate Program in Society, Nature and Development (PPGSND) - Federal University of Western Pará (UFOPA);

2 - Laboratory of Genetics and Biodiversity (LGBio - UFOPA);

3 - Institute of Biodiversity and Forests (IBEF - UFOPA)

4 – Postgraduate Program in Natural Resources of the Amazon (PPGRNA - UFOPA)

5 - Laboratory of Bioprospection and Experimental Biology (LaBex - UFOPA);

6 - Postgraduate Program in Biosciences (PPGBIO – UFOPA)

7 - Laboratory of Computational Intelligence (LabIC - UFOPA);

8 - Center of Interdisciplinary Formation (CFI - UFOPA)

9 - Postgraduate Program in Society, Environment and Quality of Life (PPGSAQ - UFOPA)

ABSTRACT

Mercury (Hg) is considered one of the most dangerous toxic metals to the environment and to human. High Hg level may induce different types of toxic effects on human health and the main target is the central nervous system (CNS). One of the main

mechanisms involved in neurotoxicity caused by Hg is the oxidative stress and its effect on antioxidant systems. Currently it is known that deforestation is one of the main reasons for the high levels of Hg in the aquatic ecosystems in Amazon. However, to the best of our knowledge, there are no recent investigations that evaluate the Hg exposure in a human population of the Low Amazon region. The present work aims to fill the gap of the lack of information related to how the urban and floodplain populations of Santarém city (Pará state, Brazilian Amazon) is affected by Hg exposure, also investigating the *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms for the population studied. Our results show that the individuals studied are environmentally exposed to Hg exposure due to the fish intake. Additionally, the analysis of our data suggests that fish intake, age, and sex are more relevant for prediction of Hg level in blood than the polymorphisms of *GSTM1* and *GSTT1* genes.

