

ANNA LAURA BECHARA JACOB FERREIRA

**“INTERAÇÃO TOXICOGENÉTICA DE
POLIMORFISMOS DA METALOPROTEINASE-9
(MMP-9) DA MATRIZ EXTRACELULAR E
EXPOSIÇÃO AO MERCÚRIO:
efeitos sobre a atividade plasmática da MMP-9”**

CAMPINAS

2010

ANNA LAURA BECHARA JACOB FERREIRA

**“INTERAÇÃO TOXICOGENÉTICA DE
POLIMORFISMOS DA METALOPROTEINASE-9
(MMP-9) DA MATRIZ EXTRACELULAR E
EXPOSIÇÃO AO MERCÚRIO:
efeitos sobre a atividade plasmática da MMP-9”**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do Título de Doutor em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

CAMPINAS

UNICAMP

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

F413i

Ferreira, Anna Laura Bechara Jacob
Interação toxicogenética de polimorfismos da metaloproteinase-9 (MMP-9) da matriz extracelular e exposição ao mercúrio: efeitos sobre a atividade plasmática da MMP-9 / Anna Laura Bechara Jacob Ferreira. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientador : José Eduardo Tanus dos Santos
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Mercúrio. 2. Metaloproteinase. 3. Polimorfismo. 4. Selênio. 5. Estresse oxidativo. I. Santos, José Eduardo Tanus dos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Toxicogenetic relevance of MMP-9 polymorphisms in mercury exposed subjects

- Keywords:**
- Mercury
 - Matrix Metalloproteinase
 - Polymorphism
 - Selenium
 - Oxidative Stress

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Prof^o. Dr^o. José Eduardo Tanus dos Santos

Prof^o. Dr^o. Eduardo Melo De Capitani

Prof^o. Dr^o. Edson Antunes

Prof^o. Dr^o. Wilson Araújo Silva Junior

Prof^a. Dr^a. Márcia Andréia Mesquita Silva da Veiga

Data da defesa:

01/07/2010

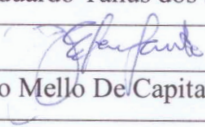
Banca Examinadora de Tese de Doutorado

Anna Laura Bechara Jacob Ferreira

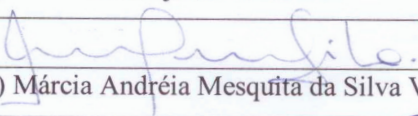
Orientador(a)(a): Prof(a). Dr(a). José Eduardo Tanus dos Santos

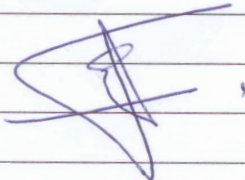
Membros:

Professor (a) Doutor (a) José Eduardo Tanus dos Santos


Professor (a) Doutor (a) Eduardo Mello De Capitani


Professor (a) Doutor (a) Wilson Araújo Silva Junior


Professor (a) Doutor (a) Márcia Andréia Mesquita da Silva Veiga


Professor (a) Doutor (a) Edson Antunes

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 01/07/2010

Dedicatória

Aos meus pais, Paulo e Olga, por me ensinarem, desde cedo, que na vida pode-se perder tudo, exceto o conhecimento adquirido.

Agradecimentos

Aos meus pais, Paulo e Olga, pelos anos de dedicação e apoio, por terem me dado educação e oportunidades, mas principalmente por terem sido, para mim, exemplo maior de determinação. Qualquer palavra que eu tente usar para expressar o meu sentimento e a minha gratidão por vocês será muito pouco. Vocês muitas vezes abdicaram de seus sonhos pelos meus sonhos, e viveram comigo os meus sonhos. Perderam o sono com as minhas preocupações, e gozaram as minhas vitórias. Sejam felizes hoje, por mais um sonho meu realizado, mais uma conquista atingida.

Aos meus irmãos, Paulinho e Daniel, pelo companheirismo, pelos conselhos, e por fazerem manter a união de nossa família. Como os “Três Mosqueteiros” (Alexandre Dumas) somos “um por todos, e todos por um”. Ao longo dos anos, fomos percebendo que nossas diferenças nos completam; cada um de nós tem qualidades ímpares, e precisamos nos manter sempre unidos... sempre.

À minha sobrinha, Nathália, por quem tenho absoluta admiração. Não há no mundo alguém mais responsável e com maior capacidade de superação que você. Obrigada por me mostrar que na vida, não importa o tamanho dos obstáculos, somos fortes o suficiente para transpô-los.

À minha “filhota”, Zoeh, por ter mudado os ares da minha casa, pelas incansáveis horas ao meu lado, pela alegria que transborda de seu corpinho. E

como diz a música “Espatódea” (Nando Reis), de onde tirei o seu nome “meu mundo não teria razão, se não fosse a Zoeh”.

Aos meus colegas de laboratório (do JETS e da Raquel), os quais me mostraram que fazer pesquisa é, acima de tudo, trabalhar em equipe. Ao longo destes 8 anos, fiz parte das mais diversas equipes, ao lado de: Rafael Zanetti, Maria Carol, Elen, Michele, Talita, Ingrid, Ana Carol, Lívia, Bárbara, Lisandra, Daniela, Jonas, Marília, Vivian, Tadeu, Fernando, Karla, Caroline, Márcio, Carlos, Valéria Sandrim, Sabrina, Debora, Vania, Marcelo Montenegro, Allethea, Aline, Stefany, Alisson, Evandro, Valéria Gomes, Juliana, Carla, Joice, Flávia, Ozélia, Danielle, Lorena, Riccardo, Junior, Pâmela, Jefferson, Renan, Marcelo Luizon, Tatiane, Vanessa Belo, Vanessa Fontana, Lucas, Diogo, Márcia, Luís Paulo, César, Leonardo, Sidney, Andrezza, Bruna, Gabriela, Felipe, Tiago, Isabel, Matheus, Rafael, Andrea, Glauce, Regina, Carol Guerra, Rosângela, Gisele, Soraya, Raquel Carros, Cris, Junia. E essas pessoas me mostraram que a rotina do laboratório pode, sim, ser repleta de sorrisos, sendo desta forma, mais leve e mais motivadora. Em especial, agradeço a amizade das “costas largas”: Elen e Michele; e das “Flores” do meu jardim: Glauce, Andrezza, Isabel e Andrea. E à ajuda, nas horas em que eu não sabia por onde começar do: César, Marcelo Montenegro, Stefany e Riccardo.

Um agradecimento à parte às minhas melhores amigas. Por coincidência ou não, minha vida é cercada de Anas, Carolinas e Anas Carolinas. Mesmo com nomes parecidos, cada uma tem um nome especial para mim: Nega (Ana Paula), Kk (Ana Carolina – Karol Sun), Carooollll (Ana Carol) e ABR (Carolina). Nega e

Kk, vocês montaram uma nova família para mim, e essa é enorme: Pam, Kaan, Yasmin, Nora, Nettão, Peu, Michele, Rapozão, Val, Jorge, Bene, Marlon, Dri, Ju, Bru... e mais alguns queridos que hora ou outra “pulam da moita”. Mas com vocês duas, “o babado é forte”. Tenho vocês duas eternizadas em mim. Na pele e no coração. E fazendo alusão à música “With a little help from my friends” (Paul McCartney e John Lennon – mas na regravação com o Joe Cocker): pegamos emprestado e emprestamos nossos ouvidos, mas na verdade, não ligamos se ao cantarmos uma música (cuja letra é a nossa própria vida) sairemos do tom, pois sabemos que conseguiremos tudo – com uma pequena ajuda dos nossos amigos. Muito obrigada minhas queridas amigas. Amo vocês, da maneira mais sincera. CaroooooIII, minha amiga de mais longa data. Compartilhamos os mesmos objetivos, desde o primeiro ano de faculdade: fizemos IC juntas, nos tornamos farmacêuticas, entramos no DD juntas, e buscamos vôos cada vez mais altos. Sempre ligadas de certa forma. Sei que muitas vezes minha amizade foi meio relapsa, mas você sempre esteve lá, do meu lado. Porém, mesmo eu não estando ao seu lado fisicamente, eu estive ao seu lado sempre. E quero estar ao seu lado para ver você se tornar uma pesquisadora reconhecida mundialmente, pois você merece, e você é muito capaz. Muito obrigada, minha amiga. Amo você. ABR, você foi a pessoa que mais esteve presente em minha vida nesses últimos anos. Compartilhou minhas conquistas, minhas angústias, secou as minhas lágrimas, riu das minhas piadas... Ajudou-me o tempo todo. Mostrou-me que é fácil ser feliz, e que a felicidade se encontra nos detalhes. Muito obrigada, por tudo. Amo você.

Aos voluntários das comunidades ribeirinhas do rio Tapajós, pela disponibilidade e solicitude.

Aos colaboradores do projeto, pela ajuda e atenção, em especial ao prof. Fernando Barbosa e à Dr^a. Donna Mergler.

Ao pessoal do depto de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, em especial ao prof. Edson Antunes, pela paciência e ajuda em diversos momentos.

Aos professores membros da banca, pela atenção e colaboração.

À prof^a. Raquel, que mesmo não sendo o oficialmente minha co-orientadora, fez este papel. Abriu-me as portas de seu laboratório e me ajudou a entender: resultados, técnicas... a vida. Mostrou-me, em sutilezas, que pesquisador é também humano; e que quando temos uma idéia, por mais que outras pessoas não acreditem nela, se nós acreditarmos, conseguiremos fazer com que se tornem realidade. A você, prof^a. Raquel, minha admiração e minha gratidão.

Ao meu orientador prof. José Eduardo, por há 8 anos ter aberto as portas do mundo da ciência para mim. Neste período, você confiou em mim, elogiou e criticou nos momentos oportunos, e me fez crescer. Aceitou-me como orientada e me forneceu o que eu precisava para me tornar pesquisadora; realizando, assim, o sonho da frase que eu respondia quando criança: “Anna, o que você quer ser quando crescer?” – “Cientista”. A você, prof. Tanus, minha eterna gratidão, admiração e respeito.

"Não resta dúvida, só os artistas vão para a ciência. Às minhas inclinações artísticas de criança devo o que sou agora."

Santiago Ramón y Cajal (1852-1934)

Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina

Resumo

A exposição ao mercúrio (Hg) causa efeitos deletérios à saúde, incluindo doenças cardiovasculares. Embora os mecanismos não estejam precisamente definidos, metaloproteinases (MMPs) -2 e -9 podem estar envolvidas. Expressão e atividades aumentadas destas MMPs são demonstradas em diversas condições patológicas, e estudos demonstraram que os níveis circulantes de MMPs poderiam ser usados como marcadores de risco cardiovascular. O gene que codifica a MMP-9 apresenta polimorfismos que afetam a expressão e o nível de atividade desta enzima, sendo que dois deles, presentes na região promotora [C⁻¹⁵⁶²T e (CA)_n], são funcionalmente importantes, tendo sido associados a diversas doenças.

Investigamos se existe associação entre os níveis circulantes de MMP-2, MMP-9 e seus inibidores endógenos (TIMPs) -2 e -1 com os níveis circulantes de Hg, em indivíduos expostos ao metal por consumo de peixes, na Amazônia Brasileira. Em seguida, examinamos se os polimorfismos da MMP-9 afetam os níveis circulantes de MMP-9, nestes indivíduos.

Para isso, analisamos as concentrações de Hg no sangue e plasma desses indivíduos por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). As concentrações de MMPs e TIMPs foram medidas nas amostras de plasma por zimografia e ELISA, respectivamente. Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram medidas no plasma, para dosar estresse oxidativo. Os níveis de selênio (Se) foram determinados por ICP-MS, por este ser um antioxidante. O DNA genômico foi extraído das amostras de sangue e os genótipos dos polimorfismos C⁻¹⁵⁶²T e (CA)_n foram determinados. A relação entre

os bioindicadores de Hg e os níveis de MMPs, assim como a relação entre os genótipos da MMP-9 e os níveis de MMP-9 foram examinados usando modelos de regressão múltipla.

Não foi encontrada relação entre Hg no sangue ou plasma e MMPs. Contudo, Hg no plasma foi negativamente associado com os níveis de TIMPs, resultando em aumento nas razões MMP-9/TIMP-1 e MMP-2/TIMP-2, o que indica uma associação positiva entre Hg no plasma e o grau de atividade de MMP-9 e MMP-2. Os polimorfismos da MMP-9 não se relacionaram aos níveis de MMP-9 quando todos os indivíduos foram analisados juntos. No entanto, quando dividimos a população estudada em terços, com base nas concentrações plasmáticas de Hg, o polimorfismo (CA)_n afetou o grau de atividade da MMP-9 no grupo com níveis mais baixos de Hg no plasma. Os níveis de MMP-9 foram mais altos em pessoas com genótipos que incluíam o alelo com mais de 21 repetições CA (alelos H), e menos naqueles cujo genótipo incluía alelos com menos de 21 repetições CA (alelos L). Nos grupos com níveis intermediários ou altos de Hg no plasma, este polimorfismo não teve efeito. Nenhuma associação foi encontrada entre o polimorfismo C⁻¹⁵⁶²T e os níveis de MMP-9, nos três grupos.

Esses achados mostram o efeito do Hg sobre o grau de atividade de MMPs, e que o efeito do Hg sobre a MMP-9 é modulado pelo polimorfismo (CA)_n da MMP-9. O aumento do grau de atividade poderia aumentar o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares em pessoas expostas ao Hg, principalmente nas que apresentam o genótipo HH.

Abstract

Mercury (Hg) exposure causes health problems, including cardiovascular diseases. Although the mechanisms are not precisely defined, metalloproteinases (MMP) -2 and -9 may be involved. Increased expression and activities of these MMPs are demonstrated in several pathological conditions, and recent studies have demonstrated that circulating levels of MMPs could be used as a blood-borne biomarker for cardiovascular risk, even in healthy individuals. The gene encoding MMP-9 presents genetic polymorphisms which affects the expression and activity level of this enzyme, two of them, present in the promoter region [C⁻¹⁵⁶²T and (CA)_n] are functionally relevant, having been involved in several diseases.

We investigated if the association between circulating levels of MMP-2, MMP-9 and their endogenous inhibitors (TIMPs) -2 and -1 with circulating levels of Hg in individuals exposed to metal through consumption of fish in the Brazilian Amazon. Then, we examined whether these MMP-9 polymorphisms affect circulating MMP-9 net levels in persons exposed to mercury.

For this purpose, we analyzed the concentrations of blood and plasma Hg by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). MMPs and TIMPs concentrations were measured in plasma samples by zymography and ELISA, respectively. Thiobarbituric acid-reactive species (TBARS) were measured in plasma to assess oxidative stress. Selenium (Se) levels were determined by ICP-MS, because it is an antioxidant. Genomic DNA was extracted from whole blood,

and genotypes for the C⁻¹⁵⁶²T and the microsatellite (CA)_n polymorphisms were determined. The relationships between biomarkers of Hg and MMPs levels, as well as the relationship between MMP-9 genotypes and MMP-9 levels, were examined using multivariate regression models.

No relationship was found between Hg in blood or plasma and MMPs. However, plasma Hg levels were negatively associated with TIMPs levels, and thereby with increasing MMP-9/ TIMP-1 and MMP-2/TIMP-2 ratios, thus indicating a positive association between plasma Hg and circulating net MMP-9 and MMP-2 activities. The polymorphisms of MMP-9 were not related to MMP-9 net levels when all subjects were analyzed together. However, when we divided the population into tertiles of plasma Hg concentrations, the polymorphism (CA)_n affected MMP-9 concentrations and MMP-9/TIMP-1 ratios in people with lower levels of Hg. MMP-9 levels were higher in persons with genotypes including alleles with more than 21 CA repeats (H alleles) and lower in those whose genotype including alleles with less than 21 CA repeats (L alleles). Conversely, this polymorphism had no effects in persons with intermediate or high plasma Hg level. No association was found between the C⁻¹⁵⁶²T polymorphism and MMP-9 levels in the three groups.

These findings show the effect of Hg on MMP-9 net, and that this effect is modulated by the (CA)_n polymorphism of MMP-9. The increase in MMPs levels could increase the risk of developing cardiovascular diseases in persons exposed to Hg, especially those with HH genotype.

Lista de abreviaturas e siglas

- número

% - porcentagem

% v/v – porcentagem volume/volume

< - menor

≥ - maior ou igual

°C – graus Celsius

A – adenina

ANOVA – análise de variância

APMA – acetato de para-amino-fenolmercúrio

C – citosina

CaCl₂ – cloreto de cálcio

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

cm – centímetro

DNA – ácido desoxirribonucléico

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – ensaio imunoenzimático

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

FCFRP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

G – glicina

g – grama

GSH-Px – glutathiona peroxidase

h – hora

H – número de repetições maior ou igual a 21

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

HCl – ácido clorídrico

Hg – mercúrio

Hg₂²⁺ - mercúrio (I)

Hg⁰ – mercúrio elementar

Hg²⁺ - mercúrio (II)

Hg₂Cl₂ – cloreto de mercúrio (I)

HgCl₂ – cloreto de mercúrio (II)

HNO₃ – ácido nítrico

ICP-MS – espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado

IMC – índice de massa corpóreo [peso em quilogramas/(altura em metros)²]

kDa – quilodáltons (10³ Daltons)

kg – quilograma (10³ gramas)

l – litro

L – número de repetições menor que 21

log – logaritmo

m – metro

M – molar

mA – miliamperagem

MeHg – metilmercúrio

mg – miligrama (10⁻³ gramas)

min – minuto

ml – mililitro (10⁻³ litros)

mM – milimolar (10⁻³ Molar)

MMP – metaloproteinase da matriz

MT-MMP – metaloproteinase da matriz extracelular do tipo trans-membrana

n – número

N – número

NaOH – hidróxido de sódio

ng – nanograma (10^{-9} grama)

nm – nanômetros (10^{-9} metros)

nM – nanomolar (10^{-9} Molar)

p – probabilidade

P.M. – peso molecular

pb – pares de base

PCR – reação em cadeia da polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

pmol – picomol (10^{-12} moles)

r – correlação de Pearson

RMSE – raiz quadrada do erro

rs – número de referência do polimorfismo no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)

s – segundo

SD – desvio padrão

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – dodecil sulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamida

Se – selênio

SNP – polimorfismo de base única

T – timina

Taq – Polimerase termo-estável, isolada da bactéria *Thermophilus aquaticus*

TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TE – tampão Tris-Cl + EDTA

TIMP – inibidor tecidual de metaloproteinases

TMB – tetrametilbenzidina

Tris-HCl – Tris hidrocloreto

VNTR – número variado de repetições em tandem

vs. – “versus”

x – vezes

Zn²⁺ - íon zinco

β – coeficiente beta

μg – microgramas (10^{-6} gramas)

μL – microlitro (10^{-6} litros)

Ω – letra do alfabeto grego, denominada ômega. Unidade de resistência

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura das MMPs	48
Figura 2. Mecanismos de ativação das pro-MMPs	50
Figura 3. Principais elementos regulatórios localizados na região promotora do gene da MMP-9	54
Figura 4. Mapa da área de estudo	68
Figura 5. Zimograma representativo de amostras de plasma, mostrando as bandas de pro-MMP-9 (92kDa) e pro-MMP-2 (72kDa)	74
Figura 6. Genotipagem para o polimorfismo C ⁻¹⁵⁶² T na região promotora do gene da MMP-9	79
Figura 7. Genotipagem para o polimorfismo (CA) _n na região promotora do gene da MMP-9	81
Figura 8. Associação entre as concentrações de Hg no plasma e Hg no sangue (µg/l) dos 159 participantes do estudo	87
Figura 9. Valores ajustados para MMP-9 (painel A), TIMP-1 (painel B), MMP-9/TIMP-1 (painel C), MMP-2 (painel D), TIMP-2 (painel E), e MMP-2/TIMP-2 (painel F) com log de Hg no plasma como variável independente, levando em consideração: idade, gênero, IMC, tabagismo, log de Se no plasma e TBARS	92

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características sócio-demográficas e parâmetros analisados na população estudada	88
Tabela 2. Resultado da análise de Regressão Linear Múltipla para MMPs, TIMPs e razão MMP/TIMP, usando log Hg no plasma como uma variável independente	91
Tabela 3. Características sócio-demográficas e parâmetros bioquímicos da população estudada, divididos de acordo com as concentrações plasmáticas de Hg	94
Tabela 4. Distribuição das freqüências de alelos e genótipos da MMP-9	97
Tabela 5. Análise de regressão linear múltipla para MMP-9, TIMP-1 e razão MMP-9/TIMP-1 usando genótipos dos polimorfismos C ⁻¹⁵⁶² T e (CA) _n da MMP-9 como variáveis independentes	100

Sumário

	Resumo	xv
	Abstract	xvii
	Lista de abreviaturas e siglas	xix
	Lista de Figuras	xxv
	Lista de Tabelas	xxvii
1.	Introdução	33
1.1.	Mercúrio na história	35
1.2.	Exposição ao mercúrio e seus impactos na saúde humana	37
1.3.	Exposição ao mercúrio na Amazônia Brasileira	43
1.4.	Intoxicação por mercúrio como fator de aumento do risco cardiovascular	45
1.5.	Metaloproteinases da matriz extracelular	47
1.6.	MMPs como marcadores de risco cardiovascular	51
1.7.	Variações genéticas	52
1.8.	Polimorfismos genéticos da MMP-9	54
2.	Hipótese	57
3.	Objetivos	61
4.	Materiais e Métodos	65
4.1.	Seleção dos voluntários e coleta das amostras	67
4.2.	Determinação das concentrações de Hg no sangue total e	70

	plasma	
4.3.	Determinação das concentrações de Se no plasma	71
4.4	Controle de qualidade dos resultados de mercúrio	71
4.5.	Determinação das concentrações plasmáticas de MMPs-2 e -9 (zimografia)	72
4.6.	Determinação das concentrações plasmáticas de TIMP-1 e TIMP-2	75
4.7.	Determinação das concentrações plasmáticas de TBARS	76
4.8.	Extração do DNA genômico	76
4.9.	Genotipagem do polimorfismo C ⁻¹⁵⁶² T da MMP-9	77
4.10.	Genotipagem do polimorfismo (CA) _n da MMP-9	79
4.11.	Análise estatística	82
5.	Resultados	85
5.1.	Associação entre os níveis plasmáticos de MMPs-2 e -9 (e seus inibidores endógenos: TIMPs-1 e -2) com os níveis circulantes de mercúrio	87
5.2.	Interação entre os polimorfismos da MMP-9 e exposição ao mercúrio, de forma a modificar as concentrações plasmáticas da MMP-9	93
6.	Discussão	103
6.1.	Associação entre os níveis plasmáticos de MMPs-2 e -9 (e seus inibidores endógenos: TIMPs-1 e -2) com os níveis circulantes de mercúrio	105

6.2.	Interação entre os polimorfismos da MMP-9 e exposição ao mercúrio, de forma a modificar as concentrações plasmáticas da MMP-9	111
7.	Conclusão	115
7.1.	Associação entre os níveis plasmáticos de MMPs-2 e -9 (e seus inibidores endógenos: TIMPs-1 e -2) com os níveis circulantes de mercúrio	117
7.2.	Interação entre os polimorfismos da MMP-9 e exposição ao mercúrio, de forma a modificar as concentrações plasmáticas da MMP-9	117
8.	Referências bibliográficas	119
9.	Anexos	135
9.1.	Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	137
9.2.	Termo de consentimento livre e esclarecido	139
10.	Apêndices	143
10.1.	Trabalho publicado - objetivo 1	145
10.2.	Trabalho publicado - objetivo 2	153

1. Introdução

1.1. Mercúrio na história

O mercúrio é classificado como um metal tóxico (P.M. 200,59), sendo este o único metal líquido à temperatura ambiente [1]. Seu símbolo químico, Hg, é a abreviatura de seu antigo nome *hydrargyrum* (Latim), *hydrargyrus* (Grego), significando literalmente água/prata (prata líquida) [1].

Historicamente, esse metal foi nomeado, por alquimistas medievais, depois de um deus e um planeta terem recebido este mesmo nome. Gregos e Romanos veneravam Mercúrio como patrono dos mercantes [2].

Mercúrio, na forma de minério vermelho brilhante, o cinábrio (sulfeto de mercúrio), era utilizado pelos chineses para preparar tinta vermelha há mais de 3000 anos [1]. Também foi encontrado em tumbas egípcias, talvez como conservante ou como protetor contra espíritos malignos [1]. Pessoas também usavam compostos de mercúrio como constituintes de cremes cutâneos, para tratamento de infecções [1]. Na Europa, na Idade Média, mercúrio era usado principalmente no tratamento de sífilis, sendo retratado na frase: “Uma noite nos braços de Vênus, uma vida em Mercúrio”. Nessa mesma época, Paracelsus, um famoso médico da época, notou que pequenas quantidades de Hg eram eficazes no tratamento da sífilis. No entanto, grandes quantidades eram fatais aos seus pacientes, fazendo, então, seu pronunciamento de que “a dose faz o veneno”, que permanece até hoje como o princípio fundamental da toxicologia [3].

Compostos de mercúrio foram utilizados em outros campos além do médico [1]. Após a revogação do Tratado de Nantes (1685), muitos huguenotes (protestantes franceses) emigraram para a Inglaterra, onde fizeram uso do nitrato de mercúrio para tratar o couro para a preparação de chapéus de alta qualidade. Aparentemente, o uso de mercúrio era bom para os chapéus de couro, mas não para os chapeleiros, que freqüentemente sucumbiam à intoxicação pela inalação de mercúrio [1]. A descoberta de que o fulminato de mercúrio era um detonador excelente para uma variedade de explosivos ocasionou um aumento substancial na produção de mercúrio, como registrado nas minas de Almaden, na Espanha [1].

Até a década de 1970, mercúrio em sua forma orgânica, especialmente metil- e etilmercúrio, foram amplamente utilizados na agricultura [1]. No entanto, esta prática foi interrompida em consequência de uma série de intoxicações em massa, tanto em humanos como em certas espécies selvagens [1]. O anti-séptico dibromo-hidroxifluoresceína (mercurocromo) tem sido amplamente utilizado, contudo, tem sido causa de vários casos registrados de intoxicação [1]. O timerosal (tiosalicilato de etilmercúrio) ainda é usado em vacinas em todo o mundo, apesar das preocupações sobre seus potenciais efeitos tóxicos em lactentes [1]. Compostos fenil- e etilmercúrio ainda têm um uso limitado como agentes antibacterianos [1].

No entanto, foi a forma líquida do mercúrio metálico que atraiu mais atenção [1]. Como é o único metal líquido à temperatura ambiente, suas propriedades

físicas de baixa viscosidade, alta densidade, excelente condutividade elétrica, e superfície refletora foram a razão para suas aplicações numerosas [1].

Seus usos na era industrial incluem mercúrio de barômetros e termômetros, eletrodos na produção eletrolítica de cloro e soda cáustica a partir de salina, e em ignições elétricas ainda amplamente utilizadas nos automóveis de hoje [1]. O vapor do mercúrio metálico também tem ampla aplicação em lâmpadas de arco de mercúrio e lâmpadas incandescentes [1].

A propensão do mercúrio líquido à formação de amálgamas estáveis com outros metais, especialmente ouro e prata era bem conhecida pelos alquimistas [1]. A amálgama com ouro poderia ser transformada em ouro puro quando o mercúrio era evaporado por aquecimento em chama [1]. Este truque dos alquimistas foi utilizado de maneira eficaz na extração de ouro e prata de seus respectivos minérios [1]. Com esse intuito, navios espanhóis trouxeram grandes quantidades de Hg às Américas [1]. Na França, no começo do século 19, a amálgama de mercúrio, principalmente com prata, começou a ser usada para preenchimento dentário; e é utilizada até hoje, apesar das preocupações sobre possíveis efeitos tóxicos [1].

1.2. Exposição ao mercúrio e seus impactos na saúde humana

O mercúrio pode ser encontrado em três estados de oxidação, cada um com perfil tóxico específico [4]. No estado zero de oxidação, Hg^0 , mercúrio elementar existe na forma metálica líquida ou como vapor [4]. As outras duas formas inorgânicas são mercúrio mercurioso (Hg^+) e mercúrico (Hg^{2+}) [4]. O mercúrio

mercúrico pode também formar compostos orgânicos como: metil-, etil-, fenil- ou dimetilmercúrio [4].

Mercúrio metálico é mais nocivo ao ser humano em seu estado de vapor. A principal fonte de exposição ao Hg^0 é o amálgama dentário [5], porém, a exposição também pode ocorrer devido à queima de combustíveis fósseis, emissões devido à atividade vulcânica, processo de fundição em atividades mineradoras, produção eletrolítica industrial de HCl e NaOH, incineração de restos industriais e hospitalares, desgaseificação derivada da erosão natural da crosta terrestre, evaporação da água, e crematórios [4]; além da exposição ao Hg^0 na forma líquida pelo mercúrio contido em termômetros, barômetros, baterias, lâmpadas fluorescentes, esfingomanômetros, medicamentos tópicos e substâncias utilizadas em práticas mágico-religiosas [4].

Compostos contendo mercúrio inorgânico na forma de sais mercuriosos (HgCl_2) ou mercúricos (Hg_2Cl_2) são usados em cremes clareadores de pele, antisépticos, antibactericidas, diuréticos e pós usados quando há desconforto dentário (calomel) [4]. Aplicações não medicinais desses sais incluem o uso como detonadores de explosivos e pigmentos de tintas [4].

A contaminação humana por mercúrio orgânico ocorre mais comumente pela ingestão de comida contaminada com metilmercúrio (MeHg), principalmente peixes e animais marinhos [6]. Os depósitos de mercúrio inorgânico em ambientes aquáticos são convertidos por metilação em MeHg por microorganismos (bactérias, fungos e fitoplâncton) [6]. Esses microorganismos são consumidos por

outros organismos aquáticos, que são consumidos por espécies progressivamente maiores [6]. O MeHg é acumulado através da cadeia alimentar, atingindo suas concentrações mais tóxicas em peixes carnívoros maiores e de maior longevidade, e em alguns mamíferos marinhos [6].

Outra forma orgânica do mercúrio é o etilmercúrio, que na forma de thimerosal tem sido utilizado como antiséptico tópico e como preservativo em vacinas [7]. Esta forma de mercúrio orgânico tem se mostrado menos tóxica que o metilmercúrio [7].

A toxicidade do mercúrio depende de suas várias formas químicas (metálica, iônicas e compostos orgânicos), elevada volatilidade e solubilidade em água e lipídios – o que facilita a transposição através dos alvéolos pulmonares e da barreira hematoencefálica – , fixação e lesão do sistema nervoso, grande reatividade com os grupos sulfidril, inibição de várias enzimas e ação auto-imune [8].

A forma química do Hg é um importante determinante da toxicocinética [9]. Em humanos, o vapor de mercúrio elementar é prontamente absorvido através do trato respiratório (aproximadamente 80%), mas muito pouco absorvido pelo trato gastrointestinal (aproximadamente 0,01%), e de uma forma limitada através da pele [9]. A extensão da absorção do Hg divalente pela inalação ou vias dérmicas são incertas, mas a absorção oral de sais inorgânicos de Hg pode variar de 2 a 38% dependendo da forma e das condições [9]. Formas orgânicas são, no

entanto, prontamente absorvidas por inalação e trato gastrointestinal (onde cerca de 95% do MeHg presente nos peixes ingeridos pode ser absorvido) [9].

Uma vez absorvido, o Hg elementar e Hg orgânico (como MeHg) são amplamente distribuídos em tecidos gordurosos [9]. Em humanos, MeHg no sangue e outros tecidos pode se ligar a grupos sulfidríla, e pode ser transportado por aminoácidos carreadores através da barreira hemato-encefálica, onde se acumula; um processo similar também resulta na transferência placentária [9]. Devido à sua elevada lipossolubilidade, o mercúrio metálico também é facilmente transferido através das barreiras placentária e hemato-encefálica [9]. Formas inorgânicas podem alcançar à maioria dos órgãos, no entanto, sua baixa lipofilicidade limita sua capacidade de penetrar as barreiras hemato-encefálica e placentária [9].

O mercúrio absorvido pode sofrer interconversão metabólica. O mercúrio elementar (Hg^0) pode ser oxidado para Hg^{2+} pela catalase e peróxido de hidrogênio [9]. MeHg também é convertido ao Hg inorgânico através da ação da flora microbiana e pela produção de espécies reativas de oxigênio e pela interação com grupos sulfidríla [9]. Como resultado, quantidades relativamente grandes de Hg, provenientes de formas metálicas ou orgânicas, podem se acumular no cérebro ou tecidos fetais, uma vez que estas formas podem facilmente atravessar as barreiras encefálica e placentária, mas tornam-se, então, imobilizadas, após conversão para o cátion inorgânico divalente [9]. Estado nutricional, interações medicamentosas, temperatura, flora bacteriana intestinal, genética e idade podem influenciar o metabolismo do mercúrio [9].

A eliminação do mercúrio pode ocorrer, principalmente, através da urina, fezes ou ar expirado, porém existem diversas outras rotas menos importantes [9]. O mercúrio elementar é excretado como Hg^0 no ar expirado, suor e saliva, e como Hg^{2+} nas fezes e urina [9]. Excreção do MeHg ocorre como Hg^{2+} (90% nas fezes e 10% na urina) e também no leite materno (16% do Hg total no leite materno é o MeHg) [9]. Excreção das formas inorgânicas de Hg ocorre principalmente através da urina, com pouco sendo eliminado por via biliar e fezes; ar expirado, cabelo, suor, leite materno e saliva também podem contribuir de alguma forma [9]. Os tempos de meia vida de eliminação das diversas formas de Hg são influenciados pela espécie, dose, sexo e idade [9]. O tempo de meia vida corporal tem sido estimado como 70-80 dias para MeHg, 58 dias para Hg elementar e 1-2 meses para as formas inorgânicas [9].

Os dois biomarcadores mais freqüentemente utilizados para determinar exposição individual ao metilmercúrio são as concentrações de mercúrio no cabelo da nuca e em sangue total; e os níveis encontrados nestes marcadores de dose interna são usados para prevenir ou diagnosticar possíveis efeitos adversos à saúde [10].

Concentrações de referência de mercúrio no sangue total são tipicamente inferiores a $5,0\mu\text{g/L}$ Hg em adultos [11]. Entretanto, dados mais recentes, publicados nos Estados Unidos, sugerem níveis normais em crianças na ordem de $2,3\mu\text{g/L}$ Hg e para adultos na ordem de $7,1\mu\text{g/L}$ Hg [12].

O leque de sintomas determinados pela contaminação pelo mercúrio mostra a grande diversidade de efeitos do mercúrio [8]. Os principais efeitos adversos atribuídos à exposição ao mercúrio são: efeitos gastrointestinais, renais, músculo-esqueléticos, hepáticos e, principalmente, neurológicos [13]. Entretanto, mais recentemente tem sido evidenciado que a exposição ao metilmercúrio promove efeitos no sistema cardiovascular [13-16].

Uma das mais sérias conseqüências da exposição ao mercúrio foi dramaticamente ilustrada na década de 50, quando altos índices de intoxicação por MeHg ocorreu em humanos, pelo consumo de peixes em vilas na Baía de Minamata, no Japão. A Chisso, uma indústria de acetaldeído (subproduto intermediário na fabricação de plásticos) liberou grande quantidade de metilmercúrio na foz do rio Minamata, que resultou em um acúmulo de metilmercúrio na fauna da Baía e do mar de Shiranui [17]. A população local que consumia os peixes da região apresentou diversos sintomas, principalmente neurológicos, tanto agudo quanto cronicamente, como: visão turva, perda auditiva, perturbações olfativas e gustativas, parestesia nas partes distais das extremidades e em volta do lábios, neuropatia periférica, ataxia [17]. Em 1984, um grupo de pesquisadores avaliou as principais causas de óbito dos habitantes expostos ao metilmercúrio em Minamata, observando que cerca de 14,1% das mortes, entre 1422 investigadas, ocorreram por doenças cardiovasculares, terceira maior causa de mortes [18].

1.3. Exposição ao mercúrio na Amazônia Brasileira

Existem duas principais maneiras da contaminação por mercúrio na região Amazônica afetar a saúde humana: a primeira é por exposição ocupacional pela inalação direta de vapores de mercúrio por garimpeiros e trabalhadores de lojas de comercialização de ouro; a segunda é através do consumo de peixes contaminados pela liberação e biometilação de mercúrio em sistemas aquáticos [19, 20].

A participação da atividade garimpeira de ouro na economia da região de Tapajós teve início no final da década de 50, quando foram descobertas as primeiras ocorrências do metal no rio das Tropas, afluente da margem direita do rio Tapajós [21]. Desde então, o garimpo revelou-se como um assunto polêmico, em função da diversidade das questões sociais, políticas, econômicas e dos problemas ambientais gerados com a utilização do mercúrio no processo de extração e a emissão do mercúrio para o ambiente [21]. O crescimento acentuado da produção brasileira de ouro nos últimos quinze anos tem colaborado para uma alteração marcante do padrão de morbidade na região Amazônica [22].

No garimpo, o mercúrio é utilizado na recuperação de pequenas partículas de ouro aluvial dos rios [19]. Estima-se que cerca de 100 toneladas de mercúrio têm sido liberadas anualmente na atmosfera durante as últimas 2 décadas nos garimpos do Brasil [19]. Aproximadamente 45% disto é liberado nos sistemas aquáticos durante a amalgamação e o restante é liberado na atmosfera durante a queima da amálgama [19].

Em áreas do ambiente amazônico sem a influência direta da garimpagem, a presença de mercúrio está associada à queima de biomassa florestal e a processos de erosão e lixiviação das partículas que contêm mercúrio associado aos óxidos e hidróxidos de ferro, favorecidos pelos desmatamentos, os quais promovem a exposição dos solos [23]. Tudo indica que valores elevados de mercúrio no rio Negro possuem origem natural e têm sido creditados à mobilização do metal acumulado durante milhares de anos nos solos argilosos, antigos e profundos que predominam na região, através de complexos orgânicos que são liberados pelo processo de podzolização [24].

Uma série de pesquisas vem sendo desenvolvidas na região amazônica no sentido de melhor compreender o ciclo biogeoquímico deste metal e conseqüentemente as implicações a saúde da população exposta principalmente a forma metilada de mercúrio. Harada e colaboradores mostraram que os níveis de mercúrio no cabelo da população da região do rio Tapajós, especificamente nas comunidades próximas a cidade de Itaituba variaram em média de 14,1 a 20,8 µg/g com valores encontrados de até 62,9 µg/g. Em geral, em população não exposta ao metilmercúrio, os níveis no cabelo deste metal são inferiores a 5 µg/g [25].

Apesar da vasta quantidade de artigos mostrando o elevado nível de mercúrio na região amazônica e em grande parte das comunidades que habitam a região, pouco foi estudado sobre as possíveis conseqüências da exposição ao metilmercúrio na saúde da população local. Em sua maioria, os estudos têm como objetivos analisar sinais neurológicos de intoxicação por Hg, e risco para déficits

neurocomportamentais. No entanto, outros estudos relacionam intoxicação por Hg e disfunções visuais, além de genotoxicidade, distúrbios do sistema imune, alterações da pressão sanguínea e estresse oxidativo [26, 27].

1.4. Intoxicação por mercúrio como um fator de aumento do risco cardiovascular

Além do cérebro, rins e fígado, o coração é também um órgão alvo do mercúrio [14]. Um estudo realizado em amostras de corações após autópsia em 46 japoneses expostos ao mercúrio determinou os níveis do metal [14]. Os níveis de mercúrio encontrados neste tecido foram similares aos encontrados no cérebro dos mesmos indivíduos e aproximadamente 80% do metal estava presente na forma de metilmercúrio [14]. A implicação à saúde, do acúmulo de mercúrio no coração, não está ainda totalmente caracterizado, e os mecanismos da cardiotoxicidade de mercúrio não são ainda conhecidos [14].

Em 2002, Guallar et al. apresentaram resultados de um estudo multicêntrico da Comunidade Européia em Antioxidantes, Infarto do Miocárdio e Câncer de Mama, feito em oito países europeus e Israel [28]. Neste estudo, após o ajuste para diversos fatores de risco cardiovascular, foram verificados níveis 15% superiores de mercúrio nas unhas dos pés de 684 voluntários com prévio diagnóstico de infarto do miocárdio em comparação a 724 voluntários sadios [28]. O odds ratio (OR) do quinto com maior concentração de mercúrio comparado com o quinto com menor concentração de mercúrio nas unhas dos pés foi 2,16, após o ajuste para fatores de risco tradicionais e antioxidantes [28].

Salonen et al. (2000) conduziram um estudo de progressão da aterosclerose de homens residentes no leste da Finlândia [29]. A concentração de mercúrio foi dosada em no cabelo de 1014 homens, e a espessura da parede da artéria carótida foi medida em dois momentos (com 4 anos de intervalo) [29]. Níveis altos de mercúrio no cabelo de um grupo de finlandeses foram associados à progressão acelerada de arteriosclerose da carótida [29]. Houve um aumento de 7,3% em média na espessura da artéria para cada mg/g de Hg no cabelo [29].

É importante ressaltar que nesses dois estudos que analisaram Hg no cabelo, assim como em outros dois não descritos acima [30, 31], os níveis médios de Hg encontrados (média 1,8 – 1,9 μ g/g) e relacionados a doenças cardiovasculares foi menor que as concentrações associadas à neurotoxicidade (> 6 μ g/g) [32].

Em cultura de células endoteliais, o metilmercúrio reduziu a produção de óxido nítrico e a atividade da eNOS, sugerindo que esta forma orgânica do metal pode estar envolvida na patogênese de doenças cardiovasculares [33].

Diversos estudos relacionam intoxicação por mercúrio e aumento do risco de infarto agudo do miocárdio, doenças coronarianas e doenças cardiovasculares em geral [28, 30, 31, 34, 35]. Muitos destes correlacionam estes eventos com o fato do mercúrio, como um metal de transição, poder promover a formação de radicais livres, além de ter uma grande afinidade por grupamentos tióis, e poder formar complexos insolúveis com selênio [28, 30, 31, 34, 35]. Isto poderia reduzir a capacidade antioxidante e promover o estresse por radicais livres e peroxidação

lipídica no corpo humano [28, 30, 31, 34, 35]. Isso pode ser particularmente relevante, pois o aumento do estresse oxidativo é um fator modulador muito importante da expressão e atividade das MMPs -2 e -9 [36, 37].

Por outro lado, fatores nutricionais podem diminuir os índices de estresse oxidativo [38-41] e possivelmente reduzir a toxicidade do Hg. Por exemplo, selênio (Se) é um micronutriente com importantes propriedades antioxidantes e pode ter importantes funções biológicas e bioquímicas nos organismos [42]. Além disso, alguns estudos sugerem que o Se pode influenciar os efeitos tóxicos de metais pesados, incluindo o Hg [42].

1.5. Metaloproteinases da matriz extracelular

As metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) são uma família chave de enzimas, dependentes de zinco, responsáveis pela degradação de vários componentes da matriz extracelular, incluindo componentes da membrana basal, o colágeno intersticial, fibronectina e várias proteoglicanas [43]. A degradação de componentes da matriz acontece tanto em processos de remodelação fisiológica (desenvolvimento embrionário, morfogênese, reprodução, reabsorção e remodelagem tecidual) quanto em processos patológicos (destruição de cartilagem em artrite, ruptura de placa aterosclerótica, reestenose miocárdica, desenvolvimento de aneurismas, metástase tumoral, degeneração macular, entre outros) [44].

A família das MMPs consiste atualmente em mais de 20 tipos, que apresentam diferentes substratos, os quais incluem: collagenases (MMP-1, MMP-8

e MMP-13), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromelinas (MMP-3, MMP-10 e MMP-11) e as MMPs tipo trans-membrana (ex.: MT1-MMP) [37]. Sua estrutura básica consiste em um pro-domínio, domínio catalítico e um domínio hemopexina (Figura 1) [45].

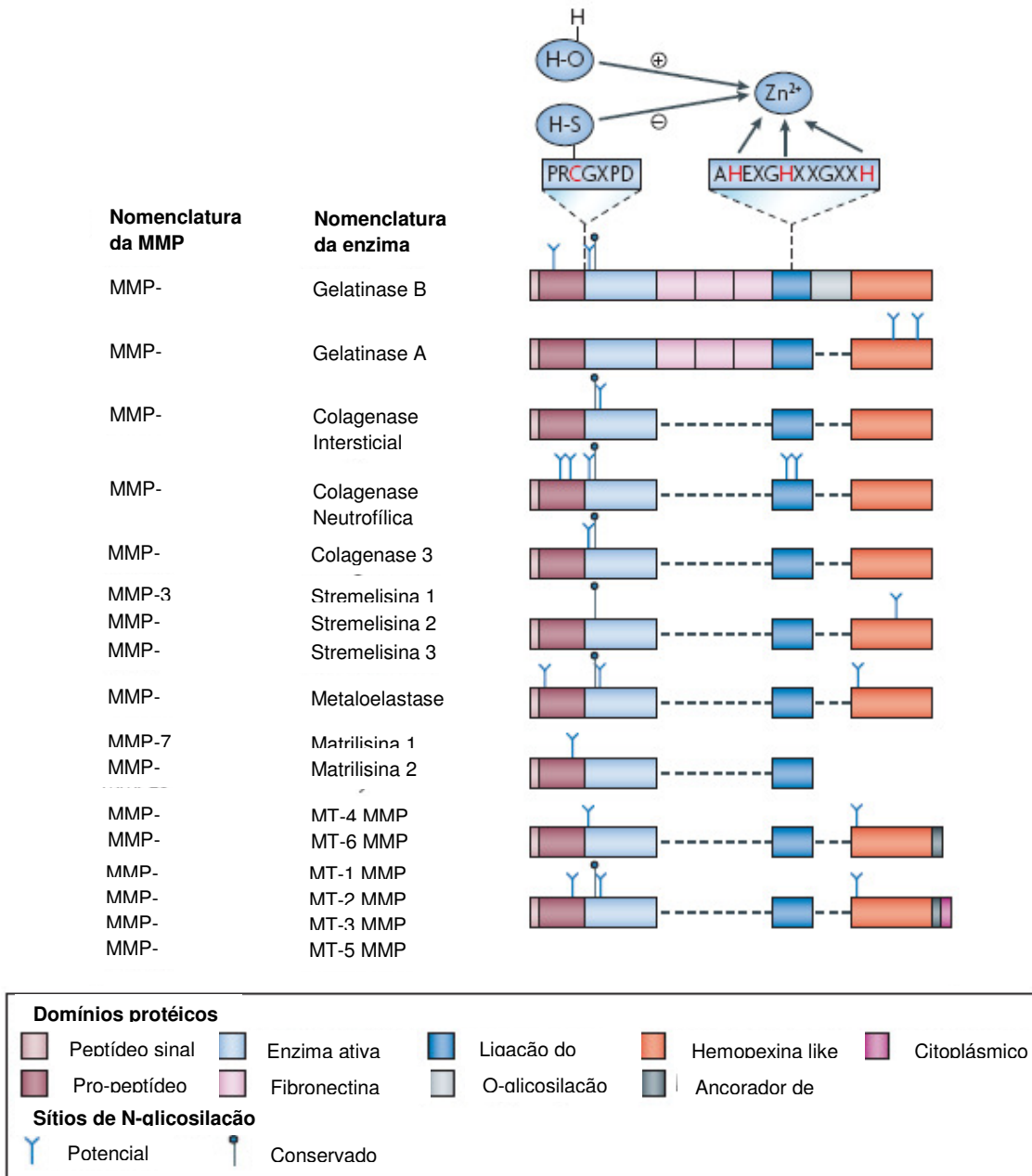


Figura 1. Estrutura das MMPs. Adaptado de Hu, J. et al., 2007. [45]

Estas enzimas contêm um domínio catalítico que apresenta uma seqüência conservada na qual três resíduos de histidina no sítio ativo formam um complexo com o zinco [46]. São secretadas na forma de precursores inativos (zimogênios) cuja latência é mantida através da interação entre o resíduo de cisteína, presente no domínio pro-peptídico, com o zinco, presente no domínio catalítico, bloqueando o acesso deste ao substrato [46]. A interação tiol cisteína-zinco pode ser quebrada por clivagem direta do pro-peptídeo por outras proteinases, redução do tiol livre por oxidantes ou *in vitro* por agentes químicos como: acetato de para-amino-fenolmercúrio (APMA), SDS e espécies reativas de oxigênio (Figura 2) [37]. Nesses casos, a ligação tiol cisteína-zinco é quebrada sem clivagem do pro-peptídeo, o sítio catalítico será exposto e a pro-enzima apresentará atividade; sendo este o princípio da técnica de zimografia, onde a pro-enzima apresenta atividade gelatinolítica [47]. Porém, *in vivo*, ocorre inicialmente um ataque proteolítico que leva à desestabilização da molécula, incluindo a interação tiol cisteína-zinco, que permite um processamento intra-molecular ou inter-molecular (por formas intermediárias de MMPs parcialmente ativadas) levando à perda total do pro-peptídeo, o que caracteriza o passo final de ativação da enzima [47].

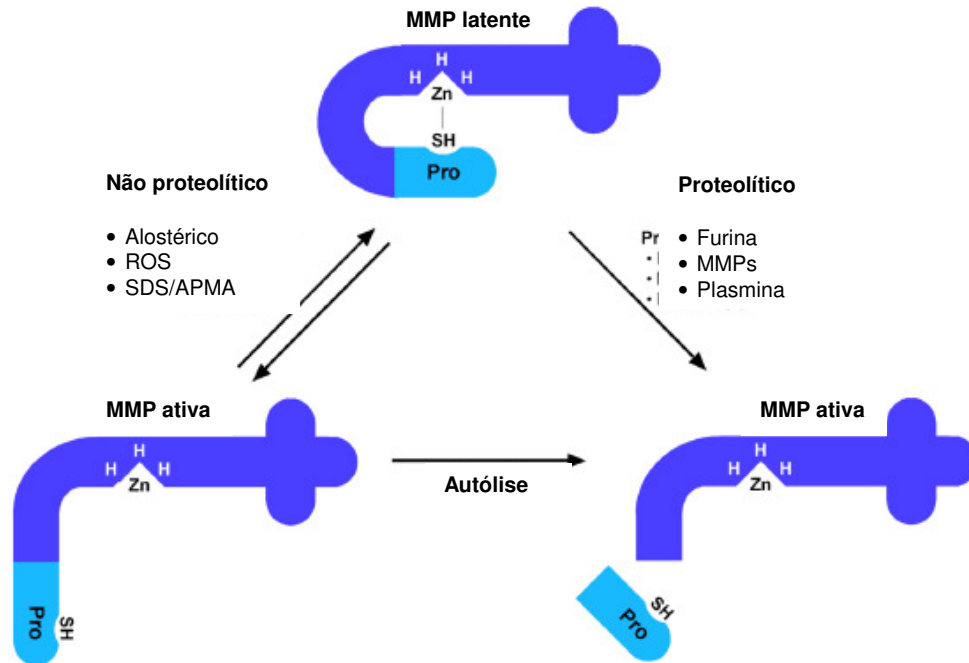


Figura 2. Mecanismos de ativação das pro-MMPs. Adaptado de Ra, H.J. e Parks, W.C., 2007 [37].

Além do controle da atividade pela ativação dos zimógenos, as MMPs podem ter a atividade regulada através da modulação da transcrição e da inibição por inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) [37].

Os TIMPs são inibidores teciduais específicos que ligam-se à região altamente conservada de ligação ao zinco no sítio de ligação nas MMPs ativas, com estequiometria 1:1 [47]. São conhecidos 4 tipos de moléculas (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4) que apresentam 30 a 40% de homologia de aminoácidos e possuem 12 resíduos cisteína conservados [47]. O TIMP-1, -2 e -4 são secretados em formas solúveis, enquanto o TIMP-3 é associado à matriz extracelular [47]. Em

condições patológicas associadas com alterações nas atividades das MMPs, mudanças nas concentrações de TIMPs são consideradas importantes devido ao seu efeito direto sobre os níveis de atividade das mesmas [47].

As gelatinases, MMP-2 e MMP-9, representam uma subfamília das MMPs que têm a capacidade de degradar colágenos da membrana basal tipo IV e V, elastina e gelatina (colágeno desnaturado) [48]. Estas enzimas parecem estar envolvidas em vários processos patológicos como: aterosclerose, aneurisma, problemas cardiovasculares [48].

1.6. MMPs como marcadores de risco cardiovascular

Estudos recentes têm mostrado que níveis circulantes de MMPs estão associados ao risco a eventos ateroscleróticos e podem ser usados como marcadores bioquímicos para risco cardiovascular [49], inclusive para indivíduos sem doenças clínicas [50, 51].

A MMP-9 está altamente expressa em regiões vulneráveis de placas ateroscleróticas e, por esta razão, tem-se sugerido que ela está envolvida no processo de remodelamento associado à aterosclerose e ruptura da placa aterosclerótica [52-55]. Níveis elevados desta enzima foram também relatados em pacientes com angina instável [56] e aneurisma de aorta [57-59]. Apoiando estes achados, Blankenberg et al. mostraram que a concentração plasmática de MMP-9 estava inicialmente aumentada em pacientes que subseqüentemente apresentaram um evento cardiovascular fatal [48].

Com relação à MMP-2, Hojo et al. mostraram que níveis plasmáticos desta enzima aumentam gradualmente depois de infarto agudo do miocárdio, com elevação máxima no 21^o dia após o ataque [60]. Vários outros estudos sugerem a participação destas enzimas na fisiopatologia de doenças vasculares isquêmicas. Níveis elevados de MMP-2 foram observados em pacientes com angina pectoris estável e instável [56], bem como em placas ateroscleróticas da artéria coronária [61].

Além da participação nas doenças vasculares isquêmicas, aumentos das concentrações plasmáticas de MMP-2 foram também relacionados com a severidade da disfunção sistólica do ventrículo esquerdo em pacientes com cardiomiopatia hipertrófica, o que sugere que mudanças nos níveis de MMP-2 podem estar associadas com mecanismos responsáveis pelo remodelamento cardíaco em pacientes com esta doença [62].

Em resumo, os trabalhos citados acima demonstram que o nível de atividade ou a concentração destas enzimas pode estar associado com risco cardiovascular aumentado.

1.7. Variações genéticas

Quando se comparam os DNAs genômicos de diferentes indivíduos podem-se encontrar diferentes tipos de variações genéticas (polimorfismos) [63, 64]. Estes polimorfismos foram originados através de mutações nos genes dos primeiros indivíduos da espécie humana e, por se tratarem de variações seletivamente neutras, persistiram em frequência moderada no genoma humano

[63, 64]. Apesar disso, existem diferenças marcantes na distribuição de alguns variantes entre diferentes etnias, por exemplo, entre africanos, asiáticos e caucasianos, que são resultantes de diferentes processos migratórios e de seleção [63, 64].

Por definição um variante genético para ser considerado um polimorfismo deve estar presente numa frequência alélica maior que 1% na população [63, 64]. Os polimorfismos podem ser classificados como: 1) VNTR – “*variable number of tandem repeats*” – caracterizado pela variação entre os indivíduos no número de repetições de uma determinada seqüência específica de nucleotídeos; também chamado de microssatélite; 2) deleção/inserção – caracterizado pela deleção ou inserção de segmentos específicos do DNA; 3) SNPs – “*single nucleotide polymorphisms*” - caracterizados pela substituição de um nucleotídeo por outro numa mesma posição do DNA; este tipo de polimorfismo é o mais comum, representando 90% da variabilidade genética encontrada no genoma humano; são encontrados, em média, a cada 1250 pares de bases do genoma humano; No genoma humano, os SNPs são di-alélicos, sendo um variante mais comum e o outro mais raro numa dada população [63, 64].

As diferenças na expressão de vários genes entre populações e entre indivíduos de uma população podem ser delineadas pelo estudo de polimorfismos genéticos, os quais podem afetar funções protéicas [65]. Isso pode determinar uma maior ou menor susceptibilidade de indivíduos ou grupos populacionais quanto ao desenvolvimento de determinadas doenças após exposição a um agente toxicológico [65].

1.8. Polimorfismos genéticos da MMP-9

O gene que codifica a MMP-9 apresenta polimorfismos genéticos que afetam a expressão e o nível de atividade desta enzima. Vários polimorfismos já foram descritos, sendo que dois deles, presentes na região promotora, são funcionalmente importantes, C⁻¹⁵⁶²T (rs 3918242) e (CA)_n (rs 3222264) (Figura 3).

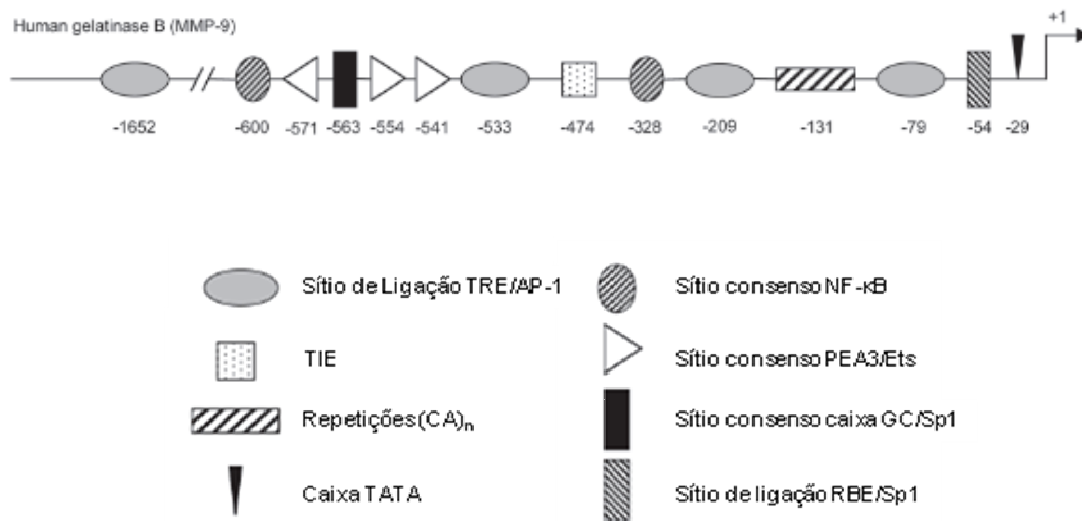


Figura 3. Principais elementos regulatórios localizados na região promotora do gene da MMP-9. Adaptado de Van den Steen, P.E., et al., 2002 [66].

Estudos recentes relacionados com implicação funcional do polimorfismo C⁻¹⁵⁶²T mostraram um efeito alelo específico na atividade transcricional, com aumento da expressão em portadores do alelo T. Estudos *in vitro* mostraram que esta substituição resulta na perda da ligação de uma proteína nuclear repressora

de transcrição a esta região e, portanto, em aumento da transcrição, resultando em expressão aumentada desta enzima [67].

Este polimorfismo tem sido associado com aumento de susceptibilidade à doença cardíaca coronariana [48, 68], câncer [69, 70], aneurismas [71, 72], severidade de arteriosclerose [67] e outras doenças cardiovasculares [73, 74], provavelmente como resultado da migração e proliferação facilitadas de células musculares lisas em portadores do alelo T. Porém, em indivíduos saudáveis, portadores do alelo T [75, 76], não foram encontrados níveis aumentados de atividade da pro-MMP-9 e da MMP-9 [77].

O microssatélite (CA)_n na posição -90/-131 apresenta uma distribuição bimodal de frequências alélicas, com o primeiro pico no alelo (CA)₁₄ e o segundo pico nos alelos (CA)₂₁ e (CA)₂₂ [78, 79]. Sugere-se que este microssatélite facilita a abertura da dupla-fita e, conseqüentemente, a transcrição do gene [78, 79]. Em estudos *in vitro*, diferentes números de repetições CA parecem controlar a expressão do gene, sendo que 14 repetições, comparado com 21, apresentam a expressão reduzida em 40% [80]. Outro estudo em camundongos mostrou que alelos com 24 repetições apresentam a expressão da MMP-9 aumentada em mais de 20 vezes quando comparados com alelos de 20 repetições [81]. Assim, a maioria dos estudos concorda que um aumento no número de repetições é associado a um aumento da expressão da enzima [80-82].

A presença de alelos com 22 ou mais repetições, mas não os níveis plasmáticos da MMP-9, foi associada com aterosclerose da carótida e

particularmente a placas com capa fibrosa fina [78]. Ainda, em pacientes com aterosclerose da carótida, portadores de alelos com 20 ou mais repetições apresentaram desenvolvimento mais rápido de espessamento da íntima-média e progressão de estenose nas placas [83]. Um estudo caso-controle mostrou associação entre o alelo com 23 repetições e a ocorrência de aneurisma intracraniano [73].

A análise global do exposto acima sugere que polimorfismos da MMP-9 parecem não afetar significativamente a atividade da MMP-9 em voluntários saudáveis. Porém, é altamente provável que tais polimorfismos modulem aumentos de atividade MMP-9 associados a outros fatores fisiopatológicos que participam de várias doenças cardiovasculares, incluindo-se fatores ambientais.

Entretanto, nenhum trabalho realizado até o momento enfocou possíveis influências da exposição ambiental ao mercúrio sobre a atividade da MMP-9. Além disto, nenhum estudo verificou se polimorfismos genéticos da MMP-9 modulam alterações da atividade plasmática da MMP-9 em indivíduos expostos ao mercúrio. Determinar as influências de polimorfismos genéticos sobre o nível de atividade da MMP-9 pode elucidar possíveis bases genéticas pelas quais tais polimorfismos influenciam o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares em indivíduos expostos ao mercúrio.

2. Hipótese

A hipótese deste projeto é que a exposição ambiental ao mercúrio possa influenciar a atividade das gelatinases (MMPs -2 e -9). Ainda, é possível que polimorfismos genéticos da MMP-9 modulem alterações da atividade plasmática da MMP-9, em indivíduos expostos ao mercúrio.

3. Objetivos

- 1- Avaliar a existência de associações dos níveis plasmáticos de MMP-2 e MMP-9 (e seus inibidores endógenos: TIMP -2 e TIMP-1) com os níveis circulantes de mercúrio em pessoas ambientalmente expostas, na região Amazônica.
- 2- Avaliar a existência de associação entre polimorfismos da MMP-9 e exposição ao mercúrio, de forma a modificar as concentrações plasmáticas da MMP-9.

4. Materiais e Métodos

4.1. Seleção de voluntários e coleta de amostras

O projeto deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto (São Paulo), protocolo número CEP/FCFRP#71, e o estudo foi explicado individualmente às pessoas que concordaram em participar deste, e estas assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Todas as pessoas participaram do estudo de maneira voluntária.

A população estudada é residente de seis comunidades ribeirinhas do Rio Tapajós (Amazônia Brasileira, estado do Pará): São Luiz do Tapajós, Nova Canaã, Santo Antônio, Mussum, Vista Alegre e Açaituba (figura 4). Nessa região, a exposição ao Hg é por consumo de peixe [84].

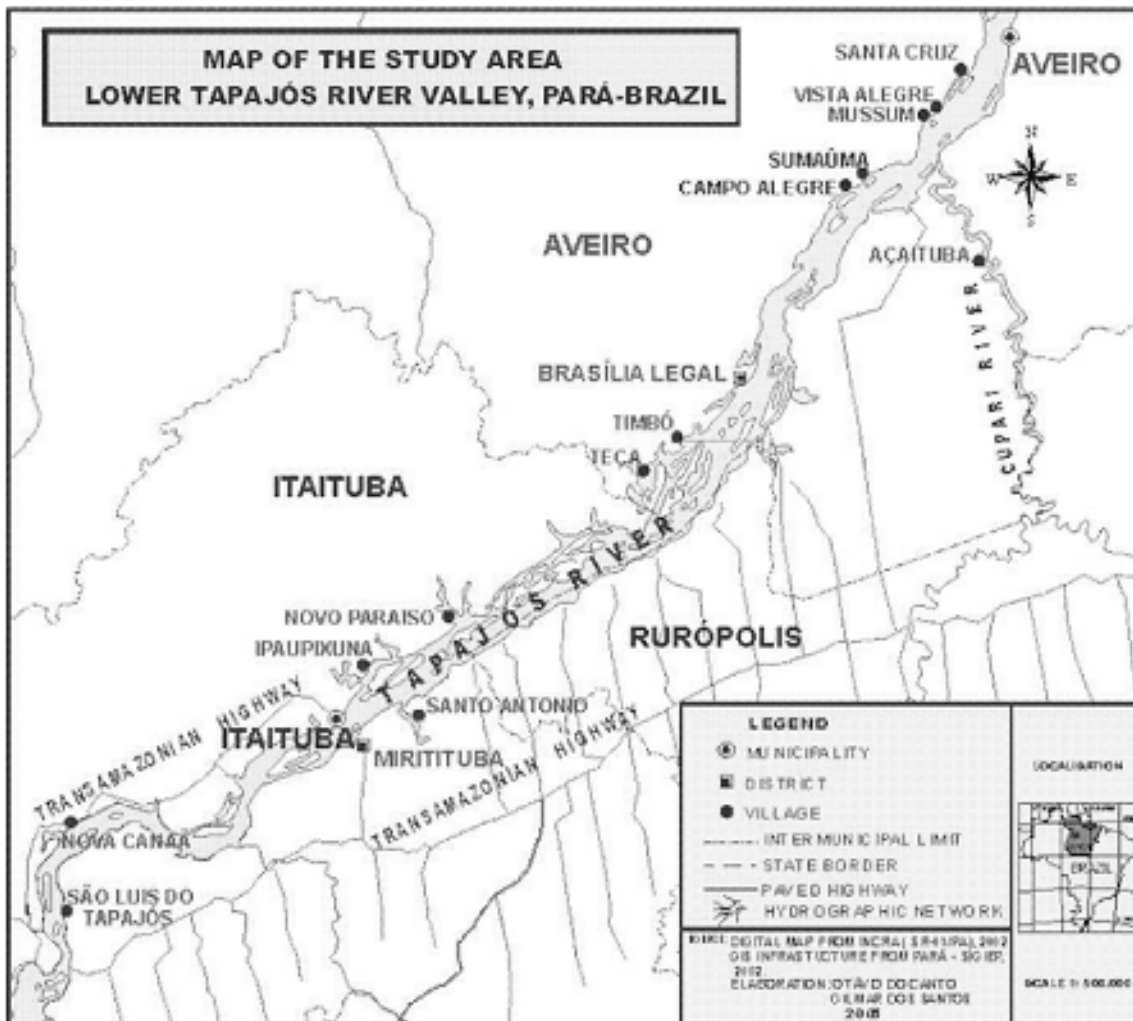


Figura 4. Mapa da área de estudo. Adaptado de Fillion, M., et al., 2006 [85].

O recrutamento dos voluntários foi feito casa a casa e por reuniões nas comunidades. Para o primeiro objetivo do projeto, 159 participantes (73 homens e 86 mulheres), com idade entre 15 e 87 anos foram estudados. Para o segundo objetivo, 266 participantes (124 homens e 142 mulheres), com o mesmo intervalo de idade, foram estudados. As análises foram feitas em duas fases, por isso o número diferente de participantes entre os dois objetivos. É necessário ressaltar

que nem todos os indivíduos presentes na primeira fase (objetivo 1) estão na segunda parte do estudo (objetivo 2), e vice-versa - não necessariamente existiam DNA e resultados bioquímicos de todas as amostras, por isso esta diferença.

Dois entrevistadores treinados se encontravam com os participantes em suas comunidades. Todos os participantes passaram por uma entrevista de aproximadamente uma hora. Um questionário foi usado para determinar as variáveis sócio-demográficas: gênero, idade, qual comunidade vive, lugar de nascimento, há quanto tempo reside na região, nível educacional, atividades de subsistência, trabalho em mineração do ouro ou exposição ao Hg por queima de amálgama, exposição a outros contaminantes, frequência e quantidade de cigarros, consumo de álcool ou drogas de abuso, histórico médico e uso de medicamentos. Outro questionário era um recall de sete dias de consumo de alimentos, onde era indicado o número de refeições que continham peixes, carne bovina, frango, porco ou outras carnes, frutas, leite e manteiga. Para a análise do consumo de peixes, uma lista contendo as principais espécies de peixes da região foi preparada; os participantes indicavam, por dia, o número de refeições que continham peixe, assim como a espécie de peixe consumida. Peixes que não estavam na lista foram anotados. Após a entrevista, medidas antropométricas (peso, altura e circunferência abdominal) foram tomadas por um técnico treinado, e o índice de massa corpóreo (IMC) foi calculado.

Uma enfermeira treinada coletou uma amostra de 6 mililitros (ml) de sangue venoso de cada participante. As amostras de sangue foram coletadas em tubos com vácuo, livre de traços de metais (BD Vacutainer®, BD Vacutainer, Franklin

Lakes, NJ, USA) contendo heparina como anticoagulante. Dois mililitros de sangue foram então pipetados em um tubo Eppendorf (2ml de volume) previamente limpo em sala limpa classe 100, e imediatamente congelados a -20°C. Para separação do plasma, 4ml das amostras de sangue foram centrifugados (1000g por 6 minutos). A fração plasmática foi pipetada em um tubo Eppendorf (2ml de volume) previamente limpo em sala limpa classe 100, e imediatamente congelados a -70°C.

4.2. Determinação das concentrações de Hg no sangue total e plasma

Enquanto o sangue total tem sido mais freqüentemente usado para a determinação da exposição ao Hg [10], tem havido alguma discussão sobre a adequação do uso de plasma como um melhor índice de exposição a metais pesados [86], incluindo Hg [87]. Assim, para este estudo, nós determinamos as concentrações de Hg tanto nas amostras de sangue total quanto no plasma.

Níveis de Hg no sangue total e plasma foram medidos no Laboratório de Toxicologia de Metais - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo - campus de Ribeirão Preto (São Paulo), por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado – ICP-MS – espectrômetro Perkin Elmer modelo Elan DRC II. As concentrações de Hg nas amostras de sangue total foram medidas de acordo com o método descrito por Palmer et al. [88], com limite de detecção para Hg sendo 0,17µg/l. As concentrações de Hg nas amostras de plasma foram feitas de acordo com o método descrito por Gouille et al. [89], com limite de detecção para Hg de 0,10µg/l.

4.3. Determinação das concentrações de Se no plasma

A quantidade de Se no sangue total e contido nos eritrócitos são bons indicadores de exposição ao Se em longo prazo, enquanto a concentração plasmática de Se reflete mudanças na ingestão de Se mais rapidamente que a concentração nos eritrócitos [90]. Os átomos de Se no plasma estão acoplados à glutathione peroxidase (GSH-Px), selenoproteína P ou ligados à albumina, e quase 95% do Se presente no plasma está ligado a proteínas. Esses compostos não penetram membranas [91] e podem estar mais biodisponíveis no sistema cardiovascular. No presente estudo, nós analisamos Se no plasma.

Níveis de Se no plasma também foram determinados no Laboratório de Toxicologia de Metais - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo - campus de Ribeirão Preto (São Paulo), por ICP-MS – espectrômetro Perkin Elmer modelo Elan DRC II, usando o método proposto por Goulle et al. [89]. O limite de detecção foi 0,09µg/l.

4.4. Controle de qualidade dos resultados de mercúrio

Água deionizada de alta pureza (resistividade 18,2 M Ω.cm) obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore®) foi utilizada em todo o trabalho. Ácido nítrico foi destilado em temperatura inferior à de ebulição, empregando-se destilador de quartzo da Kürner Analystechnik para eliminação de impurezas.

Todas as soluções foram armazenadas em frascos de polietileno. Frascos de plástico, copos do autoamostrador e materiais de vidro foram mergulhados em solução contendo 20% v/v HNO₃ por 24 h, lavados 5 vezes com água Milli-Q e

secos em capela de fluxo laminar classe 100. Todas as operações para preparo das soluções de referência de mercúrio foram realizadas em sala limpa classe 10000.

Solução estoque contendo 1,0g/L de mercúrio (Perkin-Elmer, Inc.) padronizada pela “National Institutes of Standards and Technology” (NIST) foi utilizada para calibração dos espectrômetros.

O controle de qualidade da determinação de metais foi garantido pela análise de Materiais de Referência provenientes do *U.S. National Institute of Standards and Technologies* (NIST). Além disso, diversos materiais de referência secundários, provenientes tanto do *New York State Department of Health* (NYS DOH PT programa para elementos traço no sangue total e plasma) ou pelo *Institut national de santé publique Du Québec*, Canadá (INSP regime de avaliação externa da qualidade de elementos traço em sangue e plasma), foram analisados. Amostras de referência foram analisadas antes e depois de dez amostras do estudo.

4.5. Determinação das concentrações plasmáticas de MMPs -2 e -9 (zimografia)

A análise das concentrações plasmáticas da MMP-2 e -9 foi realizada pelo método de zimografia, que permite detectar tanto a forma latente quanto ativa de ambas metaloproteinases (MMP-2 e -9) em concentrações tão baixas quanto 1 nM. A técnica baseia-se na separação eletroforética das proteínas sobre

condições desnaturantes (com o uso de SDS) as não redutoras através de um gel de poliacrilamida contendo o substrato, gelatina. Após a separação, as proteínas são renaturadas pela troca do SDS por um detergente não iônico, Triton X-100, e o gel é incubado a 37°C em tampão contendo cálcio. Apesar de não ocorrer clivagem, o SDS provoca a quebra da ligação tiol-Zn²⁺ existente entre o pro-peptídeo e o sítio catalítico, desta maneira as pro-formas das MMPs são capazes de apresentar atividade gelatinolítica.

Quantidades determinadas de plasma (1,5 µL para análise da MMP-9 e 0,5 µL para MMP-2) foram utilizadas para eletroforese, misturadas com tampão de amostra não-redutor (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 20% glicerol, 4% SDS, 0,001% de azul de bromofenol). As amostras assim preparadas foram separadas através de eletroforese em um sistema descontínuo de tampões (fonte de eletroforese *Eletrophoresis Power Supply – EPS 301*), conforme a técnica de SDS-PAGE descrita por Laemmli (1970) [92], em géis preparados no próprio laboratório, em concentração de 7% de poliacrilamida e contendo 1% de gelatina (40 mg/ml). Após a eletroforese estar concluída, os géis foram incubados por 1 hora em temperatura ambiente em solução de Triton X-100 a 2% e, em seguida, permaneceram incubados a 37°C (estufa ECB 1.1 Digital – Odontobras) por 72 h em tampão Tris-HCl a 50 mM, pH 7,4, contendo 10 mM de cloreto de cálcio (CaCl₂). Os géis foram, então, corados com 0,05% de Coomassie Brilliant Blue G-250 por 3 horas e, em seguida descorados com metanol 30% e 10% de ácido acético, em duas etapas sucessivas de 15 e 30 minutos. Atividades gelatinolíticas foram detectadas como bandas descoradas contra o fundo de gelatina corada pelo

Coomassie Brilliant Blue, por densitometria utilizando o Software de documentação e análise de eletroforese (*Electrophoresis Documentation and Analysis System – EDAS290*) da Kodak (Kodak, Rochester, NY, E.U.A.).

Para evitar variações nos valores das densidades de bandas em diferentes géis, adicionaram-se a cada gel duas amostras de sobrenadante de cultura de células, que exibia atividade de MMP-2 nos zimogramas. Considerou-se o sobrenadante de cultura de células como um “padrão interno”, pois os valores obtidos para a banda de MMP-2 formada por essa amostra nos diferentes géis foram utilizados como fator de correção, de modo que os valores obtidos para as demais bandas de quaisquer géis pudessem ser comparados entre si.

As formas de pro- MMP-2 e MMP-9 (figura 5) foram identificados como bandas de 72 e 92 kDa, respectivamente.

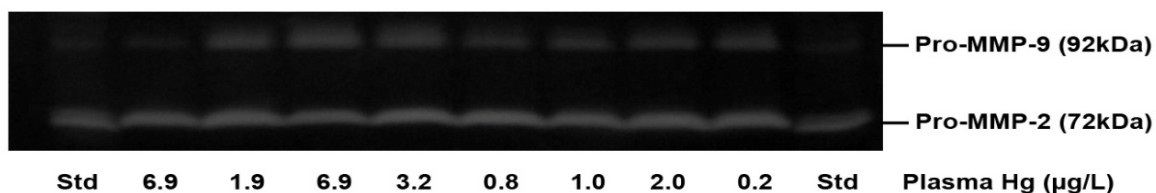


Figura 5. Zimograma representativo de amostras de plasma, mostrando as bandas de pro-MMP-9 (92kDa) e pro-MMP-2 (72kDa). Std: padrão interno; Plasma Hg ($\mu\text{g/L}$): concentrações plasmáticas de Hg ($\mu\text{g/L}$); MMP: metaloproteinase de matriz extracelular.

4.6. Determinação das concentrações plasmáticas de TIMP-1 e TIMP-2

As concentrações plasmáticas de TIMP-1 e TIMP-2 foram medidas através de um imuno ensaio baseado em ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) em formato “sanduíche”, usando reagentes da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, os padrões de concentração de TIMP-1 ou -2 conhecidas, para formação da curva padrão, e as amostras de plasma foram incubadas em microplaca previamente sensibilizada com anticorpo de captura anti-TIMP-1 ou anti-TIMP-2. As moléculas de TIMP-1 ou -2 presentes nas amostras ligaram-se aos anticorpos anti-TIMP-1 ou anti-TIMP-2 aderidos à placa. Após lavagens, os TIMPs-1 ou -2 ligados foram detectados através de uma reação enzimática. Anticorpos de detecção biotinizados anti-TIMP-1 ou anti-TIMP-2 foram adicionados à microplaca e ligaram-se aos TIMPs presentes. Após lavagem da placa, foi adicionada estreptavidina conjugada a peroxidase. Em seguida, após lavagem, foi adicionado o substrato desta enzima, uma mistura 1:1 de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e Tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi paralisada por adição de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e a coloração resultante quantificada a 450 nm utilizando um leitor de placas μ QuantTM (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). As concentrações de TIMP-1 ou TIMP-2 nas amostras foram determinadas pela interpolação das absorbâncias na curva padrão.

4.7. Determinação das concentrações plasmáticas de TBARS

A determinação de TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances) foi usada para estimar o grau de peroxidação lipídica, usando o método de Buege e Aust [93]. Devido à reação do malondialdeído presente nas amostras de plasma com o ácido tiobarbitúrico foi determinado o grau de peroxidação lipídica (medida indireta de estresse oxidativo), com a leitura da coloração rósea resultante quantificada a 535 nm utilizando um espectrofotômetro.

4.8. Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído do componente celular do sangue total, usando o kit Easy-DNA™ Kit, da Invitrogen (Carlsbad, Calif, USA), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, as células foram lisadas pela adição da solução A (solução de lise) e subsequente incubação a 65°C por 10 minutos. Proteínas e lipídios foram precipitados e extraídos pela adição da solução B (solução de precipitação) e clorofórmio. A solução foi então centrifugada para separá-la em duas fases com uma interface sólida separando as duas fases. O DNA se encontrava na fase superior (fase aquosa), as proteínas e lipídios na interface sólida, e as formas orgânicas na fase inferior. O DNA foi então removido, precipitado com etanol, e ressuspenso em tampão TE (10 mM Tris-Cl, pH 7,5, 1mM EDTA pH8,0). O DNA purificado foi armazenado a -20°C até ser utilizado para reações de PCR (*polymerase chain reaction*).

4.9. Genotipagem do polimorfismo C⁻¹⁵⁶²T da MMP-9

A genotipagem do polimorfismo C⁻¹⁵⁶²T da MMP-9 consiste, basicamente, em 4 partes: amplificação do DNA genômico, digestão com enzima de restrição, separação dos fragmentos em gel de poliacrilamida a 12% e coloração por nitrato de prata, para assim, analisarmos os resultados dos géis.

O DNA genômico extraído das amostras foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) (Termociclador P x 2 *Termal Cycler* – *Thermo Electron Corporation*). Os *primers* usados na PCR, para amplificar a seqüência de -1809 a -1374 da região promotora do gene da MMP-9, contendo o sítio -1562, foram: *sense*: 5'-GCC TGG CAC ATA GTA GGC CC- 3' e *antisense*: 5'-CTT CCT AGC CAG CCG GCA TC-3' (Demacq 2006, Zhang B 1999). A PCR foi realizada com uma mistura de 25 µL contendo: ~100 ng de DNA genômico previamente extraído, 20 pmol de cada primer, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 1,0 unidade de Taq polimerase com tampão 1x. A reação foi conduzida sob as seguintes condições: um passo inicial (para desnaturação do DNA) de 4 minutos a 94°C; seguido de 30 ciclos de: 30s a 94°C (desnaturação), 30s a 65°C (pareamento) e 1 min a 74°C (extensão); e mais 4 minutos a 74°C para finalizar a extensão.

Os produtos da PCR foram digeridos com a enzima *SphI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) a 37°C *overnight*. Cada reação era constituída de duas unidades da *SphI*, tampão da enzima e 8 µL do produto de PCR.

Os fragmentos obtidos na digestão foram separados em gel de poliacrilamida a 12 %, a 20 mA, por cerca de 2h (fonte de eletroforese Eletrophoresis Power Supply – EPS 301). A enzima *SphI* reconhece a seqüência 5'- GCATGC-3'. Quando há a troca do C pelo T na posição -1562 do gene da MMP-9 é criado um sítio de restrição para a enzima que reconhece esta seqüência e cliva a fita de DNA nesta região, quebrando o fragmento de 435 pb em um fragmento de 247 pb e um de 188 pb. Portanto, após coloração por nitrato de prata, três genótipos foram distinguidos: CC (435 pb), CT (435, 247 e 188 pb) e TT (247 e 188 pb) em gel de poliacrilamida 12% [94] (Figura 6).

Para coloração por nitrato de prata, as amostras foram fixadas com a solução fixadora (etanol 95º a 10% + ácido acético 1 %) por 10 min, sob agitação. Em seguida o gel foi lavado com água corrente e depois ficou imerso na solução de coloração (nitrato de prata 0,2%) por 30 min, também sob agitação. Lavou-se novamente o gel com água. Por fim o gel foi colocado na solução de revelação (NaOH 3% + formaldeído 1%), mantendo-o sob agitação, até que as bandas aparecessem com uma coloração castanha bem evidente. Lavou-se o gel com água para interromper a reação.

Os resultados de genotipagem por PCR/enzima de restrição foram controlados por seqüenciamento de algumas das amostras de DNA para o polimorfismo C⁻¹⁵⁶²T.

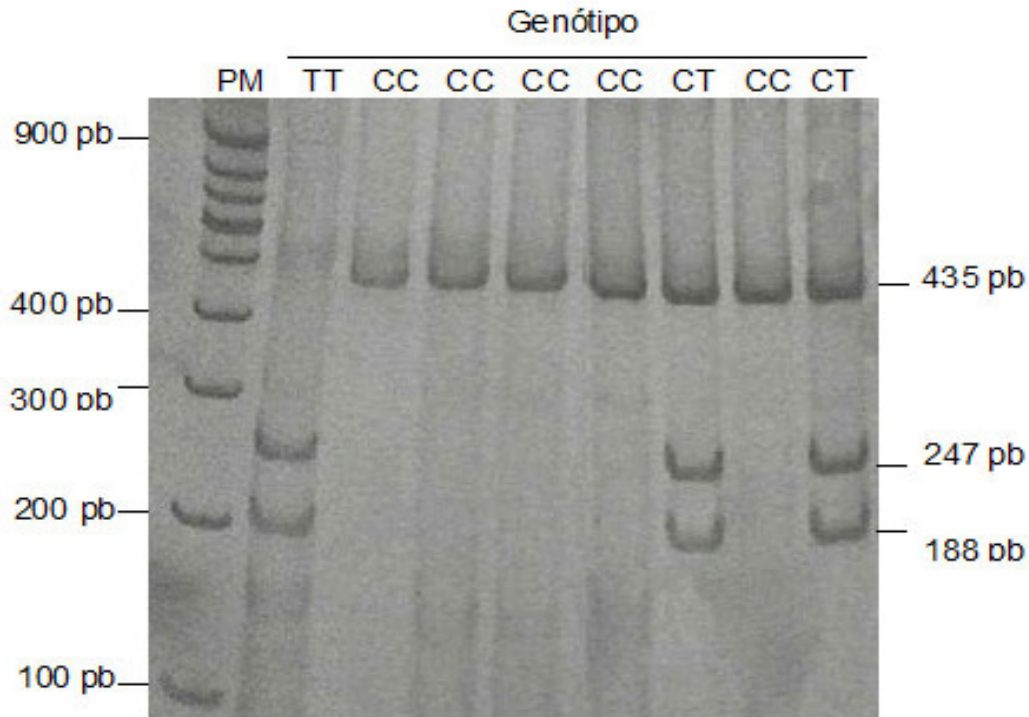


Figura 6. Genotipagem para o polimorfismo C⁻¹⁵⁶²T na região promotora do gene da MMP-9. Os produtos de PCR foram digeridos com a enzima de restrição *SphI*, produzindo diferentes fragmentos, de acordo com o genótipo específico.

4.10. Genotipagem do polimorfismo (CA)_n da MMP-9

A genotipagem do polimorfismo (CA)_n da MMP-9 consiste, basicamente em 3 partes: amplificação do DNA genômico, separação dos fragmentos em gel de poli-acrilamida a 7% com uréia 8M e coloração por nitrato de prata, para assim, analisarmos os resultados dos géis.

O DNA genômico extraído das amostras foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) (Termociclador P x 2 *Thermal Cycler* – *Thermo*

Electron Corporation). Os primers usados na PCR, para amplificar o fragmento da região promotora do gene da MMP-9 em torno da posição -90, foram: *sense*: 5'-GAC TTG GCA GTG GAG ACT GCG GGC A -3' e *antisense*: 5'-GAC CCC ACC CCT CCT TGA CAG GCA A -3' (Maeda S, et al. 2001). A PCR foi efetuada com uma mistura de 25 µL contendo: ~100 ng de DNA, 20 pmol de cada *primer*, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 1,0 unidade de Taq polimerase com tampão 1x. A reação foi conduzida sob as seguintes condições: um passo inicial (para desnaturação do DNA) de 5 minutos a 95°C; seguido de 25 ciclos de: 1 min a 95°C (desnaturação), 1 min a 72°C (pareamento) e 1 min a 74°C (extensão); e mais 1 ciclo de 7 minutos a 74°C para finalizar a extensão.

Os produtos amplificados foram separados em gel de poliacrilamida 7% - uréia 8M (fonte de eletroforese Eletrophoresis Power Supply – EPS 301) e visualizados por coloração pela prata. Diferenças no peso molecular (ou número de pares de bases), de 144 pb (13 repetições de CA) a 168 pb (25 repetições de CA), foram determinadas por comparação com a migração de um DNA *ladder* de 10 pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), e algumas amostras de homozigotos, para serem utilizados como padrão, foram seqüenciadas pelo método de Sanger [95]. As amostras foram classificadas em “L” para menos de 21 repetições de CA ou “H” para amostras contendo 21 ou mais repetições (Figura 7).

Para coloração por nitrato de prata, as amostras foram fixadas com a solução fixadora (etanol 95° a 10% + ácido acético 1 %) por 10 min, sob agitação. Em seguida o gel foi lavado com água corrente e depois ficou imerso na solução de coloração (nitrato de prata 0,2%) por 30 min, também sob agitação. Lavou-se

novamente o gel com água. Por fim o gel foi colocado na solução de revelação (NaOH 3% + formaldeído 1%), mantendo-o sob agitação, até que as bandas aparecessem com uma coloração castanha bem evidente. Lavou-se o gel com água para interromper a reação.

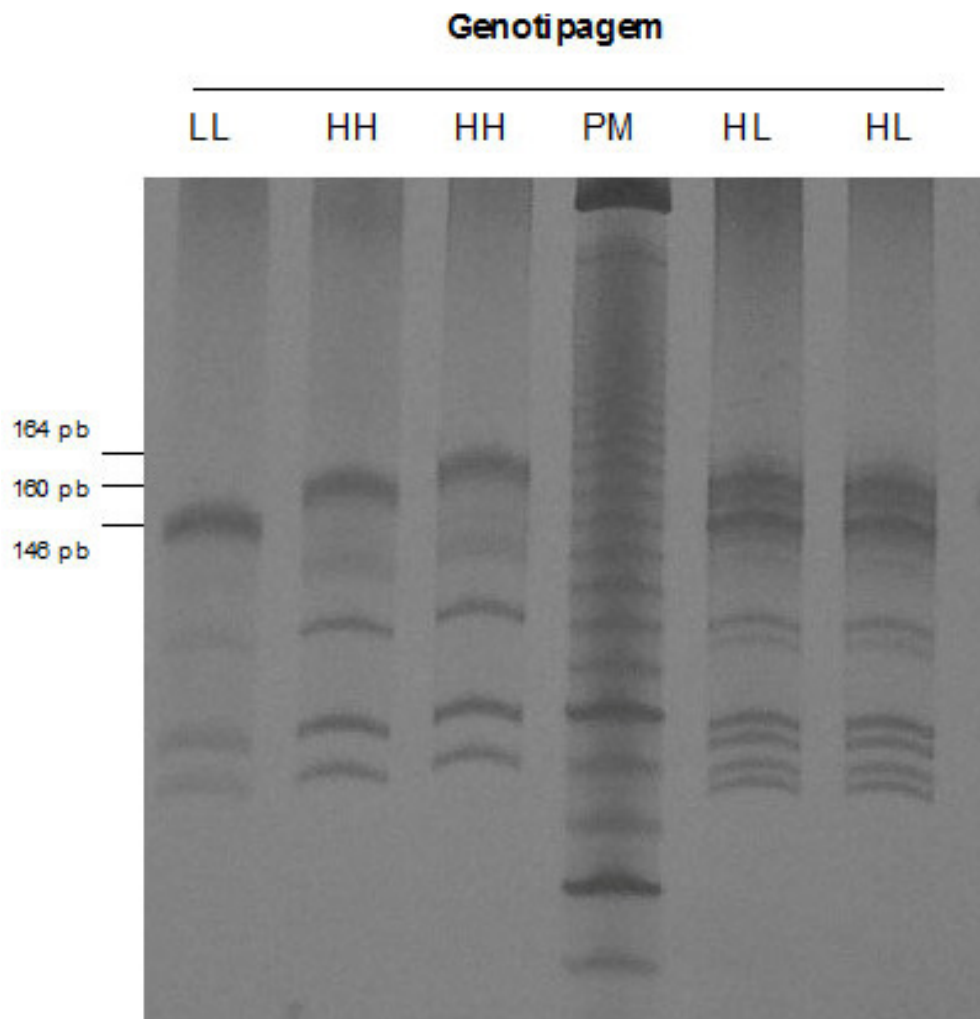


Figura 7. Genotipagem para o polimorfismo (CA)_n do gene da MMP-9. Os primeiros 3 poços são de amostras seqüenciadas e que foram usadas como padrão: 14/14, 21/21 e 23/23, respectivamente. HH= $\geq 21 / \geq 21$, LL= $< 21 / < 21$, HL= $\geq 21 / < 21$.

4.11. Análise estatística

Para o objetivo 1, foi utilizada estatística descritiva para apresentar as características gerais da população, e correlação de Pearson (r,p) para examinar as associações entre concentrações plasmáticas de MMPs ou TIMPs com variáveis sócio-demográficas que podem influenciar seus níveis, tais como: tabagismo, idade, gênero e IMC, assim como o consumo de peixe, concentração plasmática de Se e TBARS. Esses parâmetros foram então incluídos como co-variáveis em um modelo de regressão múltipla, tentando explicar mudanças em MMPs, TIMPs ou na razão MMP/TIMP como resultado das concentrações de Hg no plasma ou no sangue total. Como o consumo de peixe e Hg estão correlacionados ($r = 0,44$ para Hg no sangue total e $0,34$ para Hg no plasma), dois modelos foram analisados (com e sem consumo de peixe). Por apresentarem distribuição assimétrica, Hg e Se no plasma e Hg no sangue foram log - transformados antes de serem usados nos modelos de regressão múltipla. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. As análises foram feitas utilizando Prism 3.02 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) e Jump 5.0.1a (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Para o objetivo 2, foi usada estatística descritiva para apresentar as características gerais da população. Variáveis sócio-demográficas que podem influenciar níveis de MMP-9 ou TIMP-1, tais como: tabagismo, idade, gênero e IMC, foram incluídos em um modelo de regressão múltipla, tentando explicar mudanças na MMP-9, TIMP-1 ou na razão MMP-9/TIMP-1 como resultado dos

níveis de Hg no plasma. Em seguida, essas variáveis, assim como as concentrações plasmáticas de Hg, foram incluídas como covariáveis em um modelo de regressão múltipla tentando explicar as mudanças no grau de atividade da MMP-9 (MMP-9/TIMP1), como resultado dos genótipos da MMP-9. Como não encontramos nenhuma relação entre o grau de atividade da MMP-9 e os polimorfismos da MMP-9, considerando todas as 266 pessoas juntas, dividimos a população estudada em 3 grupos, considerando seus níveis plasmáticos de Hg (A, B e C = níveis mais baixos, intermediários e mais elevados de Hg no plasma, respectivamente), e analisamos a relação entre o grau de atividade da MMP-9 e os polimorfismos da MMP-9, em um modelo de regressão múltipla incluindo tabagismo, idade, gênero e IMC. Neste modelo, não foram incluídas as concentrações plasmáticas de Hg, pois esta variável foi utilizada para dividir os grupos. Em nenhum dos modelos feitos nesta parte do estudo foram incluídas as variáveis: concentrações plasmáticas de Se e TBARS (como feito para o primeiro objetivo) por estas não terem sido significativas em testes para escolher o melhor modelo. Quando utilizado nos modelos de regressão múltipla, a concentração plasmática de Hg foi log-transformada, por apresentar distribuição assimétrica. No caso do polimorfismo C⁻¹⁵⁶²T da MMP-9, os genótipos CT e TT foram agrupados, devido à baixa frequência de indivíduos portadores de alelos T. Para comparar as características sócio-demográficas e parâmetros analisados entre os grupos foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via (*one-way analysis of variance*) seguida de teste Tukey. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. As análises foram feitas utilizando Prism 3.02

(GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) e Jump 5.0.1a (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A distribuição dos genótipos para cada polimorfismo foi analisada para o equilíbrio de Hardy-Weinberg usando BioEstat 5.0 (Ayres et al. Software, Belém, PA, Brasil).

5. Resultados

5.1. Associação dos níveis plasmáticos de MMPs-2 e -9 (e seus inibidores endógenos: TIMPs-1 e -2) com os níveis circulantes de mercúrio

A tabela 1 resume as características sócio-demográficas e os parâmetros bioquímicos analisados, incluindo os indicadores de exposição ao mercúrio (concentrações de Hg no sangue e plasma) de 159 participantes envolvidos no estudo. Houve correlação significativa entre as concentrações de Hg no sangue e Hg no plasma ($r = 0,8682$; $p < 0,0001$; Figura 8).

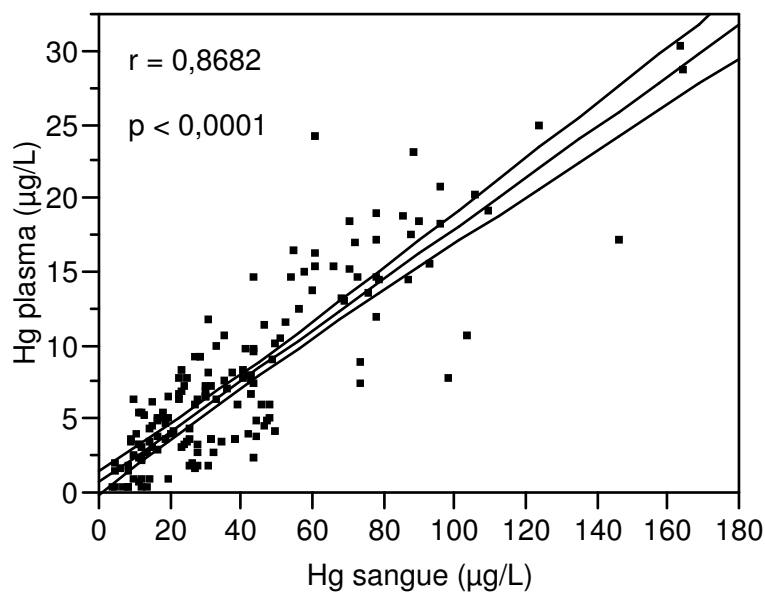


Figura 8. Associação entre as concentrações de Hg no plasma e Hg no sangue ($\mu\text{g/l}$) dos 159 participantes do estudo. A linha de regressão e o intervalo de confiança de 95% estão plotados.

Tabela 1. Características sócio-demográficas e parâmetros analisados na população estudada (N = 159).

	N	%	Varição	Média ± SD	Mediana
Idade (anos)			15 - 87	41 ± 16	38
Gênero					
Masculino	73	46			
Feminino	86	54			
IMC (kg/m²)			17 - 41	25 ± 4	24.4
Tabagismo					
Fumantes	29	18			
Não fumantes	130	82			
Consumo de peixes			0 - 14	5 ± 4	5
MMP – 9			0.05 - 1.69	0.54 ± 0.30	0.46
MMP – 2			0.46 - 2.12	1.11 ± 0.38	1.07
TIMP - 1 (ng/mL)			39.17 - 580.57	314.73 ± 88.27	311.38
TIMP - 2 (ng/mL)			49.22 - 236.60	139.94 ± 35.76	143.04
Hg sangue (µg/L)			4.30 - 164.90	40.60 ± 30.95	31.40
Hg plasma (µg/L)			0.20 - 30.20	7.76 ± 6.15	6.20
Se plasma (µg/L)			57.2 - 370.00	130.16 ± 47.60	117.50
TBARS (nM/mg proteína)			0.15 - 15.38	4.32 ± 3.11	3.73

IMC: índice de massa corpórea; Consumo de peixes: refeições por semana;
MMP: em unidades arbitrárias.

Análises univariadas buscando possíveis determinantes das atividades de MMPs e TIMPs nesta população, mostraram correlações negativas significativas entre Se no plasma e MMP-9 ($r = -0,1755$; $p = 0,0269$), e Se no plasma e TIMP-2 ($r = 0,2067$; $p = 0,0089$). TBARS foi negativamente correlacionado com MMP-2 ($r = -0,1647$; $p = 0,0381$). Nenhuma correlação foi encontrada entre tabagismo e MMPs, TIMPs ou a razão MMP/TIMP, mesmo alguns participantes do estudo sendo fumantes. O consumo de peixes foi inversa e significativamente correlacionado com a fração MMP-9/TIMP-1 ($r = -0,1801$; $p = 0,0231$). Correlações negativas significativas foram encontradas entre idade e MMP-9 ($r = -0,1792$; $p = 0,0238$) e idade e a razão MMP-9/TIMP-1 ($r = -0,3518$; $p < 0,0001$), com significativa correlação positiva entre idade e TIMP-1 ($r = 0,3743$; $p < 0,0001$), e nenhuma correlação entre idade de MMP-2 foi encontrada. A fração MMP-9/TIMP-1 foi significativamente maior em mulheres (24% maior, $p = 0,0163$, teste t). O IMC foi negativa e significativamente correlacionado com a MMP-2 ($r = -0,2344$; $p = 0,0029$) e com a razão MMP-2/TIMP-2 ($r = -0,2352$; $p = 0,0028$), mas positivamente correlacionado com TIMP-1 ($r = 0,1724$; $p = 0,0298$).

A relação entre a exposição ao mercúrio e as mudanças nas MMPs e TIMPs foram então examinadas através de modelos de regressão múltipla, que incluíram as seguintes co-variáveis: tabagismo, idade, gênero, índice de massa corpórea, log de Se no plasma e TBARS. Exceto pelo TIMP-2, que significativamente diminuiu ($\beta = -26,54351$, $p = 0,0021$) com o mercúrio no sangue total, nenhuma

associação entre Hg no sangue e MMPs, TIMP-1 ou suas razões foi observada: MMP-9 ($\beta = 0,018331$, $p = 0,8056$), MMP-2 ($\beta = -0,013082$, $p = 0,8902$), TIMP-1 ($\beta = 4,182572$, $p = 0,8366$), MMP-9/TIMP-1 ratio ($\beta = 0,000093$, $p = 0,7656$) and MMP-2/TIMP-2 ratio ($\beta = 0,001528$, $p = 0,1176$).

No modelo de regressão múltipla com mercúrio no plasma como uma variável independente, não foi encontrada associação entre Hg no plasma com MMP-9 ($\beta = 0,081922$, $p = 0,1424$) ou com MMP-2 ($\beta = 0,090222$, $p = 0,2043$). No entanto, as concentrações plasmáticas de mercúrio foram negativa e significativamente associadas com as concentrações de TIMP-1 ($\beta = -31,22264$, $p = 0,0393$) e de TIMP-2 ($\beta = -38,1198$, $p < 0,0001$), e positivamente associada com as razões de MMP-9/TIMP-1 ($\beta = 0,000454$, $p = 0,0525$) e de MMP-2/TIMP-2 ($\beta = 0,003062$, $p < 0,0001$; Figura 9; Tabela 2.).

Tabela 2. Resultado da análise de Regressão Linear Múltipla para MMPs, TIMPs e razão MMP/TIMP, usando Hg no plasma como uma variável independente (N = 159).

	MMP - 9		TIMP - 1		MMP - 9 / TIMP - 1	
	Rsquare	RMSE	Rsquare	RMSE	Rsquare	RMSE
Modelo	0,118105	0,293190	0,229285	79,26685	0,213569	0,001225
	β	P	β	P	β	P
Log Hg plasma	0,081922	0,1424	-31,22264	0,0393	0,000454	0,0525
Log Se plasma	-0,535790	0,0039	-41,84663	0,3980	-0,001721	0,0256
TBARS (nM/mg protein)	0,010404	0,1725	-1,607502	0,4346	0,000029	0,3564
Tabagismo (N)	-0,034367	0,2803	9,983102	0,2462	-0,000251	0,0599
Idade	-0,003349	0,0254	2,187359	<0,0001	-0,000029	<0,0001
Gênero (F)	0,055082	0,0265	-9,505038	0,1547	0,000325	0,0019
IMC	0,001461	0,8107	2,123479	0,1992	-0,000001	0,9680
	MMP - 2		TIMP - 2		MMP - 2 / TIMP - 2	
	Rsquare	RMSE	Rsquare	RMSE	Rsquare	RMSE
Modelo	0,074997	0,373477	0,297096	30,66540	0,167349	0,008594
	β	P	β	P	β	P
Log Hg plasma	0,090222	0,2043	-38,1198	<0,0001	0,003062	<0,0001
Log Se plasma	-0,177821	0,4458	-28,25538	0,1412	-0,000291	0,8987
TBARS (nM/mg protein)	0,000021	0,9983	-2,114915	0,0086	0,000165	0,0836
Tabagismo (N)	-0,002557	0,9496	-8,057496	0,0163	0,000546	0,1696
Idade	-0,000354	0,8518	0,291382	0,0622	-0,000008	0,6765
Gênero (F)	0,046641	0,1384	0,698631	0,7862	0,000303	0,3244
IMC	-0,022333	0,0046	0,784403	0,2201	-0,000215	0,0052

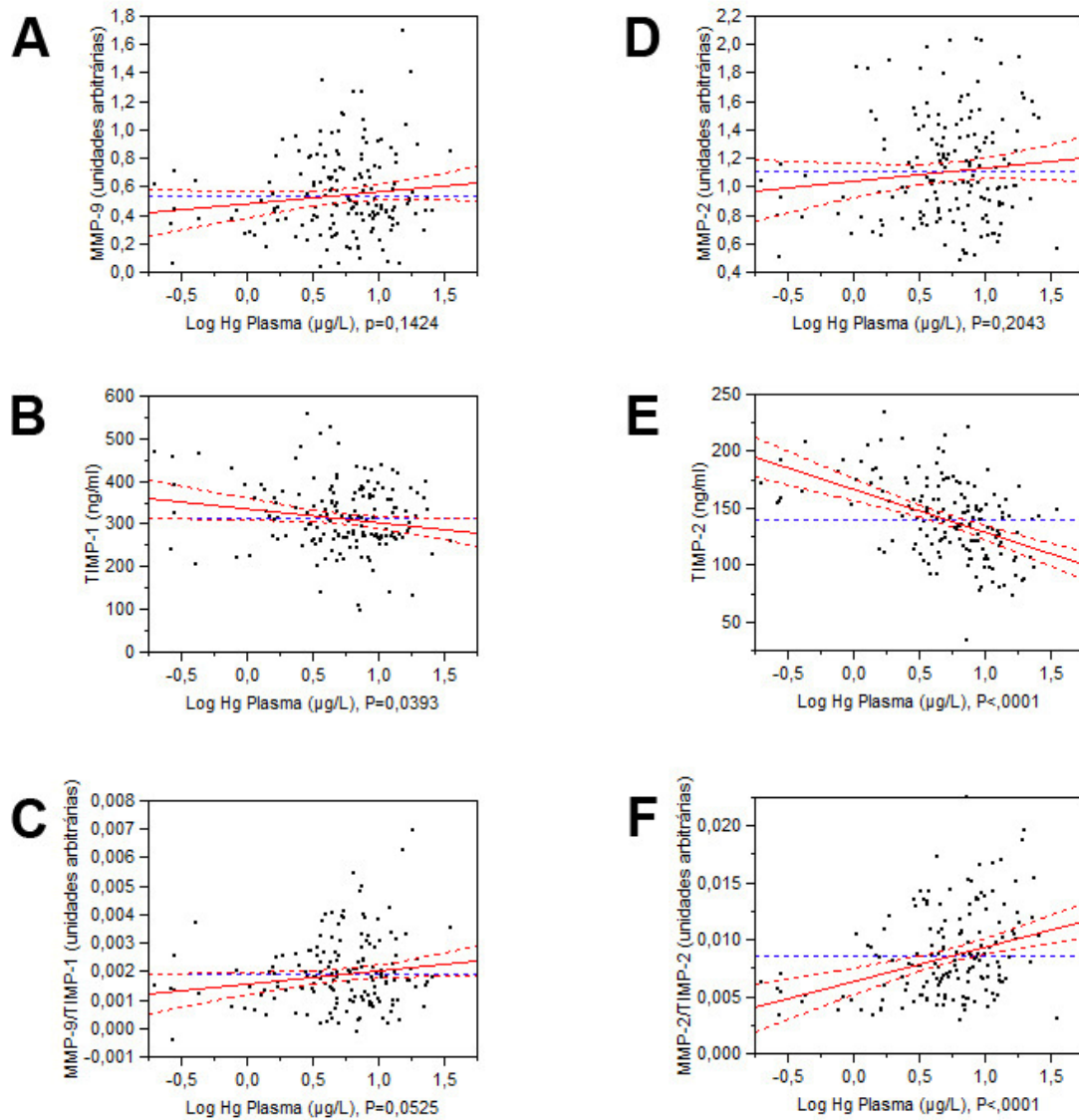


Figura 9. Valores ajustados para MMP-9 (painel A), TIMP-1 (painel B), MMP-9/TIMP-1 (painel C), MMP-2 (painel D), TIMP-2 (painel E), e MMP-2/TIMP-2 (painel F) com log de Hg no plasma como variável independente, levando em consideração: idade, gênero, IMC, tabagismo, log de Se no plasma e TBARS.

Quando incluímos o consumo de peixe como outra variável independente, as concentrações plasmáticas de mercúrio foram positiva e significativamente associadas com MMP-9 ($\beta = 0,116153$, $p = 0,0446$), razão MMP-9/TIMP-1 ($\beta = 0,000607$, $p = 0,0122$) e razão MMP-2/TIMP-2 ($\beta = 0,003308$, $p < 0,0001$), e negativamente associadas com TIMP-1 ($\beta = -40,513880$, $p = 0,0099$) e com TIMP-2 ($\beta = -43,214400$, $p < 0,0001$), enquanto o consumo de peixe foi negativamente associado com MMP-9 ($\beta = -0,012376$, $p = 0,0388$) e com a razão MMP-9/TIMP-1 ($\beta = -0,000055$, $p = 0,0272$), e positivamente associado com TIMP-1 ($\beta = 3,359212$, $p = 0,0381$) e com TIMP-2 ($\beta = 1,841935$, $p = 0,0031$).

Num modelo de regressão múltipla utilizando o consumo de peixe como variável independente, sem levar em conta a concentração de mercúrio, encontramos uma tendência ao consumo de peixe reduzir MMP-9 ($\beta = -0,008931$, $p = 0,1223$) e a razão MMP-9/TIMP-1 ($\beta = -0,000037$, $p = 0,1250$), e a aumentar os níveis de TIMP-1 ($\beta = 2,158046$, $p = 0,1706$). Os níveis de MMP-2 não foram significativamente associados com o consumo de peixes.

5.2. Interação entre polimorfismos da MMP-9 e exposição ao mercúrio, de forma a modificar as concentrações plasmáticas da MMP-9

Características sócio-demográficas e resultados bioquímicos dos 266 participantes envolvidos nesse estudo estão apresentados na tabela 3. Existe correlação significativa entre as concentrações de Hg no sangue e no plasma ($r = 0,7127$; $p < 0,0001$). Embora não tenha diferença com relação à idade, gênero,

IMC, tabagismo, MMP-9 e TIMP-1, entre os três grupos, os indicadores de exposição ao Hg (concentração de Hg no sangue e no plasma) foram diferentes entre os grupos ($p < 0,001$; tabela 3), e o consumo de peixe (indicador indireto de exposição ao Hg neste estudo) foi diferente entre os grupos A e C ($p < 0,05$; tabela 3).

Tabela 3. Características sócio-demográficas e parâmetros bioquímicos da população estudada (N = 266), divididos de acordo com as concentrações plasmáticas de Hg.

		TOTAL				
	N	%	Varição	Média ± SD	Mediana	
N	266					
Idade (anos)			15-87	42±17	40	
Gênero						
Masculino	124	47				
Feminino	142	53				
Índice de Massa Corpórea (kg/m²)			16,4-41,5	24,5±4,4	23,8	
Tabagismo						
Fumante	65	24				
Não fumante	201	76				
Consumo de peixes (refeições/semana)			0-15	6±4	5	
MMP-9 (unidades arbitrárias)			0,05-1,81	0,54±0,29	0,48	
TIMP-1 (ng/mL)			85-696	329±94	320	
Hg sangue (µg/L)			3,5-179,3	43,4±32,6	34,6	
Hg plasma (µg/L)			0,2-30,9	6,1±5,7	4,5	

grupo A [Hg plasma (µg/l): 0.2 – 3.1]					
	N	%	Variação	Média ± SD	Mediana
N	89				
Idade (anos)			15-86	41 ± 18	38
Gênero					
Masculino	42	47			
Feminino	47	53			
Índice de Massa Corpórea (kg/m²)			16,4-41,0	24,2±4,1	24,0
Tabagismo					
Fumante	20	22			
Não fumante	69	78			
Consumo de peixes (refeições/semana)			0-14	5±4*	5
MMP-9 (unidades arbitrárias)			0,12-1,53	0,53±0,27	0,46
TIMP-1 (ng/mL)			192-558	338±93	330
Hg sangue (µg/L)			3,5-83,2	25,8±17,5†	23,6
Hg plasma (µg/L)			0,2-3,1	1,4±0,9††	1,4

grupo B [Hg plasma (µg/l): 3.1 – 6.6]					
	N	%	Variação	Média ± SD	Mediana
N	89				
Idade (anos)			15-87	42±17	42
Gênero					
Masculino	31	35			
Feminino	58	65			
Índice de Massa Corpórea (kg/m²)			16,8-41,5	24,6±4,7	23,2
Tabagismo					
Fumante	26	29			
Não fumante	63	71			
Consumo de peixes (refeições/semana)			0-15	6±4	6
MMP-9 (unidades arbitrárias)			0,08-1,81	0,55±0,31	0,48
TIMP-1 (ng/mL)			150-596	332±97	311
Hg sangue (µg/L)			9,2-144,9	36,1±24,1†	30,2
Hg plasma (µg/L)			3,1-6,6	4,6±1,1†	4,5

	grupo C [Hg plasma (µg/l): 6.8 – 30.9]				
	N	%	Variação	Média ± SD	Mediana
N	88				
Idade (anos)			15-81	43±16	41
Gênero					
Masculino	51	58			
Feminino	37	42			
Índice de Massa Corpórea (kg/m²)			16,8-41,5	24,6-4,7	23,2
Tabagismo					
Fumante	19	22			
Não fumante	69	78			
Consumo de peixes (refeições/semana)			0-15	7±4	6
MMP-9 (unidades arbitrárias)			0,05-1,69	0,55±0,29	0,51
TIMP-1 (ng/mL)			85-696	318±89	319
Hg sangue (µg/L)			18,2-179,3	68,0±36,4	64,0
Hg plasma (µg/L)			6,8-30,9	12,4±5,6	10,4

* p < 0,05 vs. group C; † p < 0,001 vs. group C; ‡ p < 0,001 vs. group B.

Freqüência de alelos e genótipos está mostrada na tabela 4. A freqüência dos alelos C e T do polimorfismo C⁻¹⁵⁶²T da MMP-9 foram 95,49% e 4,51%, respectivamente. A freqüência dos alelos agrupados H e L do microsatélite (CA)_n da MMP-9 foi 64,85% e 35,15%, respectivamente. A distribuição dos genótipos para esses dois polimorfismos mostrou-se de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg [p = 0,5139, para o polimorfismo C⁻¹⁵⁶²T, e p = 0,0989, para o microsatélite (CA)_n].

Tabela 4. Distribuição das freqüências de alelos e genótipos da MMP-9.

Genótipos		
Total (N = 266)		
C⁻¹⁵⁶²T	%	N
CC	91,35	243
CT	8,27	22
TT	0,38	1
(CA)_n	%	N
HH	44,36	118
HL	40,98	109
LL	14,66	39

Alelos		
Total (N=532)		
C⁻¹⁵⁶²T	%	N
C	95,49	508
T	4,51	24
(CA)_n	%	N
H	64,85	345
L	35,15	187

Confirmando a relação entre a concentração plasmática de Hg e os níveis de MMP-9, foi feita uma regressão múltipla num modelo ajustado para sexo, idade, tabagismo e IMC. Não houve relação entre log Hg no plasma e MMP-9 ($\beta = 0,041630$; $p = 0,2371$), no entanto houve associação negativa entre log de Hg no plasma e TIMP-1 ($\beta = -22,89477$; $p = 0,0350$), que resultou em associação positiva entre log de Hg no plasma e a razão MMP-9/TIMP-1 ($\beta = 0,000296$; $p = 0,0408$).

Para determinar a influência dos genótipos da MMP-9 nas concentrações do grau de atividade da MMP-9 em indivíduos expostos ao Hg, foi feita análise de

regressão linear múltipla, ajustando para log da concentração de Hg no plasma, gênero, idade, IMC e tabagismo. Não houve relação entre os polimorfismos da MMP-9 estudados e os níveis de MMP-9 [polimorfismo (CA)_n: p = 0,2363; polimorfismo C⁻¹⁵⁶²T: p = 0,4984], TIMP-1 [polimorfismo (CA)_n: p = 0,6633; polimorfismo C⁻¹⁵⁶²T: p = 0,1053] ou razão MMP-9/TIMP-1 [polimorfismo (CA)_n: p = 0,2252; polimorfismo C⁻¹⁵⁶²T: p = 0,8138].

Assim, dividimos o grupo estudado em terços (com relação à concentração plasmática de Hg) e realizamos uma regressão múltipla para determinar a influência dos genótipos da MMP-9 nos níveis de MMP-9, utilizando como co-variáveis: gênero, idade IMC e tabagismo (o log de Hg no plasma não foi utilizado, pois já estava sendo considerado ao dividir os grupos). Os resultados das análises de regressão múltipla estão mostrados na tabela 5. No grupo A (menores concentrações de Hg no plasma), o polimorfismo microsatélite (CA)_n foi associado aos níveis de MMP-9, com tendência à associação com a razão MMP-9/TIMP-1 (p = 0,0175 e p = 0,0545, respectivamente). O genótipo HH estava associado com maiores níveis de MMP-9 e MMP-9/TIMP-1, enquanto o genótipo LL estava associado com níveis mais baixos de MMP-9 e MMP-9/TIMP-1. MMP-9 e MMP-9/TIMP-1 também estavam positivamente associados com o tabagismo ($\beta = 0,080488$, p = 0,0223; e $\beta = 0,000274$, p = 0,0407, respectivamente), e negativamente associados à idade ($\beta = -0,005478$, p = 0,0006; e $\beta = -0,000029$, p < 0,0001, respectivamente). TIMP-1 estava positivamente associado à idade ($\beta = 1,997077$, p = 0,0006). Não há associação do polimorfismo C⁻¹⁵⁶²T e o grau de atividade da MMP-9, no grupo A. No grupo B (concentrações intermediárias de Hg

no plasma) não houve associação dos polimorfismos $(CA)_n$ e $C^{-1562}T$ da MMP-9 com o grau de atividade da MMP-9. No entanto, houve associação positiva entre TIMP-1 e idade ($\beta = 1,852074$, $p = 0,0052$), e associação negativa da idade com a razão MMP-9/TIMP-1 ($\beta = - 0,000018$, $p = 0,0453$). No grupo C (maiores concentrações de Hg no plasma), não houve associação entre a o grau de atividade da MMP-9 e os polimorfismos $C^{-1562}T$ ou $(CA)_n$. MMP-9 e a razão MMP-9/TIMP-1 estavam positivamente associadas ao tabagismo ($\beta = 0,096122$, $p = 0,0148$; e $\beta = 0,000500$, $p = 0,0032$, respectivamente). A razão MMP-9/TIMP-1 apresenta tendência à associação positiva com o gênero feminino ($\beta = 0,000282$, $p = 0,0580$). Há associação positiva entre TIMP-1 e idade ($\beta = 2,726242$, $p < 0,0001$), que resultou em associação negativa entre idade e a razão MMP-9/TIMP-1 ($\beta = - 0,000027$, $p = 0,0023$).

Tabela 5. Análise de regressão linear múltipla para MMP-9, TIMP-1 e razão MMP-9/TIMP-1 usando genótipos dos polimorfismos C⁻¹⁵⁶²T e (CA)_n da MMP-9 como variáveis independentes (N = 88 ou 89/ grupo; N total = 266).

grupo A						
Modelo	MMP-9		TIMP-1		MMP-9/TIMP-1	
	Rsquare	RMSE	Rsquare	RMSE	Rsquare	RMSE
	β	p	β	p	β	p
(CA) _n		0,0175		0,8578		0,0545
HH	0,107561	0,0115	2,640827	0,8616	0,000358	0,0264
HL	0,057613	0,1668	7,941962	0,5980	0,0001574	0,3198
LL	-0,165174	0,0065	-10,58279	0,6237	-0,000516	0,0247
C ⁻¹⁵⁶² T		0,9347		0,7002		0,8124
CC	0,004847	0,9347	8,280999	0,7002	0,000054	0,8124
CT or TT	-0,004847	0,9347	-8,280999	0,7002	-0,000054	0,8124
Gênero (F)	-0,012037	0,6785	12,34298	0,2437	-0,000071	0,5207
Idade	-0,005478	0,0006	1,997077	0,0006	-0,000029	<0,0001
IMC (kg/m ²)	0,009635	0,1532	0,828118	0,7339	0,000035	0,1722
Tabagismo (Sim)	0,080488	0,0223	-2,216269	0,8602	0,000274	0,0407

grupo B						
Modelo	MMP-9		TIMP-1		MMP-9/TIMP-1	
	Rsquare	RMSE	Rsquare	RMSE	Rsquare	RMSE
	β	p	β	p	β	p
(CA) _n		0,4486		0,2822		0,3194
HH	0,060119	0,2184	2,141025	0,8832	0,000195	0,3289
HL	-0,005527	0,9063	-21,9268	0,1220	0,000153	0,4277
LL	-0,054592	0,3316	19,78576	0,2409	-0,000347	0,1325
C ⁻¹⁵⁶² T		0,9318		0,0672		0,4809
CC	0,005187	0,9318	33,59331	0,0672	-0,000175	0,4809
CT or TT	-0,005187	0,9318	-33,59331	0,0672	0,000175	0,4809
Gênero (F)	0,054986	0,1390	5,160844	0,6410	0,000227	0,1351
Idade	-0,002605	0,2296	1,852074	0,0052	-0,000018	0,0453
IMC (kg/m ²)	0,009483	0,2256	-1,583779	0,4981	0,000035	0,2701
Tabagismo (Sim)	0,027636	0,4664	7,272700	0,5222	0,000017	0,9104

grupo C						
Modelo	MMP-9		TIMP-1		MMP-9/TIMP-1	
	Rsquare	RMSE	Rsquare	RMSE	Rsquare	RMSE
	0,268531	0,261368	0,25587	80,43960	0,225546	0,001230
	β	p	β	p	β	p
(CA)n		0,5658		0,6976		0,5081
HH	-0,036523	0,4387	11,10336	0,3977	-0,000233	0,2460
HL	-0,032839	0,4768	-0,483828	0,9699	0,000006	0,9767
LL	0,069362	0,2876	-10,61953	0,5575	0,000228	0,4115
C ⁻¹⁵⁶² T		0,4289		0,9599		0,2614
CC	0,039250	0,4289	0,692024	0,9599	0,000238	0,2614
CT or TT	-0,039250	0,4289	-0,692024	0,9599	-0,000238	0,2614
Gênero (F)	0,044278	0,2025	-6,917580	0,4727	0,000282	0,0580
Idade	-0,000303	0,8815	2,726242	<0,0001	-0,000027	0,0023
IMC (kg/m ²)	0,001663	0,8337	1,441399	0,5134	-0,000006	0,8629
Tabagismo (Sim)	0,096122	0,0148	-7,087162	0,5112	0,000500	0,0032

6. Discussão

6.1. Associação dos níveis plasmáticos de MMPs-2 e -9 (e seus inibidores endógenos: TIMPs-1 e -2) com os níveis circulantes de mercúrio

Neste estudo é reportado pela primeira vez que a concentração plasmática de mercúrio está positivamente associada com a razão MMP-9/TIMP-1 e com a razão MMP-2/TIMP-2, sugerindo assim que a exposição ao mercúrio aumenta o grau de atividade das MMPs -2 e -9. Este aumento pode levar ao aumento da susceptibilidade a doenças cardiovasculares, como sugerido por evidências mostradas em estudos anteriores [48-51, 96, 97].

Enquanto as concentrações de mercúrio no cabelo e no sangue total são mais frequentemente utilizados como biomarcadores de exposição ao mercúrio, tanto para screening, diagnóstico e biomonitoramento [10], nossos resultados sugerem que o mercúrio plasmático pode ser um índice relevante de exposição e de riscos à saúde associados com o mercúrio, devido à sua cinética. A única relação significativa com o mercúrio no sangue total foi a diminuição dos níveis de TIMP-2. Esta diminuição do TIMP-2 associada ao mercúrio no sangue foi menos significativa que a observada na associação com as concentrações plasmáticas de mercúrio. Quando consideramos as concentrações plasmáticas de mercúrio como uma variável independente, outros resultados significativos são encontrados nos graus de atividade das MMPs -2 e -9. Uma possível explicação para esse efeito proeminente do mercúrio plasmático poderia ser o fato de que, embora menos disponível para a distribuição aos órgãos, ele pode representar um risco maior

para as doenças cardiovasculares, pois essas doenças são causadas por dano às paredes vasculares e coração, que estão em contato com o plasma. Além disso, os efeitos tóxicos produzidos pela exposição ao mercúrio podem estar associados às concentrações plasmáticas de mercúrio, pois estas podem melhor refletir a fração de mercúrio que está mais rapidamente disponível para trocas na corrente sanguínea. Esta fração pode estar mais disponível para agir nas células endoteliais, e assim exercer os efeitos tóxicos. Essas diferenças entre o mercúrio plasmático e o mercúrio sanguíneo são particularmente interessantes devido à alta correlação entre os dois.

MMPs podem ser reguladas em nível transcricional e traducional, por modificações pós-traducionais, e por interações com seus inibidores endógenos (TIMPs). MMPs e TIMPs estão em um balanço delicado sobre circunstâncias normais, e esse balanço é o principal determinante da composição da matriz extracelular [66]. Embora os TIMPs não sejam inibidores específicos de nenhuma MMP, TIMP-1 e TIMP-2 são os principais inibidores da MMP-9 e MMP-2, respectivamente [98, 99]. Assim, a medida das razões de MMP-9/TIMP-1 e MMP-2/TIMP-2 podem levar a uma melhor informação com relação aos graus de atividade dessas duas MMPs. Além do mais, muitas doenças estão relacionados com descontrole do grau de atividade dessas enzimas, assim levando a aumento na destruição e remodelamento tecidual [100]. Apesar do fato de não termos encontrado diferenças significativas nos níveis de MMP-2 ou MMP-9 associadas às concentrações de mercúrio plasmáticas, encontramos relações significativamente negativas entre as concentrações plasmáticas de mercúrio e os

níveis de TIMP-1 e TIMP-2, resultando em relações significativas entre as concentrações de mercúrio e as razões de MMP-9/TIMP-1 e MMP-2/TIMP-2. Esses achados são consistentes com a idéia de que a exposição ao mercúrio leva ao aumento do grau de atividade das MMPs-2 e -9. No entanto, ainda permanece tendo de ser elucidado se o aumento na atividade de MMPs leva a um aumento do risco cardiovascular associado à exposição ao Hg [28, 29, 31, 34, 35].

Elevados níveis de Hg em peixes e humanos foram reportados na Amazônia Brasileira, e relações significativas entre o consumo de peixes e os bioindicadores da exposição ao Hg tem sido consistentemente descritos [27, 84]. O peixe é um importante veículo de transmissão de Hg para o homem na sua forma orgânica (metilmercúrio) [28], e há evidências de associação entre o consumo de peixes e Hg inorgânico nesta região [101]. Neste estudo, nós não especificamos o Hg (orgânico ou inorgânico).

Quando o consumo de peixe foi incluído no modelo de regressão múltipla, a associação entre o mercúrio plasmático e o grau de atividade da MMP-9 foi mais forte, enquanto a associação com o grau de atividade da MMP-2 não foi alterada. Por outro lado, o consumo de peixe foi negativamente associado com MMP-9 e a razão MMP-9/TIMP-1 e positivamente associado com TIMP-1 e TIMP-2 neste modelo de regressão. Mesmo quando o mercúrio foi removido do modelo de regressão, as relações entre o consumo de peixe e os graus de atividades das MMPs continuaram presentes. O consumo de peixe parece ter um efeito benéfico, o que pode combater o efeito negativo da exposição ao mercúrio. Isto pode ter

base nas propriedades cardioprotetoras do consumo de peixes (presença de ácidos graxos essenciais).

As comunidades ribeirinhas estudadas são da Bacia do Rio Tapajós, que é um dos mais importantes afluentes do Rio Amazonas. A principal fonte de exposição ao Hg para essas comunidades ribeirinhas remotas é o consumo de peixes contendo Hg. Para essas populações, que dependem do peixe como principal fonte de proteína, isso representa um importante dilema de saúde pública, sobretudo porque há evidências de efeitos tanto cardioprotetores quanto cardiotoxicos associados ao consumo de peixes, devido primariamente aos ácidos graxos essenciais [28, 85]. Estudos subseqüentes nesta região devem examinar o papel dos ácidos graxos essenciais.

Níveis relativamente elevados de Se também foram reportados na Amazônia Brasileira [102]. A dieta representa a principal via de obtenção do Se [103]. Em outra região da Amazônia, foi demonstrado que determinadas espécies de peixes da Amazônia podem ser boas fontes de Se [103]. No entanto, em nossa área de estudo, Lemire et al. não observaram relação geral entre o consumo de peixes e Se, embora o consumo de peixes seja muito elevado [103]. No entanto, certas espécies de castanha, como a castanha do Pará (Brazil nuts - *Bertholletia excelsa* Humb. e Bonpl.) e nozes (Paradise nuts - *Lecythis usitata* Miers) da família Lecythidaceae, são conhecidas por acumular altos níveis de Se dos solos. Na região estudada, existem importantes variações na disponibilidade de diferentes tipos de comida durante o ano, e variações nas concentrações de Se no cabelo

sugerem que podem existir fontes sazonais de Se nos alimentos locais, que poderiam refletir nas concentrações de Se no plasma e no sangue total [102].

Nesse estudo, nós levamos em consideração as variáveis que poderiam influenciar os níveis de MMPs ou TIMPs, incluindo TBARS, selênio plasmático, tabagismo, idade, gênero e IMC. Elevado estresse oxidativo (medido como concentração de TBARS) é considerado o um importante fator modulador de expressão/atividade de MMP-2 e -9 [36, 66]. TBARS mostrou uma tendência a associação positiva com a razão MMP-2/TIMP-2, devido à associação negativa significativa com TIMP-2, mas não apresentou alterações significativas na razão MMP-9/TIMP-1.

É possível que o selênio produza efeitos antioxidantes e atenuo o aumento no estresse oxidativo associado à exposição ao mercúrio [42, 104, 105]. Além disso, o selênio pode formar complexos de alto peso molecular com o mercúrio e uma proteína plasmática, assim, atenuando a toxicidade associada à exposição ao mercúrio [41]. No entanto, a maioria dos estudos foi feita com Se inorgânico, e a natureza dessas interações ainda é pouco entendida [103]. As concentrações de selênio plasmáticas foram negativamente relacionadas com a razão MMP-9/TIMP-1 devido à diminuição na MMP-9 relacionada ao selênio (que também pode ser vista no modelo univariado). Isso pode refletir o efeito antioxidante produzido pelo selênio. Estudos posteriores são necessários para entender as possíveis relações entre o Se da dieta e o Hg.

Outras variáveis incluindo tabagismo, gênero, idade ou IMC também afetam a concentrações das razões de MMP/TIMP e, portanto, foram levados em consideração no nosso modelo de regressão múltipla.

Foram mostrados níveis aumentados de MMPs-2 e -9 em pacientes obesos [106]. No entanto, nossos resultados mostram relação negativa significativa entre IMC e níveis de MMP-2 e também com a fração MMP-2/TIMP-2, mas positivamente relacionado ao TIMP-1 (regressão univariada). Deve-se notar que o índice de massa corpórea era baixo, e poucas pessoas nessas comunidades são obesas.

Nesse estudo, o tabagismo foi negativamente associado com TIMP-2, mas não com a concentração circulante de MMPs, embora estudos prévios tenham mostrado uma relação positiva entre o tabagismo e os níveis de MMPs [107-112]. Esses achados podem resultar do pequeno número de fumantes neste estudo.

Embora se saiba do maior risco cardiovascular em populações mais velhas, sendo esperado um aumento nos níveis de MMPs com a idade, foi encontrada uma associação negativa da idade com MMP-9 e com a razão MMP-9/TIMP-1 e um aumento nos níveis de TIMP-1. Associações similares também foram encontradas em outros estudos [113, 114]. No entanto, não foi encontrada associação entre idade e o grau de atividade da MMP-2.

Relações precisas entre MMPs e o gênero ainda não estão bem estabelecidas. Todavia, é possível que existam diferenças gênero-específicas nos mecanismos fisiopatológicos das doenças cardiovasculares [115]. Nós

encontramos, níveis significativamente mais altos da razão MMP-9/TIMP-1 em mulheres (análise univariada) quando comparado com homens, e este achado foi confirmado com o modelo de regressão linear múltipla.

Desta forma, foi encontrada associação positiva entre os graus de atividades das MMPs -9 e -2 no plasma, e as concentrações plasmáticas de mercúrio, sugerindo um possível mecanismo pelo qual o mercúrio pode aumentar a susceptibilidade a doenças cardiovasculares.

6.2. Interação entre polimorfismos da MMP-9 e exposição ao mercúrio, de forma a modificar as concentrações plasmáticas da MMP-9

O principal novo achado reportado neste estudo é de que os genótipos do polimorfismo microssatélite (CA)_n da MMP-9 estão associados com os níveis de MMP-9 e MMP-9/TIMP-1 em pessoas expostas ao mercúrio em baixas concentrações. No entanto, esse polimorfismo não teve grande influência sobre os níveis de MMP-9 em pessoas com níveis intermediários ou altos de Hg. Além disso, não foi encontrada associação entre o polimorfismo C⁻¹⁵⁶²T e os níveis de MMP-9. Esses resultados sugerem que os genótipos do polimorfismo (CA)_n podem influenciar os níveis de MMP-9 em pessoas expostas a baixos níveis de Hg. Os níveis mais elevados de MMP-9 em indivíduos que apresentam o genótipo HH podem levar a maior suscetibilidade a doenças cardiovasculares, como sugerido por alguns estudos [48, 96, 97]. Com exposição média ou elevada ao mercúrio,

outros fatores podem ser mais relevantes do que os fatores genéticos associados a esse polimorfismo.

Conforme discutido anteriormente, níveis elevados de Hg em peixes e humanos foram reportados na Amazônia Brasileira, e relações significativas entre o consumo de peixes e os bioindicadores da exposição ao Hg tem sido consistentemente descritos [27, 84]. O consumo de peixes contendo Hg é a principal fonte de exposição ao Hg para as comunidades ribeirinhas da Bacia do Rio Tapajós (população estudada), as quais também dependem de peixes como sua principal fonte de proteína. Diferenças nos níveis plasmáticos de Hg refletem diferenças no consumo de peixes, o que pode ser visto quando comparamos os grupos A (concentrações mais baixas de Hg) e C (concentrações mais elevadas de Hg) (Tabela 1).

Como no estudo anterior, utilizamos as concentrações de mercúrio no plasma durante as análises, pois esta fração do sangue está em contato com as paredes vasculares e coração, podendo exercer efeitos tóxicos consideráveis.

Neste estudo, também analisamos a medida da razão MMP-9/TIMP-1, que pode levar a uma melhor informação com relação ao grau de atividade dessa MMP.

Como não temos uma população de estudo homogênea, no presente estudo, foram levadas em consideração variáveis que pudessem influenciar os níveis de MMP-9 ou TIMP-1, incluindo as concentrações plasmáticas de Hg, tabagismo, idade, gênero e IMC. Devido à relação significativa entre o consumo de peixes e

os bioindicadores de exposição ao Hg, o consumo de peixe não foi incluído nos modelos. Diferente do estudo anterior, concentrações de Se no plasma e TBARS não foram significativas associadas aos graus de atividade da MMP-9 e, portanto, não foram incluídas nos modelos de regressão múltipla.

Assim como no estudo anterior, as concentrações plasmáticas de Hg foram positivamente associadas ao grau de atividade da MMP-9.

Quando analisamos a possível influência dos genótipos da MMP-9 nos graus de atividade da MMP-9 em indivíduos expostos ao Hg, primeiramente não foi encontrada nenhuma relação entre os polimorfismos (CA)_n e C⁻¹⁵⁶²T da MMP-9 e os graus de atividade da MMP-9. No entanto, quando dividimos o grupo de estudo em terços, encontramos uma relação positiva entre os graus de atividade da MMP-9 em pessoas expostas ao Hg em baixas concentrações e o microsatélite (CA)_n. Pessoas de genótipo HH apresentaram níveis mais altos de MMP-9 quando comparados com pessoas com o genótipo LL. Esses achados são consistentes com achados *in vitro*, onde maior número de repetições do microsatélite (CA) foi associado com atividade aumentada da região promotora da MMP-9 [80], que pode levar a níveis aumentados de MMP-9, quando comparado com menores números de repetições. Níveis elevados de MMP-9 podem resultar em doenças cardiovasculares [48, 96, 97]. Em níveis intermediários e elevados de exposição ao Hg não encontramos nenhuma relação entre o polimorfismo (CA)_n e o grau de atividade da MMP-9. Nesses casos, outros fatores capazes de aumentar os níveis de MMP-9, como a exposição ao Hg propriamente dita, podem ser mais relevantes do que os efeitos genéticos associados com esses polimorfismos. Não há estudos

na literatura que possam sugerir mecanismos que expliquem a falta de interação entre esses polimorfismos e a concentração de mercúrio nos dois grupos com as maiores concentrações. Sugerimos que estudos experimentais, bem controlados, sejam feitos para clarificar essa questão. De qualquer modo, esses achados sugerem que indivíduos expostos a baixas concentrações de mercúrio, e que sejam portadores de alelos H, estejam expostos a risco cardiovascular aumentado. Esta sugestão também merece estudo clínico futuro, uma vez que não avaliamos a incidência de eventos cardiovasculares relevantes nesse indivíduos.

Uma possível razão para a falta de associação significativa entre os níveis de MMP-9 e o polimorfismo C⁻¹⁵⁶²T em indivíduos expostos ao Hg pode ser o pequeno número amostral (N = 88 ou 89/grupo), o que pode ter limitado o poder de detectar os possíveis efeitos associados com o alelo raro (T).

Analisando as outras variáveis incluídas nos modelos de regressão múltipla, encontramos relação positiva entre o tabagismo e os níveis de MMP-9. A idade foi negativamente associada ao grau de atividade da MMP-9. Encontramos uma tendência a maiores níveis da razão MMP-9/TIMP-1 em mulheres quando comparado comparados com homens, no grupo C (concentrações mais altas de Hg).

7. Conclusão

7.1. Associação dos níveis plasmáticos de MMPs-2 e -9 (e seus inibidores endógenos: TIMPs-1 e -2) com os níveis circulantes de mercúrio

Foi encontrada associação positiva entre os graus de atividades das MMPs - 9 e -2 no plasma, e as concentrações plasmáticas de mercúrio, sugerindo um possível mecanismo pelo qual o mercúrio pode aumentar a susceptibilidade a doenças cardiovasculares. Esses resultados fornecem uma nova perspectiva sobre os mecanismos biológicos que possivelmente desempenham um papel na toxicidade do Hg, especialmente em termos de doenças cardiovasculares. A relação causal entre a exposição ao Hg e o aumento da susceptibilidade às doenças cardiovasculares através de mecanismos envolvendo MMPs, no entanto, permanece tendo de ser provado.

7.2. Interação entre polimorfismos da MMP-9 e exposição ao mercúrio, de forma a modificar as concentrações plasmáticas da MMP-9

Nossos achados sugerem uma interação significativa entre o polimorfismo (CA)_n e baixos níveis de exposição ao Hg, possivelmente aumentando o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares em indivíduos de genótipo HH.

8. Referências bibliográficas

1. Clarkson, T.W. and L. Magos, *The toxicology of mercury and its chemical compounds*. Crit Rev Toxicol, 2006. **36**(8): p. 609-62.
2. Alessio, L., M. Campagna, and R. Lucchini, *From lead to manganese through mercury: mythology, science, and lessons for prevention*. Am J Ind Med, 2007. **50**(11): p. 779-87.
3. Clarkson, T.W., J.B. Vyas, and N. Ballatori, *Mechanisms of mercury disposition in the body*. Am J Ind Med, 2007. **50**(10): p. 757-64.
4. Clifton, J.C., 2nd, *Mercury exposure and public health*. Pediatr Clin North Am, 2007. **54**(2): p. 237-69, viii.
5. Mitchell, R.J., P.B. Osborne, and J.E. Haubenreich, *Dental amalgam restorations: daily mercury dose and biocompatibility*. J Long Term Eff Med Implants, 2005. **15**(6): p. 709-21.
6. Barbosa, A.C., et al., *Mercury biomagnification in a tropical black water, Rio Negro, Brazil*. Arch Environ Contam Toxicol, 2003. **45**(2): p. 235-46.
7. Magos, L., et al., *The comparative toxicology of ethyl- and methylmercury*. Arch Toxicol, 1985. **57**(4): p. 260-7.
8. Medrado-Faria, M.A., *Mercurialismo metálico crônico ocupacional*. Rev Saúde Pública, 2003. **37**(1): p. 116-27.
9. Holmes, P., K.A. James, and L.S. Levy, *Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health?* Sci Total Environ, 2009. **408**(2): p. 171-82.

10. Budtz-Jorgensen, E., et al., *Association between mercury concentrations in blood and hair in methylmercury-exposed subjects at different ages*. Environ Res, 2004. **95**(3): p. 385-93.
11. (NCCLS), N.C.f.C.L.S., *Control of Pre-Analytical Variance in trace Element Determinations; Approved Guideline*, in Document C38-A. 1997.
12. Control, C.o.D., *Second National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals*. 2003, NCEH: Atlanta, CA. p. 1-251.
13. *Toxicological Profile for Mercury*, U.S.D.o.H.a.H.S.P.H. Service, Editor. 1999, Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Atlanta, GA.
14. Chan, H.M. and G.M. Egeland, *Fish consumption, mercury exposure, and heart diseases*. Nutr Rev, 2004. **62**(2): p. 68-72.
15. Counter, S.A. and L.H. Buchanan, *Mercury exposure in children: a review*. Toxicol Appl Pharmacol, 2004. **198**(2): p. 209-30.
16. Nuttall, K.L., *Interpreting mercury in blood and urine of individual patients*. Ann Clin Lab Sci, 2004. **34**(3): p. 235-50.
17. Ekino, S., et al., *Minamata disease revisited: an update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning*. J Neurol Sci, 2007. **262**(1-2): p. 131-44.
18. Tamashiro, H., et al., *Causes of death in Minamata disease: analysis of death certificates*. Int Arch Occup Environ Health, 1984. **54**(2): p. 135-46.
19. da Silva Brabo, E., et al., *Mercury contamination of fish and exposures of an indigenous community in Para state, Brazil*. Environ Res, 2000. **84**(3): p. 197-203.

20. de Jesus, I.M., et al., *Exposure to elemental mercury in urban workers and gold miners from the Tapajos Region, Para, Brazil*. Bull Environ Contam Toxicol, 2001. **67**(3): p. 317-23.
21. Brabo, E.D., et al., [*Mercury levels in fish consumed by the Sai Cinza indigenous community, Munduruku Reservation, Jacareacanga County, State of Para, Brazil*]. Cad Saude Publica, 1999. **15**(2): p. 325-31.
22. de Oliveira Santos, E., *Diagnosis of Health Conditions in a Pan-Mining Community in the Tapajós River Basis, Itaituba, Pará, Brazil*. Cad Saude Publica, 1993. **11**(2): p. 212-25.
23. Mascarenhas, A.F., *Mercury concentration assessment in bottom sediments and suspended solid from the Acre river, in the state of Acre, Brazil*. Acta Amazonia, 2004. **34**(1): p. 61-8.
24. de Oliveira Santos, E., *Mercury in the Negro river, Brazilian Amazon - preliminary study of exposure indicators in fish and human populations*. Cad Saude Publica, 2005. **13**(1): p. 225-36.
25. Harada, M., et al., *Mercury pollution in the Tapajos River basin, Amazon: mercury level of head hair and health effects*. Environ Int, 2001. **27**(4): p. 285-90.
26. Nevado, J.J., et al., *Mercury in the Tapajos River basin, Brazilian Amazon: a review*. Environ Int. **36**(6): p. 593-608.
27. Passos, C.J. and D. Mergler, *Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review*. Cad Saude Publica, 2008. **24 Suppl 4**: p. s503-20.

28. Guallar, E., et al., *Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction*. N Engl J Med, 2002. **347**(22): p. 1747-54.
29. Salonen, J.T., et al., *Mercury accumulation and accelerated progression of carotid atherosclerosis: a population-based prospective 4-year follow-up study in men in eastern Finland*. Atherosclerosis, 2000. **148**(2): p. 265-73.
30. Salonen, J.T., et al., *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**(3): p. 645-55.
31. Virtanen, J.K., et al., *Mercury, fish oils, and risk of acute coronary events and cardiovascular disease, coronary heart disease, and all-cause mortality in men in eastern Finland*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(1): p. 228-33.
32. Schoeman, K., et al., *Defining a lowest observable adverse effect hair concentrations of mercury for neurodevelopmental effects of prenatal methylmercury exposure through maternal fish consumption: a systematic review*. Ther Drug Monit, 2009. **31**(6): p. 670-82.
33. Kishimoto, T., T. Oguri, and M. Tada, *Effect of methylmercury (CH₃HgCl) injury on nitric oxide synthase (NOS) activity in cultured human umbilical vascular endothelial cells*. Toxicology, 1995. **103**(1): p. 1-7.
34. Boffetta, P., et al., *Mortality from cardiovascular diseases and exposure to inorganic mercury*. Occup Environ Med, 2001. **58**(7): p. 461-6.
35. Virtanen, J.K., et al., *Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases*. J Nutr Biochem, 2007. **18**(2): p. 75-85.

36. Nelson, K.K. and J.A. Melendez, *Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases*. Free Radic Biol Med, 2004. **37**(6): p. 768-84.
37. Ra, H.J. and W.C. Parks, *Control of matrix metalloproteinase catalytic activity*. Matrix Biol, 2007. **26**(8): p. 587-96.
38. Furst, A., *Can nutrition affect chemical toxicity?* Int J Toxicol, 2002. **21**(5): p. 419-24.
39. Passos, C.J., et al., *Epidemiologic confirmation that fruit consumption influences mercury exposure in riparian communities in the Brazilian Amazon*. Environ Res, 2007. **105**(2): p. 183-93.
40. Peraza, M.A., et al., *Effects of micronutrients on metal toxicity*. Environ Health Perspect, 1998. **106 Suppl 1**: p. 203-16.
41. Watanabe, C., *Modification of mercury toxicity by selenium: practical importance?* Tohoku J Exp Med, 2002. **196**(2): p. 71-7.
42. Chen, C., et al., *The roles of serum selenium and selenoproteins on mercury toxicity in environmental and occupational exposure*. Environ Health Perspect, 2006. **114**(2): p. 297-301.
43. Ohbayashi, H., *Matrix metalloproteinases in lung diseases*. Curr Protein Pept Sci, 2002. **3**(4): p. 409-21.
44. Ye, S., *Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases*. Matrix Biol, 2000. **19**(7): p. 623-9.
45. Hu, J., et al., *Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(6): p. 480-98.

46. Murphy, G., et al., *Matrix metalloproteinases in arthritic disease*. Arthritis Res, 2002. **4 Suppl 3**: p. S39-49.
47. Visse, R. and H. Nagase, *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry*. Circ Res, 2003. **92**(8): p. 827-39.
48. Blankenberg, S., et al., *Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease*. Circulation, 2003. **107**(12): p. 1579-85.
49. Sundstrom, J. and R.S. Vasan, *Circulating biomarkers of extracellular matrix remodeling and risk of atherosclerotic events*. Curr Opin Lipidol, 2006. **17**(1): p. 45-53.
50. Demacq, C., et al., *Inverse relationship between markers of nitric oxide formation and plasma matrix metalloproteinase-9 levels in healthy volunteers*. Clin Chim Acta, 2008. **394**(1-2): p. 72-6.
51. Garvin, P., et al., *Circulating matrix metalloproteinase-9 is associated with cardiovascular risk factors in a middle-aged normal population*. PLoS One, 2008. **3**(3): p. e1774.
52. Brown, D.L., et al., *Identification of 92-kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with unstable angina*. Circulation, 1995. **91**(8): p. 2125-31.
53. Galis, Z.S. and J.J. Khatri, *Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly*. Circ Res, 2002. **90**(3): p. 251-62.

54. Galis, Z.S., et al., *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques*. J Clin Invest, 1994. **94**(6): p. 2493-503.
55. Loftus, I.M., et al., *Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption*. Stroke, 2000. **31**(1): p. 40-7.
56. Kai, H., et al., *Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes*. J Am Coll Cardiol, 1998. **32**(2): p. 368-72.
57. Armstrong, P.J., et al., *Differential gene expression in human abdominal aorta: aneurysmal versus occlusive disease*. J Vasc Surg, 2002. **35**(2): p. 346-55.
58. McMillan, W.D., et al., *In situ localization and quantification of mRNA for 92-kD type IV collagenase and its inhibitor in aneurysmal, occlusive, and normal aorta*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(8): p. 1139-44.
59. Palombo, D., et al., *Matrix metalloproteinases. Their role in degenerative chronic diseases of abdominal aorta*. J Cardiovasc Surg (Torino), 1999. **40**(2): p. 257-60.
60. Hojo, Y., et al., *Expression of matrix metalloproteinases in patients with acute myocardial infarction*. Jpn Circ J, 2001. **65**(2): p. 71-5.
61. Pasterkamp, G., et al., *Atherosclerotic arterial remodeling and the localization of macrophages and matrix metalloproteinases 1, 2 and 9 in the human coronary artery*. Atherosclerosis, 2000. **150**(2): p. 245-53.

62. Noji, Y., et al., *Increased circulating matrix metalloproteinase-2 in patients with hypertrophic cardiomyopathy with systolic dysfunction*. *Circ J*, 2004. **68**(4): p. 355-60.
63. Cargill, M., et al., *Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes*. *Nat Genet*, 1999. **22**(3): p. 231-8.
64. Sachidanandam, R., et al., *A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms*. *Nature*, 2001. **409**(6822): p. 928-33.
65. Crawford, D.C., D.T. Akey, and D.A. Nickerson, *The patterns of natural variation in human genes*. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2005. **6**: p. 287-312.
66. Van den Steen, P.E., et al., *Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2002. **37**(6): p. 375-536.
67. Zhang, B., et al., *Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis*. *Circulation*, 1999. **99**(14): p. 1788-94.
68. Morgan, A.R., et al., *Haplotypic analysis of the MMP-9 gene in relation to coronary artery disease*. *J Mol Med*, 2003. **81**(5): p. 321-6.
69. Grieu, F., W.Q. Li, and B. Iacopetta, *Genetic polymorphisms in the MMP-2 and MMP-9 genes and breast cancer phenotype*. *Breast Cancer Res Treat*, 2004. **88**(3): p. 197-204.

70. Matsumura, S., et al., *A single nucleotide polymorphism in the MMP-9 promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer.* J Cancer Res Clin Oncol, 2005. **131**(1): p. 19-25.
71. Jones, G.T., et al., *Functional matrix metalloproteinase-9 polymorphism (C-1562T) associated with abdominal aortic aneurysm.* J Vasc Surg, 2003. **38**(6): p. 1363-7.
72. Lamblin, N., et al., *Polymorphisms in the promoter regions of MMP-2, MMP-3, MMP-9 and MMP-12 genes as determinants of aneurysmal coronary artery disease.* J Am Coll Cardiol, 2002. **40**(1): p. 43-8.
73. Peters, D.G., et al., *Functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-9 promoter as a potential risk factor for intracranial aneurysm.* Stroke, 1999. **30**(12): p. 2612-6.
74. Pollanen, P.J., et al., *Coronary artery complicated lesion area is related to functional polymorphism of matrix metalloproteinase 9 gene: an autopsy study.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(9): p. 1446-50.
75. Mason, D.P., et al., *Matrix metalloproteinase-9 overexpression enhances vascular smooth muscle cell migration and alters remodeling in the injured rat carotid artery.* Circ Res, 1999. **85**(12): p. 1179-85.
76. Zempo, N., et al., *Matrix metalloproteinases of vascular wall cells are increased in balloon-injured rat carotid artery.* J Vasc Surg, 1994. **20**(2): p. 209-17.

77. Demacq, C., et al., *Genetic polymorphism of matrix metalloproteinase (MMP)-9 does not affect plasma MMP-9 activity in healthy subjects*. Clin Chim Acta, 2006. **365**(1-2): p. 183-7.
78. Fiotti, N., et al., *MMP-9 microsatellite polymorphism and susceptibility to carotid arteries atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(6): p. 1330-6.
79. St Jean, P.L., et al., *Characterization of a dinucleotide repeat in the 92 kDa type IV collagenase gene (CLG4B), localization of CLG4B to chromosome 20 and the role of CLG4B in aortic aneurysmal disease*. Ann Hum Genet, 1995. **59**(Pt 1): p. 17-24.
80. Shimajiri, S., et al., *Shortened microsatellite d(CA)₂₁ sequence down-regulates promoter activity of matrix metalloproteinase 9 gene*. FEBS Lett, 1999. **455**(1-2): p. 70-4.
81. Fornoni, A., et al., *Association of a decreased number of d(CA) repeats in the matrix metalloproteinase-9 promoter with glomerulosclerosis susceptibility in mice*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(8): p. 2068-76.
82. Huang, T.S., et al., *Shortening of microsatellite deoxy(CA) repeats involved in GL331-induced down-regulation of matrix metalloproteinase-9 gene expression*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **300**(4): p. 901-7.
83. Fiotti, N., et al., *MMP-9 microsatellite polymorphism: association with the progression of intima-media thickening and constrictive remodeling of carotid atherosclerotic plaques*. Atherosclerosis, 2005. **182**(2): p. 287-92.

84. Passos, C.J., et al., *Daily mercury intake in fish-eating populations in the Brazilian Amazon*. J Expo Sci Environ Epidemiol, 2008. **18**(1): p. 76-87.
85. Fillion, M., et al., *A preliminary study of mercury exposure and blood pressure in the Brazilian Amazon*. Environ Health, 2006. **5**: p. 29.
86. Barbosa, F., Jr., R.F. Gerlach, and J.E. Tanus-Santos, *Matrix metalloproteinase-9 activity in plasma correlates with plasma and whole blood lead concentrations*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2006. **98**(6): p. 559-64.
87. Berglund, M., et al., *Inter-individual variations of human mercury exposure biomarkers: a cross-sectional assessment*. Environ Health, 2005. **4**: p. 20.
88. Palmer, C.D., et al., *Determination of lead, cadmium and mercury in blood for assessment of environmental exposure: a comparison between inductively coupled plasma-mass spectrometry and atomic absorption spectrometry*. Spectrochim Acta Part B At Spectrosc, 2006. **61**: p. 980–90.
89. Gouille, J.P., et al., *Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair. Reference values*. Forensic Sci Int, 2005. **153**(1): p. 39-44.
90. Barceloux, D.G., *Selenium*. J Toxicol Clin Toxicol, 1999. **37**(2): p. 145-72.
91. Zachara, B.A., et al., *Red blood cell and plasma glutathione peroxidase activities and selenium concentration in patients with chronic kidney disease: a review*. Acta Biochim Pol, 2006. **53**(4): p. 663-77.
92. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.

93. Buege, J.A. and S.D. Aust, *Microsomal lipid peroxidation*. Methods Enzymol, 1978. **52**: p. 302-10.
94. Wang, J., et al., *Polymorphism in the gelatinase B gene and the severity of coronary arterial stenosis*. Clin Sci (Lond), 2001. **101**(1): p. 87-92.
95. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. 1977. Biotechnology, 1992. **24**: p. 104-8.
96. Timms, P.M., et al., *Circulating MMP9, vitamin D and variation in the TIMP-1 response with VDR genotype: mechanisms for inflammatory damage in chronic disorders?* QJM, 2002. **95**(12): p. 787-96.
97. Zouridakis, E., et al., *Markers of inflammation and rapid coronary artery disease progression in patients with stable angina pectoris*. Circulation, 2004. **110**(13): p. 1747-53.
98. Chow, A.K., J. Cena, and R. Schulz, *Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature*. Br J Pharmacol, 2007. **152**(2): p. 189-205.
99. Goldberg, G.I., et al., *Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin*. J Biol Chem, 1992. **267**(7): p. 4583-91.
100. Tan, J., et al., *Impact of the metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 system on large arterial stiffness in patients with essential hypertension*. Hypertens Res, 2007. **30**(10): p. 959-63.

101. Passos, C.J., et al., *Fish consumption and bioindicators of inorganic mercury exposure*. *Sci Total Environ*, 2007. **373**(1): p. 68-76.
102. Lemire, M., et al., *Biomarkers of selenium status in the Amazonian context: blood, urine and sequential hair segments*. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 2009. **19**(2): p. 213-22.
103. Lemire, M., et al., *Elevated blood selenium levels in the Brazilian Amazon*. *Sci Total Environ*, 2006. **366**(1): p. 101-11.
104. Agarwal, R. and J.R. Behari, *Effect of selenium pretreatment in chronic mercury intoxication in rats*. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2007. **79**(3): p. 306-10.
105. Su, L., et al., *The interaction of selenium and mercury in the accumulations and oxidative stress of rat tissues*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2008. **70**(3): p. 483-9.
106. Derosa, G., et al., *Matrix metalloproteinase-2 and -9 levels in obese patients*. *Endothelium*, 2008. **15**(4): p. 219-24.
107. Belvisi, M.G. and K.M. Bottomley, *The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a therapeutic role for inhibitors of MMPs?* *Inflamm Res*, 2003. **52**(3): p. 95-100.
108. Morimoto, Y., et al., *Expression of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, and extracellular matrix mRNA following exposure to mineral fibers and cigarette smoke in vivo*. *Environ Health Perspect*, 1997. **105 Suppl 5**: p. 1247-51.

109. Ning, W., et al., *Cigarette smoke stimulates matrix metalloproteinase-2 activity via EGR-1 in human lung fibroblasts*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **36**(4): p. 480-90.
110. Raitio, A., et al., *Levels of matrix metalloproteinase-2, -9 and -8 in the skin, serum and saliva of smokers and non-smokers*. Arch Dermatol Res, 2005. **297**(6): p. 242-8.
111. Segura-Valdez, L., et al., *Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD*. Chest, 2000. **117**(3): p. 684-94.
112. Wright, J.L., et al., *Cigarette smoke upregulates pulmonary vascular matrix metalloproteinases via TNF-alpha signaling*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **292**(1): p. L125-33.
113. Bonnema, D.D., et al., *Effects of age on plasma matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs)*. J Card Fail, 2007. **13**(7): p. 530-40.
114. Paczek, L., W. Michalska, and I. Bartlomiejczyk, *Trypsin, elastase, plasmin and MMP-9 activity in the serum during the human ageing process*. Age Ageing, 2008. **37**(3): p. 318-23.
115. Samnegard, A., et al., *Gender specific associations between matrix metalloproteinases and inflammatory markers in post myocardial infarction patients*. Atherosclerosis, 2009. **202**(2): p. 550-6.

9. Anexos

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Av. do Café, s/nº - Fone: (0xx16) 3602.4213 - Fax: (0xx16) 3602-4877
14040-903 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
e-mail: cep@icfrp.usp.br

Of. CEP 20/2006 - FCFRP/USP
kms

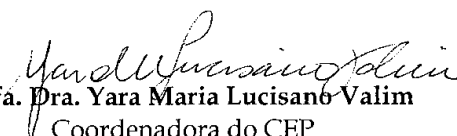
Ribeirão Preto, 11 de agosto de 2006.

Prezado Professor,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "Importância de fatores genéticos na intoxicação ambiental pelo metilmercúrio na população da região amazônica", apresentado por V. Sa. a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº 71, foi analisado e considerado **aprovado**.

Em atendimento à Resolução 196/96 deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer intercorrência ou interrupção do mesmo.

Atenciosamente,


Prof. Dra. Yara Maria Lucisano Valim
Coordenadora do CEP
FCFRP - USP

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. FERNANDO BARBOSA JUNIOR
Depto. de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas
FCFRP - USP

9.1. Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: “Importância de fatores genéticos na intoxicação ambiental pelo metilmercúrio na população da região amazônica”

Responsável:

- Dr. Fernando Barbosa Júnior

Você está sendo convidado a participar de um estudo cujos detalhes são:

1) A exposição ao mercúrio na região amazônica, principalmente vinda do consumo de peixes, já é conhecida há muitos anos. Entretanto, não se sabe muito dos problemas de saúde relacionados a essa exposição. Neste nosso estudo, nós pretendemos estudar se algumas diferenças genéticas podem modificar as quantidades de mercúrio no seu sangue e no seu cabelo, e também produzir algumas modificações nas quantidades de algumas substâncias produzidas pelo seu organismo e presentes no seu sangue que podem fazer com que o mercúrio consumido no peixe possa ser mais tóxico para você que para outras pessoas. Isto poderá contribuir para que possamos ajudar a entender e diminuir possíveis problemas a sua saúde no futuro, relacionados a essa exposição. Assim, estudaremos algumas substâncias presentes no seu sangue e que serão correlacionadas com a quantidade de mercúrio no seu sangue e no seu cabelo.

2) Sua participação neste estudo será:

Serão retirados, no máximo, 20 mL do seu sangue, e 100 mg de cabelo da região da nuca. O sangue será coletado por enfermeiro, utilizando punção na sua veia realizada com coleta por vácuo (Vacutainer) com materiais esterilizados e equipamentos de proteção individual que impeçam qualquer risco de

contaminação para você. O cabelo será coletado por enfermeiro na região da nuca utilizando tesoura devidamente esterilizada antes do uso. O volume de sangue que coletaremos é o equivalente a uma pequena xícara de café. Este sangue será utilizado para realizar todo o estudo mencionado acima e para avaliar os níveis de mercúrio em seu organismo. O cabelo coletado também será utilizado para ver os níveis de mercúrio de exposição mais antiga. Também verificaremos a sua pressão arterial (três medidas), após 5 minutos de repouso. Com isto, encerra-se a sua participação neste estudo.

Todas as amostras de sangue e cabelo que coletaremos serão congeladas e levadas para a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo onde serão processadas. Após as análises, todo o material biológico coletado será embalado em sacos plásticos apropriados para descarte de materiais biológicos (risco biológico), lacrados e entregues para o Sistema de Coletas da Prefeitura da Cidade de Ribeirão Preto para incineração.

Os resultados ficarão a disposição de vocês e manteremos o seu nome em sigilo com padrões profissionais de sigilo. Quando tivermos todos os resultados do estudo eles estarão a sua disposição e permanecerão confidenciais. O nome do voluntário ou o material analisado que indique a sua participação não será divulgado.

3) A sua participação no estudo não acarretará em custos e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional, exceto na presença de danos decorrentes da pesquisa.

4) A coleta de sangue poderá causar alguma pequena manifestação no lugar da coleta, como um pequeno inchaço e o local ficar roxo. Nestes casos, e em outros pequenos agravos provocados pela coleta do sangue a nossa equipe se compromete em fornecer pomada a você para minimizar estes efeitos.

5) Nos casos em que observarmos níveis alterados da pressão arterial e de mercúrio no seu sangue e cabelo, nós nos comprometemos a passar a você as informações necessárias para manutenção de sua saúde e buscaremos para que te auxilie um médico local.

6) Acreditamos que este estudo trará como benefício um entendimento de como a exposição ao mercúrio pode afetar algumas funções do nosso organismo, possivelmente causando alterações indesejadas associadas às doenças causadas por essa exposição.

7) Qualquer dado que possa ser publicado posteriormente, não revelará a sua identidade. Entretanto, órgãos governamentais ligados à saúde podem solicitar informações a respeito da pesquisa e identidade dos voluntários nela envolvidos.

8) Você pode retirar o seu consentimento para participar deste estudo a qualquer momento, inclusive sem justificativas e sem qualquer prejuízo para você.

9) Você terá a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos e de outras situações relacionadas com a pesquisa e o tratamento a que será submetido. Qualquer questão a respeito do estudo ou de sua saúde deve ser dirigida ao Dr. Fernando Barbosa Jr (telefone 016-36023183) do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) da Universidade de São Paulo.

Eu, _____, abaixo assinado, declaro que em ____/____/____ fui devidamente informado em detalhes pelo pesquisador responsável no que diz respeito ao objetivo da pesquisa, aos procedimentos que serei submetido, aos riscos e benefícios, à forma de ressarcimento no caso de eventuais despesas, bem como à indenização quanto por danos decorrentes da pesquisa. Declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram asseguradas e acima relacionadas.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade de participar do referido projeto.

Itaituba , _____ de _____ de _____.

Assinatura do voluntário

Assinatura do investigador/testemunha

10. Apêndices

10.1. Trabalho publicado – objetivo 1

© 2009 The Authors

Journal compilation © 2009 Nordic Pharmacological Society, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 105, 281–288

Doi: 10.1111/j.1742-7843.2009.00443.x

Mercury Exposure Increases Circulating Net Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 Activities

Anna L. B. Jacob-Ferreira¹, Carlos J. S. Passos², Alceu A. Jordão³, Myriam Fillion⁴, Donna Mergler⁴, Mélanie Lemire⁴, Raquel F. Gerlach⁵, Fernando Barbosa Jr² and Jose E. Tanus-Santos⁶

¹Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, Brazil, ²Department of Clinical Toxicological and Food Science Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, ³Nutrition and Metabolism, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, ⁴Centre interdisciplinaire de recherches sur la biologie, la santé, la société et l'environnement (CINBIOSE), University of Québec in Montreal, Montreal, QC, Canada, ⁵Department of Morphology, Stomatology and Physiology, Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, and ⁶Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

(Received 2 February 2009; Accepted 23 April 2009)

Abstract: Mercury (Hg) exposure causes health problems that may result from increased oxidative stress and matrix metalloproteinase (MMP) levels. We investigated whether there is an association between the circulating levels of MMP-2, MMP-9, their endogenous inhibitors (the tissue inhibitors of metalloproteinases; TIMPs) and the circulating Hg levels in 159 subjects environmentally exposed to Hg. Blood and plasma Hg were determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). MMP and TIMP concentrations were measured in plasma samples by gelatin zymography and ELISA respectively. Thiobarbituric acid-reactive species (TBARS) were measured in plasma to assess oxidative stress. Selenium (Se) levels were determined by ICP-MS because it is an antioxidant. The relations between bioindicators of Hg and the metalloproteinases levels were examined using multivariate regression models. While we found no relation between blood or plasma Hg and MMP-9, plasma Hg levels were negatively associated with TIMP-1 and TIMP-2 levels, and thereby with increasing MMP-9/TIMP-1 and MMP-2/TIMP-2 ratios, thus indicating a positive association between plasma Hg and circulating net MMP-9 and MMP-2 activities. These findings provide a new insight into the possible biological mechanisms of Hg toxicity, particularly in cardiovascular diseases.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of structurally related, zinc-dependent enzymes involved in the degradation of many components of the extracellular matrix during both physiological and pathological processes [1]. Increased expression and activity of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) have been reported in a variety of pathological conditions [2–4]. Importantly, recent studies have shown that the circulating levels of MMPs have been associated with the risk of atherosclerotic events and may be used as a blood-borne biochemical marker for cardiovascular risk [5], even for subjects without clinical diseases [6,7]. For example, high MMP-9 levels were associated with rapid coronary artery disease progression [8] and with fatal cardiovascular events [9]. Indeed, increased circulating MMP-9 levels were associated with the subsequent incidence of acute cardiovascular events and/or hypertension in people without cardiovascular disease [10].

Mercury (Hg) exposure is widely recognized as a serious environmental health problem leading to a variety of deleterious effects to human health [11–13]. These effects

include the promotion of cardiovascular diseases, although the mechanisms involved have not been precisely defined [14–18]. However, there is evidence implicating Hg-induced increases in oxidative stress, which may play a role in Hg toxicity [17,19,20]. This may be particularly relevant because enhanced oxidative stress [assessed as thiobarbituric acid reactive species (TBARS) concentration] is a major factor modulating MMP-2 and MMP-9 expression/activity [21,22].

On the other hand, nutritional factors may diminish the rates of oxidative stress [23–26] and possibly reduce Hg toxicity. For example, Se is an essential micronutrient with important antioxidant properties and may have important biological and biochemical functions in organisms [27]. Indeed, some studies suggest that Se may influence the toxic effects of heavy metals, including Hg [27].

The highest levels of Hg exposure reported in the current literature are found in fish-eating communities of the Brazilian Amazon [28]. However, some of these communities also have relatively high levels of Se [29,30].

In the present study, we examined whether MMP-9 and MMP-2 (and their endogenous inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases; TIMPs) plasma levels are associated with the circulating concentrations of Hg in people environmentally exposed to Hg in the Amazon region.

Author for correspondence: Jose Eduardo Tanus-Santos, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil (fax +55 16 3633 2301, e-mail tanus@fmr.usp.br).

Materials and Methods

High-purity de-ionized water (resistivity 18.2 mΩ cm) obtained by a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA) was used throughout. All reagents used were high purity analytical grade. All chemical solutions used for Hg determination were stored in high-density polypropylene bottles. Whole blood and plasma samples were stored in 2 ml tubes at -80°C . The tubes, the plastic bottles, the auto-sampler cups and the glassware materials used in the present study were cleaned with HNO_3 at 10% (v/v), rinsed five times with Milli-Q water and dried in a class 100 laminar flow hood located inside the class 10,000 clean room.

Study design and population. Approval was obtained from the Ethics Committee of the University of São Paulo at Ribeirão Preto (Brazil), protocol number CEP/FCFRP #71, and persons who agreed to participate were individually explained the study and signed an informed consent form. All persons participated on a voluntary basis.

This study is part of a larger interdisciplinary investigation that examines Hg sources and dynamics in the environment, human exposure and health effects in the Tapajós River Valley (Brazilian Amazon, state of Pará) [31]. A cross-sectional study of 450 participants was carried out from May to July 2006. For the present analyses, we randomly selected blood samples from 159 villagers (73 men and 86 women), aged from 15 to 87 years, from six riverside communities. Exposure to Hg in this region is through fish intake [32].

Villagers' data were collected using two interview-administered questionnaires. One targeted socio-demographic information (gender; age; living village; place of birth; length of time in the region; educational level; subsistence activities; work in gold mining and exposure to Hg through burning amalgam; exposure to other contaminants; frequency and quantity of smoking, drinking and recreational drugs habits; medical history; medication). The second was a 7-day recall food consumption frequency questionnaire for species-specific fish, beef, chicken, pork or other meats, fruit species, milk/butter. For fish consumption, a list was prepared, which included most of the fish species present in the region. Participants indicated, for each day, the number of meals containing fish as well as the fish species that were consumed. Anthropometric measures (weight, height, waist circumference) were taken by a trained technician and body mass index (BMI) was calculated.

Blood collection. A trained nurse collected a 6-ml venous blood sample from each participant. Blood samples were collected in 'trace metals free' evacuated tubes (BD Vacutainer®, BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA) containing heparin as anticoagulant. Two millilitres of blood was then pipetted into an Eppendorf tube (2 ml volume) previously cleaned in a class 100 clean room and immediately frozen at -20°C before analysis. For plasma separation, 4 ml of blood samples was centrifuged ($1000 \times g$ for 6 min.). The plasma fraction was then pipetted into an Eppendorf tube (2 ml volume) previously cleaned in a class 100 clean room and immediately frozen at -70°C before analysis.

Determination of Hg in whole blood and plasma. While whole blood has been most frequently used for assessment of Hg exposure [33], there has been some discussion on the suitability of using plasma as

a better index of exposure to heavy metals [34], including Hg [35]. Thus, for the present study, we determined Hg concentrations in both whole blood and plasma samples.

Hg levels in whole blood and plasma were measured at the Laboratory of Metals Toxicology, University of São Paulo in Ribeirão Preto (Brazil), by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). The concentrations of Hg in whole blood samples were measured according to the method described by Palmer et al. [36], with a Hg detection limit of $0.17 \mu\text{g/l}$. The concentrations of Hg in plasma samples were made according to the method described by Goulle et al. [37], with a Hg detection limit of $0.10 \mu\text{g/l}$.

Determination of Se concentrations in plasma. Whole blood and Se content in the erythrocytes are good indicators of long-term exposure to Se, while plasma concentration reflects changes in the intake of Se more rapidly than concentrations in erythrocytes [38]. Se in plasma is incorporated into glutathione peroxidase (GSH-Px), selenoprotein P or bound to albumin, and about 95% of the Se present in plasma is bound to proteins. These compounds do not penetrate membranes [39] and may be more bioavailable on the cardiovascular system. In the present study, we used plasma Se.

Se levels in plasma were also determined at the Laboratory of Metals Toxicology, University of São Paulo in Ribeirão Preto (Brazil), by ICP-MS, using the method proposed by Goulle et al. [37]. The detection limit was $0.09 \mu\text{g/l}$.

Quality control of the results. Quality control of trace metals determination was guaranteed by the analysis of Standard Reference Materials from the U.S. National Institute of Standards and Technologies (NIST). Moreover, various secondary reference materials, either provided by the New York State Department of Health (NYS DOH PT programme for trace elements in whole blood and plasma) or by the *Institut national de santé publique du Québec*, Canada (INSP external quality assessment scheme for trace elements in blood and plasma), were analysed. Reference samples were analysed before and after 10 ordinary samples.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gelatin zymography of MMP-2 and MMP-9. Gelatin zymography of MMP-2 and MMP-9 from plasma samples was performed as previously reported [40–42]. Briefly, plasma samples were diluted in sample buffer (2% SDS, 125 mM Tris-HCl; pH 6.8, 10% glycerol and 0.001% bromophenol blue) and subjected to electrophoresis on 7% SDS-PAGE co-polymerized with gelatin (1%) as the substrate. After electrophoresis was complete, the gel was incubated for 1 hr at room temperature in a 2% Triton X-100 solution, and incubated at 37°C for 72 hr in Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 10 mmol/l CaCl_2 . The gels were stained with 0.05% Coomassie brilliant blue G-250, and then destained with 30% methanol and 10% acetic acid. Gelatinolytic activities were detected as unstained bands against the background of Coomassie blue-stained gelatin, by densitometry using a Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) 290 (Kodak, Rochester, NY, USA). The pro forms of MMP-2 and MMP-9 (fig. 1) were identified as bands at 72 and 92 kDa, respectively, by the relation of log Mr to the relative mobility of Sigma SDS-PAGE LMW marker proteins.

Determination of TIMP-1 and TIMP-2 concentrations in plasma. Plasma TIMP-1 and TIMP-2 concentrations were measured by using the

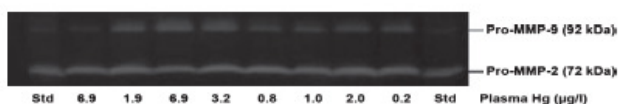


Fig. 1. Representative zymogram of plasma samples showing pro-MMP-9 (92 kDa) and pro-MMP-2 bands (72 kDa). Std, internal standard; plasma Hg, plasma Hg concentrations ($\mu\text{g/dl}$); MMP, matrix metalloproteinase.

Table 1.

Socio-demographic characteristics and analysed parameters of the study population (N = 159).

	N	%	Range	Mean \pm S.D.	Median
Age (years)			15–87	41 \pm 16	38
Gender					
Men	73	46			
Women	86	54			
Body mass index (kg/m ²)			17–41	25 \pm 4	24.4
Smoking habits					
Smokers	29	18			
Non-smokers	130	82			
Fish consumption (meals/week)			0–14	5 \pm 4	5
MMP-9 (arbitrary unit)			0.05–1.69	0.54 \pm 0.30	0.46
MMP-2 (arbitrary unit)			0.46–2.12	1.11 \pm 0.38	1.07
TIMP-1 (ng/ml)			39.17–580.57	314.73 \pm 88.27	311.38
TIMP-2 (ng/ml)			49.22–236.60	139.94 \pm 35.76	143.04
Blood Hg (μ g/l)			4.30–164.90	40.60 \pm 30.95	31.40
Plasma Hg (μ g/l)			0.20–30.20	7.76 \pm 6.15	6.20
Plasma Se (μ g/l)			57.2–370.00	130.16 \pm 47.60	117.50
TBARS (nM/mg protein)			0.15–15.38	4.32 \pm 3.11	3.73

MMP, matrix metalloproteinase; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinase; TBARS, thiobarbituric acid-reactive species

sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using reagents from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) following the instructions by the manufacturer. The reaction was evaluated using a μ QuantTM microplate reader (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA).

Determination of TBARS concentrations in plasma. The determination of TBARS was used to estimate the degree of lipid peroxidation, using the method of Buege and Aust [43].

Statistical analysis. We used descriptive statistics to present general characteristics of the population, and Pearson's correlation analysis (r, p) to examine associations between MMP or TIMP concentrations with socio-demographic variables that could influence their levels such as smoking status, age, gender and BMI, as well as fish consumption, plasma Se and TBARS concentrations. These parameters were then included as covariables in a multiple regression model seeking to explain changes in MMPs, TIMPs and MMP/TIMP ratio as a result of plasma Hg or whole blood Hg concentrations. As fish consumption and Hg are correlated ($r = 0.44$ for Hg in whole blood and 0.34 for plasma Hg), two models were analysed (with and without fish consumption). Because blood Hg, plasma Hg and Se present asymmetric distributions, their concentrations were log-transformed before use in these multiple models. The results were defined as statistically significant when $p < 0.05$. The analyses were performed using Prism 3.02 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) and Jump 5.0.1a (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Results

Table 1 summarizes the socio-demographic characteristics and analysed parameters, including the indicators of Hg exposure (blood and plasma Hg concentrations) of the 159 participants enrolled in the study. We found a significant correlation between blood Hg and plasma Hg concentrations ($r = 0.8682$; $p < 0.0001$; fig. 2).

Univariate analyses examining the possible determinants of MMPs and TIMPs activities in this population showed significant negative correlations between plasma Se and

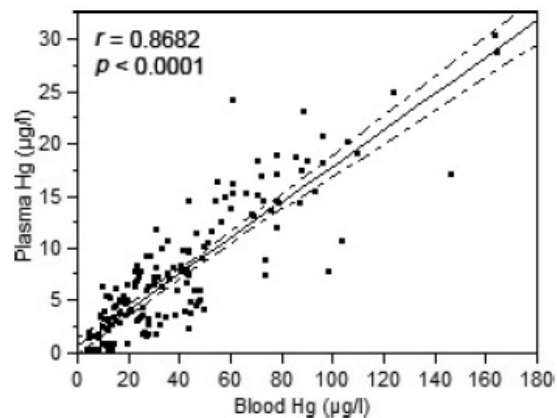


Fig. 2. Association between plasma Hg and blood Hg concentrations (μ g/l) in the 159 participants of the study. The regression line and the 95% confidence interval are plotted.

both MMP-9 ($r = -0.1755$; $p = 0.0269$) and TIMP-2 ($r = -0.2067$; $p = 0.0089$). TBARS was negatively correlated with MMP-2 ($r = -0.1647$; $p = 0.0381$). Interestingly, no correlations were found between smoking status and MMPs, TIMPs or MMP/TIMP ratios, even though some of the subjects enrolled in the present study were smokers. Fish consumption was found to be inversely and significantly correlated with MMP-9/TIMP-1 ratio ($r = -0.1801$; $p = 0.0231$). Significant negative correlations were found between age and both MMP-9 ($r = -0.1792$; $p = 0.0238$) and MMP-9/TIMP-1 ($r = -0.3518$; $p < 0.0001$), whereas a positive correlation was found between age and TIMP-1 ($r = 0.3743$; $p < 0.0001$), and no correlation with MMP-2. The MMP-9/TIMP-1 ratio was significantly higher in

women (24% higher, $p = 0.0163$, t-test). BMI was negatively and significantly correlated with both MMP-2 ($r = -0.2344$; $p = 0.0029$) and MMP-2/TIMP-2 ratio ($r = -0.2352$; $p = 0.0028$) and positively correlated with TIMP-1 ($r = 0.1724$; $p = 0.0298$).

The relationship between Hg exposure and changes in MMPs and TIMPs were then examined with multiple regression models which included the following covariates: smoking status, age, gender, BMI, log plasma Se and TBARS. Except for TIMP-2, which significantly decreased ($\beta = -26.54351$, $p = 0.0021$) with whole blood total Hg, we did not observe any association between whole blood Hg and MMPs, TIMP or their ratios: MMP-9 ($\beta = 0.018331$, $p = 0.8056$), MMP-2 ($\beta = -0.013082$, $p = 0.8902$), TIMP-1 ($\beta = 4.182572$, $p = 0.8366$), MMP-9/TIMP-1 ratio ($\beta = 0.000093$, $p = 0.7656$) and MMP-2/TIMP-2 ratio ($\beta = 0.001528$, $p = 0.1176$).

In the multiple regression model with plasma Hg as an independent variable, we found no association between plasma Hg and MMP-9 ($\beta = 0.081922$, $p = 0.1424$) or MMP-2 ($\beta = 0.090222$, $p = 0.2043$). However, plasma Hg concentrations were significantly and negatively associated

with both TIMP-1 ($\beta = -31.22264$, $p = 0.0393$) and TIMP-2 ($\beta = -38.1198$, $p < 0.0001$) concentrations, and positively associated with MMP-9/TIMP-1 ($\beta = 0.000454$, $p = 0.0525$) and MMP-2/TIMP-2 ratios ($\beta = 0.003062$, $p < 0.0001$; fig. 3, table 2).

When we included fish consumption as a further independent variable, plasma Hg concentrations were significantly and positively associated with MMP-9 ($\beta = 0.116153$, $p = 0.0446$), MMP-9/TIMP-1 ratio ($\beta = 0.000607$, $p = 0.0122$) and MMP-2/TIMP-2 ratio ($\beta = 0.003308$, $p < 0.0001$), and negatively associated with both TIMP-1 ($\beta = -40.513880$, $p = 0.0099$) and TIMP-2 ($\beta = -43.214400$, $p < 0.0001$). Fish consumption was negatively associated with MMP-9 ($\beta = -0.012376$, $p = 0.0388$) and MMP-9/TIMP-1 ratio ($\beta = -0.000055$, $p = 0.0272$), and positively associated with both TIMP-1 ($\beta = 3.359212$, $p = 0.0381$) and TIMP-2 ($\beta = 1.841935$, $p = 0.0031$).

In a multiple regression model using fish consumption without Hg concentration as an independent variable, we found a trend for fish consumption to decrease MMP-9 ($\beta = -0.008932$, $p = 0.1223$) and MMP-9/TIMP-1 ratio ($\beta = -0.000037$, $p = 0.1250$), and to increase TIMP-1

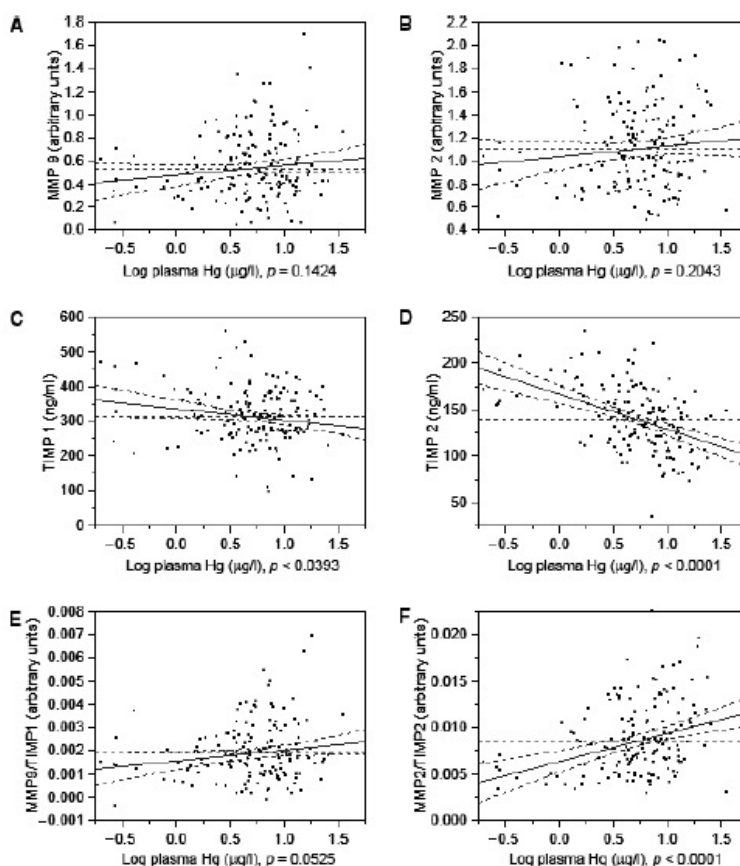


Fig. 3. Adjusted values for MMP-9 (A), MMP-2 (B), TIMP-1 (C), TIMP-2 (D), MMP-9/TIMP-1 (E) and MMP-2/TIMP-2 ratios (F) with log plasma Hg taking into account: age, gender, BMI, smoking habits, log plasma Se and TBARS.

Table 2.

Results from multiple linear regression analysis for MMPs, TIMPs and MMP/TIMP ratios, using plasma Hg as an independent variable (N = 159).

Source	MMP-9		TIMP-1		MMP-9/TIMP-1	
	R^2	RMSE	R^2	RMSE	R^2	RMSE
Model	0.118105	0.293190	0.229285	79.26685	0.213569	0.001225
	β	p	β	p	β	p
Log Hg plasma	0.081922	0.1424	-31.22264	0.0393	0.000454	0.0525
Log Se plasma	-0.535790	0.0039	-41.84663	0.3980	-0.001721	0.0256
TBARS (nM/mg protein)	0.010404	0.1725	-1.607502	0.4346	0.000029	0.3564
Smoking status (N)	-0.034367	0.2803	9.983102	0.2462	-0.000251	0.0599
Age	-0.003349	0.0254	2.187359	<0.0001	-0.000029	<0.0001
Gender (F)	0.055082	0.0265	-9.505038	0.1547	0.000325	0.0019
BMI	0.001461	0.8107	2.123479	0.1992	-0.000001	0.9680
	MMP-2		TIMP-2		MMP-2/TIMP-2	
	R^2	RMSE	R^2	RMSE	R^2	RMSE
Model	0.074997	0.373477	0.297096	30.66540	0.167349	0.008594
	β	p	β	p	β	p
Log Hg plasma	0.090222	0.2043	-38.1198	<0.0001	0.003062	<0.0001
Log Se plasma	-0.177821	0.4458	-28.25538	0.1412	-0.000291	0.8987
TBARS (nM/mg protein)	0.000021	0.9983	-2.114915	0.0086	0.000165	0.0836
Smoking status (N)	-0.002557	0.9496	-8.057496	0.0163	0.000546	0.1696
Age	-0.000354	0.8518	0.291382	0.0622	-0.000008	0.6765
Gender (F)	0.046641	0.1384	0.698631	0.7862	0.000303	0.3244
BMI	-0.022333	0.0046	0.784403	0.2201	-0.000215	0.0052

MMP, matrix metalloproteinase; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinase; TBARS, thiobarbituric acid-reactive species; BMI, body mass index.

($\beta = 2.158046$, $p = 0.1706$) levels. MMP-2 levels were not significantly associated with fish consumption.

Discussion

In this study, we report for the first time that plasma Hg concentration is positively associated with both pro-MMP-9/TIMP-1 and pro-MMP-2/TIMP-2, thus suggesting that exposure to Hg may enhance net MMP-9 and MMP-2 activities. The increases in net MMP-2 and MMP-9 activities reported here may lead to increased susceptibility to cardiovascular diseases, as suggested by mounting evidence from a number of previous studies [5–10].

While Hg concentrations in hair and whole blood are the biomarkers most frequently used for assessment of Hg exposure, either for screening or for diagnostic and biomonitoring purposes [33], our data suggest that plasma Hg may be a relevant index of exposure and health risks associated with Hg, especially taking into consideration its kinetics. Only TIMP-2 levels were significantly associated with whole blood Hg, and this association was less important than the one with plasma Hg concentrations. When considering plasma Hg concentration as an independent variable, significant associations were found between plasma Hg concentrations and net MMP-9 and MMP-2 activities. A possible explanation for this prominent effect of plasma Hg could be the fact that plasma Hg levels might reflect better the risk of cardiovascular damage in subjects exposed to Hg,

because plasma Hg is in contact with the vascular walls and heart. In addition, the toxic effects produced by Hg exposure may be associated with plasma Hg concentrations because plasma Hg may reflect the most rapidly exchangeable fraction of Hg in the bloodstream. This fraction may be more bioavailable on cells, and thus exert considerable toxic effects. These differences between plasma and whole blood Hg are particularly interesting given the high correlation between the two.

Matrix metalloproteinases can be regulated at the levels of gene transcription and translation, by post-translational modifications and by interactions with their endogenous inhibitors (TIMPs). MMPs and TIMPs are in delicate balance under normal circumstances, and this balance is a major determinant of extracellular matrix composition [1]. While TIMPs are not specific inhibitors of any MMP, TIMP-1 and TIMP-2 are major inhibitors of MMP-9 and MMP-2 respectively [44,45]. Therefore, the assessment of MMP-9/TIMP-1 and MMP-2/TIMP-2 ratios may lead to improved information regarding the net activity of these two MMPs. Moreover, many disease states are associated with imbalances in the net activities of these enzymes, thus leading to increased tissue destruction and remodelling [46]. Despite the fact that we found no significant changes in MMP-2 or MMP-9 levels associated with plasma Hg concentrations, we found significant negative relationships between plasma Hg concentrations and both TIMP-1 and TIMP-2 levels, thus resulting in significant relationships

between Hg concentrations and both MMP-9/TIMP-1 and MMP-2/TIMP-2 ratios. These findings are consistent with the idea that Hg exposure leads to increased net MMP-9 and MMP-2 activities. It remains to be elucidated, however, whether these increased MMP activities underlie the increased cardiovascular risk associated with Hg exposure [14–18].

Elevated levels of Hg in fish and in humans have been reported in the Brazilian Amazon, and significant relations between fish consumption and bioindicators of Hg exposure have been consistently described [28,32]. Indeed, fish is a major vehicle for Hg transmission to humans in its organic form (methylmercury; MeHg) [15] and there is some evidence of a positive association between fish consumption and inorganic Hg in this region [47]. In this study, we did not specify Hg (organic or inorganic).

In the present study, when fish consumption was included in the multiple regression model, the association between plasma Hg and net MMP-9 activity was stronger, while the association with net MMP-2 activity was not altered. On the other hand, fish consumption was negatively associated with MMP-9 and MMP-9/TIMP-1 ratio and positively associated with both TIMP-1 and TIMP-2 in this regression model. Even when Hg was removed from the regression model, the relations were still present. Fish consumption thus appears to have a beneficial effect, which may counteract the negative effects of Hg exposure. This may be at the basis of cardioprotective properties of fish consumption.

The riparian communities in the present study are from the Tapajós River Basin, which is one of the most important tributaries of the Amazon River. The main source of Hg exposure for these remote riparian communities is the consumption of Hg-containing fish. For these populations, which rely on fish as a main source of protein, this represents an important public health dilemma, particularly because there is evidence of both cardioprotective or cardiotoxic effects associated with fish consumption, due primarily to essential fatty acids [15,48]. Further studies in this region should examine the role of essential fatty acids.

Relatively elevated Se levels have also been reported in the Brazilian Amazon [30]. Diet represents the principal route of Se [29]. In another region of the Amazon, it was shown that certain Amazonian fish species may be good sources of Se [29]. However, in our study area, Lemire et al. observed no overall relationship between fish consumption and Se, although fish consumption is very high [29]. Nevertheless, certain edible fruit species, such as Brazil nuts (*Bertholletia excelsa* Humb. and Bonpl.) and Paradise nuts (*Lecythis usitata* Miers) of the Lecythidaceae family, are known to accumulate high levels of Se from soils. In this study region, there are important variations in the availability of different foods throughout the year, and variations in hair Se concentration suggest that there may be seasonal Se sources in local food which would be reflected in whole blood and plasma Se concentrations [30].

In the present study, we took into consideration the variables that could influence MMP or TIMP levels, including

TBARS, plasma Se, smoking status, age, gender and BMI. Enhanced oxidative stress (assessed as TBARS concentration) is considered a major factor modulating MMP-2 and MMP-9 expression/activity [1,21]. TBARS showed a positive trend with MMP-2/TIMP-2 ratio due to significant decreases in TIMP-2, but not with significant alterations in MMP-9/TIMP-1 ratio.

It is possible that Se produces antioxidant effects and attenuates the increases in oxidative stress associated with exposure to Hg [27,49,50]. In addition, Se may also form a high-molecular-weight complex with Hg and a plasma protein, thereby attenuating the toxicity associated with exposure to Hg [26]. However, most studies have been performed with inorganic Se and the nature of these interactions is still poorly understood [29]. Interestingly, plasma Se concentrations were negatively related to MMP-9/TIMP-1 ratios due to Se-related decreases in MMP-9 (which can also be seen in the univariate model). This may reflect the antioxidant effects produced by Se. Further research is needed to understand the possible relations between dietary Se and Hg.

Other variables including smoking status, gender, age or BMI also affect MMP/TIMP ratio concentrations, and therefore were taken into consideration in our regression model. Moreover, plasma MMP-2 and MMP-9 levels have been shown to increase with obesity [51]. However, while BMI was negatively and significantly related to both MMP-2 and MMP-2/TIMP-2 ratio (univariate and multiple regression) in our study, it was positively related to TIMP-1 (univariate regression). It should be noted that BMI was low and few persons in these communities are obese.

In the present study, smoking status was negatively associated with TIMP-2, but not with the circulating MMP concentrations, although previous studies have shown a positive relationship between smoking and MMP levels [52–57]. This finding may result from the small number of smokers included in the present study. Although cardiovascular risk is known to be higher in the elderly, we found a negative association between age and MMP-9 or MMP-9/TIMP-1, as well as an increase in TIMP-1 levels. Similar associations were also found in other studies [58,59]. However, we did not find an association between age and net MMP-2 activity.

Precise relationships between MMPs and gender have not been established yet. However, it is possible that gender-specific differences exist when dealing with pathophysiological mechanisms of cardiovascular diseases [60]. Interestingly, we found significantly higher MMP-9/TIMP-1 ratios in women (univariate analyses) when compared with men, and this finding was confirmed with the multiple regression model.

In conclusion, we found a positive association between net MMP-9 and MMP-2 activities in plasma and the plasma Hg concentrations, thus suggesting a possible mechanism through which Hg exposure may increase the susceptibility to cardiovascular diseases. These findings provide a new insight into the biological mechanisms possibly playing a role

in Hg toxicity, especially in terms of cardiovascular diseases. A causal relationship between Hg exposure and increased susceptibility to cardiovascular diseases through mechanisms involving MMPs, however, remains to be proved.

Acknowledgements

This study was funded by Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

References

- Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2002;**37**:375–536.
- Palei AC, Sandrim VC, Cavalli RC, Tanus-Santos JE. Comparative assessment of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9, and their inhibitors, tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in preeclampsia and gestational hypertension. *Clin Biochem* 2008;**41**:875–80.
- Martinez ML, Lopes LF, Coelho EB, Nobre F, Rocha JB, Gerlach RF *et al*. Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-9 activity in patients with hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;**47**:117–22.
- Fortuna GM, Figueiredo-Lopes L, Dias-Junior CA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. A role for matrix metalloproteinase-9 in the hemodynamic changes following acute pulmonary embolism. *Int J Cardiol* 2007;**114**:22–7.
- Sundstrom J, Vasan RS. Circulating biomarkers of extracellular matrix remodeling and risk of atherosclerotic events. *Curr Opin Lipidol* 2006;**17**:45–53.
- Demacq C, Metzger IF, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Inverse relationship between markers of nitric oxide formation and plasma matrix metalloproteinase-9 levels in healthy volunteers. *Clin Chim Acta* 2008;**394**:72–6.
- Garvin P, Nilsson L, Carstensen J, Jonasson L, Kristenson M. Circulating matrix metalloproteinase-9 is associated with cardiovascular risk factors in a middle-aged normal population. *PLoS ONE* 2008;**3**:e1774.
- Zouridakis E, Avanzas P, Arroyo-Espliguero R, Fredericks S, Kaski JC. Markers of inflammation and rapid coronary artery disease progression in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 2004;**110**:1747–53.
- Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G *et al*. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 2003;**107**:1579–85.
- Timms PM, Mannan N, Hitman GA, Noonan K, Mills PG, Syndercombe-Court D *et al*. Circulating MMP9, vitamin D and variation in the TIMP-1 response with VDR genotype: mechanisms for inflammatory damage in chronic disorders? *QJM* 2002;**95**:787–96.
- Clarkson TW, Magos L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit Rev Toxicol* 2006;**36**:609–62.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Mercury. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service, Atlanta, 1999.
- Mergler D, Anderson HA, Chan LH, Mahaffey KR, Murray M, Sakamoto M *et al*. Methylmercury exposure and health effects in humans: a worldwide concern. *Ambio* 2007;**36**:3–11.
- Boffetta P, Sallsten G, Garcia-Gomez M, Pompe-Kim V, Zaridze D, Bulbulyan M *et al*. Mortality from cardiovascular diseases and exposure to inorganic mercury. *Occup Environ Med* 2001;**58**:461–6.
- Guallar E, Sanz-Gallardo MI, van't Veer P, Bode P, Aro A, Gomez-Aracena J *et al*. Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 2002;**347**:1747–54.
- Salonen JT, Seppanen K, Lakka TA, Salonen R, Kaplan GA. Mercury accumulation and accelerated progression of carotid atherosclerosis: a population-based prospective 4-year follow-up study in men in eastern Finland. *Atherosclerosis* 2000;**148**:265–73.
- Virtanen JK, Rissanen TH, Voutilainen S, Tuomainen TP. Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases. *J Nutr Biochem* 2007;**18**:75–85.
- Virtanen JK, Voutilainen S, Rissanen TH, Mursu J, Tuomainen TP, Korhonen MJ *et al*. Mercury, fish oils, and risk of acute coronary events and cardiovascular disease, coronary heart disease, and all-cause mortality in men in eastern Finland. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;**25**:228–33.
- Jie XL, Jin GW, Cheng JP, Wang WH, Lu J, Qu LY. Consumption of mercury-contaminated rice induces oxidative stress and free radical aggravation in rats. *Biomed Environ Sci* 2007;**20**:84–9.
- Wolf MB, Baynes JW. Cadmium and mercury cause an oxidative stress-induced endothelial dysfunction. *Biomaterials* 2007;**28**:73–81.
- Nelson KK, Melendez JA. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radic Biol Med* 2004;**37**:768–84.
- Ra HJ, Parks WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol* 2007;**26**:587–96.
- Furst A. Can nutrition affect chemical toxicity? *Int J Toxicol* 2002;**21**:419–24.
- Peraza MA, Ayala-Fierro F, Barber DS, Casarez E, Rael LT. Effects of micronutrients on metal toxicity. *Environ Health Perspect* 1998;**106** (Suppl 1):203–16.
- Passos CJ, Mergler D, Fillion M, Lemire M, Mertens F, Guimaraes JR *et al*. Epidemiologic confirmation that fruit consumption influences mercury exposure in riparian communities in the Brazilian Amazon. *Environ Res* 2007;**105**:183–93.
- Watanabe C. Modification of mercury toxicity by selenium: practical importance? *Tohoku J Exp Med* 2002;**196**:71–7.
- Chen C, Yu H, Zhao J, Li B, Qu L, Liu S *et al*. The roles of serum selenium and selenoproteins on mercury toxicity in environmental and occupational exposure. *Environ Health Perspect* 2006;**114**:297–301.
- Passos CJ, Mergler D. Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review. *Cad Saude Publica* 2008;**24** (Suppl 4):s503–20.
- Lemire M, Mergler D, Fillion M, Passos CJ, Guimaraes JR, Davidson R *et al*. Elevated blood selenium levels in the Brazilian Amazon. *Sci Total Environ* 2006;**366**:101–11.
- Lemire M, Mergler D, Huel G, Passos CJ, Fillion M, Philibert A *et al*. Biomarkers of selenium status in the Amazonian context: blood, urine and sequential hair segments. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2008;**30**:30.
- CARUSO. Mercury exposure and ecosystem health in the Amazon. <http://www.unites.uqam.ca/gmf/caruso/caruso.htm>. 2007 (last accessed on 24 May 2008).
- Passos CJ, Da Silva DS, Lemire M, Fillion M, Guimaraes JR, Lucotte M *et al*. Daily mercury intake in fish-eating populations in the Brazilian Amazon. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2008;**18**:76–87.
- Budtz-Jorgensen E, Grandjean P, Jorgensen PJ, Weihe P, Keiding N. Association between mercury concentrations in blood and hair in methylmercury-exposed subjects at different ages. *Environ Res* 2004;**95**:385–93.
- Barbosa F Jr, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Matrix metalloproteinase-9 activity in plasma correlates with plasma and whole blood lead concentrations. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006;**98**:559–64.

- 35 Berglund M, Lind B, Bjornberg KA, Palm B, Einarsson O, Vahter M. Inter-individual variations of human mercury exposure biomarkers: a cross-sectional assessment. *Environ Health* 2005;**4**:20.
- 36 Palmer CD, Lewis ME, Geraghty CM, Barbosa F, Parsons PJ. Determination of lead, cadmium and mercury in blood for assessment of environmental exposure: a comparison between inductively coupled plasma-mass spectrometry and atomic absorption spectrometry. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc* 2006;**61**:980–90.
- 37 Gouille JP, Mahieu L, Castermant J, Neveu N, Bonneau L, Laine G *et al*. Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair. Reference values. *Forensic Sci Int* 2005;**153**:39–44.
- 38 Barceloux DG. Selenium. *J Toxicol Clin Toxicol* 1999;**37**:145–72.
- 39 Zachara BA, Gromadzinska J, Wasowicz W, Zbrog Z. Red blood cell and plasma glutathione peroxidase activities and selenium concentration in patients with chronic kidney disease: a review. *Acta Biochim Pol* 2006;**53**:663–77.
- 40 Gerlach RF, Uzuelli JA, Souza-Tarla CD, Tanus-Santos JE. Effect of anticoagulants on the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Anal Biochem* 2005;**344**:147–9.
- 41 Souza-Tarla CD, Uzuelli JA, Machado AA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Methodological issues affecting the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Clin Biochem* 2005;**38**:410–4.
- 42 Gerlach RF, Demacq C, Jung K, Tanus-Santos JE. Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma. *Clin Biochem* 2007;**40**:119–23.
- 43 Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978;**52**:302–10.
- 44 Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT, Marmer BL. Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J Biol Chem* 1992;**267**:4583–91.
- 45 Chow AK, Cena J, Schulz R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br J Pharmacol* 2007;**152**:189–205.
- 46 Tan J, Hua Q, Xing X, Wen J, Liu R, Yang Z. Impact of the metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 system on large arterial stiffness in patients with essential hypertension. *Hypertens Res* 2007;**30**:959–63.
- 47 Passos CJ, Mergler D, Lemire M, Fillion M, Guimaraes JR. Fish consumption and bioindicators of inorganic mercury exposure. *Sci Total Environ* 2007;**373**:68–76.
- 48 Fillion M, Mergler D, Sousa Passos CJ, Larnibe F, Lemire M, Guimaraes JR. A preliminary study of mercury exposure and blood pressure in the Brazilian Amazon. *Environ Health* 2006;**5**:29.
- 49 Agarwal R, Behari JR. Effect of selenium pretreatment in chronic mercury intoxication in rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 2007;**79**:306–10.
- 50 Su L, Wang M, Yin ST, Wang HL, Chen L, Sun LG *et al*. The interaction of selenium and mercury in the accumulations and oxidative stress of rat tissues. *Ecotoxicol Environ Saf* 2008;**70**:483–9.
- 51 Derosa G, Ferrari I, D'Angelo A, Tinelli C, Salvadeo SA, Ciccarcelli L *et al*. Matrix metalloproteinase-2 and -9 levels in obese patients. *Endothelium* 2008;**15**:219–24.
- 52 Belvisi MG, Bottomley KM. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a therapeutic role for inhibitors of MMPs? *Inflamm Res* 2003;**52**:95–100.
- 53 Morimoto Y, Tsuda T, Nakamura H, Hori H, Yamato H, Nagata N *et al*. Expression of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, and extracellular matrix mRNA following exposure to mineral fibers and cigarette smoke in vivo. *Environ Health Perspect* 1997;**105** (Suppl 5):1247–51.
- 54 Ning W, Dong Y, Sun J, Li C, Matthay MA, Feghali-Bostwick CA *et al*. Cigarette smoke stimulates matrix metalloproteinase-2 activity via EGR-1 in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;**36**:480–90.
- 55 Raitio A, Tuomas H, Kokkonen N, Salo T, Sorsa T, Hanemaaijer R *et al*. Levels of matrix metalloproteinase-2, -9 and -8 in the skin, serum and saliva of smokers and non-smokers. *Arch Dermatol Res* 2005;**297**:242–8.
- 56 Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, Selman M. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest* 2000;**117**:684–94.
- 57 Wright JL, Tai H, Wang R, Wang X, Churg A. Cigarette smoke upregulates pulmonary vascular matrix metalloproteinases via TNF-alpha signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;**292**:L125–33.
- 58 Bonnema DD, Webb CS, Pennington WR, Stroud RE, Leonardi AE, Clark LL *et al*. Effects of age on plasma matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs). *J Card Fail* 2007;**13**:530–40.
- 59 Paczek L, Michalska W, Bartłomiejczyk I. Trypsin, elastase, plasmin and MMP-9 activity in the serum during the human ageing process. *Age Ageing* 2008;**37**:318–23.
- 60 Samnegard A, Hulthe J, Silveira A, Ericsson CG, Hamsten A, Eriksson P. Gender specific associations between matrix metalloproteinases and inflammatory markers in post myocardial infarction patients. *Atherosclerosis* 2008;**5**:5.

10.2. Trabalho publicado – objetivo 2

ARTICLE IN PRESS

STOTEN-12015; No of Pages 8

Science of the Total Environment xxx (2010) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv



A functional matrix metalloproteinase (MMP)-9 polymorphism modifies plasma MMP-9 levels in subjects environmentally exposed to mercury

Anna L.B. Jacob-Ferreira^a, Carlos J.S. Passos^b, Raquel F. Gerlach^c,
Fernando Barbosa Jr.^d, Jose E. Tanus-Santos^{e,*}

^a Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, Brazil

^b Faculty UnB at Planaltina, University of Brasília, Brazil

^c Department of Morphology, Stomatology and Physiology, Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

^d Department of Clinical Toxicological and Food Science Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

^e Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 May 2010

Received in revised form 27 May 2010

Accepted 27 May 2010

Available online xxxxx

Keywords:

Mercury

Matrix metalloproteinases

Polymorphism

ABSTRACT

Mercury (Hg) exposure causes health problems including cardiovascular diseases. Although precise mechanisms have not been precisely defined yet, matrix metalloproteinases (MMPs) may be involved. The gene encoding MMP-9 presents genetic polymorphisms which affect the expression and activity level of this enzyme. Two polymorphisms in the promoter region [C⁻¹⁵⁶²T and (CA)_n] are functionally relevant, and are implicated in several diseases. This study aimed at examining how these polymorphisms affect the circulating MMP-9 levels and its endogenous inhibitor, the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in 266 subjects environmentally exposed to Hg. Blood and plasma Hg concentrations were determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). MMP-9 and TIMP-1 concentrations were measured in plasma samples by gelatin zymography and ELISA, respectively. Genotypes for the C⁻¹⁵⁶²T and the microsatellite (CA)_n polymorphisms were determined. We found a positive association ($P < 0.05$) between plasma Hg concentrations and MMP-9/TIMP-1 ratio (an index of net MMP-9 activity). When the subjects were divided into tertiles with basis on their plasma Hg concentrations, we found that the (CA)_n polymorphism modified MMP-9 concentrations and MMP-9/TIMP-1 ratio in subjects with the lowest Hg concentrations (first tertile), with the highest MMP-9 levels being found in subjects with genotypes including alleles with 21 or more CA repeats (H alleles) ($P < 0.05$). Conversely, this polymorphism had no effects on subjects with intermediate or high plasma Hg levels (second and third tertiles, respectively). The C⁻¹⁵⁶²T polymorphism had no effects on MMP-9 levels. These findings suggest a significant interaction between the (CA)_n polymorphism and low levels of Hg exposure, possibly increasing the risk of developing diseases in subjects with H alleles.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mercury (Hg) exposure is a serious environmental health problem leading to a variety of deleterious effects to human health (Clarkson and Magos, 2006; Mergler et al., 2007; Registry, 1999) including cardiovascular diseases, although precise mechanisms have not been precisely defined yet (Boffetta et al., 2001; Guallar et al., 2002; Salonen et al., 2000; Virtanen et al., 2007; Virtanen et al., 2005). Plasma Hg levels have recently been associated with increased in circulating net matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities, thus suggesting a possible mechanism through which Hg

exposure may increase the susceptibility to cardiovascular diseases (Jacob-Ferreira et al., 2009). MMPs are zinc-dependent enzymes involved in the degradation of several components of the extracellular matrix during both physiological and pathological process (Van den Steen et al., 2002). They are secreted as zymogens (inactive enzymes), and their activity is regulated by different mechanisms, including modulation of transcription, activation of latent MMP (pro-enzyme) and inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs) (Ra and Parks, 2007; Woessner, 1998).

Recent studies have shown that the circulating levels of MMPs are associated with the risk of atherosclerotic events (Sundstrom and Vasan, 2006), even in subjects without clinically evident diseases (Demacq et al., 2008a; Garvin et al., 2008). Particularly, high MMP-9 levels have been associated with a variety of pathological conditions, such as rapid coronary artery disease progression (Zouridakis et al., 2004), and fatal cardiovascular events (Blankenberg et al., 2003). Increased circulating MMP-9 levels have also been associated with the

* Corresponding author. Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil. Tel.: + 55 16 3602 3329; fax: + 55 16 3633 2301.

E-mail addresses: tanus@fmrp.usp.br, tanussantos@yahoo.com (J.E. Tanus-Santos).

incidence of acute cardiovascular events and/or hypertension in people without cardiovascular disease (Timms et al., 2002).

The gene encoding MMP-9 presents genetic polymorphisms, which affect the expression and activity of this enzyme. Among other polymorphisms, two are located in the promoter region of the MMP-9 gene and are functionally important: a single nucleotide polymorphism (SNP) C⁻¹⁵⁶²T (rs 3918242) and the microsatellite (CA)_n near the -90 position (rs 3222264) (Van den Steen et al., 2002). In vitro studies have shown that the C to T substitution at -1562 position results in the loss of binding of a nuclear repressor protein, thus leading to increased MMP-9 expression (Zhang et al., 1999). This polymorphism has been associated with increased susceptibility to arterial aneurysms (Jones et al., 2003; Lamblin et al., 2002), coronary atherosclerosis (Zhang et al., 1999), and other cardiovascular diseases (Koh et al., 2008; Morgan et al., 2003; Peters et al., 1999; Pollanen et al., 2001), although it has now affected MMP-9 levels in healthy subjects (Demacq et al., 2006). The microsatellite (CA)_n corresponds to a sequence of variable numbers of cytosine-adenine repeats (13–27 repeats) and has a bimodal distribution of allele frequencies. The first and the second peaks occur, respectively, at (CA)₁₄ and (CA)_{21–23} in many populations (Van den Steen et al., 2002). In vitro studies have shown a 50% reduction in the MMP-9 promoter activity with (CA)₁₄ compared with (CA)₂₁ (Shimajiri et al., 1999). These findings may explain the association between a number of CA repeats ≥ 22 and carotid atherosclerosis (Fiotti et al., 2006). Moreover, patients with carotid atherosclerosis and carrying more than 20 repeats in one allele showed faster intima-media thickening growth and stenosis progressions of plaques (Fiotti et al., 2005). In addition, a case-control study showed an association between the (CA)₂₃ and the occurrence of intracranial aneurysm (Peters et al., 1999).

While whole blood concentrations have been most frequently used to assess Hg exposure (Budtz-Jørgensen et al., 2004), there is growing evidence suggesting that plasma concentration is possibly a better index of exposure to heavy metals (Barbosa et al., 2006) including Hg (Berglund et al., 2005; de Marco et al., 2009; Jacob-Ferreira et al., 2009).

In the present study, we hypothesized that MMP-9 polymorphisms may modify the increases in MMP-9 levels associated with Hg exposure. Therefore, we examined whether MMP-9 genotypes for the (CA)_n and the C⁻¹⁵⁶²T polymorphisms affect plasma MMP-9 levels, as well as the concentrations of MMPs endogenous inhibitor, the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in 266 subjects environmentally exposed to Hg.

2. Materials and methods

2.1. Materials

High-purity de-ionized water (resistivity 18.2 mΩ cm) obtained by a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA) was used throughout. All reagents used were high-purity analytical grade. All chemical solutions used for Hg determination were stored in high-density polypropylene bottles. Whole blood and plasma samples were stored in 2 ml tubes at -80 °C. The tubes, the plastic bottles, the auto-sampler cups and the glassware materials used in the present study were cleaned with HNO₃ at 10% (v/v), rinsed five times with Milli-Q water and dried in a class 100 laminar flow hood located inside the class 10,000 clean room.

2.2. Study design and population

We studied 266 subjects (124 men and 142 women) living in the Tapajós River valley (Brazilian Amazon, State of Pará), aged from 15 to 87 years. Exposure to Hg in this region is through fish intake (Passos et al., 2008). All persons participated on a voluntary basis. Villagers'

data were collected using two interview-administered questionnaires. One asked about socio-demographic information (gender; age; living village; place of birth; length of time in the region; educational level; subsistence activities; work in gold mining and exposure to Hg through burning amalgam; exposure to other contaminants; frequency and quantity of smoking, drinking and drug habits; medical history; and medication). The second was a 7-day recall food consumption frequency questionnaire for species-specific fish, beef, chicken, pork or other meats, fruit species, milk/butter. For fish consumption, a list was prepared, which included most of the fish species present in the region. Participants indicated, for each day, the number of meals containing fish as well as the fish species that were consumed. Anthropometric measures (weight, height, and waist circumference) were taken by a trained technician and body mass index (BMI) was calculated.

Approval was obtained from the Ethics Committee of the University of Sao Paulo at Ribeirao Preto (Brazil), protocol number CEP/FCFRP #71. The study was explained individually to persons who agreed to participate and signed an informed consent form.

2.3. Blood collection

A trained nurse collected a 6-ml venous blood sample from each participant. Blood samples were collected in 'trace metals free' evacuated tubes (BD Vacutainer®, BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA) containing heparin as anticoagulant. Two milliliters of blood was then pipetted into an Eppendorf tube (2 ml volume) previously cleaned in a class 100 clean room and immediately frozen at -20 °C before analysis. For plasma separation, 4 ml of blood samples was centrifuged (1000×g for 6 min.). The plasma fraction was then pipetted into an Eppendorf tube (2 ml volume) previously cleaned in a class 100 clean room and immediately frozen at -70 °C before analysis.

2.4. Determination of Hg in whole blood and plasma

Hg levels in whole blood and plasma were measured by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). The concentrations of Hg in whole blood samples were measured according to the method described by Palmer et al. (2006), with a Hg detection limit of 0.17 µg/l. The concentrations of Hg in plasma samples were made according to the method described by Gouille et al. (2005), with a Hg detection limit of 0.10 µg/l.

2.5. Quality control of the results

Quality control of trace metal determination was guaranteed by the analysis of Standard Reference Materials from the U.S. National Institute of Standards and Technologies (NIST). Moreover, various secondary reference materials, either provided by the New York State Department of Health (NYS DOH PT programme for trace elements in whole blood and plasma) or by the *Institut national de santé publique du Québec*, Canada (INSP external quality assessment scheme for trace elements in blood and plasma), were analyzed. Reference samples were analyzed before and after 10 ordinary samples.

2.6. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gelatin zymography of MMP-9

Gelatin zymography of MMP-9 from plasma samples was performed as previously reported (Gerlach et al., 2005, 2007; Souza-Tarla et al., 2005). Briefly, plasma samples were diluted in sample buffer (2% SDS, 125 mM Tris-HCl; pH 6.8, 10% glycerol and 0.001% bromophenol blue) and subjected to electrophoresis on 7% SDS-PAGE co-polymerized with gelatin (1%) as the substrate. After electrophoresis was complete, the gel was incubated for 1 h at room temperature

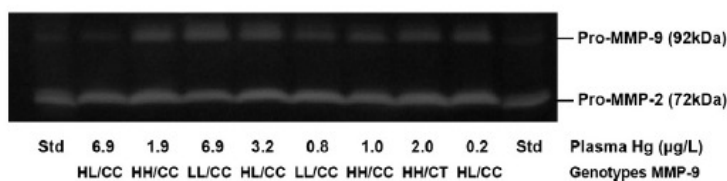


Fig. 1. Representative zymogram of plasma samples showing pro-MMP-9 (92 kDa) and pro-MMP-2 bands (72 kDa). Std, internal standard; plasma Hg, plasma Hg concentrations ($\mu\text{g/L}$); MMP, matrix metalloproteinase. HH, LL and HL, genotypes of the $(\text{CA})_n$ polymorphism of MMP-9; CC and CT, genotypes of the C^{-1562}T polymorphism of MMP-9.

in a 2% Triton X-100 solution, and incubated at 37 °C for 72 h in Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 10 mmol/l CaCl_2 . The gels were stained with 0.05% Coomassie brilliant blue G-250, and then destained with 30% methanol and 10% acetic acid. Gelatinolytic activities were detected as unstained bands against the background of Coomassie blue-stained gelatin, by densitometry using a Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) 290 (Kodak, Rochester, NY, USA). The pro forms of MMP-9 (Fig. 1) were identified as bands at 92 kDa, by the relation of log Mr to the relative mobility of Sigma SDS-PAGE LMW marker proteins.

2.7. Determination of TIMP-1 concentrations in plasma

Plasma TIMP-1 concentrations were measured by using the sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using reagents from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) following the instructions by the manufacturer. The reaction was evaluated using a $\mu\text{Quant}^{\text{TM}}$ microplate reader (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA).

2.8. Genotyping

Genomic DNA was extracted from the cellular component of whole blood, using the Easy-DNA Kit (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), following the instructions by the manufacturer, and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analyzed. Genotypes for the C^{-1562}T polymorphism were determined by polymerase chain reaction (PCR) amplification using the primers: 5'-GCC TGG CAC ATA GTA GGC CC-3' (sense) and 5'-CTT CCT AGC CAG CCG GCA TC-3' (antisense), and PCR conditions as previously described (Demacq et al., 2006; Zhang et al., 1999). The amplified products were digested with *SphI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) overnight at 37 °C, producing fragments of 247 bp and 188 bp in the case of a polymorphic variant (allele T) or an undigested 435 bp band in the case of a wild type allele (allele C). Fragments were separated by electrophoresis in 12% polyacrylamide gels and visualized by silver staining (Fig. 2A). Genotyping results by PCR/restriction were controlled by sequencing some of the DNA samples for the C^{-1562}T polymorphism.

To determine the genotypes for the $(\text{CA})_n$ polymorphism, PCR was carried out using the primers: 5'-GAC TTG GCA GTG GAG ACT GCG GGC A-39 (sense) and 5'-GAC CCC ACC CCT CCT TGA CAG GCA A-3' (antisense), as previously described (Maeda et al., 2001). PCR was performed in a 25 μl mixture with 100 ng DNA, 20 pmol of each primer, 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM MgCl_2 , 1.0 U Taq polymerase and 2.5 μl of 10X PCR buffer. After an initial denaturation at 95 °C for 5 min, the samples were subjected to 25 cycles of amplification, consisting of denaturation for 1 min at 95 °C, annealing for 1 min at 72 °C and extension for 1 min at 74 °C, followed by a final extension for 7 min. The amplified products were separated in a 7% polyacrylamide-urea gel and visualized by silver staining (Fig. 2B). Differences in molecular weight (or number of bases), from 144 bp (CA 13 repeats) to 168 bp (CA 25 repeats), were determined by comparison with migration of a 10-bp DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and with some samples from homozygotes that were sequenced

(Fig. 2B). The DNA sequencing of the homozygote samples was carried out by the method of (Sanger et al., 1992) according to the protocol of a cycle sequencing ready reaction kit (Big Dye Terminator, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), with some modifications. The samples were classified as lower (L) for less than 21 CA repeats or higher (H) for samples with 21 or more CA repeats.

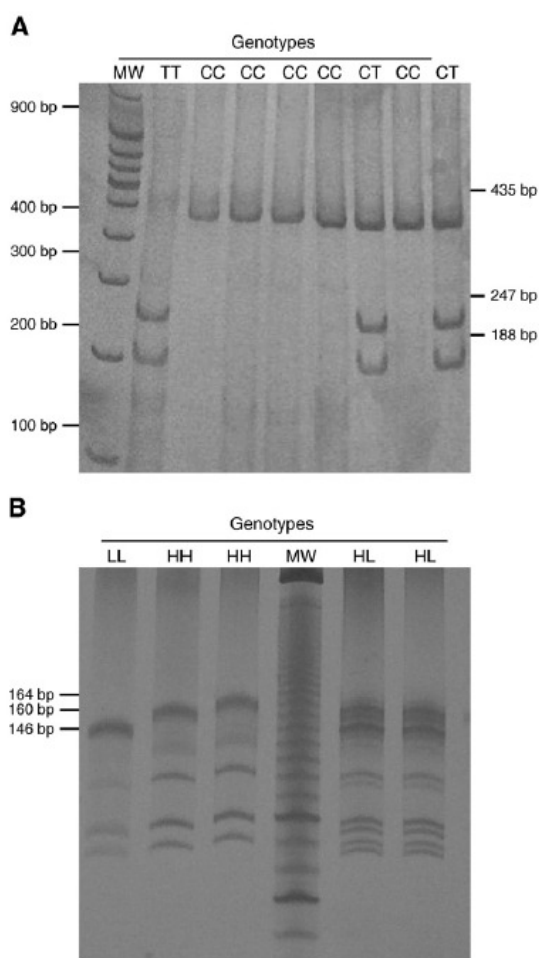


Fig. 2. Genotyping for the polymorphism in the promoter region of the MMP-9 gene. Panel A: C^{-1562}T polymorphism; the PCR products were digested with the *SphI* restriction enzyme producing different fragments leading to specific genotypes. Panel B: $(\text{CA})_n$ polymorphism; the first three lanes are from sequenced samples, used as standard: 14/14, 21/21 and 23/23, respectively. MW = molecular weight.

Table 1
Socio-demographic characteristics and biochemical parameters of the study population (N = 266) divided according to plasma Hg concentrations.

	Total			Group A			Group B			Group C					
	N	%	Range	Mean ± SD	Median	N	%	Range	Mean ± SD	Median	N	%	Range	Mean ± SD	Median
N	266					89					88				
Age (years)			15–87	42 ± 17	40			15–86	41 ± 18	38			15–87	42 ± 17	42
Gender															
Men	124	47				42	47				31	35			
Women	142	53				47	53				58	65			
Body mass index (kg/m ²)			16.4–41.5	24.5 ± 4.4	23.8			16.4–41.0	24.2 ± 4.1	24.0			16.8–41.5	24.6 ± 4.7	23.2
Smoking habits															
Smokers	65	24				20	22				26	29			
Non-smokers	201	76				69	78				63	71			
Fish consumption (meals/week)			0–15	6 ± 4	5			0–14	5 ± 4*	5			0–15	6 ± 4	6
MMP-9 (arbitrary unit)			0.05–1.81	0.54 ± 0.29	0.48			0.12–1.53	0.53 ± 0.27	0.46			0.08–1.81	0.55 ± 0.31	0.48
TIMP-1 (ng/mL)			85–696	329 ± 94	320			150–598	338 ± 93	330			150–596	332 ± 97	311
Blood Hg (µg/L)			3.5–179.3	43.4 ± 32.6	34.6			3.5–83.2	25.8 ± 17.5†	23.6			9.2–144.9	36.1 ± 24.1†	30.2
Plasma Hg (µg/L)			0.2–30.9	6.1 ± 5.7	4.5			0.2–3.1	1.4 ± 0.9‡	1.4			3.1–6.6	4.6 ± 1.1†	4.5

MMP, matrix metalloproteinase; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinase.

* p < 0.05 vs. group C.

† p < 0.001 vs. group C.

‡ p < 0.001 vs. group B.

2.9. Statistical analyses

We used descriptive statistics to present general characteristics of the population. Socio-demographic variables which could influence MMP-9 or TIMP-1 levels, such as smoking status, age, gender and BMI, were included as covariables in a multiple regression model seeking to explain changes in net MMP-9 activity in relation to plasma Hg concentrations. These variables as well as plasma Hg concentrations were then included as covariables in a multiple regression model seeking to explain changes in MMP-9, TIMP-1, and MMP-9/TIMP-1 ratio (an index of net MMP-9 activity) as a result of MMP-9 genotypes. Because we found no relation between net MMP-9 activity and MMP-9 polymorphisms when we took into consideration all the 266 subjects, we divided them into 3 groups (named A, B, and C) taking into consideration their plasma Hg concentrations (lower, intermediate, and higher tertiles, respectively). We analyzed the relation between net MMP-9 activity and MMP-9 polymorphisms in a model including smoking status, age, gender and BMI. Plasma Hg concentration was not included in this model because we carried out three analyses corresponding to the three groups A, B, and C.

When used in multiple regression models, plasma Hg concentrations were log-transformed because they present asymmetric distribution. The CT and TT genotypes for the MMP-9 C⁻¹⁵⁶²T polymorphism were grouped because the number of subjects carrying the T allele was very small. To compare the socio-demographic characteristics and the analyzed parameters between groups, we used one-way analysis of variance followed by the Tukey test. The results were defined as statistically significant when p < 0.05. The analyses were performed using Prism 3.02 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) and Jump 5.0.1a (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The distribution of genotypes for each polymorphism was also assessed for deviation from the Hardy–Weinberg equilibrium using BioEstat 5.0 (Ayres et al. Software, Belém, PA, Brazil).

3. Results

The socio-demographic characteristics and biochemical results for the 266 participants enrolled in this study are shown in Table 1. We found a significant correlation between blood Hg and plasma Hg concentrations ($r = 0.7127$; $p < 0.0001$).

Allele and genotype frequencies are shown in Table 2. The frequency of the C and T alleles for the C⁻¹⁵⁶²T polymorphism was 95.49% and 4.51%, respectively. The frequency of the H and L grouped alleles for the microsatellite (CA)_n was 64.85% and 35.15%, respectively. The distribution of genotypes for the two polymorphisms studied here showed no deviation from Hardy–Weinberg equilibrium (both $p > 0.05$).

The relationship between Hg exposure (plasma Hg concentrations) and changes in MMP-9 and TIMP-1 or MMP-9/TIMP-1 ratio was examined with multiple regression models, which included the following covariates: smoking status, age, gender and BMI. There was no relation between log of plasma Hg and MMP-9 ($\beta = 0.041630$; $p = 0.2371$). However, we found a negative association between log of plasma Hg and TIMP-1 ($\beta = -22.89477$; $p = 0.0350$), thus resulting in a positive association between log of plasma Hg and MMP-9/TIMP-1 ratio ($\beta = 0.000296$; $p = 0.0408$).

To determine the influence of MMP-9 genotypes on net MMP-9 activity levels in Hg exposed subjects, we performed multiple linear regression analysis adjusting for log plasma Hg, gender, age, BMI and smoking status. We found no relation between the studied MMP-9 polymorphisms and MMP-9 levels (all $p > 0.05$) or MMP-9/TIMP-1 ratio ($p > 0.05$).

The 266 subjects included in the present study were then divided into 3 groups (A, B, and C) with basis on their plasma Hg concentrations (lower, intermediate, and higher tertiles, respectively). We found significant intergroup differences in fish consumption (a possible indirect indicator of Hg exposure in the present study),

Table 2
MMP-9 alleles and genotypes frequency distributions.

Genotypes Total (N=266)		
C ⁻¹⁵⁶² T	%	N
CC	91.35	243
CT	8.27	22
TT	0.38	1
(CA) _n		
HH	44.36	118
HL	40.98	109
LL	14.66	39
Alleles Total (N=532)		
C ⁻¹⁵⁶² T	%	N
C	95.49	508
T	4.51	24
(CA) _n		
H	64.85	345
L	35.15	187

with higher fish consumption by subjects in the C group compared with those in the A group ($p < 0.05$; Table 1). No other differences between groups were found with respect to socio-demographic characteristics or biochemical variables. We performed multiple regression analyses for each group separately to determine the influence of MMP-9 genotypes on MMP-9 levels. We used as covariables: age, gender, BMI and smoking status. The results for multiple linear regression analyses are shown in Table 3.

The (CA)_n microsatellite polymorphism affected MMP-9 levels and marginally modified MMP-9/TIMP-1 ratios ($p = 0.0175$, and $p = 0.0545$, respectively) in the A group (low Hg exposure). The HH genotype was associated with higher MMP-9 levels and higher MMP-9/TIMP-1 ratios, whereas the LL genotype was associated with lower MMP-9 levels and lower MMP-9/TIMP-1 ratios. MMP-9 and MMP-9/TIMP-1 levels were also positively associated with smoking ($\beta = 0.080488$, $p = 0.0223$; and $\beta = 0.000274$, $p = 0.0407$, respectively), and negatively associated with age ($\beta = -0.005478$, $p = 0.0006$; and $\beta = -0.000029$, $p < 0.0001$, respectively). TIMP-1 was positively associated with age ($\beta = 1.997077$, $p = 0.0006$). There was no association between the C⁻¹⁵⁶²T polymorphism and net MMP-9 activity in the A group.

Both MMP-9 polymorphisms had no effects on MMP-9 or MMP-9/TIMP-1 levels in the B and C groups (intermediate and high plasma Hg concentrations, respectively).

4. Discussion

The main novel findings reported here is that the microsatellite (CA)_n MMP-9 genotypes are associated with MMP-9 and MMP-9/TIMP-1 levels in subjects exposed to Hg at low concentrations. However, this polymorphism had no major influence on the MMP-9 levels in subjects with intermediate or high Hg levels. In addition, we found no association between the C⁻¹⁵⁶²T polymorphism and net MMP-9 activity. These findings suggest that the (CA)_n genotypes may affect MMP-9 levels in subjects exposed to low levels of Hg, leading to higher MMP-9 levels in subjects with HH genotype, and possibly increasing their cardiovascular risk, as suggested by a number of studies (Blankenberg et al., 2003; Timms et al., 2002; Zouridakis et al., 2004). However, this MMP-9 polymorphism may not be relevant in subjects exposed to intermediate or high Hg levels.

Elevated levels of Hg in fish and in humans have been reported in the Brazilian Amazon, with significant relations between fish consumption and biomarkers of Hg exposure being consistently

Table 3
Multiple linear regression analysis for MMPs, TIMPs and MMP/TIMP ratios, using the genotypes of CT and (CA)_n polymorphisms as independent variables (N = 88 or 89/group, N total = 266).

Source	Group A [Hg plasma (µg/l): 0.2–3.1]				Group B [Hg plasma (µg/l): 3.1–6.6]				Group C [Hg plasma (µg/l): 6.8–30.9]							
	MMP-9	TIMP-1	MMP-9/TIMP-1		MMP-9	TIMP-1	MMP-9/TIMP-1		MMP-9	TIMP-1	MMP-9/TIMP-1					
	Rsquare	RMSE	β	p	Rsquare	RMSE	β	p	Rsquare	RMSE	β	p				
Model	0.218289	0.246864	0.151753	89.67769	0.269069	0.00094	0.091364	0.310472	0.159247	93.02892	0.137651	0.001270	0.268531	80.43960	0.225546	0.001230
(CA) _n	0.0175				0.0545				0.2822				0.5658			0.5081
HH	0.107561	0.0115	2.640827	0.8616	0.0264	0.060119	0.2184	2.141025	0.8832	0.000195	0.3289	0.000153	0.036523	11.10336	0.3977	0.000233
HL	0.057613	0.1668	7.941962	0.5980	0.0001574	0.3198	-0.005527	0.9063	0.1220	0.000153	0.4277	-0.032839	0.4768	-0.483828	0.9699	0.000006
LL	-0.165174	0.0065	-10.58279	0.6237	-0.000516	0.0247	-0.054592	0.3316	19.78576	0.2409	-0.000347	0.1325	0.069362	-10.61953	0.5575	0.000228
C ⁻¹⁵⁶² T	0.004847	0.9347	8.280999	0.7002	0.8124	0.005187	0.9318	33.59331	0.0672	-0.000175	0.4809	0.039250	0.4289	0.692024	0.9599	0.000238
CT or TT	-0.004847	0.9347	-8.280999	0.7002	0.8124	-0.005187	0.9318	-33.59331	0.0672	0.000175	0.4809	-0.039250	0.4289	-0.692024	0.9599	-0.000238
Gender	-0.012037	0.6785	12.34298	0.2437	-0.000071	0.5207	0.054686	0.1360	5.160844	0.06410	0.000227	0.1351	0.044278	-6.917580	0.4727	0.000282
(F)	-0.005478	0.0006	1.997077	0.0006	<0.0001	-0.002605	0.2296	1.852074	0.0052	-0.000018	0.4453	-0.000303	0.8815	2.726242	<0.0001	-0.000027
Age	0.009635	0.1532	0.828118	0.7339	0.000035	0.1722	0.009483	0.2256	-1.583779	0.4981	0.000035	0.2701	0.001663	1.441399	0.5134	-0.000006
BMI	0.080488	0.0223	-2.216269	0.8602	0.000274	0.0407	0.027636	0.4664	7.272700	0.5222	0.000017	0.9104	0.096122	-0.7087162	0.5112	0.000500
Smoking status																
(Y)																

MMP, matrix metalloproteinase; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinase; BMI, body mass index.

described (Passos et al., 2008; Passos and Mergler, 2008). Indeed, the consumption of Hg-containing fish is the main source of Hg exposure for the riparian communities from the Tapajos River Basin. In agreement with our findings, the differences in plasma Hg concentrations reflect differences in fish consumption. In this regard, although Hg concentrations in hair and whole blood are the most frequently used biomarkers for assessment of Hg exposure (Budtz-Jorgensen et al., 2004), plasma Hg may be a relevant index of exposure and health risks associated with Hg exposure, especially when considering the risk of cardiovascular diseases (Jacob-Ferreira et al., 2009).

MMPs can be regulated at the levels of gene transcription and translation, by post-translational modifications, and by interactions with their endogenous inhibitors (TIMPs). There is a physiological balance between MMPs and TIMPs under normal circumstances (Van den Steen et al., 2002). While TIMPs are not specific inhibitors of any MMP, TIMP-1 is the major MMP-9 inhibitor (Goldberg et al., 1992). Therefore, the assessment of MMP-9/TIMP-1 may lead to improved information regarding net MMP-9 activity, and many disease states are associated with altered net MMP-9 activity (Tan et al., 2007). Indeed, the circulating MMP-9 levels have been suggested to be a clinically relevant blood-borne biochemical marker of diagnostic and prognostic value in cardiovascular disease conditions (Altieri et al., 2003; Blankenberg et al., 2003; Lynch et al., 2004; Martinez et al., 2006; Sundstrom and Vasan, 2006). The positive association between plasma Hg concentrations and net MMP-9 levels reported in the present study is consistent with the idea that Hg may increase the susceptibility to cardiovascular diseases by promoting MMP-9 activity (Jacob-Ferreira et al., 2009). Interestingly, recent studies have shown altered MMP levels in clinical conditions associated with increased risk of cardiovascular diseases (Belo et al., 2009; Goncalves et al., 2009; Marcaccini et al., 2009; Martins-Oliveira et al., 2009; Palei et al., 2008; Uzuelli et al., 2008). In addition, many of these studies have shown increased MMPs/TIMPs ratio (Belo et al., 2009; Martins-Oliveira et al., 2009; Palei et al., 2008), which clearly indicate an imbalanced protease activity in these conditions. It is possible that this increased net protease activity leads to structural and functional modifications of the cardiovascular system and increased risk of clinically relevant events (Castro et al., 2008, 2010).

The initial analysis of the possible effects of MMP-9 polymorphisms on net MMP-9 levels showed no significant relation between the (CA)_n or the C⁻¹⁵⁶²T polymorphisms and net MMP-9 levels. However, when the subjects were divided into three groups (tertiles), we found a significant relation between net MMP-9 levels and the genotypes for the microsatellite (CA)_n polymorphism in subjects exposed to low Hg concentrations. In this group, subjects with the HH genotype had higher net MMP-9 levels, whereas subjects with the LL genotype had lower net MMP-9 levels. These findings are consistent with *in vitro* results showing that a high number of (CA) repeats are associated with increased MMP-9 promoter activity (Shimajiri et al., 1999) and increased MMP-9 levels when compared with a low number of repeats. These findings suggest that subjects with the HH genotype may be exposed to increased cardiovascular risk associated with this particular genotype (Blankenberg et al., 2003; Timms et al., 2002; Zouridakis et al., 2004). Conversely, we found no such association between (CA)_n genotypes and MMP-9 levels in subjects exposed to intermediate or high Hg levels. It is possible that the particular mechanisms by which Hg enhances MMP-9 levels are dominant and not dependent on MMP-9 polymorphisms when Hg exposure is more severe. Together, these findings suggest that the genetic contribution to MMP-9 levels is more evident at low Hg levels.

We found no effects associated with the C⁻¹⁵⁶²T MMP-9 polymorphism on MMP-9 levels. It is possible that the relatively small sample size for each group (N = 70 or 71/group) may have limited the power to detect possible effects associated with rare T allele for this polymorphism.

Taking into consideration other variables included in the multiple regression models, we found a positive relation between smoking

status and MMP-9 and MMP-9/TIMP-1 ratio levels, even with a small number of smokers included in the present study. This finding is consistent with previous studies showing a positive relationship between smoking and MMP levels (Belvisi and Bottomley, 2003; Morimoto et al., 1997; Ning et al., 2007; Raitio et al., 2005; Segura-Valdez et al., 2000; Wright et al., 2007). Although the cardiovascular risk is known to be higher in the elderly, we found a negative association between MMP-9 and MMP-9/TIMP-1 levels and age, as well as a positive association between TIMP-1 levels and age. Similar associations were found in other studies (Bonnema et al., 2007; Jacob-Ferreira et al., 2009; Paczek et al., 2008). We found a trend to higher MMP-9/TIMP-1 ratios in women when compared with men in the C group (higher plasma Hg concentrations). Precise relationships between MMPs and gender have not been established yet. However, it is possible that gender-specific differences exist when dealing with pathophysiological mechanisms involved in cardiovascular diseases (Samnegard et al., 2009).

This is the first study to report on the possible association between MMP-9 polymorphisms and increased MMP-9 and MMP-9/TIMP-1 levels in subjects exposed to Hg. We have also carried out haplotype analysis including genotypes for the two MMP-9 polymorphisms described in the present study, as previously described (Demacq et al., 2009; Demacq et al., 2008b; Sandrim et al., 2010). However, we found no significant association (data not shown) between MMP-9 haplotypes and MMP-9 and MMP-9/TIMP-1 levels in the present study. Although haplotype analysis has been valued as a more powerful approach than the analysis of single polymorphisms, it may be less informative when a causal connection between genetic variations and a phenotype is truly driven by a single polymorphism (Palei et al., 2010). This may well be the case of the present study. However, larger studies are required to confirm our haplotype findings.

5. Conclusion

In conclusion, our findings suggest a significant interaction between the (CA)_n polymorphism and low levels of Hg exposure, possibly increasing the risk of developing cardiovascular diseases in subjects with HH genotype (or H alleles) for the (CA)_n polymorphism, when compared with those with LL genotype (or L alleles). These findings need further clinical confirmation with long term studies looking at clinical events.

Acknowledgements

This study was supported by Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Altieri P, Brunelli C, Garibaldi S, Nicolino A, Ubaldi S, Spallarossa P, et al. Metalloproteinases 2 and 9 are increased in plasma of patients with heart failure. *Eur J Clin Invest* 2003;33:648–56.
- Barbosa Jr F, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Matrix metalloproteinase-9 activity in plasma correlates with plasma and whole blood lead concentrations. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006;98:559–64.
- Belo VA, Souza-Costa DC, Lana CM, Caputo FL, Marcaccini AM, Gerlach RF, et al. Assessment of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-8, MMP-9, and their inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in obese children and adolescents. *Clin Biochem* 2009;42:984–90.
- Belvisi MG, Bottomley KM. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a therapeutic role for inhibitors of MMPs? *Inflamm Res* 2003;52:95–100.
- Berglund M, Lind B, Bjornberg KA, Palm B, Einarsson O, Vahter M. Inter-individual variations of human mercury exposure biomarkers: a cross-sectional assessment. *Environ Health* 2005;4:20.
- Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 2003;107:1579–85.

- Boffetta P, Sallsten G, Garcia-Gomez M, Pompe-Kirn V, Zaridze D, Bulbulyan M, et al. Mortality from cardiovascular diseases and exposure to inorganic mercury. *Occup Environ Med* 2001;58:461–6.
- Bonnema DD, Webb CS, Pennington WR, Stroud RE, Leonard AE, Clark LL, et al. Effects of age on plasma matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs). *J Card Fail* 2007;13:530–40.
- Budtz-Jorgensen E, Grandjean P, Jorgensen PJ, Weihe P, Keiding N. Association between mercury concentrations in blood and hair in methylmercury-exposed subjects at different ages. *Environ Res* 2004;95:385–93.
- Castro MM, Rizzi E, Figueiredo-Lopes L, Fernandes K, Bendhack LM, Pitol DL, et al. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. *Atherosclerosis* 2008;198:320–31.
- Castro MM, Rizzi E, Prado CM, Rossi MA, Tanus-Santos JE, Gerlach RF. Imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in hypertensive vascular remodeling. *Matrix Biol* 2010;29:194–201.
- Clarkson TW, Magos L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit Rev Toxicol* 2006;36:609–62.
- de Marco KC, Passos CJ, Sertorio J, Tanus-Santos JE, Barbosa Jr F. Environmental exposure to methylmercury is associated with a decrease in nitric oxide production. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2009;106(5):411–5.
- Demacq C, de Souza AP, Machado AA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Genetic polymorphism of matrix metalloproteinase (MMP)-9 does not affect plasma MMP-9 activity in healthy subjects. *Clin Chim Acta* 2006;365:183–7.
- Demacq C, Metzger IF, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Inverse relationship between markers of nitric oxide formation and plasma matrix metalloproteinase-9 levels in healthy volunteers. *Clin Chim Acta* 2008a;394:72–6.
- Demacq C, Vasconcelos VB, Marcaccini AM, Gerlach RF, Silva Jr WA, Tanus-Santos JE. Functional polymorphisms in the promoter of the matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene are not linked with significant plasma MMP-9 variations in healthy subjects. *Clin Chem Lab Med* 2008b;46:57–63.
- Demacq C, Vasconcelos VB, Marcaccini AM, Gerlach RF, Machado AA, Tanus-Santos JE. A genetic polymorphism of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) affects the changes in circulating MMP-9 levels induced by highly active antiretroviral therapy in HIV patients. *Pharmacogenomics* 2009;9:265–73.
- Hotti N, Altamura N, Fiscaro M, Carraro N, Abovasio R, Sarra VM, et al. MMP-9 microsatellite polymorphism: association with the progression of intima-media thickening and constrictive remodeling of carotid atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 2005;182:287–92.
- Hotti N, Altamura N, Fiscaro M, Carraro N, Uxa L, Grassi G, et al. MMP-9 microsatellite polymorphism and susceptibility to carotid arteries atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1330–6.
- Garvin P, Nilsson L, Carstensen J, Jonasson L, Kristenson M. Circulating matrix metalloproteinase-9 is associated with cardiovascular risk factors in a middle-aged normal population. *PLoS One* 2008;3:e1774.
- Gerlach RF, Uzuelli JA, Souza-Tarla CD, Tanus-Santos JE. Effect of anticoagulants on the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Anal Biochem* 2005;344:147–9.
- Gerlach RF, Demacq C, Jung K, Tanus-Santos JE. Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma. *Clin Biochem* 2007;40:119–23.
- Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT, Marmer BL. Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J Biol Chem* 1992;267:4583–91.
- Goncalves FM, Jacob-Ferreira AL, Gomes VA, Casella-Filho A, Chagas AC, Marcaccini AM, et al. Increased circulating levels of matrix metalloproteinase (MMP)-8, MMP-9, and pro-inflammatory markers in patients with metabolic syndrome. *Clin Chim Acta* 2009;403:173–7.
- Gouille JP, Mahieu L, Castermant J, Neveu N, Bonneau L, Laine G, et al. Metal and metalloids multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair. Reference values. *Forensic Sci Int* 2005;153:39–44.
- Guallar E, Sanz-Gallardo M, van't Veer P, Bode P, Aro A, Gomez-Aracena J, et al. Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 2002;347:1747–54.
- Jacob-Ferreira AL, Passos CJ, Jordao AA, Filion M, Mergler D, Lemire M, et al. Mercury exposure increases circulating net matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2009;105:281–8.
- Jones GT, Phillips VL, Harris EL, Rossak JJ, van Rij AM. Functional matrix metalloproteinase-9 polymorphism (C-1562T) associated with abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2003;38:1363–7.
- Koh YS, Chang K, Kim PJ, Seung KB, Baek SH, Shin WS, et al. A close relationship between functional polymorphism in the promoter region of matrix metalloproteinase-9 and acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2008;127:430–2.
- Lamblin N, Bauters C, Hemant X, Lablanche JM, Helbecque N, Amouyel P. Polymorphisms in the promoter regions of MMP-2, MMP-3, MMP-9 and MMP-12 genes as determinants of aneurysmal coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:43–8.
- Lynch JR, Blessing R, White WD, Grocott HP, Newman MF, Laskowitz DT. Novel diagnostic test for acute stroke. *Stroke* 2004;35:57–63.
- Maeda S, Haneda M, Guo B, Koya D, Hayashi K, Sugimoto T, et al. Dinucleotide repeat polymorphism of matrix metalloproteinase-9 gene is associated with diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2001;60:1428–34.
- Marcaccini AM, Novaes Jr AB, Meschiari CA, Souza SL, Palioto DB, Sorgi CA, et al. Circulating matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) and MMP-9 are increased in chronic periodontal disease and decrease after non-surgical periodontal therapy. *Clin Chim Acta* 2009;409:117–22.
- Martinez ML, Lopes LF, Coelho EB, Nobre F, Rocha JB, Gerlach RF, et al. Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-9 activity in patients with hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;47:117–22.
- Martins-Oliveira A, Speciali JG, Dach F, Marcaccini AM, Goncalves FM, Gerlach RF, et al. Different circulating metalloproteinases profiles in women with migraine with and without aura. *Clin Chim Acta* 2009;408:60–4.
- Mergler D, Anderson HA, Chan LH, Mahaffey KR, Murray M, Sakamoto M, et al. Methylmercury exposure and health effects in humans: a worldwide concern. *Ambio* 2007;36:3–11.
- Morgan AR, Zhang B, Tapper W, Collins A, Ye S. Haplotype analysis of the MMP-9 gene in relation to coronary artery disease. *J Mol Med* 2003;81:321–6.
- Morimoto Y, Tsuda T, Nakamura H, Hori H, Yamato H, Nagata N, et al. Expression of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, and extracellular matrix mRNA following exposure to mineral fibers and cigarette smoke in vivo. *Environ Health Perspect* 1997;105(Suppl. 5):1247–51.
- Ning W, Dong Y, Sun J, Li C, Matthy MA, Feghali-Bostwick CA, et al. Cigarette smoke stimulates matrix metalloproteinase-2 activity via EGR-1 in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;36:480–90.
- Paczek I, Michalska W, Bartłomiejczyk I, Trypsin, elastase, plasmin and MMP-9 activity in the serum during the human ageing process. *Age Ageing* 2008;37:318–23.
- Palei AC, Sandrim VC, Cavalli RC, Tanus-Santos JE. Comparative assessment of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9, and their inhibitors, tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in preeclampsia and gestational hypertension. *Clin Biochem* 2008;41:875–80.
- Palei AC, Sandrim VC, Duarte G, Cavalli RC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Matrix metalloproteinase (MMP)-9 genotypes and haplotypes in preeclampsia and gestational hypertension. *Clin Chim Acta* 2010;411:874–7.
- Palmer CD, Lewis ME, Geraghty CM, Barbosa F, Parsons PJ. Determination of lead, cadmium and mercury in blood for assessment of environmental exposure: a comparison between inductively coupled plasma-mass spectrometry and atomic absorption spectrometry. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc* 2006;61:980–90.
- Passos CJ, Mergler D. Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review. *Cad Saude Publica* 2008;24(Suppl. 4):s503–20.
- Passos CJ, Da Silva DS, Lemire M, Filion M, Guimaraes JR, Lucotte M, et al. Daily mercury intake in fish-eating populations in the Brazilian Amazon. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2008;18:76–87.
- Peters DG, Kassam A, St Jean PL, Yonas H, Ferrell RE. Functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-9 promoter as a potential risk factor for intracranial aneurysm. *Stroke* 1999;30:2612–6.
- Pollanen PJ, Karhunen PJ, Mikkelsson J, Jaipala P, Perola M, Penttila A, et al. Coronary artery complicated lesion area is related to functional polymorphism of matrix metalloproteinase 9 gene: an autopsy study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1446–50.
- Ra HJ, Parks WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol* 2007;26:587–96.
- Raitio A, Tuomas H, Kokkonen N, Salo T, Sorsa T, Hanemaaijer R, et al. Levels of matrix metalloproteinase-2, -9 and -8 in the skin, serum and saliva of smokers and non-smokers. *Arch Dermatol Res* 2005;297:242–8.
- Registry AflSaD. Toxicological Profile for Mercury. In: Service USDoHaSPH, editor. Atlanta, GA, 1999.
- Salonen JT, Seppanen K, Lakka TA, Salonen R, Kaplan GA. Mercury accumulation and accelerated progression of carotid atherosclerosis: a population-based prospective 4-year follow-up study in men in eastern Finland. *Atherosclerosis* 2000;148:265–73.
- Samnegard A, Hulthe J, Silveira A, Ericsson CG, Hamsten A, Eriksson P. Gender specific associations between matrix metalloproteinases and inflammatory markers in post myocardial infarction patients. *Atherosclerosis* 2009;202:550–6.
- Sandrim VC, Palei AC, Luizoz MR, Izidoro-Toledo TC, Cavalli RC, Tanus-Santos JE. eNOS haplotypes affect the responsiveness to antihypertensive therapy in preeclampsia but not in gestational hypertension. *Pharmacogenomics* 2010;10:40–5.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *1977. Biotechnology* 1992;24:104–8.
- Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M, Uhal BD, Becerril C, Selman M. Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest* 2000;117:684–94.
- Shimajiri S, Arima N, Tanimoto A, Murata Y, Hamada T, Wang KY, et al. Shortened microsatellite d(CA)₂₁ sequence down-regulates promoter activity of matrix metalloproteinase 9 gene. *FEBS Lett* 1999;455:70–4.
- Souza-Tarla CD, Uzuelli JA, Machado AA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Methodological issues affecting the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Clin Biochem* 2005;38:410–4.
- Sundstrom J, Vasan RS. Circulating biomarkers of extracellular matrix remodeling and risk of atherosclerotic events. *Curr Opin Lipidol* 2006;17:45–53.
- Tan J, Hua Q, Xing X, Wen J, Liu R, Yang Z. Impact of the metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 system on large arterial stiffness in patients with essential hypertension. *Hypertens Res* 2007;30:959–63.
- Timms PM, Mannan N, Hitman GA, Noonan K, Mills PG, Syndercombe-Court D, et al. Circulating MMP9, vitamin D and variation in the TIMP-1 response with VDR genotype: mechanisms for inflammatory damage in chronic disorders? *QJM* 2002;95:787–96.
- Uzuelli JA, Dias-Junior CA, Tanus-Santos JE. Severity dependent increases in circulating cardiac troponin I and MMP-9 concentrations after experimental acute pulmonary thromboembolism. *Clin Chim Acta* 2008;388:184–8.
- Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2002;37:375–536.

- Virtanen JK, Voutilainen S, Rissanen TH, Mursu J, Tuomainen TP, Korhonen MJ, et al. Mercury, fish oils, and risk of acute coronary events and cardiovascular disease, coronary heart disease, and all-cause mortality in men in eastern Finland. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:228–33.
- Virtanen JK, Rissanen TH, Voutilainen S, Tuomainen TP. Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases. *J Nutr Biochem* 2007; 18:75–85.
- Woessner JF. The matrix metalloproteinase family. In: Parks WC, Mechem RP, editors. *Matrix Metalloproteinases*. San Diego, CA: Academic Press; 1998. p. 1–14.
- Wright JL, Tai H, Wang R, Wang X, Churg A. Cigarette smoke upregulates pulmonary vascular matrix metalloproteinases via TNF-alpha signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292:L125–33.
- Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1999;99:1788–94.
- Zouridakis E, Avanzas P, Arroyo-Espiguero R, Fredericks S, Kaski JC. Markers of inflammation and rapid coronary artery disease progression in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 2004;110:1747–53.

Please cite this article as: Jacob-Ferreira ALB, et al, A functional matrix metalloproteinase (MMP)-9 polymorphism modifies plasma MMP-9 levels in subjects environmentally exposed to mercury, *Sci Total Environ* (2010), doi:10.1016/j.scitotenv.2010.05.036