



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

ANA LUÍZA DIOGO DE OLIVEIRA

**POTENCIAL HEPATOTÓXICO DO METILMERCÚRIO EM CAMUNDONGOS
C57BL/6J LACTENTES**

FORTALEZA

2017

ANA LUÍZA DIOGO DE OLIVEIRA

**POTENCIAL HEPATOTÓXICO DO METILMERCÚRIO EM CAMUNDONGOS
C57BL/6J LACTENTES**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ramon da Silva Raposo.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

O45 Oliveira, Ana Luíza Diogo de.
Potencial Hepatotóxico do Metilmercúrio em Camundongos C57BL/6J Lactentes / Ana Luíza Diogo de Oliveira. – 2017.
42 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Ramon da Silva Raposo.

1. Metilmercúrio. 2. Fígado. 3. Lactentes. I. Título.

CDD 661

ANA LUÍZA DIOGO DE OLIVEIRA

**POTENCIAL HEPATOTÓXICO DO METILMERCÚRIO EM CAMUNDONGOS
C57BL/6J LACTENTES**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ramon da Silva Raposo (Orientador)
Universidade de Fortaleza (Unifor)

Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Ms. Edyane Pereira Barroso Raposo
Vigilância Epidemiológica – Coordenadoria Regional de Saúde I.

A Deus e à minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tornar tudo isso possível. Por todo o Amor e Fé que me motivam e me dão forças para seguir em frente.

Aos meus pais, Verônica e Delmy, por todo o Amor, incentivo, confiança, dedicação, paciência, conselhos, valores e Fé. Por acreditarem em mim, e fazerem com que eu também acreditasse. Sou imensamente grata. “A bênção minha mãe, a bênção meu pai; A luta de vocês que de mim fez um samurai” (Ser feliz, Rael).

Aos meus irmãos, Beatriz e Delmy Filho, por toda a torcida, companheirismo, Amor, carinho e cuidado.

Aos meus familiares, muito grata pela torcida por todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Ramon Raposo, pela orientação, aprendizado, incentivo, toda a atenção, solicitude e preciosos ensinamentos. Gratidão por ter confiado em mim e me acolhido de braços abertos, concedendo-me tamanha oportunidade.

Ao Prof. Dr. Vicente Faria, pela orientação na monitoria, pela paciência, conselhos, incentivo e confiança.

Ao Daniel, pelo apoio, paciência, conselhos, dicas, ensinamentos e reflexões, sem os quais não teria sido possível a execução deste trabalho.

À Réuria, ao Israel, e colegas do Nubex, pelos ensinamentos acerca do trabalho no Biotério, por toda paciência e companheirismo.

À dona Beth, pela disponibilidade, paciência e ajuda em todo o processo de preparo das lâminas.

À Universidade de Fortaleza e ao Nubex, pela disponibilização da infraestrutura.

Às amigas Tanimara e Clara, por todo o companheirismo, estudos em grupo, confiança e tantos momentos que passamos juntas no decorrer destes 5 anos. Nem imagino como teria sido o curso sem ter vocês comigo.

Aos Paninhos, às Marrentas, “Alana casou?” e Lindotecs, pela amizade, companheirismo e momentos de descontração, que me mantiveram de pé nos momentos difíceis.

À minha priminha Luiza, que com tanta paciência me ajudou com as últimas revisões e retoques finais. Grata pela força!

Aos professores do Bacharelado em Biotecnologia, por toda a contribuição em meu desenvolvimento acadêmico, profissional e pessoal.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa e Ms. Edyane Pereira Barroso Raposo, por aceitarem o convite e dividirem comigo este momento tão importante.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente na execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

“É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê”.

(Além do que se vê, Los Hermanos)

RESUMO

A intoxicação por mercúrio vem sendo considerada um grande problema ambiental, com relatos de casos de exposição desde a década de 50. O mercúrio liberado por atividades antropogênicas se sedimenta em solos e rios, onde é convertido para sua forma orgânica metilada, o metilmercúrio. Sendo consumido por peixes, chega aos seres humanos por meio da atividade pesqueira, atingindo principalmente populações ribeirinhas. O fígado, como um órgão alvo na intoxicação por metilmercúrio foi o foco deste estudo. Devido a ampla disponibilidade de estudos com organismos adultos e acerca da contaminação via placenta, este visou avaliar os danos induzidos exclusivamente por meio da amamentação. Para tal trabalho, foram utilizados camundongos C57BL/6J selvagens em desenvolvimento pós-natal. Os animais foram divididos em 2 grupos: sem intoxicação e com intoxicação, sendo administrados a este último 20 mg/L de cloreto de metilmercúrio através da água de beber. Amostras de fígado foram coletadas para condução de análise histológica por leitura em microscópio óptico. O grupo ao qual foi administrado solução de cloreto de metilmercúrio apresentou hepatócitos de tamanho, forma e cor normais, bem como ausência de figuras de mitose ou anormalidades de mutagênese, sem área de necrose ou aumento na quantidade de células de defesa de Kupffer. Não foram observadas alterações histopatológicas no grupo intoxicado, quando comparado ao grupo controle. Tais resultados indicam que não houve a passagem de metilmercúrio via aleitamento materno em quantidades suficientes para induzir danos histológicos.

Palavras-chave: metilmercúrio, fígado, lactentes.

ABSTRACT

Intoxication by methylmercury has been considered a major environmental issue, with reports of exposure cases since the 50's. The mercury released by anthropogenic activities sediments on soils and waters, where it is converted into its organic methylated form, methylmercury. Being consumed by fishes, it gets to humans through fishing activities, reaching mainly the riverside population. The liver, as a target organ in methylmercury intoxication was the highlight of this study. Given to the wide availability of studies with adult organisms and concerning placental contamination, this one aims to evaluate damages induced exclusively through breastfeeding. For such purpose, postnatal in development wild C57BL/6J mice were used. Animals were divided into two groups: without intoxication and with intoxication, administering 20mg/L methylmercury chloride through drinking water to the last one. Liver samples were collected to perform histological analysis of the liver by optical microscopy. The group that received methylmercury chloride presented normally shaped, sized and colored hepatocytes, as well as absence of mitosis figures or mutagenesis abnormalities, with no necrosis area or increase in the amount of defense cells of Kupffer. No histopathological changes were observed in the intoxicated group, when compared to the control group. Such results indicate that there was no passage of methylmercury via breastfeeding in sufficient amounts to induce histological damage.

Keywords: methylmercury, liver, suckling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Distribuição de pacientes com Doença de Minamata em áreas costeiras do mar de Yatsushiro. Números em parênteses indicam o número de pacientes registrados com a doença em dezembro, 2010.....	16
Figura 2	– Mapa do Iraque, mostrando as províncias onde extensivos estudos foram realizados acerca da contaminação com metilmercúrio.....	17
Figura 3	– Esquema do ciclo biogeoquímico de mercúrio no ambiente Amazônico. (?) = processos presumidos mas desconhecidos.....	20
Figura 4	– Entrada para área de experimentação, controlada por biometria.....	29
Figura 5	– Antesala de paramentação, anterior à entrada na área de experimentação.....	30
Figura 6	– Sala de camundongos em experimentação.....	30
Figura 7	– Rack ventilado com microisoladores e relógio termo-higrômetro.....	31
Figura 8	– Microscópio binocular Primo Star ZEISS.....	34
Figura 9	– Camundongos C57BL/6J ao 18º dia de vida, sendo A: grupo controle, e B: grupo intoxicado com cloreto de metilmercúrio.....	35
Figura 10	– Análise histológica do fígado.....	37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Médias de pesos de animais e fígados de grupos controle e intoxicado.....	36
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AC	Antes de Cristo
Al	Alumínio
As	Arsênio
Cr	Cromo
Cu	Cobre
Da	Dalton
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FCF-IQ/USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Instituto de Química / Universidade de São Paulo
Fe	Ferro
g	Gramas
h	Horas
Hg	Mercúrio
Kg	Quilograma
L	Litro
MeHg	Metilmercúrio
mg	Miligrama
mL	Mililitros
Mn	Manganês
NaCl	Cloreto de Sódio
Nubex	Núcleo de Biologia Experimental
pH	Potencial Hidrogeniônico
Unifor	Universidade de Fortaleza
%	Percentual
°C	Graus centígrados
µm	Micromêtro
®	Marca registrada

SUMÁRIO

1	REFERENCIAL TEÓRICO	15
1.1	Introdução.....	15
1.2	Mercúrio (Hg) e metilmercúrio (MeHg).....	19
1.2.1	Biometilação.....	21
1.3	Efeitos ambientais.....	22
1.3.1	Absorção e cadeia alimentar.....	22
1.3.2	Efeitos no organismo e exposição por amamentação.....	23
1.3.2.1	O Fígado.....	25
1.3.2.2	Danos celulares.....	27
2	OBJETIVO	28
2.1	Objetivo geral.....	28
2.2	Objetivo específico.....	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1	Animais e grupos experimentais.....	29
3.1.1	Formação de grupos por acasalamento.....	32
3.1.2	Modelo de intoxicação mercurial.....	32
3.1.3	Ética.....	32
3.2	Isolamento e coleta de amostras de fígado.....	32
3.3	Análise histológica de fígado.....	33
3.3.1	Preparo de lâminas.....	33
3.3.2	Leitura em microscópio óptico.....	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	Análise histológica de fígado.....	35
5	CONCLUSÃO	39
	REFERÊNCIAS	40

1 REFERENCIAL TEÓRICO

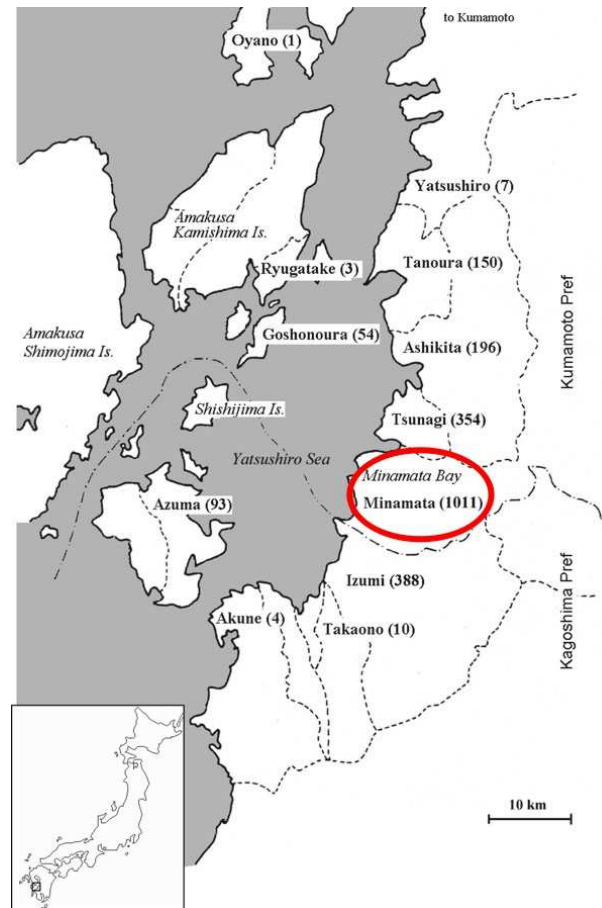
1.1 Introdução

Os primeiros casos de intoxicação envolvendo metilmercúrio (MeHg) a serem identificados e registrados, decorrentes do Desastre de Minamata, ocorreram em 1956. Devido ao acelerado crescimento econômico do Japão no período pós-Segunda Guerra Mundial, houve um aumento nas atividades industriais. Chisso Co. Ltd., com sua produção de acetaldeído a partir do uso de Hg inorgânico, passou a despejar grandes quantidades de dejetos contaminados na baía de Minamata, cidade localizada na costa ocidental da ilha de Kyushu. O metilmercúrio (MeHg), formado durante a síntese de acetaldeído pela reação de acetileno com água, era descartado nas águas do litoral (CECCATELLI & ASCHNER, 2012).

A moléstia, provocada por severo grau de intoxicação com MeHg, foi nomeada Doença ou Mal de Minamata, e tinha como principais sintomas desordens neurológicas irreversíveis, tais como perda do controle muscular em movimentos voluntários, tremores, problemas de audição e visão e dificuldade de fala (KUGLER, 2017).

Estudos revelaram níveis elevados de Hg no couro cabeludo de pacientes e pesquisadores passaram a relacionar seus sintomas com a frequência do consumo de peixes e ostras, tendo em vista o local de residência e período no mesmo. Famílias envolvidas em atividades pesqueiras foram as mais atingidas. Outras cidades nos arredores de Minamata também foram afetadas (Figura 1), confirmando que a contaminação estaria na água e que teria se espalhado para cidades próximas. Em 2010, mais de 40.000 residentes ainda apresentavam sintomas parciais da contaminação (CECCATELLI & ASCHNER, 2012).

Figura 1. Distribuição de pacientes com Doença de Minamata em áreas costeiras do mar de Yatsushiro. Números em parênteses indicam o número de pacientes registrados com a doença em dezembro, 2010.



Fonte: (CECCATELLI & ASCHNER, 2012).

O segundo grande caso de intoxicação por MeHg a ser abordado, envolve o uso frequente de fungicidas e inseticidas para controle de infecções em plantações. A utilização de químicos com este mesmo objetivo é feita já desde o primeiro século AC, sendo o cloreto mercúrico um composto comumente utilizado. Quando as primeiras substâncias organomercuriais para tratamento de sementes começaram a chegar aos mercados, duas qualidades essenciais eram enfatizadas: a capacidade de proteção antifúngica e a baixa toxicidade às sementes. Mas apesar de não fazerem mal às sementes, apresentavam elevada toxicidade a quem as consumisse (SKERFVING & COPPLESTONE, 1976).

Em 1971, após cerca de 4 anos de colheitas ruins, o governo do Iraque solicitou a importação de grãos para semeio. Cerca de 95 toneladas de cevada e trigo foram fornecidos pelo grande exportador americano Cargill Inc., sendo boa parte do trigo proveniente do México, e a cevada da Califórnia. Todos os grãos, tratados com metilmercúrio e artificialmente coloridos de rosa, para evitar que pessoas os ingerissem, foram entregues em sacos com avisos que informavam “não consumir”. No entanto, nenhum saco estava identificado em árabe, somente em inglês e espanhol (GREENWOOD, 1985). A distribuição dos grãos teve início em setembro de 1971, e em janeiro de 1972 já se observavam casos de contaminação em diversas cidades, como mostrado na Figura 2 (BAKIR et al., 1973).

No final de janeiro e fevereiro de 1972 houve, em hospitais, o aumento da frequência de pacientes apresentando sintomas semelhantes aos observados no Mal de Minamata: danos neurológicos acompanhados de perda de movimentos voluntários, entorpecimento de membros, língua e lábios, bem como problemas de visão e audição. Estes pacientes eram de ambos os sexos e de todas as idades (incluindo mulheres gestantes), majoritariamente moradores de áreas rurais. Aproximadamente 450 mortes foram registradas em 1972 (SKERFVING & COPPLESTONE, 1976). Também foram realizados estudos acerca dos animais da região, por meio dos quais foram percebidos elevados níveis de mercúrio em pequenas aves e mamíferos, como ratos e camundongos (JERNELÖV, 1976).

Figura 2. Mapa do Iraque, mostrando as províncias onde extensivos estudos foram realizados acerca da contaminação com metilmercúrio.



Fonte: (GREENWOOD, 1985).

Outra forma comum de contaminação por Hg resultante de atividade antropogênica, a garimpagem, teve seu ápice nas Américas Central e do Sul de 1550 a 1850, nos quais estima-se que aproximadamente 200.000 toneladas métricas tenham sido descartadas no ambiente (NEVADO et al., 2010; MALM, 1998). Com o uso da amalgamação para mineração na região da Floresta Amazônica, por cada quilo de ouro obtido, era eliminado entre 1.3 a 1.7kg de Hg (NRIAGU, 1993). Devido ao surgimento de uma nova corrida do ouro por volta dos anos 80, o Brasil alcançou o primeiro lugar na produção, sendo o maior garimpo encontrado nas proximidades do rio Tapajós. Em 1989 a produção atingiu o pico, gerando 4 toneladas de ouro por mês, e em 1990 a atividade garimpeira já era responsável pela emissão de até 120 toneladas de mercúrio por ano (NEVADO et al., 2010).

O método de amalgamação foi introduzido nas Américas no século 16, durante a mineração de ouro e prata no México. É um processo muito utilizado na mineração para concentrar metais preciosos por meio da fusão do mesmo com mercúrio (EISLER, 2004). Após amalgamação, o Hg utilizado é queimado e volatilizado, constituindo um poluente tóxico altamente móvel. Ao ser inalado é prontamente absorvido pelos pulmões, chegando à corrente sanguínea e sendo metabolizado pelos tecidos, podendo se acumular no fígado. No entanto, a inalação direta afeta apenas pessoas que trabalham essencialmente com a mineração. A volatilização, por sua vez, promove fácil dispersão pelo ar até que haja a sedimentação em solos e rios (WASSERMAN et al., 2003).

Populações ribeirinhas vivendo nos arredores do rio Tapajós, portanto, tem sido cronicamente expostas a intoxicação por mercúrio desde a década de 1980, pois se alimentam com frequência de pescados da região. Atualmente os níveis de exposição humana a este metal pesado tem decrescido, mas as taxas ainda se encontram acima do permitido (10 µg/g no cabelo, determinado pela Organização Mundial de Saúde em 1990) (NEVADO et al., 2010).

Como caso recente, tem-se ainda o desastre da cidade de Mariana, em Minas Gerais. Considerado o pior desastre ambiental da mineração brasileira, o rompimento de uma barragem da mineradora Samarco resultou na liberação de aproximadamente 50 milhões de metros cúbicos de dejetos no Rio Doce, atingindo o estado do Espírito Santo e chegando ao Oceano

Atlântico (NETO et al., 2016). Apesar de a mineradora declarar que os dejetos continham apenas lama, estudos recentes já mostram alterações na distribuição de alguns metais no rio, tais como Ferro (Fe), Alumínio (Al), Manganês (Mn) e Cromo (Cr). Consequências mais graves ainda podem aparecer com o passar dos anos, incluindo a provável presença de metais pesados, como Arsênio (As), Cobre (Cu) e Mercúrio (Hg) (ESCOBAR, 2015).

1.2. Mercúrio (Hg) e metilmercúrio (MeHg)

De acordo com o Ministério da Saúde (2015), o mercúrio (Hg) é um elemento químico da classe dos metais pesados que pode assumir as seguintes formas químicas: mercúrio metálico, inorgânico e orgânico. O mercúrio metálico consiste na forma mais pura deste metal, também conhecido como mercúrio elementar. É um metal líquido e volátil, capaz de produzir vapores inodoros e incolores à temperatura ambiente. Rapidamente absorvido por inalação e quase imediatamente oxidado a mercúrio iônico, pode ser retido no cérebro por anos. Em muitas partes do mundo dentistas ainda utilizam preenchimento dental com amálgama contendo mercúrio em sua forma elementar (BJØRKLUND et al., 2017).

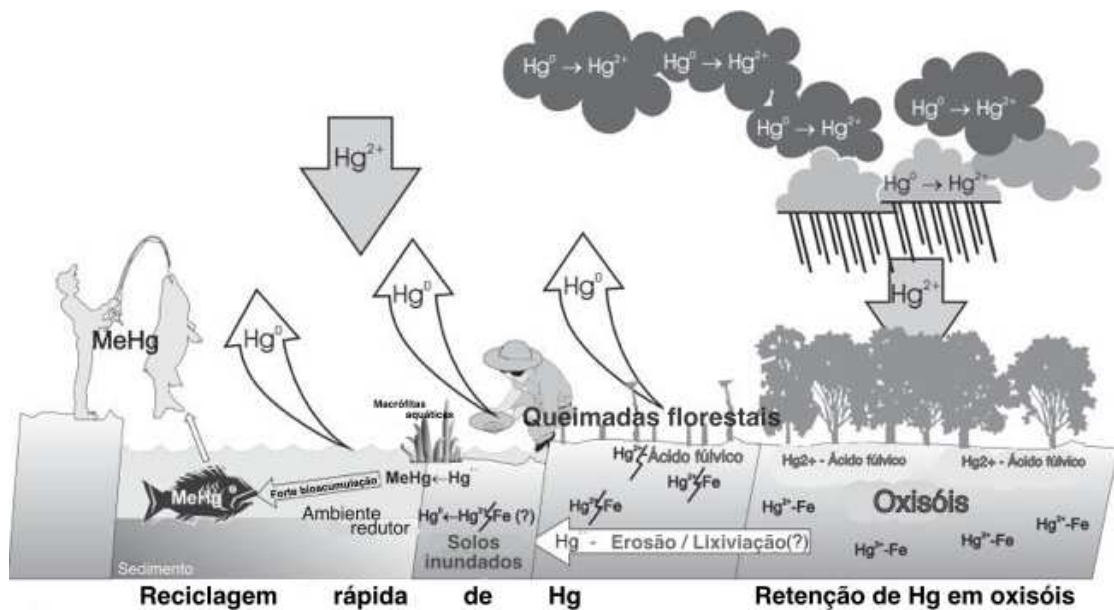
O mercúrio inorgânico ou sal, por sua vez, se dá por sua combinação com outros elementos, tais como cloro, oxigênio e enxofre. Os sais mais comuns são sulfeto de mercúrio e cloreto de mercúrio (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Mercúrio inorgânico já foi encontrado em produtos cosméticos, laxantes, diuréticos e antissépticos. Também pode ser formado a partir da vaporização de mercúrio elementar e pelo metabolismo de metilmercúrio (BJØRKLUND et al., 2017).

Já o mercúrio orgânico é obtido pela interação do metal com cadeias de carbono, através de biotransformações efetuadas em grande parte por microrganismos. Dentre estes, se destaca o metilmercúrio. Este, consiste em um poluente metálico tóxico, que pode ser liberado para o ambiente via fontes naturais ou antropogênicas (PIRRONE et al., 2010). Está amplamente distribuído pelo ambiente e é naturalmente encontrado em ambiente aquático em baixas concentrações (ULLRICH et al., 2001). Tem sido encontrado em peixes, aves, pesticidas, fungicidas, inseticidas e vacinas contendo timerosal, uma substância conservante. Seu

extensivo uso em atividades industriais e na agricultura resultou em sérios casos de contaminação de solos e águas, e atualmente a principal forma de exposição se dá pelo consumo de pescados (BJØRKLUND et al., 2017).

Autores sugerem que o Hg é transportado pelo ar, até que se deposita em solos e rios (Figura 3). A depender das condições do ambiente, o metal pode ser interconvertido e disperso de sedimentos para a fase aquosa, assimilados pela biota aquática, ou perdido para a atmosfera, bem como pode ser transportado com partículas de sedimento para locais ainda não afetados (ULLRICH et al., 2001). No entanto, seu ciclo biogeoquímico ainda não é completamente entendido.

Figura 3. Esquema do ciclo biogeoquímico de mercúrio no ambiente Amazônico. (?) = processos presumidos mas desconhecidos.



Fonte: (WASSERMAN et al., 2003). Traduzida pela autora.

No geral, tal metal é liberado por processos de queima de biomassa (WASSERMAN et al., 2003), atividades industriais, médicas, aplicações artísticas, queima de combustíveis fósseis, incineração de resíduos (FERAIN et al., 2016), emissões vulcânicas (WHO, 1990) e desmatamento para criação de gado e agricultura, o que aumenta a erosão do solo e contribui

para a dispersão do mesmo (HACON et al., 2008). Ao se depositar em solos e no fundo de rios, é então convertido em metilmercúrio por meio de transformações bioquímicas efetuadas por organismos vivos, principalmente através de reações mediadas por bactérias (LEAKEY, 1969; COMPEAU et al., 1985; ULLRICH et al., 2001; WASSERMAN et al., 2003; HACON et al., 2008) e nas raízes submersas de macrófitas, além de processos abióticos (ULLRICH et al., 2001), em ambientes ricos em matéria orgânica (WASSERMAN et al., 2003). Ocorrem naturalmente em ambiente aquático tanto processos de metilação quanto de demetilação, mantendo níveis equilibrados de MeHg. As concentrações deste composto na biota aquática podem exceder os níveis observados em sedimentos devido a sua bioacumulação (ULLRICH et al., 2001).

1.2.1. Biometilação

Para que haja a reação de metilação, a presença de uma molécula doadora de metil é a principal condição. Tal processo pode ocorrer enzimática ou não enzimaticamente. A via enzimática requer a presença de organismos com metabolismo ativo, enquanto que a não enzimática necessita somente de produtos metilados de um metabolismo ativo (ULLRICH et al., 2001).

Wood et al. (1968) sugeriram que uma provável via de metilação de Hg seria pela transferência não enzimática de um grupo metil oriundo de um derivado da vitamina B12, metilcobalamina, para um íon de Hg. DeSimone et al. (1972) demonstraram que esta transferência se dá por meio de um processo de carbânion, um ânion orgânico no qual uma carga negativa em excesso se localiza no átomo de carbono. Acredita-se que metilcobalamina seja o único agente capaz de transferir carbânions espontaneamente para íons de mercúrio, além de ser amplamente encontrado em ambientes anaeróbios, caracterizando-o como a principal forma de metilação de Hg (WHO et al., 1990; ULLRICH et al., 2001).

A respeito de organismos que efetuem este processo, pouco é sabido. Sabe-se que organismos com capacidade de metilar Hg foram encontrados entre outros aeróbios, aeróbios facultativos e também anaeróbios. No entanto, já foi observado que o potencial de metilação

bacteriana é maior em ambientes sem a ocorrência de oxigênio (ULLRICH et al., 2001). De acordo com Xun et al. (1987), Ullrich et al. (2001) e Chen et al. (2014), os níveis desta conversão estão diretamente relacionados à quantidade de matéria orgânica presente no meio, assim como o pH do ecossistema, uma vez que esta transformação depende de organismos vivos.

1.3. Efeitos ambientais

Metais pesados como mercúrio, assim como cromo, manganês, cobre, níquel, zinco e outros, não são biodegradáveis e, portanto, se acumulam no decorrer da cadeia alimentar (PADRILAH et al., 2017). Por isso é de fundamental importância que se monitore e meça seus níveis em ambientes aquáticos, de forma a se estudar o grau de contaminação nos organismos locais e, conseqüentemente os potenciais riscos aos seres humanos, como consumidores no topo da cadeia alimentar. A poluição nestes ambientes pode ser letal ou subletal para organismos aquáticos, no entanto dependerá do tipo do contaminante, assim como de suas concentrações. Metais, como mercúrio, podem tanto serem absorvidos em sedimentos quanto se acumularem em organismos bentônicos (KUMAR et al., 2017).

1.3.1. Absorção e cadeia alimentar

Em ambiente aquático, a bioacumulação de MeHg resulta em elevados níveis em peixes nos mais altos níveis tróficos, apresentando risco para humanos e outras espécies consumidoras. Portanto, consiste na principal via de exposição de humanos ao metal pesado (YIN et al., 2017). O mercúrio em sua forma inorgânica, por sua vez, não é tão neurotóxico, não passa para o feto e é mais rapidamente eliminado (SKERFVING & COPPLESTONE, 1976), por não ser capaz de interagir com componentes celulares com a mesma facilidade.

Em sua forma orgânica metilada, MeHg é considerado ainda mais tóxico e facilmente bioacumulado devido a suas propriedades lipofílicas e de ligação a proteínas, e biomagnificado ao longo da cadeia alimentar, agindo como potente neurotoxina. Ao ser ingerido, é quase

completamente absorvido no estômago (acima de 90%), sendo distribuído para todo o corpo pela corrente sanguínea. Uma parcela significativa chega ao sistema nervoso, enquanto que outra parte atravessa a placenta em mulheres grávidas e atinge os fetos (SKERFVING & COPPLESTONE, 1976; WHO, 1990; NORDENHÄLL et al., 1997; MANFROI et al., 2004; ABDALLA et al., 2010; HIRAOKA et al., 2017). Sua distribuição pelo organismo se completa em até 4 dias em seres humanos. Ao final desse período, o cérebro pode apresentar taxas de 6% da dose inicial, e este tecido pode apresentar até 6 vezes mais MeHg do que o sangue. No entanto, as razões cérebro/sangue podem diferir bastante entre espécies distintas, tendendo a ser menor em não-primatas (1,2 em camundongos e 0,06 em ratos). Os níveis de distribuição podem ainda diferir de acordo com diferenças de sexo e idade (WHO, 1990).

Já no organismo de mamíferos, metilmercúrio é metabolicamente convertido a mercúrio inorgânico, uma etapa chave para sua eliminação. Nos casos de intoxicação registrados no Iraque, nos quais as vítimas foram oralmente expostas a doses diárias de MeHg, foram observadas as seguintes taxas: sangue, 7%; plasma, 22%; leite materno, 39%; e urina, 73%. Nestes casos, medidas demonstraram que os níveis de mercúrio inorgânico em tecido hepático se encontravam entre 16 e 40% (WHO, 1990).

Quanto a sua eliminação pelo sistema excretor, sabe-se que a conversão de MeHg a Hg inorgânico é efetuada por microrganismos da microbiota intestinal (WHO, 1990; ROTHENBERG et al., 2016). Presume-se que aproximadamente 10% do mercúrio inorgânico produzido por estes microrganismos é reabsorvido pela corrente sanguínea e contribui para as concentrações de Hg inorgânico encontradas em tecidos, plasma, bile, leite materno e urina (WHO, 1990).

1.3.2. Efeitos no organismo e exposição por amamentação

É possível observar o acúmulo de metilmercúrio em diversos tecidos e órgãos, tais como músculos, sangue, brânquias (em peixes), cabelos, cérebro, intestinos, fígado, rins, coração, pulmões (ABDALLA et al., 2010), entre outros. Em músculos, altas concentrações de MeHg podem ser percebidas, devido a afinidade de tal metal por grupos tióis presentes em

aminoácidos como cisteína (AZEVEDO et al, 2017; HIRAOKA et al., 2017). Entretanto, devido a capacidade de conversão e excreção do fígado, em geral não se percebem elevados níveis de metilmercúrio em tecido hepático (AZEVEDO et al., 2017).

Os danos mais severos são observados no cérebro, onde o metilmercúrio apresenta fortes efeitos neurotóxicos. A exposição pré-natal a MeHg tem sido vinculada a numerosos danos neurológicos, tais como redução das funções cognitivas, redução da atividade motora, desordens na fala, paralisia cerebral (OLIVEIRA et al., 2017), distúrbios sensoriais, mentais e emocionais (CECCATELLI & ASCHNER, 2012), sendo alguns destes sintomas também observados em casos de intoxicação direta por ingestão de pescados. O desenvolvimento de mal de Parkinson, Alzheimer e esclerose múltipla também pode ser vinculado à exposição tóxica (BJØRKLUND et al., 2017). No caso do Mal de Minamata, além destes sintomas foram observados a incidência de gestações anormais, com o nascimento de natimortos, e o aumento na frequência de abortos espontâneos (CECCATELLI & ASCHNER, 2012), indicando acentuada sensibilidade e suscetibilidade de fetos em desenvolvimento aos efeitos de metilmercúrio, nos quais os íons deste metal têm a capacidade de atravessar a placenta e se acumular em órgãos fetais (WHO, 1990; CECCATELLI & ASCHNER, 2012; OLIVEIRA et al., 2017). Em aves, também foi demonstrada a passagem de mercúrio para filhotes, através do ovo (ACKERMAN et al., 2017).

Dentre os órgãos afetados, o rim é considerado um órgão alvo primário, pois recebe o metal diretamente do sangue, e a presença de albumina, a proteína mais abundante no plasma, permite o seu acúmulo. Isso se deve a composição desta proteína, que é rica em grupos tióis. A afinidade do metilmercúrio a estes grupos leva a um estresse oxidativo devido a sua entrada em células epiteliais tubulares renais, que eleva as concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs), induzindo a peroxidação lipídica (BRIDGES & ZALUPS, 2005).

Estudos sugerem, ainda, que metilmercúrio pode influenciar na desregulação epigenética de células, devido a alterações no padrão de metilação de moléculas de DNA. Nestas moléculas, o perfil de metilação é o que determina a expressão genética e a especificidade de linhagens celulares. Dessa forma, esta desregulação na metilação do DNA pode ser a causa de doenças tais como câncer e fibrinogênese (KHAN et al., 2017).

Um efeito adicional induzido por MeHg consiste na abertura de poros de permeabilidade em mitocôndrias, permitindo a passagem de moléculas grandes com massa de aproximadamente 1500 Da, o que leva a apoptose por inchaço da organela devido a entrada de água e íons em excesso, bem como vazamento de outros íons importantes. O transporte de prótons através deste poro pode ainda ocasionar em um colapso do potencial de membrana, levando à morte celular (BRAGADIN et al., 2001; NETO et al., 2008; CATALÁ, 2011; BJØRKLUND et al., 2017).

Em mamíferos em período pós-natal, no qual o indivíduo se alimenta exclusivamente por aleitamento materno, o organismo ainda se apresenta bastante sensível a danos causados pela exposição a metilmercúrio, como mostrado por Nordenhäll et al. (1997), Sundberg et al. (1999), Farina et al. (2003), Franco et al. (2006), Abdala et al. (2010) e Bjørklund et al. (2017), o que indica a possibilidade de passagem do contaminante via amamentação para os filhotes, quando não via placenta. Vale ressaltar que esta passagem depende primeiramente do metabolismo deste contaminante pela genitora, para então haver a contaminação da prole.

1.3.2.1. O Fígado

O principal componente estrutural do fígado é a célula hepática, ou hepatócito, que se organiza em placas interconectadas. Ordenados em lóbulos hepáticos, compõem unidades formadas por massas poligonais irregulares de tecido. Em cortes histológicos de determinados animais (como suínos), estes lóbulos são separados entre si por uma camada de tecido conjuntivo, o que não ocorre em humanos. Na periferia do lóbulo encontram-se ductos biliares, vasos linfáticos, nervos e vasos sanguíneos. Enquanto que no seu centro, onde é comum a presença hemácias, se observa a luz de uma veia, de onde partem hepatócitos radialmente dispostos em placas celulares. Entre estas placas tem-se a presença de capilares, conhecidos como sinusoides hepáticos. Separando os capilares sinusoides e os hepatócitos, observa-se um espaço denominado Espaço de Disse, onde estão presentes células de Kupffer (DI FIORI, 1980; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Além de hepatócitos, macrófagos também são comumente encontrados nos sinusoides, designados células de Kupffer. Estas constituem aproximadamente 15% da população celular no fígado, e muitas estão localizadas na periferia do lóbulo hepático. Suas principais funções são a degradação de hemácias velhas, digestão de hemoglobinas, secreção de proteínas relacionadas a processos imunológicos e destruição de bactérias oriundas do intestino grosso (DI FIORI, 1980; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

O fígado é um dos maiores órgãos do corpo, e tem a importante função de metabolizar e acumular nutrientes assim como neutralizar e eliminar substâncias tóxicas absorvidas. Recebe cerca de 80% de seu sangue por meio da veia porta, contendo todo o sangue advindo do trato digestivo, baço e pâncreas, e ao contrário dos demais órgãos, não recebe apenas sangue arterial, mas também venoso. A eliminação de substâncias tóxicas se dá por meio da bile, uma secreção exócrina que atua na degradação de lipídeos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Várias drogas e substâncias tóxicas podem ser inativadas por conjugação, metilação ou oxidação. Muitas drogas e outras substâncias (incluindo metilmercúrio) são lipofílicas e, portanto, capazes de atravessar a membrana das células intestinais, chegando dessa forma ao fígado (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Carboidratos e lipídeos são armazenados no fígado na forma de glicogênio e triglicerídeos, respectivamente. Esta capacidade de armazenamento é importante pois supre as necessidades energéticas do organismo nos períodos entre refeições (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). No entanto, a elevada taxa lipídica facilita o acúmulo de metilmercúrio, o que o caracteriza como um dos órgãos alvo neste tipo de intoxicação (DÍAZ et al., 2001; BRAGADIN et al., 2002; ABDALLA et al., 2010), devido a suas propriedades lipossolúveis. Por outro lado, o fígado executa um papel chave na detoxificação de MeHg via bile, convertendo-o em espécies inorgânicas menos bioacumulativas do metal, por meio de reações de demetilação, reduzindo assim sua toxicidade (LIN et al., 1996; AZEVEDO et al., 2017).

1.3.2.2. Danos celulares

Quanto a sua entrada na célula, tanto transporte passivo quanto ativo tem sido sugeridos para a absorção de MeHg, a depender do tipo de célula. O metilmercúrio prejudica o crescimento, reprodução e sobrevivência do organismo, além de promover alteração no metabolismo de íons divalentes, induzir estresse oxidativo e desencadear lesões irreversíveis como apoptose e necrose celular (WHO, 1990).

Em meio intracelular, o MeHg apresenta a capacidade de induzir a mutação genética e perda de especificidade celular, promoção tumoral e progressão (JÚNIOR et al., 2001; FERREIRA, 2009). Adams & Sonne (2013) relataram outras relevantes categorias de lesões celulares induzidas no fígado por este poluente, dentre elas o acúmulo intracelular de lipídeos ou glicogênios hepáticos (esteatose hepática), dissolução da carioteca (cariólise) e perda nuclear, necrose coagulativa com formação de aglomerados proteicos (degeneração hialina), fibrose leve e formação de centros melanomacrofágicos (macrófagos pigmentados), como indicadores de inflamação. Este trabalho teve como base organismos obtidos diretamente da natureza, sendo o local de coleta no Oceano Atlântico. De acordo com Zhang et al. (2017), em seu trabalho foram observados, além de necrose hepática, o inchaço, desaparecimento e desarranjo estrutural de lóbulos hepáticos. Neste estudo, os animais foram submetidos a intoxicação por um período de 8 semanas. Mela et al. (2007), demonstraram ainda a ocorrência de lesões pré-necróticas (com infiltração leucocitária), bem como áreas de necrose, também com a presença de centros melanomacrofágicos, desordens no citoesqueleto e mudanças na forma nuclear e na distribuição da cromatina. Outras alterações relatadas foram danos severos ao Espaço de Disse entre hepatócitos. Neste último seguiu-se um protocolo com período de intoxicação de 70 dias.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliação do potencial hepatotóxico do metilmercúrio em camundongos C57BL/6J lactentes por meio de análise histológica.

2.2 Objetivo específico

- Estudo da possibilidade de intoxicação exclusivamente por meio da amamentação, e de seus danos causados ao fígado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e grupos experimentais

O trabalho foi desenvolvido no Biotério de Experimentação do Núcleo de Biologia Experimental (Nubex), da Universidade de Fortaleza (Unifor). A área de experimentação possui entrada controlada por biometria, com antesala de paramentação, conforme Figuras 4 e 5, respectivamente. A sala de camundongos em experimentação reservada aos animais deste projeto contém aviso de risco biológico na porta e entrada permitida somente a pessoas autorizadas, mostrado na Figura 6.

Figura 4. Entrada para área de experimentação, controlada por biometria.



Fonte: A autora.

Figura 5. Antesala de paramentação, anterior à entrada na área de experimentação.



Fonte: A autora.

Figura 6. Sala de Camundogos em Experimentação.



Fonte: A autora.

Camundongos selvagens isogênicos C57BL/6J foram fornecidos pelo setor de Produção do próprio Biotério do Nubex, e mantidos em gaiolas fechadas (microisoladores) dispostos em racks ventilados. Foi reservada uma sala para estes camundongos em experimentação por todo o protocolo até o momento da coleta de amostras. Os animais foram mantidos com fornecimento de água e dieta padrão *ad libitum*, ambos esterilizados. A sala mantinha um ciclo claro-escuro de 12:12 h, e ambiente com temperatura (19 °C) e umidade (65%) controlados, como mostrado na Figura 7. Na sala se encontram disponíveis um Protocolo de Manejo de Materiais Contaminados com Cloreto de Metilmercúrio, bem como ficha de informações de segurança de produtos químicos acerca de Cloreto de Metilmercúrio.

Figura 7. Rack ventilado com microisoladores e relógio termo-higrômetro.



Fonte: A autora.

3.1.1 Formação de grupos por acasalamento

Foram realizados acasalamentos entre irmãos e irmãs, mantendo contato por um período mínimo de 7 dias, com tempo de gestação entre 19 e 21 dias. Após esse período, cada fêmea foi mantida em uma gaiola isolada com sua respectiva ninhada.

3.1.2 Modelo de intoxicação mercurial

Os grupos foram compostos por camundongos C57BL/6J fêmeas e suas ninhadas. Cada ninhada constituiu um grupo de 8 filhotes, sendo a um administrado solução de cloreto de metilmercúrio, e um controle, sem qualquer intoxicação. A exposição ao cloreto de metilmercúrio foi feita via oral, a partir da água de beber para camundongos lactantes, imediatamente após o nascimento dos filhotes até o dia 18 pós-natal, período do qual os mesmos receberam alimentação exclusiva por aleitamento.

Estes grupos foram utilizados para avaliar os danos causados por intoxicação com metilmercúrio em tecido hepático durante o período pré-desmame (período de lactação). O grupo que foi intoxicado com metilmercúrio recebeu diariamente uma solução de cloreto de metilmercúrio diluído na água de beber (20 mg/L) a partir do nascimento, utilizando metade da concentração indicada por MOREIRA et al. (2012). Para formulação dessa solução, foi utilizado reagente de cloreto de metilmercúrio da marca Sigma-Aldrich, de fórmula linear CH_3HgCl e número CAS: 115-09-3.

Ao final do protocolo, os animais sofreram eutanásia por decapitação após anestesia com cetamina/xilazina, para a coleta de amostras. Para a anestesia, foi preparada solução contendo 0,1 mL de cetamina, 0,4 mL de xilazina, e NaCl 0,9% de modo a completar 1,5 mL. Os animais foram sacrificados ao completar o 18º dia pós-natal (janela crítica do desenvolvimento).

3.1.3 Ética

O presente trabalho foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Fortaleza e aprovado sob o protocolo número 015/2016.

3.2 Isolamento e coleta de amostras de fígado

Após período de tratamento (18 dias), filhotes foram sacrificados por decapitação. Fígados foram rapidamente retirados e transferidos para conservação em solução de Formol 10%, até o início do processamento para preparo de lâminas destinadas à análise histológica.

3.3 Análise histológica de fígado

3.3.1 Preparo de lâminas

O preparo das lâminas para análise histológica foi feito no Laboratório do Departamento de Odontologia da Unifor.

O tecido foi coletado em cirurgia, sendo reservados um corte de cada lobo para análise. Para fixação, as amostras foram rapidamente transferidas para Formol a 10%, de modo a evitar o processo de autólise (digestão enzimática) das células, impedir a destruição por microrganismos, endurecer o tecido para melhor tratamento posterior e aumentar a capacidade de coloração, por um período de no mínimo 24 horas. As amostras foram transferidas para solução de Etanol 70% por 1 hora, dando início ao processo de desidratação. Em seguida, foram feitos diversos banhos em concentrações crescentes de etanol (desde 70% a 100%). Após a desidratação, o etanol foi substituído por xilol. Esta etapa tem como objetivo diafanizar a amostra, limpando todos os possíveis orifícios deixados por água e retirando impurezas ainda presentes, para obtenção de amostra translúcida e melhor penetração de parafina (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008).

No passo seguinte, denominado inclusão, a amostra foi então colocada em parafina líquida a 60 °C por 3 horas, a fim de impregnar o tecido em moldes, de modo a preparar blocos. O bloco, ao ser retirado do molde, foi levado à geladeira para endurecimento antes do corte, sendo então levado ao micrótomo para cortes de 5 µm de espessura. Os cortes foram distendidos em água aquecida a uma temperatura de 45 °C, a fim de evitar microdobras no material, sendo então pescados com uso de uma lâmina (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008).

Na terceira etapa, o tecido passou por desparafinização, iniciando com 1 hora em estufa a 60 °C, retirando em 80% a parafina que envolve a amostra (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008).

Durante a etapa de coloração, o restante de parafina ainda no material foi gradualmente retirado. Primeiramente, foram feitas duas lavagens por 10 minutos em Xilol, seguidos de mergulhos rápidos em soluções de Etanol em concentrações decrescentes, de 95% a 80%. Em seguida, foi feita lavagem com água destilada, imergindo a amostra por 10 minutos em

hematoxilina. A peça foi posteriormente lavada em água corrente, seguida de lavagem com água destilada e então rapidamente mergulhada em eosina, sendo mais uma vez lavada com água corrente (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008).

As amostras passaram por mais uma etapa de desidratação, com soluções de Etanol a concentrações crescentes (de 80% a 99% e então xilol). Para finalizar, foi adicionada uma gota de resina sintética (Entelan[®]), de modo a evitar a presença de bolhas que possam atrapalhar a visualização da lâmina (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008).

3.3.2 Leitura em microscópio óptico

A leitura das lâminas para análise histológica foi realizada no Biotério de Experimentação do Nubex, em microscópio binocular Primo Star ZEISS (Figura 8).

Figura 8. Microscópio binocular Primo Star ZEISS.



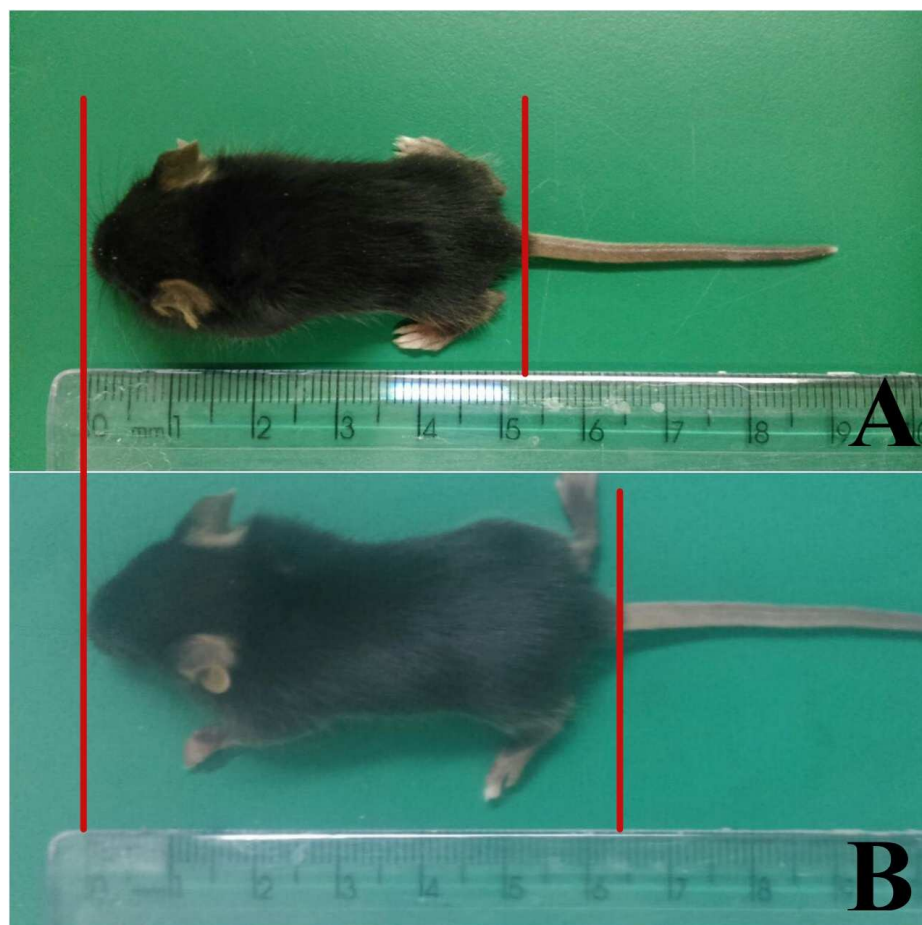
Fonte: A autora.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise histológica de fígado

Os animais não exibiram diferenças significativas em seus tamanhos (Figura 9) ou pesos (Quadro 1), quando comparando o grupo controle ao grupo intoxicado com cloreto de metilmercúrio. Os pesos de seus fígados também se mantiveram em valores uniformes. Também não foi observada perda de pelo.

Figura 9 – Camundongos C57BL/6J ao 18º dia de vida, sendo A: grupo controle, e B: grupo intoxicado com cloreto de metilmercúrio.



Fonte: A autora.

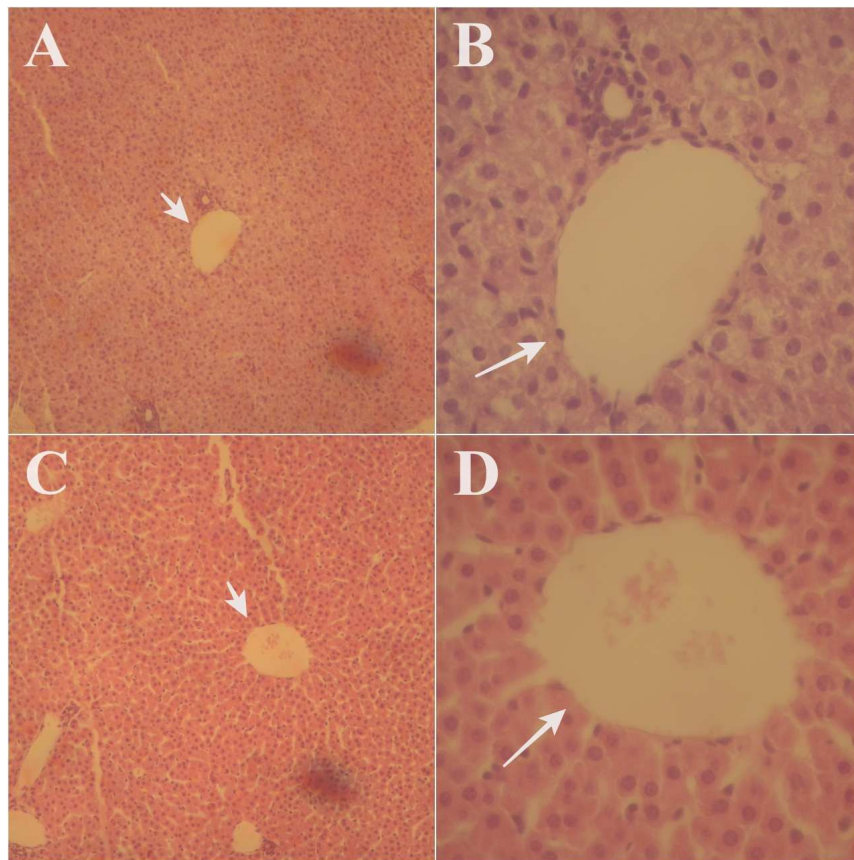
Quadro 1. Médias de pesos de animais e fígados de grupos controle e intoxicado.

	Peso do animal	Peso do fígado
Média de Grupo Controle (g)	5,2462 ± 0,1158	0,1227 ± 0,0146
Média de Grupo Intoxicado (g)	5,0375 ± 0,2622	0,0820 ± 0,0298

Fonte: A autora.

O grupo controle apresentou hepatócitos radialmente arranjados ao redor da veia central do lóbulo, sem separação clara entre lóbulos hepáticos. Hepatócitos apresentavam tamanho, forma e cor normais, como esperado. Quando comparados aos cortes histológicos do grupo controle, o grupo submetido a solução de cloreto de metilmercúrio também exibiu hepatócitos normocorados, de tamanhos e formas normais. Lóbulos hepáticos foram vistos com estrutura normal e sem alterações em espaços de Disse. Não foram observadas figuras de mitose ou quaisquer anormalidades de mutagênese. Também não foi constatado aumento de células de defesa de Kupffer ou áreas de necrose celular, quando comparado ao grupo controle. Foi observada leve hiperemia vascular (aumento do fluxo sanguíneo em determinado local), mas tal dado não se mostra suficiente para diagnosticar uma histopatologia. Não ocorreram alterações conclusivamente histopatológicas, como mostrado na Figura 10.

Figura 10– Análise histológica de fígado.



As imagens A e B representam, respectivamente, lóbulo hepático do grupo controle em aumentos de 100x e 400x. Nas imagens C e D observam-se, respectivamente, lóbulo hepático do grupo intoxicado com metilmercúrio em aumentos de 100x e 400x. As setas brancas indicam veias centrais dos lóbulos. Microscópio Primo Star ZEISS.

Levando em consideração que o presente estudo analisa somente as ninhadas de fêmeas intoxicadas com metilmercúrio, é importante enfatizar que a solução contaminante não é diretamente administrada aos filhotes. Tendo em vista que somente a genitora é diretamente submetida ao metal pesado, é necessário que este seja por ela metabolizado para então atingir seus filhotes por meio da amamentação. De acordo com o Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP (2013), filhotes de camundongos passam por desmame no 21º dia após o nascimento. O protocolo determina a administração via oral de cloreto de metilmercúrio à mãe durante os primeiros 18 dias após o nascimento dos filhotes, pois considera que neste período a alimentação das ninhadas se dá exclusivamente por aleitamento materno.

Segundo os estudos conduzidos por Franco et al. (2006), também com foco em animais lactentes, o tempo de exposição durou o período completo de amamentação (21 dias), no qual

se observou um aumento nos níveis de metilmercúrio em cerebelo, bem como alterações em atividades motoras. Apesar disso, o grupo enfatiza que a exposição no período da gestação em si ainda é a principal responsável por contaminação da descendência. Este aspecto vem ao encontro de Rothenberg et al., (2016) e Bjørklund et al. (2017), que também comentam sobre a maior susceptibilidade de indivíduos em período pré-natal à toxicidade induzida por metais pesados.

Assim, ao se verificar que nas condições testadas, de concentração de MeHg e tempo de exposição, não houve a intoxicação dos filhotes através da amamentação, é possível supor que o tempo de exposição e a quantidade de metal pesado não tenham sido suficientes para a indução de danos histológicos aos fígados dos filhotes. Vale ressaltar que o fígado é um órgão alvo em casos de contaminação por formas orgânicas de Hg, e neste não foram observadas alterações histológicas suficientes que permitam atestar danos provocados por MeHg. Tendo em vista o que foi exposto pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1990), é provável ainda que o metilmercúrio ingerido pela mãe tenha sido metabolizado a mercúrio em sua forma inorgânica, não interagindo assim com compostos celulares com a mesma facilidade que em sua forma orgânica metilada.

Caso os filhotes tivessem sido diretamente expostos a este contaminante na forma de MeHg, os mesmos estariam bastante frágeis. Vale ressaltar que durante o período de amamentação os órgãos que compõem o sistema digestivo ainda se mostram imaturos, com sua microbiota intestinal ainda não completamente formada. Os filhotes estariam portanto, altamente vulneráveis a agentes tóxicos tais como MeHg (SUNDBERG et al., 1999; ROTHENBERG et al., 2016).

5 CONCLUSÃO

Este trabalho se mostrou inovador ao estudar a possibilidade de intoxicação exclusivamente por meio da amamentação e danos causados ao fígado, visto que muitos estudos já mostraram os efeitos da intoxicação direta por ingestão, bem como a passagem de MeHg da mãe para o filhote via placenta.

Nas condições de concentração de metilmercúrio administrado às genitoras dos grupos, e do tempo de exposição das mesmas com suas ninhadas, não foram observadas alterações de peso, tamanho ou histológicas significativas que permitam afirmar que houve a passagem de metilmercúrio via aleitamento materno.

Supõe-se que o tempo de exposição e a concentração de metilmercúrio administrada não tenham sido suficientes para contaminação dos filhotes. Outra possibilidade é a de que o metilmercúrio ingerido pela mãe tenha sido metabolizado a mercúrio inorgânico. Dessa forma, a análise histológica não evidenciou sinais de toxicidade aos lactentes.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, F. H., BELLÉ, L. P., BITENCOURT, P. E. R., DA SILVA, J. E., ROMAN, S., DA ROSA, C., SCHETINGER, M. R., MORETTO, M. B. **Methylmercury-induced changes in target organs of suckling rat pups.** *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(6), 605–609. 2012.
- ACKERMAN, J. T., HARTMAN, C. A., & HERZOG, M. P. **Maternal transfer of mercury to songbird eggs.** *Environmental Pollution*, 230, 463–468. 2017.
- ADAMS, D. H., & SONNE, C. **Mercury and histopathology of the vulnerable goliath grouper, *Epinephelus itajara*, in U.S. waters: A multi-tissue approach.** *Environmental Research*, 126, 254–263. 2003.
- AZEVEDO, L. S., ALMEIDA, M. G., BASTOS, W. R., SUZUKI, M. S., RECKTENVALD, M. C. N. N., BASTOS, M. T. S., VERGÍLIO, C. S., DE SOUZA, C. M. M. **Organotropism of methylmercury in fish of the southeastern of Brazil.** *Chemosphere*, 185, 746–753. 2017.
- BAKIR, F., DAMLUJI, S. F., AMIN-ZAKI, L., MURTADHA, M., KHALIDI, A., AL-RAWI, N. Y., TIKRITI, S., DHAHIR, H. I., CLARKSON, T. W., SMITH, J. C., & DOHERTY, R. A. **Methylmercury Poisoning in Iraq.** *Science* 181. 1973.
- BJØRKLUND, G., DADAR, M., MUTTER, J., & AASETH, J. **The toxicology of mercury: Current research and emerging trends.** *Environmental Research*, 159(August), 545–554. 2017.
- BRAGADIN, M., MARTON, D., MANENTE, S., GRASSO, M., & TONINELLO, A. **Methylmercury induces the opening of the permeability transition pore in rat liver mitochondria.** *Journal of Inorganic Biochemistry*, 89(1–2), 159–162. 2002.
- BRIDGES, C. C.; ZALUPS, R. K. **Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals.** *Toxicology Applied Pharmacology*, 204(3), 274–308. 2005.
- CATALÁ, A. **Lipid peroxidation modifies the picture of membranes from the “Fluid Mosaic Model” to the “Lipid Whisker Model.”** *Biochimie*, 94(1), 101–109. 2012.
- CECCATELLI, S; ASCHNER, M. **Methylmercury and neurotoxicity** (Vol. 1). Springer, 2012.
- CHEN, C. Y., BORSUK, M. E., BUGGE, D. M., HOLLWEG, T., BALCOM, P. H., WARD, D. M., WILLIAMS, J., MASON, R. P. **Benthic and pelagic pathways of methylmercury bioaccumulation in estuarine food webs of the Northeast United States.** *PLoS ONE*, 9(2). 2014.
- COMPEAU, G. C., & BARTHA, R. **Sulfate-reducing bacteria: principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment.** *Microbiology*, 50(2), 498–502. 1985.

DESIMONE, R. E., PENLEY, M. W., CHARBONNEAU, L., SMITH, S. G., WOOD, J. M., HILL, H. A. O., PRATT, J. M., RIDSDALE, S., WILLIAMS, R. J. P. **The kinetics and mechanism of cobalamin-dependent methyl and ethyl transfer do mercuric ion.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 304 (1973) 851-863. 1972.

DÍAZ, D., KREJSA, C. M., WHITE, C. C., KEENER, C. L., FARIN, F. M., & KAVANAGH, T. J. **Tissue specific changes in the expression of glutamate – cysteine ligase mRNAs in mice exposed to methylmercury,** *Toxicology Letters* 122, 119–129. 2001.

DI FIORI, M. S. H. **Atlas de Histologia Normal.** 7ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1980.

EISLER, R. **Mercury hazards from gold mining to humans, plants and animals.** *Rev. Environm. Contam. Toxicol*, 181: 139-198. 2004.

ESCOBAR, H. **Mud tsunami wreaks ecological havoc in Brazil.** *Science*, 350(6265), 1138–1139. 2015.

FARINA, M., SOARES, F. A. A., ZENI, G., SOUZA, D. O., & ROCHA, J. B. T. **Additive pro-oxidative effects of methylmercury and ebselen in liver from suckling rat pups.** *Toxicology Letters*, 146(3), 227–235. 2004.

FERAIN, A., BONNIEAU, C., NEEFS, I., REES, J. F., LARONDELLE, Y., SCHAMPHELAERE, K. A. C. D., & DEBIER, C. **The fatty acid profile of rainbow trout liver cells modulates their tolerance to methylmercury and cadmium.** *Aquatic Toxicology*, 177, 171–181. 2016.

FERREIRA, G. UFRGS Dissertação de Mestrado. **Avaliação da atividade antioxidante de espécies de *Pterocaulon* (ASTERACEAE).** 2009.

FRANCO, J. L., TEIXEIRA, A., MEOTTI, F. C., RIBAS, C. M., STRINGARI, J., GARCIA POMBLUM, S. C., MORO, A. M., BOHRER, D., BAIROS, A. V., DAFRE, A. L., SANTOS, A. R. S., FARINA, M. **Cerebellar thiol status and motor deficit after lactational exposure to methylmercury.** *Environmental Research*, 102(1), 22–28. 2006.

GREENWOOD, M. R. **Methylmercury poisoning in Iraq. An epidemiological study of the 1971—1972 outbreak.** *Journal of Applied Toxicology*, 5(3), 148–159. 1985.

HACON, S., BARROCAS, P. R. G., de VASCONCELLOS, A. C. S., WASSERMAN, J. C., CAMPOS, R. C., RIBEIRO, C., & AZEVEDO-CARLONI, F. B. **An overview of mercury contamination research in the Amazon basin with an emphasis on Brazil.** *Cadernos de Saúde Pública*, 24(7), 1479–1492. 2008.

HIRAOKA, H., NAKAHARA, K., KANEKO, Y., AKIYAMA, S., OKUDA, K., IWAWAKI, T., FUJIMURA, M., KUMAGAI, Y., TAKASUGI, N., & UEHARA, T. **Modulation of Unfolded Protein Response by Methylmercury.** *Biol. Pharm. Bull.* 40(9), 1595–1598. 2017.

JERNELÖV, A. **Environmental contamination by mercury in Iraq.** *Bulletin of the World Health Organization*, 53, , 115–118. 1976.

JÚNIOR, L. R., HÖEHR, N. F., VELLASCO, A. P., & KUBOTA, L. T. **Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo.** *Quimica Nova*, 24(1), 112–119. 2011.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 12^a ed. Rio de Janeiro: Grupo Editorial Nacional, 2013.

KHAN, H., SINGH, R. D., TIWARI, R., GANGOPADHYAY, S., ROY, S. K., SINGH, D., & SRIVASTAVA, V. **Mercury exposure induces cytoskeleton disruption and loss of renal function through epigenetic modulation of MMP9 expression.** *Toxicology*, 386(80), 28–39. 2017.

KUGLER, M. **The Minamata disaster and the disease that followed.** Disponível em: <<https://www.verywell.com/minamata-disease-2860856>>. Acesso em: 22 de set. 2017.

KUMAR, N., KRISHNANI, K. K., & SINGH, N. P. **Oxidative and cellular stress as bioindicators for metal contamination in freshwater mollusk *Lamellidens marginalis*.** *Environmental Science and Pollution Research*, 24(19), 16137–16147. 2017.

LEAKEY, L. S. B. **Biological methylation of mercury in aquatic organisms.** *Nature*, 223(5207), 753–754. 1969.

LIN, T. H., HUANG, Y. L., & HUANG, S. F. **Lipid peroxidation in liver of rats administrated with methyl mercuric chloride.** *Biological Trace Element Research*, 54, 33–41. 1996.

MALM, O. **Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon.** *Environmental Research*, 77(2), 73–8. 1998.

MANFROI, C. B., SCHWALM, F. D., CERESER, V., ABREU, F., OLIVEIRA, A., BIZARRO, L., ROCHA, J. B. T., FRIZZO, M. E. S., SOUZA, D. O., FARINA, M. **Maternal milk as methylmercury source for suckling mice: Neurotoxic effects involved with the cerebellar glutamatergic system.** *Toxicological Sciences*, 81(1), 172–178. 2004.

MELA, M., RANDI, M. A. F., VENTURA, D. F., CARVALHO, C. E. V., PELLETIER, E., OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. **Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68, 426–435. 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dica de leitura. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/1117-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/contaminantes-quimicos/contaminantes-quimicos-linha1/16185-mercuro>>. Acesso em: 18 de out. 2017.

MOREIRA, E. L., DE OLIVEIRA, J., DUTRA, M. F., SANTOS, D. B., GONÇALVES, C. A., GOLDFEDER, E. M., DE BEM, A. F., PREDIGER, R. D., ASCHNER, M., FARINA, M. **Does methylmercury-induced hypercholesterolemia play a causal role in its neurotoxicity and cardiovascular disease?** *Toxicological Sciences*, 130(2), 373–382. 2012.

NEVADO, J. J. B., MARTÍN-DOIMEADIOS, R. C. R., BERNARDO, F. J. G., MORENO, M. J., HERCULANO, A. M., DO NASCIMENTO, J. L. M., & CRESPO-LÓPEZ, M. E. **Mercury in the Tapajós River basin, Brazilian Amazon: A review.** *Environment International*, 36(6), 593–608. 2010.

NEVES, S. M. P., ONG, F. M. P., RODRIGUES, L. D., SANTOS, R. A., FONTES, R. S., SANTANA, R. O. **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP.** São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013.

NETO, F. F., ZANATA, S. M., ASSIS, H. C. S., NAKAO, L. S., RANDI, M. A. F., & RIBEIRO, C. A. O. **Toxic effects of DDT and methyl mercury on the hepatocytes from *Hoplias malabaricus*.** *Toxicology in Vitro*, 22(7), 1705–1713. 2008.

NORDENHÄLL, K., DOCK, L., & VAHTER, M. **Cross-fostering study of methyl mercury retention, demethylation and excretion in the neonatal hamster.** *Pharmacology & Toxicology*, 82, 132-136. 1998.

NRIAGU, J. O. **Legacy of mercury pollution.** *Nature*, 363. 1993.

OLIVEIRA, C., JOSHEE, L., GEORGE, H., NIJHARA, S., & BRIDGES, C. **Oral exposure of pregnant rats to toxic doses of methylmercury alters fetal accumulation.** *Reproductive Toxicology*, 69, 265–275. 2017.

PADRILAH, S. N., AHMAD, S. A., YASID, N. A., SABULLAH, M. K., DAUD, H. M., KHALID, A., & SHUKOR, M. Y. **Toxic effects of copper on liver and cholinesterase of *Clarias gariepinus*.** *Environmental Science and Pollution Research*, 1–14. 2017.

PIRRONE, N., CINNIRELLA, S., FENG, X., FINKELMAN, R. B., FRIEDLI, H. R., LEANER, J., MASON, R., MUKHERJEE, A. B., STRACHER, G. B., STREETS, D. G., TELMER, K. **Global mercury emissions to the atmosphere from anthropogenic and natural sources.** *Atmospheric Chemistry and Physics*, 10(13), 5951–5964. 2010.

ROTHENBERG, S. E., KEISER, S., AJAMI, N. J., WONG, M. C., GESELL, J., PETROSINO, J. F., JOHS, A. **The role of gut microbiota in fetal methylmercury exposure: Insights from a pilot study.** *Toxicology Letters*, 242, 60-67. 2016.

SKERFVING, S. B., & COPPLESTONE, J. F. **Poisoning caused by the consumption of organomercury dressed seed in Iraq.** *Bulletin of the World Health Organization*, 54(1), 101–112. 1976.

SUNDBERG, J., JÖNSSON, S., KARLSSON, M. O., & OSKARSSON, A. **Lactational exposure and neonatal kinetics of methylmercury and inorganic mercury in mice.** *Toxicology and Applied Pharmacology*, 154, 160–169. 1999.

ULLRICH, S. M., TANTON, T. W., & SVETLANA, A. **Mercury in the aquatic environment : A review of factors affecting methylation.** *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 31(3), 241–293. 2001.

WASSERMAN, J., HACON, S., & WASSERMAN, M. **Biogeochemistry of mercury in the Amazonian environment.** *Ambio: A Journal of the Human Environment*, 32(5), 336–342. 2003.

WOOD, J. M., KENNEDY, P. S., & ROSEN, C. G. **Synthesis of methylmercury compounds by extracts of a methanogenic bacterium.** *Nature*, 220,173. 1968.

WHO (World Health Organization) (1990). **Methylmercury in Environmental Health Criteria 101.** *Environmental Health Criteria*, 148. 1990.

XUN, L., CAMPBELL, N. E. R., & RUDD, J. W. M. **Measurements of specific rates of net methyl mercury production in the water column and surface sediments of acidified and circumneutral lakes.** *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* Vol. 44. 1987.

YIN, R., ZHANG, W., SUN, G., FENG, Z., HURLEY, J. P., YANG, L., SHANG, L., FENG, X. **Mercury risk in poultry in the Wanshan Mercury Mine, China.** *Environmental Pollution*, 230, 810–816. 2017.

ZHANG, H., TAN, X., YANG, D., LU, J., LIU, B., & BAIYUN, R. **Dietary luteolin attenuates chronic liver injury induced by mercuric chloride via the Nrf2 / NF- κ B / P53 signaling pathway in rats.** *Oncotarget*, 8(25), 40982–40993. 2017.