



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

LEONARDO LOBO SARAIVA BARROS

**EFEITOS DA INTOXICAÇÃO MERCURIAL NO HIPOCAMPO E PARÂMETROS
LIPÍDICOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À DIETA OCIDENTAL**

FORTALEZA
2017

LEONARDO LOBO SARAIVA BARROS

**EFEITOS DA INTOXICAÇÃO MERCURIAL NO HIPOCAMPO E NOS
PARÂMETROS LIPÍDICOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À DIETA
OCIDENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Biomedicina

Linha de Pesquisa: Patogêneses das doenças imunoinflamatórias.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá

FORTALEZA
2017

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

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

- B279e Barros, Leonardo Lobo Saraiva.
Efeitos da intoxicação mercurial no hipocampo e parâmetros lipídicos de camundongos submetidos à dieta ocidental / Leonardo Lobo Saraiva Barros. – 2017.
81 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá.
1. metilmercúrio. 2. dieta ocidental. 3. hipocampo. 4. parâmetros lipídicos. 5. estresse oxidativo. I. Título.
CDD 610
-

LEONARDO LOBO SARAIVA BARROS

**EFEITOS DA INTOXICAÇÃO MERCURIAL NO HIPOCAMPO E NOS
PARÂMETROS LIPÍDICOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À DIETA
OCIDENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Biomedicina

Linha de Pesquisa: Patogêneses das doenças imunoinflamatórias.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Fernando Vagner Lobo Ladd
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN

Prof. Dr. Ramon da Silva Raposo
Universidade de Fortaleza – UNIFOR

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pelo dom da inteligência, sabedoria, saúde e determinação para conclusão do presente curso de Mestrado realizado na Universidade Federal do Ceará – UFC através do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá**, pela recepção, acompanhamento, ensinamentos e orientação dos projetos concluídos no LABICONTE. Mesmo na etapa final estando em mais um pós-doutorado no EUA, orientou com maestria a finalização dessa pesquisa. Meus sinceros agradecimentos.

À minha esposa e companheira Carina Espina de Jordão Barros e meu filho Luiz Marcelo de Jordão Barros por todo amor e compreensão nas horas mais ausentes e distantes. Os mesmos foram fundamentais na conclusão desse trabalho. Sem os mesmos esse sonho não seria possível de ser realizado.

Aos meus pais Marcelo Messias Barros e Mônica M. Lobo Saraiva Barros e meus Irmãos Henrique e Marcela Barros por todo o incentivo e apoio durante toda minha vida na construção e formação educacional.

Ao amigo e prof. Dr. Fernando Lobo Ladd, vinculado à Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN que me acolheu e foi um facilitador nos conhecimentos sobre estereologia e por ter aceito o convite de participar da banca de defesa.

Ao Prof. Dr. Ramon da Silva Raposo vinculado ao Núcleo de Biologia Experimental – Nubex, da Universidade de Fortaleza, que em parceria com o LABICONTE, viabilizou a conclusão do projeto e por ter aceito o convite de participar da banca de defesa.

À Profa. Dra. Flávia Almeida Santos e os colegas do Laboratório de Produtos Naturais que muito contribuíram para análises dos resultados.

À Profa. Dra. Jaqueline Alvarez Leite, do Laboratório de Bioquímica Nutricional da Universidade Federal de Minas Gerais, que contribuiu de forma direta para a manutenção dessa pesquisa.

À Prof. Dra. Maria Helena Crespo Lopez, vinculada à Universidade Federal do Pará – UFPA, que muito contribuiu para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao amigo Daniel Viera Pinto por todo companheirismo e amizade durante nossos experimentos e convivência em diversas etapas dessa jornada.

Ao amigo Raul Freitas pelos momentos de ajuda na etapa final e conclusão dessa dissertação.

À amiga Cristhyane Aquino pela amizade, presença e ajuda nos experimentos realizados no Labiconte.

À amiga Juliana Rêgo pela amizade e todo o companheirismo ao longo desses dois anos de muito estudo e dedicação.

Ao amigo Dr. Márcio Wilker Campelo pela ajuda e companheirismo prestados durante toda essa jornada e ajuda na revisão e compreensão dos assuntos abordados.

Ao amigo Jardlon Albino pela lealdade, amizade e ajuda em diversas fases desse projeto.

Aos amigos de pós-graduação, Kildere Canuto, Lianna, Antonione Mora, Luís Antônio, Felipe Moura e José Carlos.

Às alunas e amigas de iniciação científica Carolina Benício e Dulci Maria por toda a ajuda e companheirismo nessa jornada.

Ao Laboratório de Microbiologia e Parasitologia da UFC.

Ao Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de imagem da UFC.

Ao ex-aluno de pós-graduação e amigo Davi Cunha que foi importante nos primeiros momentos de ingresso no laboratório.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, coordenadores e professores pela oportunidade e conhecimentos adquiridos.

Ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD), financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que permitiu a realização dessa pesquisa.

Às secretárias Ivone e Rita por toda disponibilidade e gentileza quando solicitadas.

“A persistência é o menor caminho do êxito”

Charles Chaplin

RESUMO

O metilmercúrio (MeHg) é uma espécie química orgânica de Hg_2^+ com grande relevância toxicológica, devido principalmente a sua capacidade de ser bioacumulado, o que pode causar diversos impactos na saúde humana e no meio ambiente. A intoxicação aguda do MeHg pode provocar surdez, tremor, ataxia, incoordenação motora, parestesia, coma e óbito. Na intoxicação crônica pode ocorrer perda de memória, depressão, redução do campo visual, distúrbios motores e cardiovasculares. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da dieta ocidental associada ou não à intoxicação por MeHg cronicamente no ganho de peso corporal, parâmetros lipídicos e alterações morfológicas no hipocampo, uma região cerebral importante relacionada à memória, em camundongos após desmame. Foram utilizados camundongos machos C57BL6/J, após desmame, com idade de 21 dias e peso entre 8-10 g. Os animais experimentais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais de acordo com o tipo de dieta e exposição ao MeHg. Os grupos que foram intoxicados receberam diariamente uma solução de cloreto de MeHg na água de beber (20 mg/L) de PN41 a PN61 de idade. Os grupos experimentais foram: grupo normonutrido (N), recebendo dieta padrão; grupo hiperlipídico (H), recebendo dieta ocidental; grupo normonutrido com exposição de MeHg (NHg) e hiperlipídico com exposição de MeHg (HHg). Foram utilizados um total de 60 animais. Para a indução de hiperlipidemia, os animais foram submetidos à alimentação exclusiva com dieta ocidental (42% de lipídeos), com 0,15% de colesterol, durante os dias 21 a 61 de idade. Os animais foram eutanasiados ao completar 40 dias de dieta. Foram coletadas amostras de hipocampo, pelos e soro sanguíneo para análises estereológicas (volume total, volumes de CA1, CA2/CA3, CA4 e giro denteado), balanço do estresse oxidativo (glutathiona/GSH e glutathiona peroxidase/GPx), toxicológicas (níveis de Hg) e parâmetros lipídicos (colesterol total e triglicerídeos), respectivamente. Os animais foram pesados com intervalo de 48h durante 40 dias pós-desmame. A intoxicação mercurial reduziu o delta de ganho de peso corporal apenas no grupo recebendo dieta ocidental (HHg). Como esperado, a adição de MeHg na água de beber resultou no aumento significativo dos níveis de Hg no pelo dos animais expostos ($p < 0,001$). Os animais desafiados com MeHg que receberam a dieta ocidental tiveram menores níveis de Hg quando comparado ao grupo normonutrido intoxicado. A intoxicação por MeHg aumentou os níveis de colesterol total sérico dos grupos normonutrido e do grupo recebendo a dieta ocidental. Os níveis séricos de triglicerídeos aumentaram apenas no grupo recebendo a dieta ocidental desafiado com intoxicação pelo MeHg ($p < 0,01$), mostrando um efeito combinado. A dieta ocidental *per se* reduziu os níveis GSH no hipocampo quando comparado com o grupo normonutrido. A intoxicação mercurial independente da dieta reduziu significativamente os níveis de GSH e GPx no hipocampo. Na análise estereológica, foi evidenciado que intoxicação mercurial independente da dieta reduziu o volume total e o volume de todas as camadas do hipocampo estudadas. Os resultados desse estudo sugerem um efeito combinado da dieta ocidental e do desafio do MeHg em relação aos níveis séricos de triglicerídeos. A intoxicação mercurial foi neurotóxica no hipocampo reduzindo GPx e GSH e afetando sua arquitetura, efeitos esses independentes da dieta. Mais estudos são necessários para avaliar em mais detalhes os mecanismos envolvidos.

Palavras-Chave: Metilmercúrio, dieta ocidental, hipocampo, parâmetros lipídicos, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Methylmercury (MeHg) is an organic chemical species of Hg_2^+ with great toxicological relevance, mainly due to its ability to be bioaccumulated, which can cause diverse impacts on human health and the environment. Acute intoxication of MeHg may cause deafness, tremor, ataxia, motor incoordination, paresthesia, coma, and death. In chronic intoxication memory loss, depression, visual field impairment, motor and cardiovascular disorders may occur. The objective of this work was to evaluate the effect of the western diet associated with chronic MeHg intoxication on body weight gain, lipid parameters and morphological changes in the hippocampus, an important memory-related brain region, in mice after weaning. Male weaned C57BL6/J mice, aged 21 days and weighting between 8-10g were used in this study. Experimental mice were randomly assigned into four experimental groups according to the type of diet and exposure to MeHg. Groups that were intoxicated received a daily solution of MeHg chloride in the drinking water (20 mg/L) from PN41 to PN61 of age. The experimental groups were: normonourished group (N), receiving standard diet; hyperlipidic group (H), receiving western diet; normonourished group exposed to MeHg (NHg) and the hyperlipidic group exposed to MeHg (HHg). A total of 60 animals were used. For the induction of hyperlipidemia, mice were submitted to exclusive western diet (42% of lipids), with 0.15% of cholesterol, during days 21 to 61 of age. The animals were euthanized at the completion of 40 days of diet. Hippocampal, hair and sera samples were harvest for stereological analyses (total volume, volumes of CA1, CA2/CA3, CA4 and dentate gyrus), oxidative stress balance (glutathione/GSH and glutathione peroxidase/GPx), toxicological (Hg levels) and lipid parameters (total cholesterol and triglycerides), respectively. Mice were weighed at 48h intervals for 40 days after weaning. Mercurial intoxication reduced the body weight gain delta only in the western diet group (HHg). As expected, addition of MeHg in drinking water resulted in a significant increase in hair Hg levels in the exposed mice ($p < 0.001$). Animals challenged with MeHg who received western diet had lower hair Hg levels when compared to the intoxicated normonourished group. MeHg intoxication increased serum total cholesterol levels both in the normonourished and western diet groups. Serum triglyceride levels increased only in the group receiving western diet challenged with MeHg intoxication ($p < 0.01$), showing a combined effect. The western diet per se reduced GSH levels in the hippocampus when compared to the normonourished group. Mercury intoxication significantly reduced GSH and GPx levels in the hippocampus regardless of the diets. In the stereological analyses, mercury intoxication reduced the total volume and volume of all layers of the hippocampus studied regardless of the diets as well. The results of this study suggest a combined effect of western diet and MeHg challenge on serum triglyceride levels. The mercury intoxication was neurotoxic in the hippocampus reducing GPx and GSH and affecting its architecture, these effects were found independent of the diets. More studies are needed to assess in more detail the mechanisms involved.

Keywords: methylmercury, western diet, hippocampus, lipid profile, oxidative stress.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μm – Micrômetro

μmol - Micromolar

$\mu\text{g/L}$ – Micrograma por litro

$^{\circ}\text{C}$ – Grau Celsius

CA= *Cornu ammonis*

BHE – Barreira hematoencefálica

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro

BrdU - 5-bromo-2'-deoxyuridine

EPI – Equipamento de proteção Individual

EROS – Espécies reativas de oxigênio

Fe (III) – Ferro

GABA – Ácido gama-aminobutírico

GCL – Camada granular celular

GD – Giro denteado

GPx – Glutathione peroxidase

GR – Glutathione reductase

GSH – Glutathione

GSSG – Glutathione reduzida

H- Grupo hiperlipídico

Hg^{2+} – Mercúrio

HgClO – Hipoclorito de mercúrio

Hg_2O^{2-} – Óxido de mercúrio

Hg_2Cl_2 – Cloreto de mercúrio

HgO – Óxido de mercúrio

HgS – Sulfeto de mercúrio

$\text{Hg}(\text{CNO})_2$ – Fulminato de mercúrio

HHg – Grupo hiperlipídico + mercúrio

HNO_3 – Ácido nítrico

IgG – Imunoglobulina G

IL-6 – Interleucina- 6

Kcal – Quilocalorias

IL-1 β – Interleucina-1 beta

LAT-1 - Transportador 1 de L-aminoácido
MDA – Malondialdeído
MeHg– Metilmercúrio
MeHg-Cys – Complexo metilmercúrio / L- Cisteína
mg/L – Miligrama por litro
ml/Dia – Mililitro por dia
N – Grupo normonutrido
NHg – Grupo normonutrido + mercúrio
NPC – Células nervosas progenitoras
PFTE – Politetrafluoroetileno
PN= Pós-natal
SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação
ZSG – Zona subgranular do hipocampo
SNC – Sistema nervoso central
ZSV – Zona subventricular do ventrículo lateral
TGI – Trato gastrointestinal
TNF- α – Fator de necrose tumoral-alfa
UFC– Universidade Federal do Ceará
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
UFPA – Universidade Federal do Pará

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Foto de uma vítima da contaminação com metilmercúrio na baía de Minamata com sequelas.....	20
Figura 2. Intoxicações exógenas por mercúrio por UF, Brasil – 2006 a 2014.....	21
Figura 3. Representação do ciclo do mercúrio.....	23
Figura 4. Ação do metilmercúrio promovendo neurotoxicidade e estresse oxidativo.....	25
Figura 5. Efeitos do MeHg sobre a homeostase GSH.....	25
Figura 6. (A) Ilustração das camadas do hipocampo. (B) Ilustração da via colateral de Schaffer.....	33
Figura 7. Formação estrutural diferente da neurogênese no bulbo olfatório e no giro denteado do hipocampo.....	34
Figura 8. Microisolador apresentando adesivo com símbolo de material com risco biológico.....	42
Figura 9. Microisolador apresentando adesivo com símbolo do diagrama de Hommel.....	42
Figura 10. Criostato utilizado para obtenção dos cortes de 40 µm de espessura do hipocampo.....	46
Figura 11. Sistema de pontos em cruz utilizado para delimitar área das camadas do hipocampo e posterior análise do volume das mesmas através do princípio de Cavalieri.....	47
Figura 12. Secção coronal de hipocampo mostrando toda a estrutura do órgão em camadas.....	48
Figura 13. Efeito da administração de dieta hiperlipídica e exposição ao MeHg sobre o delta de ganho de peso corporal (peso final - peso inicial) de camundongos C57BL/6J.....	50
Figura 14. Análise da concentração de MeHg por kg de pelo de camundongos C57BL/6J.....	51
Figura 15. Impacto da administração de dieta ocidental e exposição ao MeHg sobre a concentração de colesterol total sérico (mg/dL) em camundongos C57BL/6J.....	52

Figura 16. Efeito da administração de dieta ocidental e exposição ao MeHg sobre a concentração de triglicerídeos séricos (mg/dL) de camundongos C57BL/6J.....	53
Figura 17. Avaliação do estresse oxidativo por meio da análise das concentrações de GSH no hipocampo dos camundongos C57BL/6J submetidos a dieta ocidental e/ou intoxicação pelo MeHg.....	54
Figura 18. Avaliação do estresse oxidativo por meio da análise das concentrações de GPx no hipocampo dos camundongos C57BL/6J submetidos a dieta ocidental e/ou intoxicação pelo MeHg.....	55
Figura 19. Análise estereológica do volume total do hipocampo (mm^3) de camundongos C57BL/6J submetidos a dieta ocidental e/ou intoxicação pelo MeHg.....	56
Figura 20. Análise estereológica do volume da camada CA1 do hipocampo (mm^3) de camundongos C57BL/6J submetidos a dieta ocidental e/ou intoxicação pelo MeHg.....	57
Figura 21. Análise estereológica do volume das camadas CA2/CA3 do hipocampo (mm^3) de camundongos C57BL/6J submetidos a dieta ocidental e/ou intoxicação pelo MeHg.....	58
Figura 22. Análise estereológica do volume da camada CA4 do hipocampo (mm^3) de camundongos C57BL/6J submetidos a dieta ocidental e/ou intoxicação pelo MeHg.....	59
Figura 23. Análise estereológica do volume do GD do hipocampo (mm^3) de camundongos C57BL/6J submetidos a dieta ocidental e/ou intoxicação pelo MeHg.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do MeHg.....	17
Tabela 2. Desenho experimental e grupos planejados.....	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Mercúrio	16
1.1.1 <i>Metilmercúrio</i>	17
1.2 Contaminação ambiental e humana	19
1.3 Impacto da intoxicação por MeHg no estresse oxidativo	23
1.4 Impacto da intoxicação por MeHg nas dislipidemias e sistema cardiovascular	26
1.5 Impacto da intoxicação por MeHg no sistema nervosa central	28
1.6 Dietas com alto teor de gordura e calorias	29
1.7 Hipocampo	32
1.8 Neurogênese do hipocampo	33
2 JUSTIFICATIVA	36
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivos específicos	37
4 MATERIAS E MÉTODOS	38
4.1 Animais	38
4.2 Equipamentos e materiais	39
4.3 Drogas, reagents e soluções	40
4.4 Indução da hiperlipidemia	40
4.5 Intoxicação dos animais	41
4.6 Manejo e descarte de material contaminado com metilmercúrio	41
4.7 Análise ponderal	44
4.8 Dosagem de metilmercúrio	44

4.9	Análise do perfil lipídico	45
4.10	Análise esterológicas	45
4.10.1	<i>Perfusão transcardíaca da solução fixadora</i>	45
4.10.2	<i>Microtomia, coloração e preparo das laminas</i>	46
4.11	Avaliação do estresse oxidativo em amostras do hipocampo	48
4.12	Análise estatística	49
5	RESULTADOS	50
5.1	Avaliação ponderal dos grupos experimentais	50
5.2	Concentração de mercúrio no pelo dos grupos experimentais	51
5.3	Dosagem dos níveis séricos de colesterol total	52
5.4	Dosagem de triglicerídeos	53
5.5	Dosagem de glutathiona (GSH) no hipocampo	54
5.6	Dosagem de glutathiona peroxidase (GPx) no hipocampo	55
5.7	Análise estereológica do volume do hipocampo total	56
5.8	Análise estereológica do volume da camada CA1	57
5.9	Análise estereológica do volume da camada CA2/CA3	58
5.10	Análise estereológica do volume da camada CA4	59
5.11	Análise estereológica do volume do giro denteado (GD)	60
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	70
	ANEXO	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 Mercúrio

O mercúrio (Hg) é um elemento natural encontrado no meio ambiente sendo o único elemento metálico líquido a temperatura ambiente, mas em altas temperaturas constitui-se em um gás tóxico, inodoro e incolor. A gaseificação da crosta terrestre, erupções vulcânicas e evaporação da água são fontes naturais de sua produção correspondendo a uma emissão de 25 mil a 125 mil toneladas por ano (SANTOS *et al.*, 2006; BITENCOURT *et al.*, 2013). No entanto, além destas fontes naturais, fontes de origem antropogênica como, por exemplo, a extração em depósitos subterrâneos do minério cinabário (sulfeto de mercúrio), indústrias que queimam combustíveis fósseis, produção eletrolítica de cloro-soda, produção de acetaldeído, incineradores de lixo, polpa de papel, tintas, pesticidas, fungicidas, baterias, lâmpadas de vapor de mercúrio e produtos odontológicos também contribuem para a contaminação ambiental do mercúrio (NASCIMENTO; CHASIN, 2001).

O Hg_2^+ apresenta uma densidade elevada, possuindo uma alta tensão superficial, o que faz com que ele forme esferas pequenas nas rochas e minerais onde é depositado. O metal Hg^0 pode formar com facilidade ligas com diversos outros metais como ouro e prata produzindo amálgamas. O mercúrio apresenta-se como estrutura monovalente sob forma de Hg nos compostos mercuriosos Hg_2O_2^- e Hg_2Cl_2 e estrutura bivalente em compostos mercúricos a exemplo do HgO e o HgClO , HgS e $\text{Hg}(\text{CNO})_2$ (MMA, 2010).

O mercúrio apresenta-se na natureza de diferentes formas: elementar (metálico- Hg^0); cloreto inorgânico (cloreto de mercúrio- HgCl_2); e orgânico (metil- $\text{CH}_3\text{-Hg}^+ \text{X}^-$ e etilmercúrio- $\text{CH}_2\text{CH}_3\text{-Hg}^+$). Cada uma destas formas estruturais apresenta diferentes riscos tóxicos causando implicações para saúde. O mercúrio na sua composição elementar constitui-se em um líquido que se vaporiza rapidamente, no entanto consegue permanecer na atmosfera terrestre por até um ano, podendo também ser transportado e depositado a nível global. Ele também pode se instalar nos sedimentos fluviais, onde é transformado em metilmercúrio (MeHg), causando danos em toda a cadeia alimentar dos ecossistemas (WHO, 2007).

A produção e a bioacumulação do MeHg na cadeia alimentar podem variar em função de fatores como temperatura, concentração de bactérias no meio, pH, solo ou sedimento, concentração de sulfeto, condições de oxirredução do meio e variações sazonais. Desta forma, o aumento da concentração de MeHg é proporcional ao aumento da matéria

orgânica, uma vez que os nutrientes orgânicos aumentam a atividade microbiana, aumentando como consequência produção desse composto (BISINOTI; JARDIM 2004).

1.1.1 Metilmercúrio (MeHg)

O metilmercúrio (MeHg) é uma espécie química orgânica de Hg_2^+ com grande relevância toxicológica, devido principalmente a sua capacidade de ser bioacumulado na rede alimentar, o que pode causar diversos impactos na saúde humana e no meio ambiente. As características físico-químicas do MeHg são exibidas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do MeHg.

Propriedades	Indicativos
Fórmula Molecular	CH_3HgX^-
Ponto de Fusão	170 °C
Gravidade Específica	4,06
Estabilidade	Estável, exceto na presença de oxidantes fortes
Toxicidade (muito tóxico por inalação, ingestão ou através do contato com a pele), perigoso devido aos efeitos acumulativos	Dose letal para ratos (DL-50) 1,95 mg kg ⁻¹
Primeiros sintomas de contaminação no homem	Nível de MeHg no sangue de 200 – 500 ng mL ⁻¹
Solubilidade a 25°C	> 6 mg/L
Concentração de saturação do vapor a 20 °C	94 mg/m ³

Fonte: Adaptado de Bisinote; Jardim (2004).

A estabilidade do MeHg sofre alterações de acordo com o local de armazenamento, influência da temperatura e meio que se encontra dissolvido. Em seus estudos, Lansens *et al.*(1990) demonstraram que uma solução contendo 10 µg/L de MeHg é estável em água ultrapura por 8 semanas, quando armazenada a 5 °C. Em um outro momento quando a solução é estocada no escuro ou na presença de luz e a temperatura ambiente ocorre perda de 15% do MeHg na primeira semana e de 50% na segunda. Foi evidenciado também que a mesma solução é estável em HNO₃ 20% (m/v) por um período de 12 semanas, quando estocada no refrigerador a 5 °C, ou quando mantida em recipiente de PTFE, armazenado a temperatura ambiente e no escuro. Leermakers *et al.*(1990) evidenciaram em seus achados

que soluções contendo 0,08 µg/L de MeHg a pH 6,0 estocadas em recipiente de vidro permanecem estáveis por 5 dias, e após este período o MeHg é convertido em mercúrio inorgânico. A estocagem de MeHg em diclorometano também não preserva suas propriedades, sendo que este pode ser convertido a mercúrio inorgânico num período de 15 dias (BISINOTE; JARDIM, 2004).

Altamente tóxico, o MeHg em situações de exposição aguda pode provocar surdez, tremor, ataxia, incoordenação motora, parestesia, coma e óbito (BITENCOURT et al., 2013).

Nos casos em que o contato direto com o MeHg se torna crônico, a perda de memória, depressão, redução do campo visual, distúrbios motores que se assemelham a esclerose lateral amiotrófica, riscos para distúrbios cardiovasculares podem estar presentes (CHANG *et al.*, 2008; CHUU; LIU; LIN-SHIAU, 2007; OZUAH, 2000).

A exposição oral representa uma forma importante pela qual a população humana está exposta ao MeHg. Vale ressaltar que a absorção de MeHg no trato gastrointestinal (TGI) é de cerca de 90-95%, o que é significativamente maior quando comparado à absorção TGI de sais inorgânicos de mercúrio a partir de alimentos (FARINA; ROCHA; ASCHNER, 2011). Devido ao seu alto potencial neurotóxico, muitos mecanismos têm sido apresentados na literatura na tentativa de melhor entendimento dessa toxicidade. São propostos a indução de estresse oxidativo, dano mitocondrial, interrupção da homeostase do cálcio intracelular, interrupção da função neurotransmissora, inibição dos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA), inibição da captação de glutamato e apoptose/necrose (ASCHNER *et al.*, 2007; BELLÉ *et al.*, 2009; DO NASCIMENTO *et al.*, 2008; FERRARO *et al.*, 2009; MORETTO *et al.*, 2005; SHANKER *et al.*, 2002; WAKABAYASHI *et al.*, 1995).

Kaur, Aschner e Syversen (2006) e Sarafian *et al.* (1994) utilizando modelos *in vitro* avaliaram os mecanismos envolvidos na neurotoxicidade do MeHg. Esses autores identificaram depleção de glutatona (GSH), aumento da produção de espécies reativas ao oxigênio (EROS). A redução da expressão de ciclina E também tem sido descrita após exposição crônica e subtóxica do MeHg sobre células pregenitoras neuronais (XU *et al.*, 2010).

A depleção nos níveis de GSH é resultado da alta afinidade que o MeHg apresenta por tióis endógenos. Em células hepáticas o composto orgânico do mercúrio forma complexos

solúveis com a cisteína e a glutatona, secretados pela bile e reabsorvidos no trato gastrointestinal, dando início ao processo de peroxidação lipídica, o qual pode produzir alterações nas membranas celulares (BITENCOURT, 2013). O MeHg também induz abertura do poro de transição da permeabilidade nas mitocôndrias do fígado de rato, representando um importante mecanismo molecular responsável pela morte celular (BRAGADIN *et al.*, 2002). Sobre a função renal em humanos, poucos relatos sobre a ação do MeHg são relatados na literatura, porém alguns estudos desenvolvidos em animais sugerem que o MeHg induz toxicidade renal (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000).

O MeHg é formado principalmente por uma relação co-metabólica de bactérias redutoras de sulfato e em quantidade menor por bactérias sequestradoras de Fe(III). O mercúrio também pode ser metilado por microorganismos metanônicos (arqueobactérias anaeróbias que possuem capacidade de fabricar o gás metano) indicando que a produção de MeHg possa ocorrer em sedimentos de água doce anóxicos empobrecidos de sulfato e Fe (III) (BIGHAM *et al.*, 2016).

O MeHg é um poluente ambiental amplamente distribuído no meio-ambiente, apresentando efeitos tóxicos e degenerativos tanto no sistema nervoso em desenvolvimento quanto no adulto (XU *et al.*, 2010). É um composto produzido a partir do mercúrio inorgânico (Hg), que pode causar intoxicações agudas e crônicas ao homem, com danos ao sistema nervoso (OMS, 2008).

1.2 Contaminação ambiental e humana

O mercúrio se insere no meio ambiente a partir de emissões naturais, como vulcões, desgaseificação crustal e incêndios florestais, bem como de atividades humanas, incluindo a queima de carvão para energia, o processo de eletrólise de cloreto alcalino utilizado na fabricação de soluções cáusticas e mineradoras. Liberado na atmosfera, o mercúrio pode seguir em grandes distâncias, mesmo em todos os continentes, entrando assim no "ciclo global". As forças para reduzir a liberação de mercúrio para o meio ambiente têm aumentado e são determinantes para diminuir consideravelmente o volume de emissões produzidas pelo homem. No entanto, o mercúrio continua a ser um poluente global, e existem regiões no mundo onde os níveis de contaminação permanecem elevados (CECCATELLI *et al.*, 2013).

Analisando o histórico de desastres ambientais, observam-se diversos casos relatados por meio da contaminação com o mercúrio, com destaque para o acidente em Minamata no Japão, quando na década de 30 uma empresa denominada Chisso, instalou-se na cidade para a produção de acetaldeído usado para produção de materiais plásticos. O acetaldeído era fabricado por uma reação de acetileno com água usando mercúrio como catalisador. Na década de 50, houve a intensificação da produção em função da política de crescimento industrial no período posterior a Segunda Guerra Mundial no Japão e os resíduos com MeHg foram descartados no Mar Yatsushiro por meio da Baía de Minamata, causando uma devastadora contaminação nos peixes da região. No entanto, somente em 1956 é que foram constatados os primeiros casos de pessoas com problemas no sistema nervoso central e no cérebro que relatavam sintomas de dormência nos membros, fraquezas musculares, problemas visuais, dificuldades na fala, paralisias e deformidades que levavam ao óbito desses pacientes (**Figura 1**).

Figura 1. Foto de uma vítima da contaminação com MeHg na baía de Minamata com sequelas.



Fonte: Acervo O Globo, 2014, disponível em: <http://acervo.oglobo.com>

As investigações iniciais da doença de Minamata nos primeiros seis meses apontaram que a causa estava relacionada com a ingestão de peixes e mariscos contaminados por um determinado agente tóxico, sendo a hipótese da contaminação pelo MeHg apresentada em 1959, mas somente em 1968 é que foi reconhecida (HACHIYA, 2012). A Chisso interrompeu a produção apenas em 1970 e após mais de 20 anos de luta nos tribunais, em 1973, a fábrica foi julgada como culpada pelo desastre ambiental que causou a morte de mais

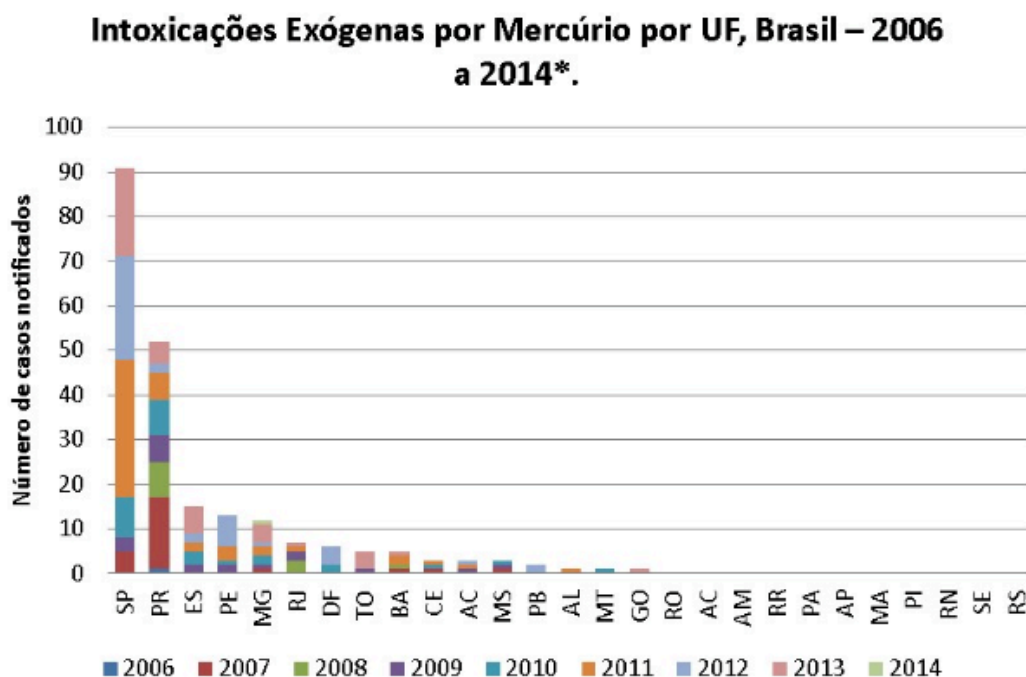
de 887 pessoas, tendo que pagar US\$ 600 milhões às 138 pessoas que estavam movendo processo judicial por reparações (O Globo, 2017).

Um outro surto de contaminação por MeHg de grandes proporções deu-se na década 70 no Iraque, devido à ingestão de pão feito com sementes de trigo que haviam sido tratadas com um fungicida a base de MeHg, ocasionando em torno de 7 mil casos de envenenamento, levando a 450 óbitos (YOSHIDA, 2016).

No Brasil, todo o mercúrio utilizado é importado, pois não existem fontes naturais registradas deste metal no país e sua comercialização é controlada pelo IBAMA- (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) tendo sua distribuição e utilização diferenciada nas regiões brasileiras. Na região sul do Brasil, por exemplo, o mercúrio é emitido por meio das atividades das usinas termoelétricas a carvão em forma de vapor e cinzas. As indústrias químicas e eletroeletrônicas do sudeste e as petroquímicas e refinarias do Nordeste geram resíduos de Mercúrio. O Centro-Oeste e o Norte, por sua vez, destacam-se pela a atividade mineradora que utiliza esse metal (SINAN, 2017).

Segundo dados fornecidos pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), foram registrados no Brasil 220 casos de exposição e intoxicação por meio do mercúrio entre 2006 a 2014, sendo que 41% dos casos ocorreram em São Paulo e 24% no Paraná, conforme observado na **Figura 2**.

Figura 2. Intoxicações exógenas por mercúrio por UF, Brasil – 2006 a 2014.



Fonte: SINAN, 2014/ Portal da Saúde. * Os dados de 2014 são parciais.

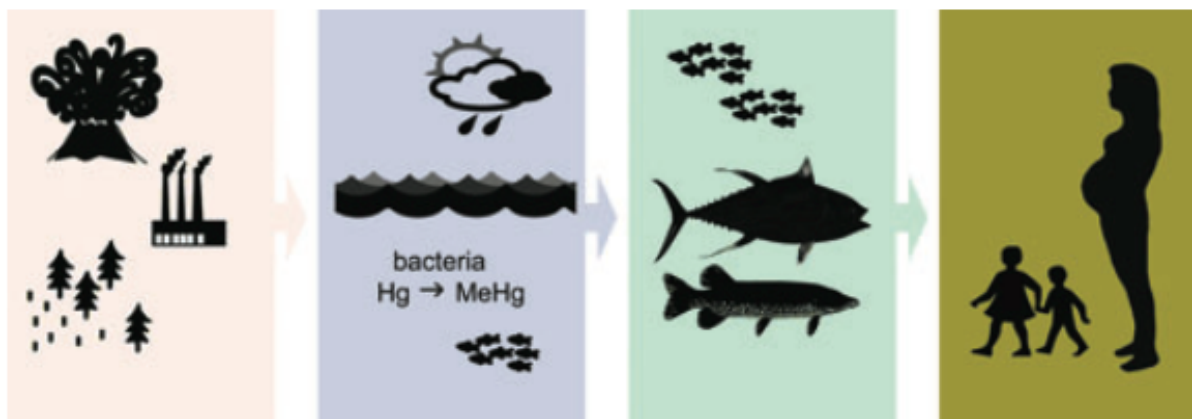
Na região da Amazônia, a exposição ao MeHg por meio do consumo de peixes tem gerado uma crescente preocupação nas últimas duas décadas em função da exploração ambiental e motivando diversas pesquisas com o objetivo de avaliar os níveis de contaminação pelo Hg^{2+} em comunidades que frequentemente consomem os peixes da região (FARIAS *et al.*, 2012). Uma destas pesquisas realizada em 2011 teve como objetivo mapear a contaminação das espécies de peixes do Rio Tapajós com mercúrio. Essa pesquisa mostrou que as espécies de peixes piscívoras da região analisada que fazem parte da alimentação da população local como tucunaré (*Cichla*), sarda (*Sarda sarda*), dourada (*Sparus aurata*), pescada (*Cynoscion leiarchus*), filhote (*Brachyplathystoma filamentosum*) e surubim (*Pseudoplatyatoma coruscans*), apresentaram níveis de MeHg muito superior as espécies de peixes não-piscívoras daquela região (CRESPO-LÓPEZ *et al.*, 2011).

O mercúrio depositado em lagos, rios e oceanos é transformado em MeHg pela atividade metilante das bactérias sulfato-redutoras. As bactérias presentes no sedimento desses mananciais podem também desmetilar o MeHg, via reação reversa. O balanço das reações de metilação e desmetilação determina se um ambiente atuará como fonte ou sumidouro de MeHg (VASQUEZ *et al.*, 1999).

O MeHg assim se insere na cadeia alimentar aquática e é bioacumulado e biomagnificado com os níveis mais altos encontrados em peixes predatórios. Frequentemente os seres humanos são mais expostos ao MeHg comendo peixes, mariscos e mamíferos marinhos contaminados (**Figura 3**). A partir do momento que o MeHg é ingerido, é quase completamente absorvido no trato gastrointestinal, entrando na corrente sanguínea e assim é distribuído para todos os órgãos, incluindo o cérebro, já que tem facilidade para atravessar facilmente a barreira hematoencefálica (BHE) (CLARKSON, 2002). O transpasse da BHE é mediado pelo sistema neutro de suporte de aminoácidos como um complexo MeHg-cisteína pelo transportador de aminoácidos LAT1. (ASCHNER, 1990; MOTTET *et al.*, 1997). MeHg sofre uma desmetilação lenta no cérebro o que resulta na acumulação de mercúrio inorgânico que cruza a BHE, podendo também se acumular no cabelo e nas unhas (VAHTER, 1994). A excreção de MeHg ocorre vagarosamente e principalmente através da bile e das fezes, mas também através da urina e do suor. A meia-vida de MeHg no sangue pode variar significativamente dependendo da idade; nos adultos é entre 50 e 70 dias, enquanto nos recém-nascidos é mais longo, pois os bebês excretam menos MeHg em comparação com os adultos. Outra forma de excreção é através do leite materno, proporcionando um risco para

lactentes amamentados. Com tudo isso o MeHg pode facilmente atravessar a placenta, atingindo níveis de sangue do cordão umbilical que são 1,7 vezes maiores do que no sangue materno (CECCATELLI *et al.*, 2013).

Figura 3. Representação do ciclo do mercúrio.



Fonte: adaptada de Ceccatelli *et al.*, 2013. Desde sua liberação para o meio ambiente, sua conversão em MeHg, entrando na cadeia alimentar aquática, tornado-se alvo do consumo humano, que por sua vez mulheres grávidas passam para seus filhos.

1.3 Impacto da intoxicação por MeHg no estresse oxidativo

A neurotoxicidade induzida por MeHg tem sido investigada em vários estudos experimentais em modelos *in vitro* e *in vivo*, na tentativa de um melhor entendimento sobre os principais mecanismos moleculares e celulares envolvidos nesse processo.

Hoje se sabe que o MeHg é capaz de migrar do sistema circulatório (sangue) para o SNC através da barreira hematoencefálica pelo sistema transportador de aminoácidos neutro tipo L (LAT1). Em estudos posteriores Kerper, Ballatori e Clarkson (1992) concluíram que o MeHg entrou no cérebro de ratos como um complexo de cisteína através do sistema LAT1 como resultado do mimetismo entre o complexo MeHg / L-cisteína (MeHg-Cys) e L-metionina, um substrato para o sistema de transporte de aminoácidos LAT1.

Em um estudo *in vitro* mais recente, Yin *et al.* (2008) utilizando cultura de células de CHO-k1 (células de ovário de hamster), demonstraram que a superexpressão do transportador LAT1 se associou a uma maior absorção de MeHg na presença de L-cisteína, com redução da viabilidade celular. Esses achados indicam que o complexo MeHg-Cys é um substrato para o sistema LAT1, que transporta ativamente o MeHg através das membranas, sendo responsável por boa parte dos altos níveis de Hg^{2+} no cérebro após exposição. Embora outros transportadores possam ter contribuído para o transporte de MeHg, o LAT1 parece ser

o principal, se não o único, responsável pelo transporte MeHg de tecidos periféricos para o SNC (BRIDGES; ZALUPS, 2010). Com os níveis elevados de MeHg no SNC, eventos deletérios como o aumento do estresse oxidativo estão mais propensos a ocorrer (FARINA; ROCHA; ASCHNER, 2011).

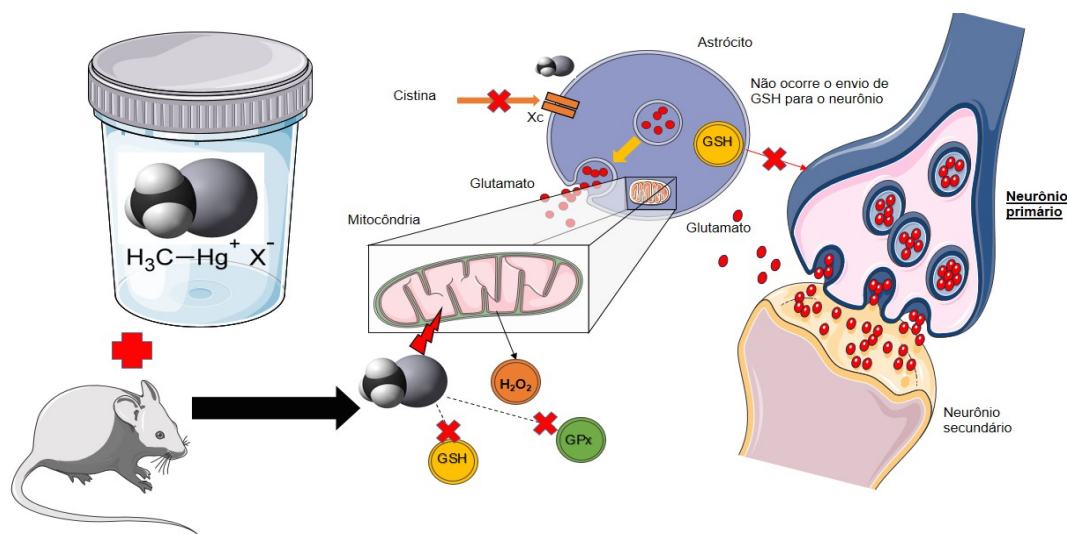
O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidante (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Como consequência se pode observar danos em proteínas, lipídeos, DNA, além de modificações estruturais em proteínas e carboidratos alterando estrutura e função destas moléculas. Os efeitos danosos teciduais podem ser decorrentes de reações bioquímicas enzimáticas e não enzimáticas mediadas por compostos intermediários altamente reativos, que podem ser tanto endógenos ou exógenos (SMALL *et al.*, 2012).

O estresse oxidativo provocado por MeHg está relacionado à sua interação com os tióis intracelulares, como a glutatona (GSH). GSH é o composto de tiol intracelular de baixo peso molecular mais abundante em todos os tecidos, incluindo o SNC (DRINGEN, 2000). Estudos sugerem que o sistema antioxidante de glutatona pode ser um alvo da neurotoxicidade do MeHg. O sistema antioxidante da glutatona inclui glutatona reduzida, GSSG, (o antioxidante que contém sulfidrilo de baixo peso molecular mais importante) e as enzimas relacionadas com GSH, glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR).

As células de mamíferos contêm cinco isoformas de GPx dependentes de selênio: GPx citosólico (GPx1), GPx gastrointestinal (GPx2), GPx de plasma (GPx3), hidroxiperoxidase fosfolípídica GPx (GPx4) e, em humanos, GPx6, expresso apenas no sistema olfativo (FRANCO *et al.*, 2009). Com bastante relevância, a glutatona peroxidase e a glutatona redutase são enzimas centrais envolvidas na desintoxicação de peróxidos e redução do dissulfureto de glutatona (glutatona oxidada, GSSG), respectivamente (DRINGEN, 2000).

As especificidades dessas enzimas, bem como a manutenção de um estado de tiol normal representada principalmente pela relação GSH/GSSG, são essenciais para a proteção das células contra danos oxidativos. Com foco especial na toxicidade induzida por MeHg, sabe-se que o átomo de mercúrio interage diretamente com o grupo tiol de GSH, induzindo a formação de um complexo GS-HgCH₃ excretável (BALLATORI; CLARKSON, 1982). Segundo Franco *et al.* (2007) esta interação diminui os níveis de GSH, o que pode contribuir para a ocorrência de estresse oxidativo (**Figura 4**).

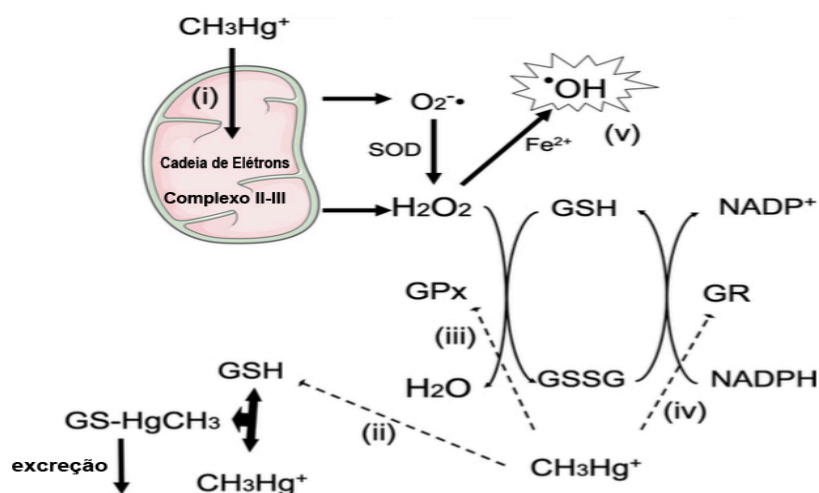
Figura 4. Ação do MeHg promovendo neurotoxicidade e estresse oxidativo.



Fonte: Própria. MeHg em contato com o sistema nervoso do animal (astrócito), bloqueia a captação de cistina, que por sua vez no interior da mitocôndria inibe o GSH e GPx, diminuindo o envio de GSH para o neurônio.

Os baixos níveis do sistema antioxidante GSH no SNC, provocados pela exposição ao MeHg (AMONPATUMRAT, 2008; FRANCO *et al.*, 2006; STRINGARI *et al.*, 2008.), colaboram para o aumento do efeito neurotóxico do MeHg. Na **Figura 5**, os efeitos de MeHg sobre a homeostase GSH.

Figura 5. Efeitos do MeHg sobre a homeostase GSH.



Fonte: Adaptado de Farina; Rocha; Aschener (2011). (i) O metilmercúrio (CH_3Hg^+ ; MeHg) interrompe a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, levando a formação aumentada de espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). (ii) MeHg também reage com glutathiona reduzida (GSH), levando à depleção de GSH devido à formação de um complexo MeHg-GSH (GS-HgCH_3), que é excretado do corpo. MeHg dificulta o aumento fisiológico das atividades de glutathiona redutase (GR) e glutathiona peroxidase (GPx) no SNC de roedores durante o período pós-natal inicial (iii e iv) mas também diminui a atividade GPx em animais adultos. Todos esses eventos (i-iv) culminam no aumento da geração de EROS e do estresse oxidativo (v).

A redução na atividade GPx torna as células suscetíveis ao estresse oxidativo. Farina *et al.* (2005) e Carvalho *et al.* (2007) documentaram a inibição da mesma enzima por compostos de mercúrio *in vivo* no cerebelo de camundongos adultos. O MeHg é conhecido por induzir a geração de compostos peróxido nas células, além de reduzir a atividade da GPx, a principal enzima responsável pela degradação do peróxido, levando a um efeito nocivo cumulativo. Franco *et al.* (2009) examinaram a participação de GPx na toxicidade induzida por MeHg usando métodos *in vivo e in vitro*. Neste estudo, os mesmos demonstraram que o MeHg inibe a atividade do GPx no cérebro de ratos, nas frações isoladas de mitocôndrias e nas células SH-SY5Y cultivadas. Este fenômeno é concomitante com alterações no estresse oxidativo e nos marcadores apoptóticos.

1.4 Impacto da intoxicação do MeHg nas dislipidemias e sistema cardiovascular

Os estudos voltados para o melhor entendimento sobre o metilmercúrio, reconhecem que o mesmo é a forma mais danosa entre os compostos de mercúrio e é formado quando o mercúrio inorgânico que circula no ambiente geral é dissolvido em água doce e água do mar. Sabe-se que ele se torna concentrado através da cadeia alimentar ecológica e ingerido em seres humanos. Esse metal pode ser ingerido através da ingestão de alimentos por pessoas cujas ocupações não estão diretamente relacionadas à exposição ao mercúrio, e isso pode afetar a saúde humana. Portanto, o metilmercúrio é um material perigoso que merece a atenção de especialistas em saúde ambiental (HONG, 2012).

Muitos são seus efeitos danosos relacionados com as dislipidemias, distúrbios cardiovasculares e neurotoxicidade. Em relação aos efeitos cardiovasculares, a exposição ao MeHg pode causar estresse oxidativo, o que pode levar ao desenvolvimento de doença cardiovascular devido a sua colaboração para arritmias, hipertensão arterial e o surgimento de placa aterosclerótica (ESTECHA *et al.*, 2014).

Moreira *et al.* (2012) estudaram a estreita relação entre doença cardiovascular e dislipidemia a fim de investigar os efeitos da exposição MeHg em longo prazo sobre os níveis de lipídios plasmáticos em camundongos, bem como seus mecanismos subjacentes e potenciais relações com a neurotoxicidade induzida por MeHg. A principal evidência encontrada foi que a exposição a longo prazo à exposição a MeHg induziu dislipidemia em roedores. Especificamente, camundongos Swiss e C57BL/6 tratados por 21 dias com uma solução de MeHg (40 mg/l, *ad libitum*) diluída em água da torneira apresentaram aumento dos

níveis plasmáticos de colesterol total e não-HDL. A hipercolesterolemia induzida por MeHg também foi observada em camundongos (*knockouts*) para receptor de lipoproteína de baixa densidade LDL. Mesmo que a síntese hepática de colesterol esteve inalterada, sinais significativos de nefrotoxicidade foram observados em indicando que o envolvimento de nefropatia na homeostase lipídica induzida por MeHg.

Estudos epidemiológicos têm explorado a relação entre MeHg e aterosclerose, geralmente medindo o aumento da espessura da camada íntima média da artéria carótida. Em um estudo prospectivo envolvendo 1.014 homens finlandeses do estudo KIHHD (Estudo de Fator de Risco Isquêmico de Doença Cardíaca de Kuopio), um aumento médio de 8 μm de espessura intimal foi encontrado para cada aumento de $\mu\text{g/g}$ de mercúrio em cabelos (SALONEN, 2000). Esses achados sugerem que o acúmulo de mercúrio no organismo está associado à progressão da aterosclerose carotídea. Esta relação também foi encontrada em estudos realizados em balneários nas Ilhas Feroe e em adultos; entretanto, outros estudos não encontraram essa associação (ROMAN, 2011), (CHOI, 2009).

A relação direta e os mecanismos pelos quais o MeHg exerce seus efeitos negativos sobre o sistema cardio vascular ainda não são totalmente bem elucidados. No entanto, a sua elevada afinidade para os grupos tiol e a sua capacidade para se ligar selênio formando um complexo insolúvel poderia reduzir as defesas antioxidantes e promover a peroxidação de radical livre e de lípidos no corpo humano (ESTECHA *et al.*, 2014).

Embora os peixes possam conter compostos prejudiciais saúde, por fazer parte da bioacumulação de MeHg no cadeia alimentar aquática, portanto sendo fonte direta de contaminação do homem e contribuinte para os distúrbios cardiovasculares e eventos relacionados as dislipidemias, é uma fonte muito importante de nutrientes, especialmente omega-3, ácidos graxos de cadeia longa, vitaminas e selênio que pode prevenir doenças crônicas, inclusive as relacionadas aos distúrbios cardio vasculares cardiovasculares, é interessante o consumo várias espécies de peixes menores devido o acúmulo de MeHg nas espécies maiores, e evitar o consumo de peixes a partir de águas com um elevado teor de poluição ambiental principalmente metais pesados (VIRTANEN *et al.*, 2007).

1.5 Impacto da intoxicação do MeHg no sistema nervoso central

O MeHg é um metal orgânico e com poder de contaminação ambiental com neurotoxicidade reconhecida, principalmente para o desenvolvimento do sistema nervoso (BOSE *et al.*, 2012). As áreas de lesão induzidas pela exposição ao MeHg estão principalmente no cérebro, no entanto, a extensão e severidade da ação neuropatológica dependem do nível de intoxicação, região afetada, ambiente redox, envolvimento celular e do estágio de desenvolvimento (FUJIMURA e USUKI, 2017).

Segundo dados relatados pela OMS (2008), dois grupos populacionais são mais vulneráveis à intoxicação por mercúrio. O primeiro é os infantes, que compreende o feto, o recém-nascido e a criança, devido à plasticidade do SNC num período crítico de desenvolvimento, podendo a exposição ocorrer ainda no útero e pelo consumo de leite materno contaminado. O segundo grupo são as mulheres, que compõem as novas mães, grávidas e mulheres que possam vir a engravidar, devido ao risco teratogênico desse composto e terminação da gravidez.

A intoxicação com MeHg tem atraído atenção particularmente crescente em todo o mundo, porque aproximadamente 10% de MeHg absorvido atravessa a barreira hematoencefálica, além de atravessar a barreira placentária e se acumular no cérebro humano, podendo gerar neurotoxicidade severa ou mesmo subclínica com efeitos duradouros (CECCATELLI *et al.*, 2013, YOSHIDA *et al.*, 2016).

A exposição ao MeHg é prejudicial, particularmente para o cérebro em desenvolvimento. De fato, o envenenamento pré-natal com alta dose e exposição crônica de MeHg pode causar déficits neurológicos permanentes como: atraso mental, paralisia cerebral, alterações na função motora, desenvolvimento de linguagem, atenção e memória em crianças e adolescentes, com o comprometimento do sistema antioxidante GSH (FARINA *et al.*, 2011, BOSE *et al.*, 2012, GUIDA *et al.*, 2017).

Mesmo que os astrócitos sejam as células preferencias de acumulação de MeHg, os neurônios parecem ser mais suscetíveis à toxicidade induzida por MeHg. As células neuronais de diferentes estruturas cerebrais, como hipocampo, cerebelo e córtex cerebral, foram descritas como possíveis alvos para os efeitos tóxicos provocados por MeHg. Com relação às alterações histológicas observadas após a exposição ao MeHg, foram especialmente relatadas diminuições significativas do número de neurônios (FARINA *et al.*, 2011).

Danos neurológicos irreversíveis podem ocorrer como ilustrados em Minamata, Niigata e Iraque. Os principais sintomas apresentados foram: parestesia, ataxia, neurastenia, disartria, visão e deficiência auditiva, distúrbios sensoriais, desequilíbrio, espasticidade e tremor, levando posteriormente coma e morte; esses sinais e sintomas foram atribuídos a danos ou perda de neurônios, particularmente no cérebro e cerebelo (YOSHIDA *et al.*, 2016).

Johnson e Atchison (2009) relatam a interação de doença neurodegenerativa com a exposição a metais pesados. Entre eles o mercúrio como componente tóxico ambiental relacionado com o surgimento de esclerose lateral amiotrófica.

Mesmo baixos níveis de exposição ao MeHg produzem uma leve disfunção sensório-motora e tremor. A disfunção sensório-motora é um marcador comportamental primário da exposição prolongada a MeHg de início no adulto. Embora haja evidência de que o MeHg pode afetar os domínios sensoriais e motores, há escassez na literatura sobre os mecanismos envolvidos (SHEN *et al.*, 2016).

1.6 Dietas com alto teor de gordura e calorias

As dietas de alto teor de gorduras e calorias têm contribuído para o aumento da obesidade, que quase dobrou em todo o mundo nos últimos trinta anos e tornou-se uma pandemia (WHO, 2013).

Os índices de obesidade estão aumentando e são especialmente mais observados nos países industrializados, com enfoque especial nos Estados Unidos. As taxas de obesidade para adultos americanos quase dobraram de 13,3% para 32,1% durante os anos 1960 a 2004, enquanto a porcentagem de americanos com sobrepeso durante o mesmo período aumentou de 44,8% para 66% (2006), e o consumo de dietas de alto teor de gordura e calorias parece ser a principal causa desse aumento (PISTELL *et al.*, 2010). Atualmente a obesidade é reconhecida como um problema de saúde mundial e atingiu proporções epidêmicas que afetam os países desenvolvidos e em desenvolvimento. Confirmando-se a persistência dessa tendência, cogita-se que a que a prevalência de obesidade global seja de 18% para homens e de 21% para mulheres em 2025. (DI CESARE *et al.*, 2016).

A obesidade já se tornou um dos principais desafios da saúde pública, devido a estar diretamente ligada a várias comorbidades como doenças cardiovasculares, distúrbios metabólicos e alguns tipos de câncer. Além disso, ela pode estar associada a déficits

cognitivos em humanos, especialmente na memória declarativa que depende do hipocampo (BOITARD *et al.*, 2014).

Além do ganho de peso, a obesidade geralmente está associada a um conjunto de distúrbios coletivamente conhecidos como síndrome metabólica. Sabe-se que a etiologia deste transtorno metabólico ocorre devido a uma interação entre predisposições genéticas e fatores ambientais, que resulta em uma resposta imune e imediata à inflamação de baixo grau que afeta vários tecidos incluindo o fígado, o tecido adiposo e o SNC (LUMENG; SALTIEL, 2011).

Notoriamente, a obesidade está intimamente associada a um padrão de inflamação crônica caracterizada por produção anormal de citocinas, reagentes de fase aguda aumentada e outros mediadores e ativação de uma rede de vias de sinalização inflamatória. De certo, os marcadores inflamatórios se correlacionam fortemente com o grau de obesidade e resistência à insulina e também são preditivos do risco de doença vascular (PISTELL, 2010).

Os modelos de obesidade induzida pela dieta são importantes para desvendar os mecanismos iniciais da obesidade e patologias associadas e são importantes também para esclarecer as diferenças entre as principais dietas como as de alto teor de gordura, alto teor de açúcar, dietas ocidentais e alto teor de colesterol. Vários são os achados patológicos correlacionados com o consumo de dieta ocidental. O aumento da ingestão de ácidos graxos induz a ativação de células imunes e uma resposta inflamatória em muitos órgãos, incluindo tecido adiposo, fígado, pâncreas e músculo. Uma vez o fígado afetado, frequentemente a esteatose é observada devido ao acúmulo de triglicerídeos em hepatócitos e sua função metabólica acaba sendo prejudicada, como no metabolismo de lipídeos, levando a outros transtornos associados à obesidade como: hipertrigliceridemia, aumento da lipoproteína de baixa densidade, colesterol, intolerância à glicose e outros. Tanto a dieta de alto teor de gorduras (com 60% e 45% de Kcal oriundo de lipídeos) e dieta ocidental (40% e 45% de Kcal oriundo de lipídeos) resultaram em aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), levando a potencial neuroinflamação e/ou alterações comportamentais e cognitivas em roedores (GUILLEMONT-LEGRIS e MUCCIOLI, 2017).

O impacto a longo-prazo da obesidade induzida pelas dietas na neuroinflamação apresenta diferentes ações sobre diferentes regiões cerebrais. No hipocampo, alguns marcadores inflamatórios como IL-1 β , IL-6, TNF- α se mostraram elevados. Notoriamente há

aumento da astrogliose na ativação glial e sobre a BHE verifica-se aumento do extravasamento de IgG com o envelhecimento após dieta hipercalórica (60% Kcal da gordura) (GUILLEMONT-LEGRIS e MUCIOLI, 2017).

Tozuka, Wada e Wada (2009) evidenciaram que a prole de matrizes submetidas à uma dieta rica em gordura desenvolveu hiperlipidemia com acúmulo de lipídios peroxidados no soro sanguíneo e no giro denteado do hipocampo durante o período pós-desmame. Ademais, foi observada também uma redução da neurogênese, o que sugere que o estresse oxidativo mediado por lipídios é capaz de reduzir a proliferação neuronal nesta área. Em contrapartida, a diminuição da ingestão dietética em ratos promoveu neurogênese por induzir a sobrevivência e diferenciação de novos neurônios e neste processo o fator neurotrófico derivado cerebral (BDNF) está envolvido (LEE *et al.*, 2000); (LEE, SEROOGY, MATTSON, 2002). Park, Choi, *et al.* (2010) propõem que dietas ricas em gorduras diminuem os níveis de BDNF e aumentam os níveis de malondialdeído (MDA). Este último exerce efeito tóxico sobre células nervosas progenitoras (NPC), no entanto o tratamento com BDNF restaura a atividade destas células. Além disso, eles sugerem que o BDNF possui papel importante no controle do peso, agindo em algumas situações como fator anorexígeno.

Pistell *et al.*, 2010, observaram que camundongos C57BL/6 submetidos à uma dieta rica em gordura, dieta ocidental (41% de gordura) resultou no aumento do peso corporal e da reatividade dos astrócitos, mas não houve prejuízo a cognição (medida através de teste de labirinto *Stone T-maze*), reatividade microglial ou níveis elevados de citocinas. Porém nos animais que receberam dieta com alto teor de gordura (60% de gordura), o peso corporal aumentou e a cognição foi prejudicada, apresentando aumento da inflamação cerebral e diminuição do BDNF. Concluiu-se nesse estudo que embora diferentes formulações de dieta possam aumentar o peso corporal, as dietas com maior teor de gordura são mais propensas para alterar a cognição comportamental e estão associadas à inflamação cerebral.

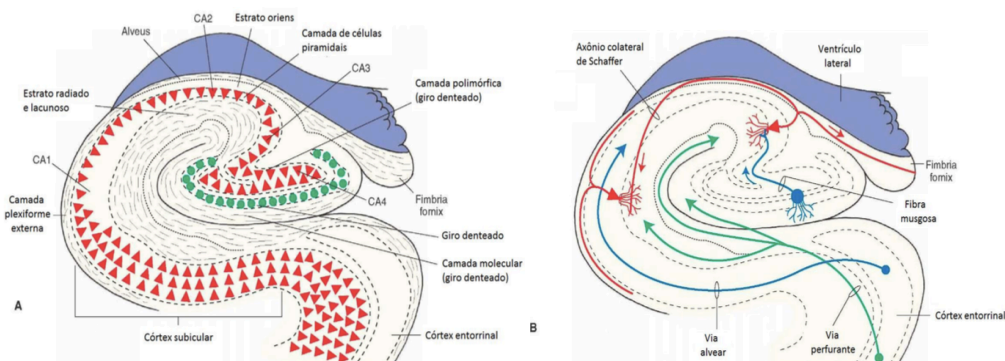
Atualmente, não está claro se os efeitos diferenciais da dieta de alto teor de gordura e dieta ocidental na neuroinflamação são apenas devido à composição diferencial de lipídeos presentes na dieta ou o fato de tê-la em excesso (GUILLEMONT-LEGRIS e MUCIOLI, 2017).

1.7 Hipocampo

O hipocampo é uma região pequena do cérebro que faz parte do sistema límbico e é associado primeiramente com a memória e a navegação espacial. Apresenta-se como uma estrutura bilateral que está representada como uma crista que se estende para o ventrículo lateral. A superfície exterior do hipocampo contém de fibras mielinizadas advindas, de células do hipocampo, e deixam a região através de uma grande via eferente, o fórnix. O envoltório exterior do hipocampo é branco devido ao revestimento de mielina dos axônios. O revestimento externo é o chamado alveus, constituído por fibras aferentes e eferentes que dão origem à fimbria que, por sua vez, é continuada com o fórnix. O hipocampo é dividido em corno de Amon, giro denteado, e subículo. O corno de Amon é subdividido em quatro subcampos: CA (*Cornu ammonis*) 1 a 4. Seguindo da camada exterior para a mais medial, o corno de Amon contém as camadas: alveus, estrato oriens, piramidal, radiado, lacunoso e a camada molecular. O GD é composto de células estreitamente empacotadas chamadas células granulares. Os axônios das células granulares se estendem para as células piramidais da região de CA3, e emitem fibras para a região de CA1, compondo a chamada via colateral de Schaffer (**Figura 6**).

A partir de CA1, as fibras prolongam-se para o complexo subicular e para as camadas profundas do córtex entorrinal. CA1 é a camada que ocupa a maior parte da região superior, e a CA2 a maior parte da região inferior. CA2 representa uma pequena área entre CA1 e CA3. CA4 forma uma zona de transição entre o hipocampo e o GD, contendo um agrupamento de células grandes que preenche o hilo do giro denteado. (ISCASON, 1987; WITTER, 1989).

Figura 6. (A) Ilustração das camadas do hipocampo. (B) Ilustração da via colateral de Schaffer



Fonte: adaptado de <http://what-when-how.com/neuroscience/the-limbic-system-integrative-systems-part-1/>.

O hipocampo vem sendo alvo de estudos relacionados com a aprendizagem e memória por servir como um modelo para o processamento cortical e sua citoarquitetura regular ser relativamente simples. Outra razão para escolha é pelo tamanho e a localização central indicando que ele desempenha um papel importante na função do cérebro total. O aprendizado e memória representam um processo neural comum aos humanos e animais, permitindo que o estudo em animais seja extrapolado em parte para os humanos (KLAUSBERGER; SOMOGYI, 2008).

1.8 Neurogênese do hipocampo

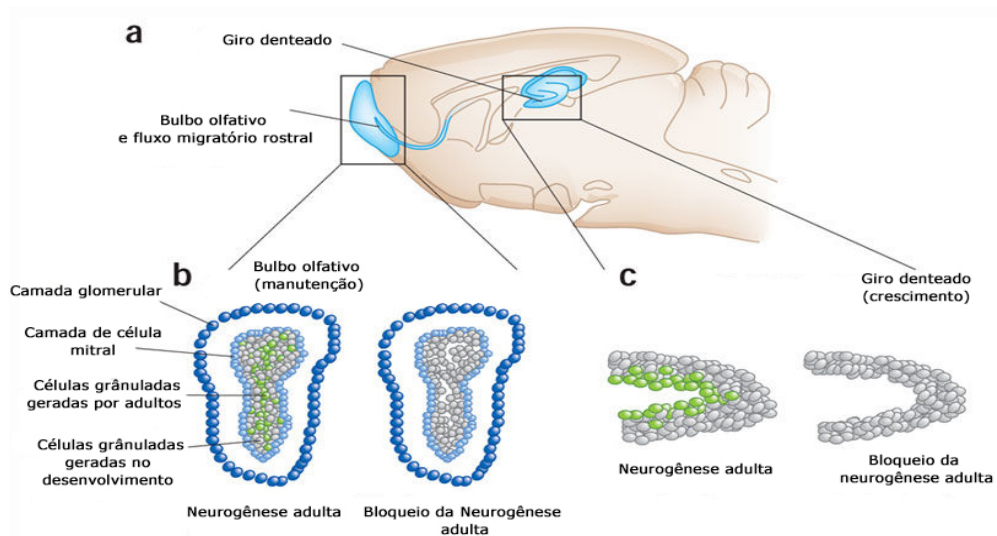
Na região hipocampal o processo de geração de neurônios funcionais ocorre desde o cérebro embrionário até a fase adulta do indivíduo, em que há contínua produção de novas células nervosas para substituição dos neurônios mortos e assim novas sinapses funcionais são estabelecidas. A neurogênese ocorre pelo menos de duas maneiras: proliferação ou sobrevivência neuronal. A proliferação refere-se à multiplicação de neurônios pela atividade de células tronco, enquanto que a sobrevivência diz respeito à quantidade desses neurônios que chegam à maturidade funcional.

Estudos relatam que a proliferação das células no cérebro continua após o nascimento e por toda a vida adulta na zona subventricular (ZSV) dos ventrículos laterais de mamíferos. Lois e Alvarez-Buylla (1994) evidenciaram que existe um grande número de células marcadas com timidina radioativa na região ZSV, quando comparado a outras regiões como córtex e estriado. Os mesmos realizaram estudos *in vitro* e viram que as células da ZSV são capazes de migrar da região de cultura e são também capazes de se diferenciar em

neurônios e glia. Frankland e Miller (2008) relatam que os neurônios gerados continuamente na ZSV dos ventículos laterais podem migrar para o bulbo olfatório, amadurecem e adquirem características de neurônios maduros. A migração de células é um importante mecanismo para substituir as células mortas do bulbo olfatório.

Focos neurogênicos foram identificados no cérebro mamífero adulto, incluindo a zona subgranular (ZSG) do hipocampo. A progênie de células-tronco ZSG migra para a camada celular de grânulos (GCL) do giro denteado (GD) e integram-se a circuitos do hipocampo como neurônios excitatórios maduros (KOZAREVA, 2017). É provável que as células provenientes desta região sejam essenciais não para substituir as células mortas, como ocorre no bulbo olfatório, mas sim para adicionar mais células e conseqüentemente levar ao crescimento do tecido (**Figura 7**).

Figura 7. Formação estrutural diferente da neurogênese no bulbo olfatório e no giro denteado do hipocampo.



Fonte: Adaptada de Frankland e Miller, (2008). No cérebro adulto, a neurogênese persiste em duas regiões: a zona subventricular do ventrículo lateral (novos neurônios migram ao longo do fluxo migratório rostral para preencher o bulbo olfatório) e a região subgranular do hipocampo (os novos neurônios migram a curta distância da zona subgranular à camada granular do giro denteado). (B) Os neurônios gerados no adulto são essenciais para a manutenção do bulbo olfatório. Quando a neurogênese é bloqueada para esse sítio, existe uma depleção extensiva de células granulares no bulbo olfatório. (C) Em contraste, no giro denteado, os neurônios gerados no adulto contribuem para o crescimento do tecido. Quando a neurogênese do hipocampo é bloqueada, o crescimento do giro é atenuado.

Kempermann et al. (2008) relatam que a neurogênese do hipocampo adulto é implicada na aprendizagem e memória, bem como desempenha um papel no humor (BALU e LUCKI, 2009, O'LEARY e CRYAN, 2014). A neurogênese do hipocampo pode ser comprometida negativamente por fatores como idade, estresse e depressão (CAMERON, MCKAY,1999); (KUHN, DICKINSON-ANSON, GAGE,1996); (WALTER, KEINER, WITTE *et al.*,2011); (WARNER-SCHMIDT, DUMAN,2006); (MARLATT e LUCASSEN, 2010; SPALDING *et al.*, 2013) e melhorada pela atividade física, estímulo ambiental e fatores de crescimento (KEMPERMANN, KUHN, GAGE,1997); (OLSON, EADIE, ERNST *et al.*, 2006); (VAN, SCHINDER, CHRISTIE *et al.*, 2002).

2 JUSTIFICATIVA

Os estudos sobre dietas de alto teor de calorias e suas implicações têm se tornado cada vez mais frequentes. No Brasil, segundo o último levantamento do Ministério da Saúde, os números de sobrepeso na população brasileira, passaram de 42,7 %, em 2006, para 48,5%, em 2011. Outro fator preocupante é a exposição da população ao MeHg. Recentemente um acidente ocorrido em 2015, devido ao rompimento de uma barragem em Mariana-MG, trouxe a tona os riscos que a contaminação por esse metal pode provocar na saúde humana, como dislipidemias e alterações neurológicas. Estudos recentes mostraram que a exposição ao MeHg pode se tornar crônica, podendo levar a perda de memória, distúrbios motores e riscos para doenças cardiovasculares (CHANG et al., 2008).

Este estudo propõe investigar a associação de uma dieta ocidental e intoxicação por MeHg nas alterações morfológicas e de estresse oxidativo no hipocampo. Antes da realização do presente trabalho, nenhum outro estudo foi encontrado, avaliando as consequências dessa associação nessa região do SNC.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo pretende avaliar o efeito de uma dieta ocidental associada ou não à intoxicação crônica por MeHg no ganho de peso corporal, parâmetros níveis séricos de marcadores lipídicos, alterações morfológicas e de estresse oxidativo no hipocampo de camundongos C57BL/6J após desmame.

3.2 Objetivos Específicos

- Monitorar o ganho de peso corporal de camundongos C57BL6/J submetidos à dieta ocidental e/ou expostos à intoxicação mercurial.
- Avaliar os níveis séricos de triglicérides e colesterol total e dosagem de nível de MeHg no pelo de camundongos C57BL6/J submetidos à dieta ocidental e/ou expostos à intoxicação mercurial.
- Avaliar se a dieta ocidental aumenta a intoxicação mercurial, elevando os níveis de Hg no pelo dos animais expostos com MeHg.
- Analisar através do método de estereologia as principais alterações de volume do hipocampo e suas camadas em camundongos C57BL6/J submetidos à dieta ocidental e/ou expostos à intoxicação mercurial.
- Avaliar alterações de estresse oxidativo (níveis de glutaniona, GSH e glutationala peroxidase, GPx) no hipocampo de camundongos C57BL6/J, após intoxicação mercurial e/ou dieta ocidental.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6J, após desmame, com idade de 21 dias e peso entre 8-10 gramas. Os mesmos foram provenientes do biotério de produção do Núcleo de Biologia Experimental (Nubex), da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) e mantidos sob rigoroso controle sanitário. Esses animais foram mantidos em microisoladores em racks com sistema automático de ventilação, filtragem do ar e controle de luz, com livre acesso a ração e água. Os mesmos permaneceram em temperatura controlada de 21°C. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Cuidado Animal da Universidade de Fortaleza, com parecer de nº 015/2015 (**Anexo**).

Os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais de acordo com a idade, tipo de dieta e exposição ao MeHg (normonutrido, recebendo dieta padrão e hiperlipídica, recebendo dieta ocidental, com ou sem exposição de MeHg) (**Tabela 2**).

Tabela 2. Desenho experimental e grupos planejados.

	Dieta	Dieta	Dieta	Dieta
Grupos Experimentais (n=5)	Ração comercial padrão	Ocidental	Ração comercial padrão	Ocidental
	Normonutrido (N)	Hiperlipídico (H)	Normonutrido + MeHg (NHg)	Hiperlipídico + MeHg (HHg)
Idade Pós-natal (em dias)	21-61	21-61	21-61	21-61

Para o grupo normonutrido foi ofertada dieta padrão comercial para roedores (*Presence Labina*[®]), já para o grupo hiperlipídico foi ofertada uma dieta composta de 42% de lipídeos, quanto ao terceiro grupo normonutrido + MeHg foi ofertada dieta comercial padrão para roedores e os animais deste grupo foram expostos à intoxicação através de MeHg e o quarto e último grupo hiperlipídico + MeHg foi submetido à dieta ocidental e exposto ao MeHg. Todos os grupos receberam água e ração *ad libitum* por 40 dias.

4.2 Equipamentos e materiais

Durante todo o protocolo experimental, foram utilizados instrumentos e aparelhos listados abaixo:

- Balança digital eletrônica para pesagem de animais – Filizola;
- Balança analítica precisa (Eletronic Balance FA-2104N);
- Centrífuga refrigerada para tubos Sigma 1-14k – Uniscience;
- Criostato (Leica CM 1850);
- Espectrofotômetro UV-Visible (Shimadzu UV-260, Shimadzu Corp, Tóquio, Japão);
- Espectrofotômetro de absorção atômica (DMA-80, da Milestone Sel - Itália);
- Tubos Eppendorfs;
- Tubos Falcons;
- Geladeira e freezer Thermo Scientific (-80°C);
- Instrumental cirúrgico;
- Microscópio Nikon Eclipse;
- Ponteiras para pipetas;
- Seringas (B-D Plastipak);
- Tubos de polipropileno para centrífuga;
- Vidraria: béqueres, pipetas manuais e tubos de ensaio;
- Vórtex Maxi Mix II Thermolyne tipe 37600 mixer;
- Luvas de nitrila;
- Máscara e óculos de proteção individual 3M contra risco biológico;
- Espectrômetro de absorção atômica DMA-80;
- Tubos para coleta de sangue sem EDTA;
- Microisoladores (Alesco, Monte Mor – São Paulo, Brasil);
- Microscópio confocal;
- Paquímetro digital (nove 54 ferramentas);
- Placas de petri.

4.3 Drogas, reagents e soluções

- Cloreto de metilmercúrio (Sigma-Aldrich, Brasil);
- Soro Fisiológico;
- Cetamina (Kensol[®] König);
- Xilazina (Vetanarcol[®] König);
- Paraformaldeído 4%;
- Sacarose a 30%;
- Solução de Karnovsky;
- Tissui-Tek O.C.T. composto, (Sakura);
- PBS (tampão fosfato salino);
- Kit Labstest[®] para dosagem de colesterol;
- Kit Labstest[®] para dosagem de triglicerídeos.
- EDTA 0,02M
- DTNB 0,01M
- Tampão Fosfato 0,1M

4.4 Indução da hiperlipidemia

Para indução da hiperlipidemia, os animais foram submetidos à alimentação exclusiva com dieta ocidental (42% de lipídeos), otimizada de gordura com 0,15% de colesterol (0,15 g/100g da dieta). A mesma foi preparada no Laboratório de Bioquímica Nutricional, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil. A dieta rica em gordura foi preparada de acordo com os padrões da Associação de Químicos Analíticos Oficiais. Os macronutrientes da dieta ocidental foram pesados e misturados homogeneamente para formar uma massa, em seguida a dieta foi armazenada separadamente em uma geladeira (4°C) em caixas de plástico hermeticamente fechadas. A dieta (em g/100g) foi composta de sacarose (34,15g), caseína (19,5g), amido de milho (15,0g), matéria seca do leite anidro (21,0g), celulose (5,0g), mistura mineral (3,5g), mistura de vitaminas (1,0g), carbonato de cálcio (0,4g), metionina (0,3g), etoxiquina (0,005g) e colesterol (0,15g) (REZENDE *et al.*, 2011).

4.5 Intoxicação dos animais

Os grupos que foram intoxicados com MeHg receberam diariamente uma solução de cloreto de MeHg na água de beber (20 mg/L) (ANDERSEN e ANDERSEN, 1993) durante o período pós-natal de PN41 até PN61. Os animais apresentaram um consumo médio de água de aproximadamente 6 ml/dia, considerando que cada animal atingiu o peso de 25 a 30g ao final do experimento, chegamos ao consumo total de 84 mg/Kg ou 4 mg/Kg/dia .

Ao final do protocolo, os animais foram submetidos à eutanásia com overdose de cetamina/xilazina, em seguida foi realizada a coleta das amostras. Os animais foram sacrificados ao completar 40 dias de dieta (61 dias de vida pós-natal). As amostras destinadas para realização de técnicas de biologia molecular foram imediatamente acondicionadas em nitrogênio líquido. A coleta de sangue (sem anticoagulante) foi feita por punção transcardíaca para obtenção de soro. O soro foi obtido a partir de centrifugação do sangue total coagulado a 8.000 Rpm por 5min a 4°C. Foi feita coleta dos pelos dos animais, com material plástico na região dorsal do animal após o sacrifício. Outros animais foram perfundidos com solução de Karnovsky por via transcardíaca e o hipocampo foi dissecado em placa de gelo e processado para análises estereológicas (LADD *et al.*, 2010).

4.6 Manejo e descarte de material contaminado com MeHg

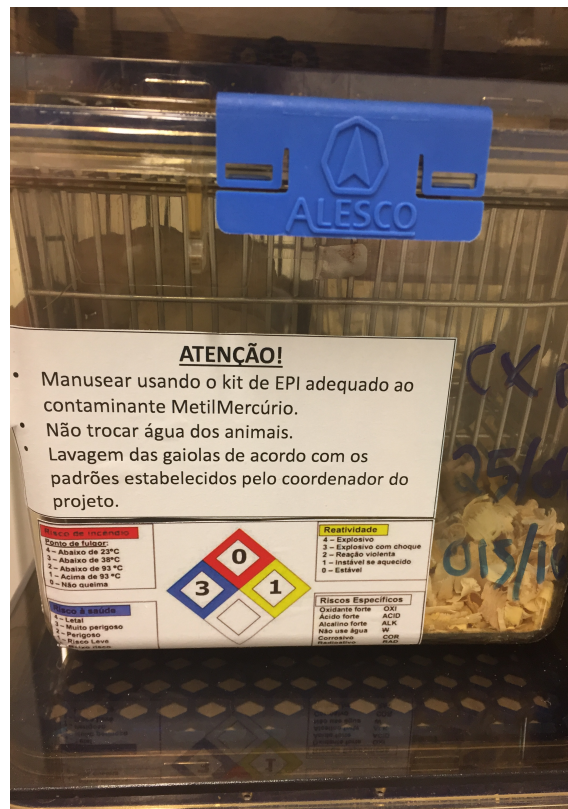
Os animais expostos ao cloreto de MeHg permaneceram por todo tempo em microisoladores com suas devidas mamadeiras separadas para esse fim. Os microisoladores foram devidamente identificados com adesivos contendo o símbolo de material contaminante e risco biológico (**Figura 8**) e o diagrama de Hommel (**Figura 9**).

Figura 8. Microisolador apresentando adesivo com símbolo de material com risco biológico.



Fonte: Própria.

Figura 9. Microisolador apresentando adesivo com símbolo do diagrama de Hommel.



Fonte: Própria.

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

Os microisoladores contaminados foram limpos em água corrente por técnicos treinados portando os EPIs necessários.

O descarte da maravalha contaminada foi feito em saco com a identificação de risco biológico e enviada para incineração, visto que parte pequena do MeHg é excretada pela urina e fezes.

O descarte das carcaças dos animais foi feito envolvendo-as em papel alumínio e colocando-as em sacos com identificação de risco biológico, sendo enviadas para empresa especializada para tratamento do material contaminado (incineração). Até o envio, as carcaças em saco plástico com identificação de risco biológico foram armazenadas em freezer para esse fim.

O preparo da solução de MeHg foi realizada em cabine de segurança com exaustor. 20mg de cloreto de MeHg foram diluídos por litro de água comum filtrada para administração aos animais. O produto foi pesado em balança analítica dentro da cabine de biossegurança. A solução de cloreto de MeHg (20 mg/L) foi armazenada em container com tampa de fluoropolímero. O MeHg foi pesado em balança analítica utilizando papel de filtro.

A administração da solução de MeHg em mamadeiras envolvidas com papel alumínio foi feita para os animais no PN41 ao PN 61, *ad libitum*. A troca da solução de MeHg foi feita semanalmente.

A água contaminada residual das mamadeiras foi armazenada em recipientes de plástico, identificados com o diagrama de Hommel e o símbolo de risco biológico e armazenados protegidos em lugar reservado e de acesso controlado (UNIFESP, 2017).

4.7 Análise Ponderal

Os animais foram pesados em dias alternados com intervalo de 48h, sempre no período da manhã, durante o protocolo experimental de 40 dias, sendo ao total 14 dias de pesagem. Ao final foi calculado um delta de peso em (g) que consiste na diferença entre o peso final e o peso inicial.

4.8 Dosagem de Metilmercúrio

A quantificação do MeHg presente nos animais foi feita através de análise dos pelos dos mesmos. Para obtenção dos pelos, foi feita tricotomia da região lombar dos animais através do uso de lâmina de bisturi. Cuidadosamente utilizando uma pinça, o material foi obtido e armazenado em recipientes de vidro de borosilicato, cor âmbar, com tampas contendo batoques feitos a partir de depolitetrafluorretileno, garantindo a não evaporação do produto (EPA, 2001). Os frascos foram sinalizados com uma etiqueta azul contendo as precauções e cuidados com o contato da pele, olhos, roupas e inalação, bem como instruções sobre a ventilação adequada (EPA, 2001; KASPER *et al.*, 2014).

Após a coleta do material e armazenagem, o material foi enviado para o departamento de química da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, para ser submetido ao método de espectrofotometria de absorção atômica. As vidrarias utilizadas nos procedimentos analíticos foram previamente mantidas em solução de HNO₃ 10%, por 24 h, KMnO₄ em solução H₂SO₄ e NH₂OH HCl a 10%, lavados com água corrente, e posteriormente lavados com água destilada e deionizada em sistema Milli-Q e secos em estufa a temperatura de 50°C.

As determinações de Hg total nas amostras foram realizadas de acordo com o método analítico proposto por Akagi, Malm e Branches (1996), sendo descrito resumidamente a seguir: amostras foram pesadas e acondicionadas em frascos de digestão de aproximadamente 50 mL. Em seguida, foram adicionados 2 mL de HNO₃ + HClO₄ (1:1), 5 mL de H₂SO₄, 1 mL de H₂O deionizada. Após agitação, os frascos de digestão foram levados à chapa aquecedora a temperatura de 220°C durante 20 minutos. Em seguida, as soluções foram resfriadas a temperatura ambiente, transferidas para balão volumétrico de 50 mL, aferidas e homogeneizadas com água. Na realização das análises foram utilizados reagentes da marca Merck. As determinações de Hg²⁺ nas amostras foram feitas por espectrofotometria

de absorção atômica com sistema de geração de vapor a frio, utilizando-se analisador direto de mercúrio (MASCARENHAS *et al.*, 2004).

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM), sendo comparados os valores de concentração de mercúrio dos animais expostos ao dos animais controles (não intoxicados).

4.9 Análise de lipídios séricos (colesterol total e triglicérides)

Amostras de sangue foram coletadas por via transcardíaca e alocadas em tubos Eppendorf para obtenção de soro.

Os níveis de colesterol total e triglicérides séricos foram determinados por analisador semi-automático (LabQuest, Labtest, Brasil), utilizando kits de diagnóstico (Labtest[®], Brasil).

4.10 Análise estereológicas

4.10.1 Perfusão transcardíaca da solução fixadora

Com o animal devidamente anestesiado, foi feita uma incisão na cavidade torácica. Uma agulha de insulina, fixada na ponta de um fragmento de mangueira de um equipo foi introduzida no ventrículo esquerdo. Uma pequena incisão foi feita no átrio direito (para drenagem do sangue e excesso de solução fixadora). Em seguida fez-se perfusão de aproximadamente 10 mL de solução fisiológica 0,9% de NaCl, com auxílio de uma seringa de mesmo volume que foi instalada na outra ponta do fragmento da mangueira. Este procedimento tem como objetivo a remoção do máximo de sangue do corpo do animal. Posteriormente foi realizada perfusão de aproximadamente 10 mL de solução fixadora de Palay (contendo 1% de formaldeído e 1% de glutaraldeído em tampão de fosfato 0,12 M e pH 7,2) (ANDRADE; MADEIRA; PAULA-BARBOSA, 1995). Após a perfusão, o hipocampo foi imediatamente dissecado, estabilizado manualmente ao longo do eixo septotemporal (diminuir a curvatura anatômica do órgão), e acondicionado em recipiente contendo a mesma solução fixadora (CHEN *et al.*, 2008).

4.10.2 Microtomia, coloração e preparo das lâminas

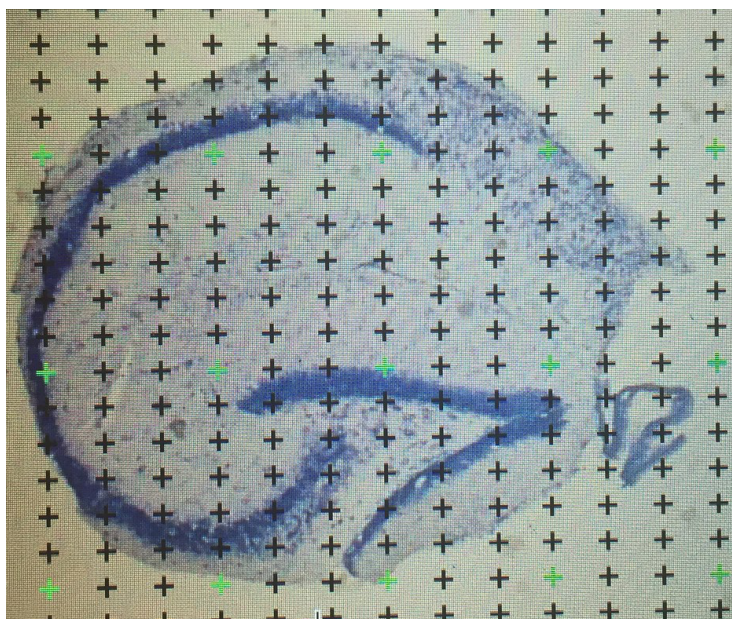
As metades de cada amostra de hipocampo (ou seja, os hemi-hipocampos) foram selecionados para o preparo dos cortes aleatoriamente, sem distinção entre direito e esquerdo. Subsequentemente as amostras foram criopreservadas em sacarose 30% embebidas em tissue tek e sequencialmente cortadas em secções de 30 µm de espessura. Foi utilizado para este procedimento um aparelho de criostato (**Figura 10**). Os cortes foram ortogonais ao eixo longitudinal do hipocampo e uma fração média de (1/30). As secções finas foram recolhidas em lâminas de vidro, coradas com uma solução alcóolica a 1% de azul de toluidina, desidratadas em concentrações progressivas de etanol, montadas com lamínula e DPX (Fluka, Buchs, Suíça), e utilizadas para padronizar a posição exata (HOSSEINI-SHARIFABAD; NYENGAARD, 2007) e para estimativa do volume do hipocampo fixado e das camadas CA1, CA2/CA3, CA4, GD, e volume total do hipocampo utilizando o princípio de Cavalieri (**Figura 11**). É representado pela fórmula: $V = \Sigma P \times (a/p) \times t \times k$, onde V (volme), ΣP (somatório de pontos), a/p (área por pontos), t (epsessura do corte) e k (secção).

Figura 10. Criostato utilizado para obtenção dos cortes de 30 µm de espessura do hipocampo.



Fonte: própria.

Figura 11. Sistema de pontos em cruz utilizado para delimitar área das camadas do hipocampo e posterior análise do volume das mesmas através do princípio de Cavalieri.

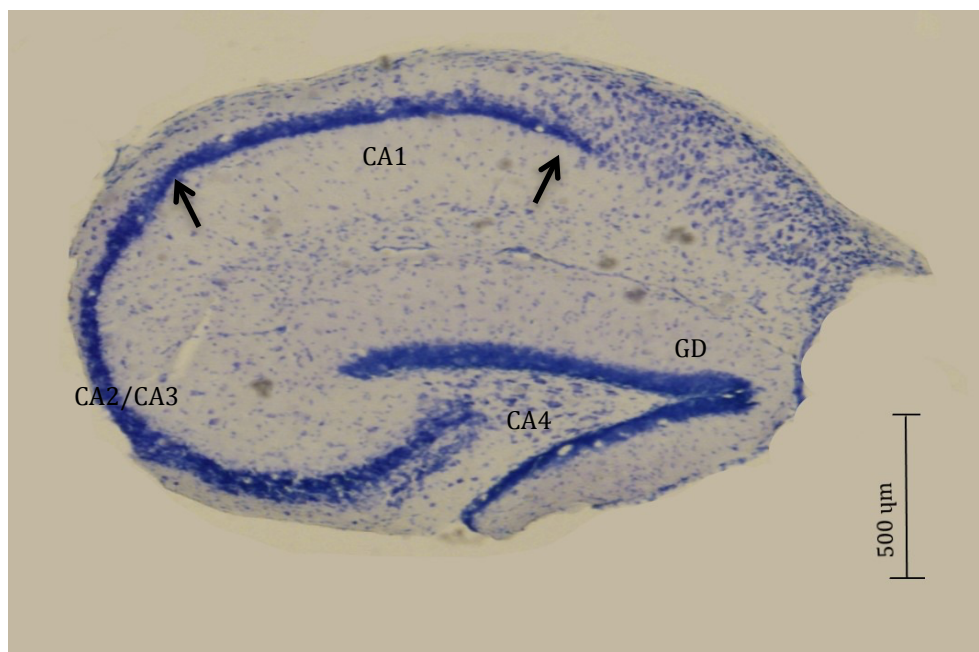


Fonte: Própria.

Neste estudo, toda a estrutura do hipocampo, incluindo camada de células granulares do giro dentado e a camada de células piramidais de CA1, CA2/CA3 e CA4 (**Figura 12**), foram definidas em todos os níveis do corte de acordo com as coordenadas estereotáxicas publicadas anteriormente (PAXINOS; FRANKLIN, 2004).

Foi adotado como validação das médias dos volumes das camadas do hipocampo o coeficiente de erro, calculado pela fórmula: $CE (\Sigma P) = \sqrt{\text{Total variance}/\Sigma P}$ e aceito para variações de até 15%. Nos achados do presente estudo encontrou-se os valores médios de coeficiente de erro por grupo nas medidas de: CA1 [N(2%), H(2%), NHg (3%) e HHg (3,2%)], CA2/CA3 [N(2%), H(2%), NHg (3%) e HHg (3,2%)], CA4 [N(2%), H(2%), NHg (3%) e HHg (3,4%)], GD [N(2%), H(2%), NHg (3%) e HHg (3,2%)] e volume total do hipocampo [N(1%), H(1%), NHg (1,4%) e HHg (1,%)].

Figura 12. Secção coronal de hipocampo mostrando toda a estrutura do órgão em camadas. As pontas de seta indicam os limites da camada CA1. Devido às pequenas dimensões da camada CA2, esta foi incluída na camada piramidal CA3, nomeada CA3/CA2. (Corado com azul de toluidina. Barra de escala: 500 μm).



Fonte Própria.

4.11 Avaliação do estresse oxidativo em amostras de hipocampo

Para a avaliação da glutathione (GSH), os teores foram medidos como grupo total de sulfidrilo não proteico (NPSH), utilizando o método de Moron *et al.* (1979). Rapidamente, as proteínas foram precipitadas com 25% de TCA, centrifugadas e o sobrenadante foi recolhido, o qual foi misturado com solução salina tampão de fosfato de sódio 0,2 M (PH 8,0), DTNB 0,06 mM e incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente, em solução tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,4) na proporção de 10%. A absorvância das amostras foi lida contra o branco a 412 nm em um espectrofotômetro e a concentração de GSH foi calculada a partir de uma curva padrão (VISWANADH, 2010).

Para avaliação da glutathione peroxidase (GPx) os hipocampus foram pesados e homogeneizados em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,4) na proporção de 10%. O homogenato foi centrifugado a 1200 rpm, por 15 minutos, 4 °C. Depois da centrifugação, 100 μL do sobrenadante foi adicionado a 150 μL do *cocktail* (Glutathione redutase (1U): 50 μL ; GSH: 0,0768g, NADPH: 0,0167g e peróxido de hidrogênio H_2O_2 0,4%, diluídos em 25 mL de tampão fosfato de potássio) em placa de 96 poços. A placa foi lida em leitor de microplacas

por 10 minutos, em intervalos de 1 minuto e em comprimento de onda de 365 nm (YOSHIKAWA *et al.*, 1993). A área sobre a curva dos valores das absorvâncias, nos intervalos de tempo de 1 minuto foi calculada e dividida pelo coeficiente de extinção do NADPH = $6,22 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ e multiplicado por 1000. Os resultados obtidos foram expressos em μmol de glutathiona peroxidase, pelo tempo, por miligrama de proteína ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína). A dosagem de proteína nas amostras foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951).

4.12 Análise estatística

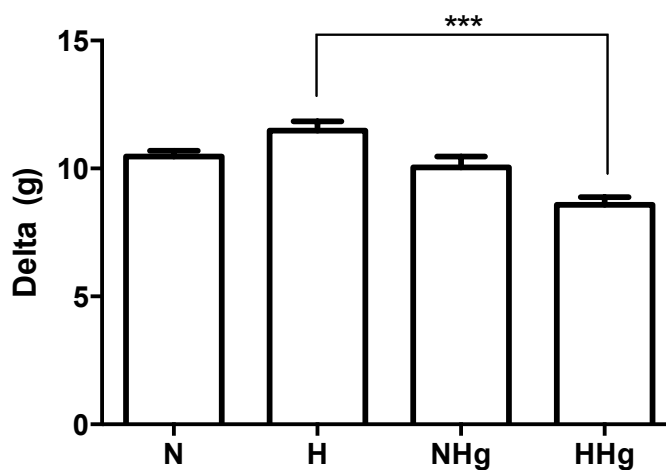
Os resultados foram mostrados como média \pm erro padrão da média (EPM). O teste de variância ANOVA seguido pela correção por Bonferroni foi utilizado para comparar os grupos. O valor de $p < 0,05$ foi usado para indicar diferenças significativas. Para construção dos gráficos e análise estatística foi utilizado o programa Graph Pad Prism (GraphPad Prism 5 Software, San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação ponderal dos grupos experimentais

Os animais que receberam a dieta ocidental por 40 dias e foram expostos ao MeHg (grupo HHg) apresentaram redução significativa ($p < 0,001$) do delta de ganho de peso (g) ($9,83 \pm 0,36$ g) quando comparado com o grupo H ($11,85 \pm 0,25$ g). Não houve diferença significativa no delta de ganho de peso entre os grupos N e NHg ($10,0 \pm 0,36$ g) (**Figura 13**).

Figura 13. Efeito da administração de dieta ocidental e exposição ao MeHg sobre o delta de ganho de peso corporal (peso final - peso inicial) de camundongos C57BL/6J.

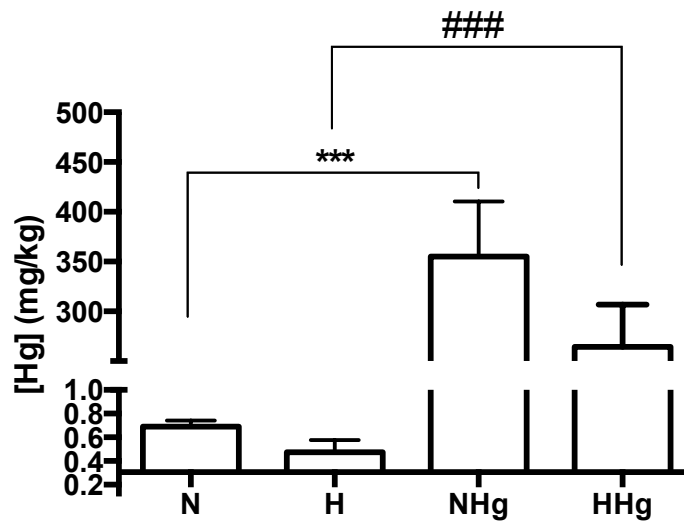


Os valores foram expressos pela média \pm EPM de 7 animais em cada grupo (ANOVA, Bonferroni). *** $p < 0,001$ entre os grupos H e HHg.

5.2 Concentração de mercúrio no pelo dos grupos experimentais

A exposição crônica ao MeHg nos animais durante um período 20 dias resultou em aumento significativo nos níveis de Hg no pelo, alcançando $(355 \pm 110,8 \text{ mg/Kg})$ no grupo NHg e $264,5 \pm 84,96 \text{ mg/Kg}$ no grup HHg ($p < 0,001$), quando comparado com os grupos não intoxicados, grupo N ($0,66 \pm 0,06 \text{ mg/Kg}$) e grupo H ($0,38 \pm 0,09 \text{ mg/Kg}$). Não houve diferença significativa na dosagem de Hg no pelo entre os dois grupos de animais intoxicados ($p > 0,05$) (**Figura 14**).

Figura 14. Análise da concentração de mercúrio por kg de pelo de camundongos C57BL/6J.

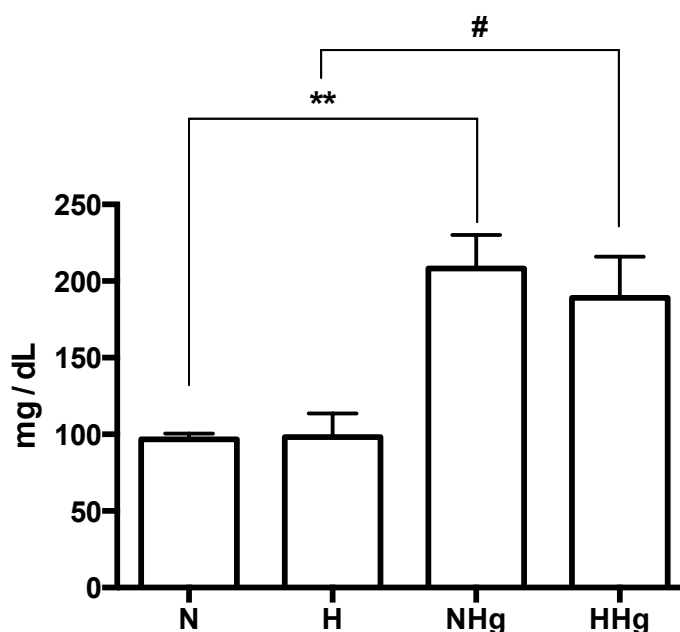


Os valores foram expressos pela média \pm EPM de 5 animais em cada grupo.*** $p < 0,001$ indica aumento significativo em relação ao grupo H e N (ANOVA, Bonferroni).

5.3 Dosagem dos níveis séricos de colesterol total

No grupo normonutrido, a exposição crônica do MeHg na água de beber por 20 dias causou o aumento significativo dos níveis de colesterol total sérico, grupo N ($96,8 \pm 3,72$ mg/dL) vs grupo NHg ($173,2 \pm 16,73$ mg/dL) ($p < 0,01$). Da mesma forma, no grupo que recebeu a dieta ocidental, a exposição crônica do MeHg na água de beber por 20 dias causou o aumento significativo dos níveis de colesterol total sérico, grupo H ($98,20 \pm 15,23$) vs HHg ($189,0 \pm 26,96$ mg/dL), $p < 0,05$. Não houve diferença significativa nas concentrações séricas de colesterol total entre os dois grupos de animais intoxicados ($p > 0,05$) (**Figura 15**).

Figura 15. Impacto da administração de dieta ocidental e exposição ao MeHg sobre a concentração de colesterol total sérico (mg/dL) em camundongos C57BL/6J.

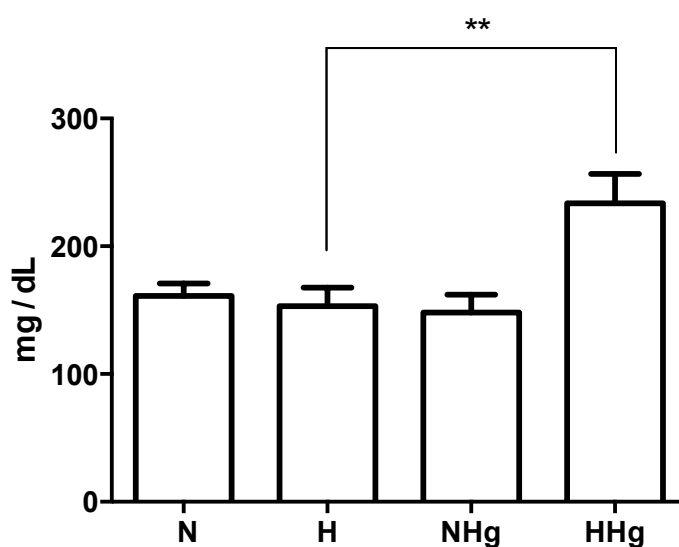


Os valores foram expressos pela média \pm EPM de 5 animais em cada grupo. ** $p < 0,01$ entre o NHg e N, # $p < 0,05$ entre os grupos HHg e H (ANOVA, Bonferroni).

5.4 Dosagem de triglicerídeos

Foi observado aumento significativo dos valores médios de triglicerídeos do grupo HHg ($233,6 \pm 23,09$ mg/dL) em comparação aos demais grupos ($p < 0,01$). Não houve diferença estatística entre os grupos N ($161,0 \pm 9,99$ mg/dL), grupo H ($153,2 \pm 14,47$ mg/dL), e NHg ($148,0 \pm 14,14$ mg/dL), respectivamente (**Figura 16**).

Figura 16. Efeito da administração de dieta ocidental e exposição ao MeHg sobre a concentração de triglicerídeos séricos (mg/dL) de camundongos C57BL/6J.

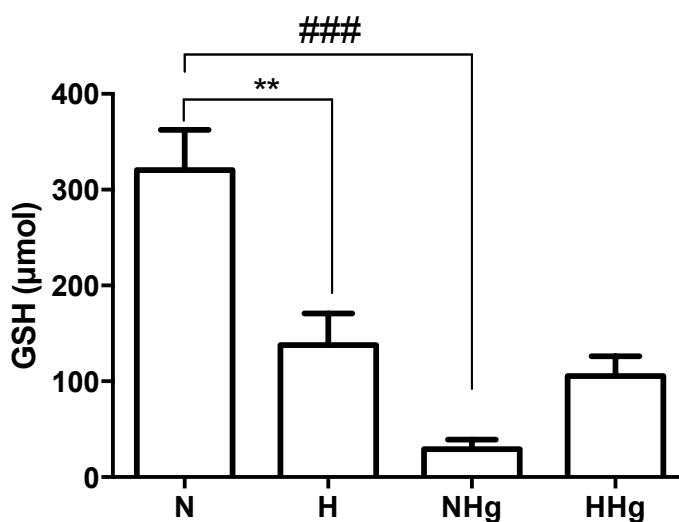


Os valores foram expressos pela média \pm EPM de 5 animais em cada grupo. ** $p < 0,01$ (ANOVA, Bonferroni).

5.5 Dosagem de glutathiona (GSH) no hipocampo

Na análise no hipocampo, evidenciou-se uma diminuição significativa ($p < 0,01$) na concentração de GSH (μmol), como marcador de balanço oxidativo, do grupo H ($112,3 \pm 36,1 \mu\text{mol}$) ($p < 0,01$) e do grupo NHg ($28,69 \pm 10,01 \mu\text{mol}$) ($p < 0,0001$) quando comparado com o grupo N ($320,4 \pm 41,97 \mu\text{mol}$). Não houve diferença estatística significativa entre os níveis de GSH dos grupos H, NHg e HHg ($70,99 \pm 24,21 \mu\text{mol}$) (**Figura 17**).

Figura 17. Avaliação do estresse oxidativo por meio da análise das concentrações de GSH no hipocampo dos camundongos C57BL/6J submetidos à dieta ocidental e/ou intoxicação pelo MeHg.



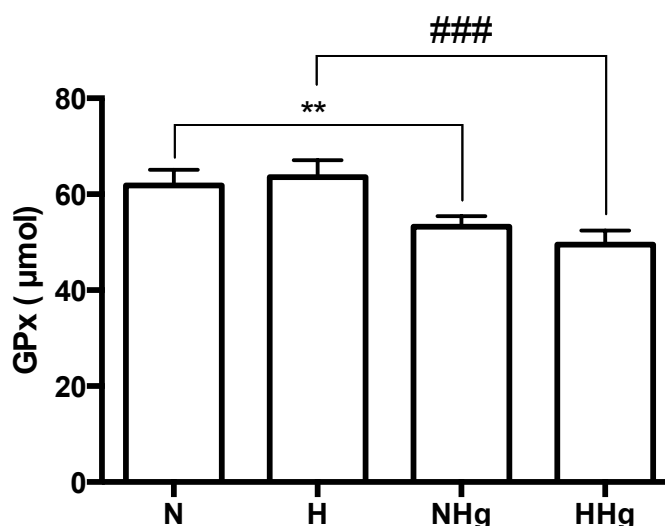
Os valores foram expressos pela média \pm EPM de 5 animais em cada grupo. ** $p < 0,01$ entre os grupos N e H, ### $p < 0,0001$ entre os grupos N e NHg (ANOVA, Bonferroni).

5.6 Dosagem de glutathiona peroxidase (GPx) no hipocampo

A intoxicação por MeHg na água de beber reduziu significativamente as concentrações de GPx no hipocampo, independente da dieta utilizada. Foi evidenciada redução da concentração nos grupos NHg ($53,24 \pm 0,97 \mu\text{mol}$) quando comparado com o grupo N ($63,57 \pm 1,59 \mu\text{mol}$) ($p < 0,01$), e do grupo HHg ($49,48 \pm 1,32 \mu\text{mol}$) quando comparado com o grupo H ($61,82 \pm 1,47 \mu\text{mol}$) ($p < 0,0001$).

Não foi encontrada diferença significativa nas concentrações de GPx no hipocampo entre os grupos N e H (**Figura 18**).

Figura 18. Avaliação do estresse oxidativo por meio da análise das concentrações de GPx no hipocampo dos camundongos C57BL/6J submetidos à dieta ocidental e/ou intoxicação pelo MeHg.



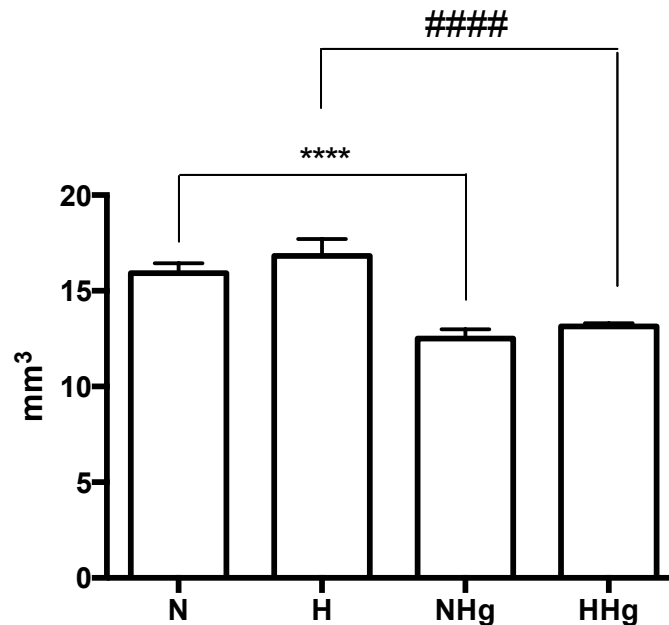
Os valores foram expressos pela média \pm EPM de 5 animais em cada grupo. ** $p < 0,01$ entre os grupos NHg e N, ### $p < 0,0001$ nos grupos HHg e H (ANOVA, Bonferroni).

5.7 Análise estereológica do volume do hipocampo total

A administração da dieta ocidental por 40 dias por si só não alterou o volume total do hipocampo quando comparado com o controle normonutrido ($p > 0,05$).

A intoxicação mercurial crônica (20 dias) determinou redução significativa do volume total no hipocampo independente da dieta ($p < 0,0001$), conforme a seguir NHg ($12,50 \pm 0,21 \text{ mm}^3$) e HHg ($13,14 \pm 0,07 \text{ mm}^3$) quando comparado com os seus respectivos controles, a saber: grupo N ($15,92 \pm 0,23 \text{ mm}^3$) e grupo H ($16,82 \pm 0,39 \text{ mm}^3$). Os grupos NHg e HHg não diferiram em relação ao volume do hipocampo entre si (**Figura 19**).

Figura 19. Análise estereológica do volume total do hipocampo (mm^3) de camundongos C57BL/6J submetidos à dieta ocidental e/ou intoxicação pelo MeHg.

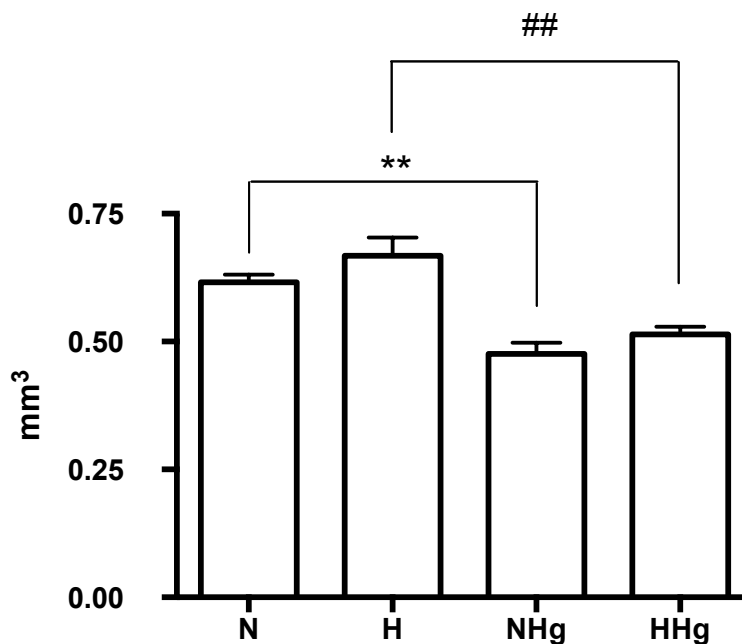


Os valores foram expressos pela média \pm EPM de 5 animais em cada grupo. **** $p < 0,0001$ entre aos grupos NHg e N. #### $p < 0,0001$ entre os grupos HHg e H (ANOVA, Bonferroni).

5.8 Análise estereológica do volume de camada CA1

O volume da camada CA1 do hipocampo apresentou uma redução significativa ($p < 0,01$) no grupo NHg ($0,47 \pm 0,09 \text{ mm}^3$) quando comparado com o grupo N ($0,61 \pm 0,00 \text{ mm}^3$), e do grupo HHg ($0,51 \pm 0,06 \text{ mm}^3$) quando comparado com o grupo H ($0,68 \pm 0,01 \text{ mm}^3$) ($p < 0,01$), evidenciando um efeito neurotóxico de MeHg independente da dieta (**Figura 20**).

Figura 20. Análise estereológica do volume da camada CA1 do hipocampo (mm^3) de camundongos C57BL/6J submetidos à dieta ocidental e/ou intoxicação pelo MeHg.

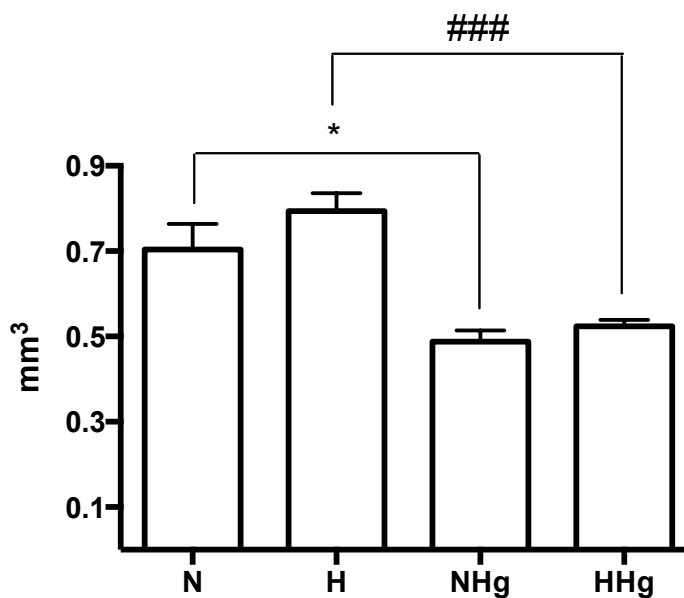


Os valores foram expressos pela média \pm EPM de 5 animais em cada grupo. ** $p < 0,01$ entre os grupos NHg e N. ## $p < 0,01$ entre os grupos HHg e H (ANOVA, Bonferroni).

5.9 Análise estereológica do volume de camada CA2/CA3

A administração da dieta ocidental por 40 dias não alterou de forma significativa o volume das camadas CA2/CA3 do hipocampo ($p > 0,05$). Contudo, a intoxicação pelo MeHg por 20 dias resultou em redução significativa do volume de CA2/CA3 do hipocampo tanto no grupo NHg ($0,48 \pm 0,01 \text{ mm}^3$) quando no grupo HHg ($0,52 \pm 0,01 \text{ mm}^3$) ($p < 0,05$), comparado com seus respectivos controles de dieta, a saber: grupo N ($0,70 \pm 0,02 \text{ mm}^3$) e grupo H ($0,79 \pm 0,01 \text{ mm}^3$) ($p < 0,001$). Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos N e H, novamente corroborando com um efeito neurotóxico do MeHg independente da dieta nesse parâmetro (**Figura 21**).

Figura 21. Análise estereológica do volume das camadas CA2/CA3 do hipocampo (mm^3) de camundongos C57BL/6J submetidos à dieta ocidental e/ou intoxicação pelo MeHg.

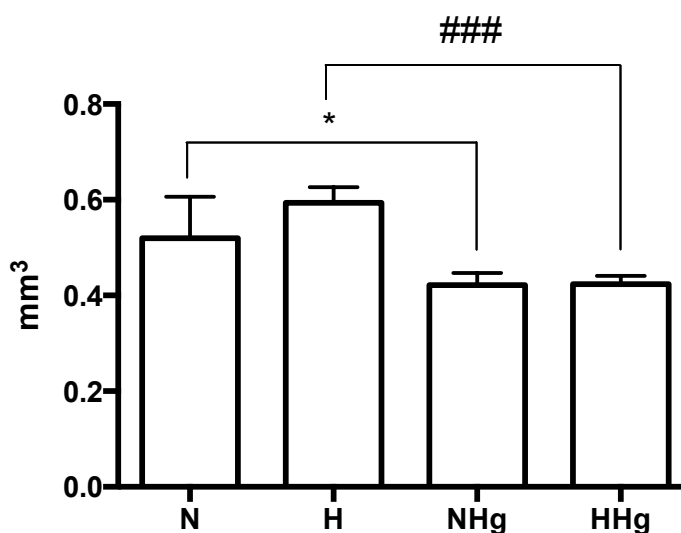


Os valores foram expressos pela média \pm EPM de 5 animais em cada grupo * $p < 0,05$ entre aos grupos NHg e N. ### $p < 0,001$ entre os grupos HHg e H (ANOVA, Bonferroni).

5.10 Análise estereológica do volume de camada CA4

A administração da dieta ocidental por 40 dias não alterou de forma significativa o volume das camadas CA4 do hipocampo ($p > 0,05$). Contudo, a intoxicação pelo MeHg por 20 dias resultou em redução significativa do volume de CA4 do hipocampo tanto no grupo NHg ($0,42 \pm 0,01 \text{ mm}^3$) quanto no grupo HHg ($0,42 \pm 0,00 \text{ mm}^3$), comparado com seus respectivos controles de dieta, a saber: grupo N ($0,52 \pm 0,03 \text{ mm}^3$) ($p < 0,05$) e grupo H ($0,59 \pm 0,01 \text{ mm}^3$) ($p < 0,001$), sendo que não houve diferença significativa entre os grupos N e H (Figura 22).

Figura 22. Análise estereológica do volume da camada CA4 do hipocampo (mm^3) de camundongos C57BL/6J submetidos à dieta ocidental e/ou intoxicação pelo MeHg.

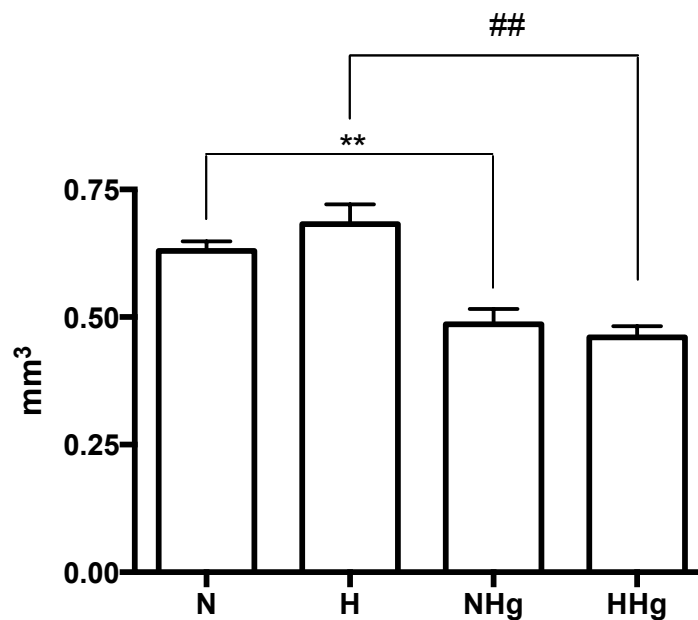


Os valores foram expressos pela média \pm EPM de 5 animais em cada grupo. * $p < 0,05$ entre aos grupos NHg e N. ### $p < 0,001$ entre os grupos HHg e H (ANOVA, Bonferroni).

5.11 Análise estereológica do volume do giro denteado (GD)

Houve uma redução significativa no volume do GD do hipocampo após exposição crônica de MeHg na água de beber por 20 dias no grupo NHg ($0,48 \pm 0,01 \text{ mm}^3$) quando comparado com o grupo N ($0,63 \pm 0,00 \text{ mm}^3$) ($p < 0,01$), e do grupo HHg ($0,46 \pm 0,01 \text{ mm}^3$) quando comparado com o grupo H ($0,68 \pm 0,01 \text{ mm}^3$) ($p < 0,01$). Não foi evidenciada diferença significativa entre os grupos N e H (**Figura 23**).

Figura 23. Análise estereológica do volume do GD do hipocampo (mm^3) de camundongos C57BL/6J submetidos à dieta ocidental e/ou intoxicação pelo MeHg.



Os valores foram expressos pela média \pm EPM de 5 animais em cada grupo. ** $p < 0,01$ entre aos grupos NHg e N. ## $p < 0,01$ entre os grupos HHg e H (ANOVA, Bonferroni).

6 DISCUSSÃO

Esta pesquisa tem como principal inovação avaliar pela primeira vez o efeito combinado de uma dieta ocidental (hiperlipidêmica, por 40 dias, 42% kcal de lipídeos) com a intoxicação pelo metilmercúrio (MeHg) (4mg/kg/dia) por 20 dias na água de beber *ad libitum*, além do efeito isolado desses dois desafios, no hipocampo de camundongo C57BL/6J após o desmame (21 dias de vida pós-natal). Esse estudo passa a ter maior relevância para compreender os efeitos da exposição do MeHg em humanos, exposição esta que pode ter potencialmente ocorrido na região de Mariana/MG, recentemente, o maior desastre ambiental envolvendo contaminação de leito de rios por metais pesados no país, ainda sendo objeto de investigação (ANA, 2016).

Na Região Metropolitana de Fortaleza (RMF)/CE, os aterros sanitários, resíduos odontológicos, combustão de combustíveis fósseis, eliminação de lixo médico e municipal, águas residuais e escoamento urbano estão entre as fontes humanas de poluição por Hg. Como resultado, ostras e sedimentos amostrados em estuários locais (rios Cocó e Ceará) apresentaram maiores concentrações de Hg quando comparados aos estuários rurais ao longo da costa do estado do Ceará (COSTA e LACERDA, 2009). Há uma preocupação com o consumo de peixes na RMF, pois os mesmos também podem ser expostos a maiores concentrações ambientais de Hg.

Lacerda *et al.* (2016) avaliando a contaminação por Hg e o risco associado à saúde humana pelo consumo de peixe comercializado na área costeira de Fortaleza, observou que as concentrações médias de Hg total medidas no músculo de peixes de espécies comercializadas no mercado de Fortaleza, CE, Brasil variaram de 14 a 509 ng/g de peso úmido. As menores concentrações ocorreram em pequenos peixes onívoros e as maiores em grandes espécies de carnívoros, especialmente tubarões. Os maiores indivíduos (> 110 cm de comprimento) da espécie *Piscívora scomberomorus cavalla* mostraram concentrações de Hg de até 1.737 ng/g, embora a concentração média para esta espécie tenha sido muito menor (352 ng/g). Portanto, Os peixes maiores (ex: cavala) apresentaram concentrações de Hg acima dos limites legais para consumo humano, sugerindo risco para a população.

Neste estudo, os grupos que foram expostos ao metilmercúrio (MeHg) (dose de 20mg/L na água de beber, com estimado consumo de 4mg/kg/dia) apresentaram concentrações significativamente elevadas de mercúrio no pelo, confirmando que

administração de MeHg na água de beber induz intoxicação crônica nesses animais. Os valores de $1\mu\text{g/g}$ de cabelo em populações dos Estados Unidos foi relacionado à presença de alterações cognitivas e comportamentais, sendo o equivalente ao consumo de $0,1\mu\text{g/kg/dia}$ (Toxicological Effect of Methylmercury, 2000).

Foram observadas alterações no delta de ganho de peso corporal, sendo significativas entre os grupos hiperlipídico intoxicado (HHg) e hiperlipídico (H), indicando que a intoxicação mercurial teve um efeito redutor no ganho de peso apenas no grupo hiperlipídico.

Elahy *et al.* (2015) utilizaram dieta ocidental enriquecida com ácidos graxos saturados em camundongos C57BL/6J, com 6 semanas de idade, por um período de 10 semanas, com padrões lipídicos semelhantes à dieta usada em nosso trabalho, e não encontrou diferença estatística no peso final dos animais quando comparados com o controle (dieta com baixo teor de gordura).

Cai *et al.* (2016), quando analisaram o efeito de dois modelos de dietas (12,5% e 40% de gordura, respectivamente) em ratos *Sprague-Dawley*, com idade de 7 semanas, com o objetivo de determinar se hiperglicemia e hiperlipidemia poderiam causar estresse no retículo endoplasmático (ERS) no hipocampo reduzindo os níveis de proteínas relacionadas com a plasticidade neuronal, especificamente o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e a sinaptofisina (SYN), evidenciaram que o grupo que consumiu dieta com alto teor de gordura aumentou de peso significativamente em relação ao grupo com dieta com baixo teor de gordura, utilizando-se porém protocolo de 8 semanas de intervenção.

Da mesma forma, Carlin *et al.* (2016) utilizaram modelo de *Western Diet* (17% de proteína e 41% de gordura) para camundongos C57BL/6J, de 9 semanas de idade, e encontraram aumento de peso significativo após 8 semanas de protocolo em relação ao grupo controle (com 13% de gordura), o que também foi observado no presente estudo, apesar do tempo de dieta ser menor (40 dias/~ 6 semanas).

Quanto à intoxicação por MeHg, tem sido demonstrada na literatura uma redução do peso corporal dos animais intoxicados com esse agente. Corte *et al.* (2013) investigaram a eficácia do disselenido de difenilo [(PhSe)₂] na atenuação da toxicidade induzida pelo MeHg em ratos machos *Wistar*, com peso entre 250-310g e com idade entre 3 e 3,5 meses. Os animais foram tratados com MeHg [5mg/kg/dia , intragastricamente (i.g.)] e/ou (PhSe₂)

[1mg/kg/dia, intraperitonealmente (i.p.)] durante 21 dias. O ganho de peso corporal e os déficits motores foram avaliados antes do tratamento, e nos dias 11 e 21 de tratamento. O cotratamento com (PhSe)₂ aumentou a acumulação de Hg no fígado (50,5%) e no cérebro (49,4%), e aumentou os déficits motores induzidos por MeHg e a perda de peso corporal da segunda semana até o final do tratamento em comparação com o grupo controle. Esses resultados indicam que (PhSe)₂ pode aumentar a carga corporal de Hg, bem como os efeitos neurotóxicos induzidos por MeHg em ratos, porém essa perda não é vista em todos os trabalhos.

Quanto aos valores de colesterol total sérico, foi observado que os grupos expostos ao MeHg apresentaram aumento significativo quando comparado com os controles, efeito esse independente da dieta. Esse resultado é relevante, corroborando com achados na literatura sugerindo que a exposição crônica com o MeHg pode aumentar o risco cardiovascular (MOREIRA *et al.*, 2012). Os níveis séricos de colesterol total é um reconhecido marcador clínico de risco aterosclerótico (LI *et al.*, 2015). Apenas o grupo HHg apresentou aumento significativo nos níveis séricos de triglicerídeos em comparação aos demais grupos. Novamente indicando que um efeito combinando da dieta ocidental com a intoxicação por MeHg pode aumentar o risco de doença metabólica e cardiovascular. O diabetes mellitus tipo 2 é a doença metabólica crônica mais comum, afetando aproximadamente 6% da população adulta no mundo ocidental. Esta condição é uma das principais causas de doenças cardiovasculares, cegueira. A influência da obesidade no risco de diabetes tipo 2 é determinada pelo grau de obesidade e pela localização da gordura corporal, sendo a resistência à insulina a principal ligação entre essas doenças metabólicas. Estudos experimentais mostraram que os fatores alimentares, e particularmente os lipídios (dietas com 40 a 60 % de lipídios), estão fortemente associados ao ganho de massa corporal, resistência a insulina, hipertensão arterial, esteatose hepática, hipertrigliceridemia e consequentemente diabetes tipo 2 (SILVA *et al.*, 2014).

O aumento da ingestão de ácidos graxos induz a ativação de células imunes e uma resposta inflamatória em muitos órgãos, incluindo o fígado. Frequentemente a esteatose é observada devido ao acúmulo de triglicerídeos em hepatócitos, levando a outros transtornos associados à obesidade, como: hipertrigliceridemia, aumento da lipoproteína de baixa densidade (LDL), intolerância à glicose e outros (GUILLEMONT-LEGRIS e MUCCIOLI, 2017).

Um recente trabalho de revisão sistemática demonstrou a ocorrência de síndrome metabólica (SM) em indivíduos expostos ao MeHg. Roy, Tremblay e Ayotte (2017) observaram uma correlação entre o aparecimento da SM, diabetes *mellitus* (DM) e a intoxicação pelo MeHg. Um total de 34 estudos foi analisado nessa revisão. A avaliação dos dados epidemiológicos sugere uma possível associação entre as concentrações totais de Hg em diferentes matrizes biológicas e a incidência de DM ou SM, mas a relação não é consistente. Estudos *in vivo* e *in vitro* suportam a plausibilidade biológica da relação entre a exposição ao Hg e DM ou SM. Cinco dos nove critérios de Bradford Hill foram cumpridos: força, temporalidade, plausibilidade, coerência e analogia. O aumento da exposição total ao Hg pode aumentar o risco de DM e SM, mas a falta de consistência das evidências epidemiológicas evita a inferência de uma relação causal. Estudos de coortes prospectivos adicionais e consideração cuidadosa de variáveis e interações de confusão são necessários para concluir sobre a relação causal da exposição total ao Hg no desenvolvimento de DM ou SM.

Moreira *et al.* (2012) pesquisaram os efeitos da exposição ao MeHg (40 mg/l por 20 dias na água de beber *ad libitum*) de longo-prazo (28 dias) nos níveis de lipídios plasmáticos e sua neurotoxicidade em camundongos C57BL/6. Esses autores observaram aumento nos níveis de colesterol total plasmático, o que também foi possível identificar nos achados desse presente estudo.

Analisando o estresse oxidativo, houve redução significativa da concentração de glutathiona (GSH) nos grupos H, NHg e HHg, e de glutathiona peroxidase (GPx) nos grupos intoxicados, relacionando-se, assim, ao aumento do estresse oxidativo. Em relação ao volume do hipocampo, observamos em todos os grupos intoxicados, uma redução significativa do volume total e das camadas CA1, CA2/CA3, CA4 e GD.

Eom *et al.*(2014) e Chen *et al.*(2006) intoxicaram camundongos com baixas doses de MeHg (20µg/kg/dia) e encontraram aumento na formação de espécies reativas de oxigênio e intolerância à glicose com quatro semanas de exposição. Esses autores sugeriram a presença de SM nos animais expostos. Nossos achados corroboram com esses trabalhos, indicando hipercolesterolemia (aumentos nos níveis de colesterol sérico nos animais intoxicados pelo MeHg), que, pode dar origem ou agravar a apresentação de outras desordens relacionadas ao metabolismo lipídico e glicolítico. Uma das limitações do nosso estudo foi não ter avaliado

intolerância a glicose e a glicemia nos animais recebendo dieta ocidental com ou sem MeHg, sendo um ponto a ser avaliado em trabalhos futuros.

O aumento da produção espécies reativas de oxigênio (EROs) está bem documentada na literatura como consequência da intoxicação mercurial, como no relatado por Eom *et al.* 2014. No presente estudo, observamos uma redução significativa nos níveis de GSH, no hipocampo, quando comparamos os grupos N e H com os grupos N e NHg, sendo estes últimos com valores bem inferiores aos anteriores, pelo impacto maior no estresse oxidativo induzido pela dieta ocidental e exposição ao Hg.

O MeHg diminui a captação de cistina pelas células nervosas (astrócitos) e aumenta a captação de glutamato, dessa forma agindo diretamente sobre a formação de GSH, visto que a glutathiona é composta basicamente por cistina, glicina e glutamato (FARINA, 2011).

O aumento do estresse oxidativo pode servir de sinalizador para indução da via apoptótica e morte celular, reduzindo ainda mais a captação de cistina e elevando a receptação do glutamato. Além disso, o MeHg atua na membrana mitocondrial interferindo na cadeia transportadora de elétrons e aumentando a produção de EROs, que não são retirados da célula de forma suficiente pela baixa de produção do GSH. Quando ocorre na célula sem a ação oxidativa mercurial, o GSH é reduzido a GSSG pela GR, sua forma oxidada, quando na presença de EROs, transportando para o meio extracelular as formas reativas de oxigênio (ELAHI *et al.*, 2015).

Os valores de GPx no hipocampo também foram significativamente reduzidos nos animais intoxicados quando comparados aos demais grupos. Existem cinco isoformas de GPx, GPx1 (citosólica), GPx2 (gastrintestinal), GPx3 (plasmática), GPx4 (hidroperóxido fosfolípídeo) e GPx6 (sistema olfatório) (BRIGELIUS-FLOHE, 2006).

Kirkpatrick *et al.* (2015), em animais C57BL/6J adultos machos, que receberam por via oral 5 mg/ kg/dia MeHg ou o veículo durante 28 dias, avaliaram que TrxR e GPx foram significativamente diminuídos no cérebro e no fígado, enquanto que a atividade de GR diminuiu no fígado e aumentou no tecido cerebral de animais tratados com MeHg.

Santos et al., (2016) recentemente confirmaram que o MeHg é um metal de forte tropismo pelo SNC, chegando a concentrações que podem ser de 3 a 6 vezes maiores que as do sangue. Farina *et al.* (2003) utilizando uma dose de 10mg/L de MeHg na água de beber de camundongos (Swiss Albino) adultos (2 meses) não encontraram alterações significativas de neurotoxicidade, ao passo que em doses superiores a 40mg/L, as alterações neurotóxicas (diminuição significativa de captação de glutamato e redução da atividade de GPx foram bem evidentes, contudo com redução do consumo de água pelos animais.

Boitard et al. (2014) avaliaram os efeitos de uma dieta de alto teor de gordura (24% de lipídeos e ofertando 4,7Kcal/g) em ratos machos Wistar com idade de 3 semanas (grupos juvenis) ou 12 semanas (grupos adultos). Os grupos controles receberam dieta contendo (2,5% de lipídios e oferecendo 2,9 Kcal/g). A exposição à dieta de alto teor de gordura nos grupos juvenis prejudicou a memória de referência espacial de longo prazo no labirinto de água de Morris sem afetar a aquisição ou a memória de curto prazo. Isso sugere um efeito nos processos de consolidação. Além disso, o consumo atrasou a aprendizagem de inversão espacial nos mesmos grupos. A ingestão da dieta com 24% de lipídeos ainda no grupo juvenil não afetou a expressão basal de citocinas pró-inflamatórias na periferia nem no cérebro, mas aumentou a expressão de IL-1 β e TNF- α especificamente no hipocampo após um desafio imune periférico com lipopolissacarídeo. Curiosamente, a mesma duração da ingestão da dieta de alto teor de gordura na idade adulta não afetou o desempenho espacial (memória de longo prazo ou aprendizado de reversão) nem a expressão de citocinas induzidas por lipopolissacarídeos no hipocampo. Finalmente, a aprendizagem de reversão espacial aumentou a expressão IL-1 β no hipocampo, mas não no córtex frontal e no hipotálamo de ratos jovens. Esses resultados indicam que a ingestão de uma dieta de alto teor de gorduras na faixa etária juvenil, promove a expressão de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo, que provavelmente contribuiu para o comprometimento da memória espacial.

A estereologia é um método analítico que oferece um conjunto de princípios para se obter estimativas sobre a estrutura morfológica. Para tanto, as medidas de características estruturais, como volume, superfície, comprimento e número de objetos, podem ser usadas em estudos comparativos e experimentais de tecidos e órgãos (WEST, 2012). O uso de método estereológico vem sendo cada vez mais utilizado e exigido na análise morfométrica sem vício de estruturas do sistema nervoso central.

Podemos evidenciar através do método de estereologia (Cavalieri) que os volumes

de CA1, CA2/CA3, CA4, GD e o volume do hipocampo total foram reduzidos significativamente nos animais que sofreram exposição aos efeitos do MeHg, quer seja associada com uma dieta padrão comercial ou dieta ocidental, quando comparados com os animais do grupo normonutrido e hiperlípico. Nossos resultados são inéditos, pois na literatura não encontramos registros da avaliação estereológica, após intoxicação por MeHg com ou sem dieta ocidental.

Falluel-Morel *et al.*(2007) identificaram que o MeHg é capaz de aumentar os níveis de caspase-3 ativada no hipocampo de rato e causar déficits de aprendizado juvenil subsequente. O aumento da apoptose em neurônios do hipocampo pode ser uma provável explicação para nossos achados de redução do volume dessas camadas. Além disso, Sokolowskiet *al.* (2011) demonstraram que a exposição do hipocampo ao MeHg induziu morte celular dependente de mitocôndria por ativação seqüencial de caspase-9 e caspase-3. Para explorar mecanismos apoptóticos, os ratos Sprague-Dawley foram expostos a 5 µg/g de MeHg ou PBS no dia 7 pós-natal e o hipocampo foi avaliado em vários momentos para níveis de proteínas apoptóticas. MeHg induziu um aumento de 38% na proteína Bax e um aumento do citocromo c após 4 h, seguido de aumentos posteriores na caspase-9 (40% às 12 h, 33% às 24 h) e caspase-8 (33% às 24 h), em comparação com os controles.

O MeHg também induziu um aumento no executor caspase-3, uma protease ativada por caspase-9 mitocondrial-dependente e caspase-8 independente de mitocôndria. Para definir outras vias, foi utilizado um modelo de cultura do prosencéfalo e descobriu-se que os aumentos induzidos por MeHg na caspase-3 e na caspase-8 foram completamente bloqueados por um inibidor específico da caspase-9, enquanto que a indução de caspase-9 não foi perturbada pelo inibidor de caspase-8. Essas observações sugerem que o MeHg age principalmente através da cascata dependente da mitocôndria para ativar a caspase-3 em precursores do prosencéfalo, uma via que pode contribuir para neurotoxicidade previamente documentada no desenvolvimento do hipocampo. Por sua vez, usando a proteína final, caspase-3, como marcador sensível para lesão neural, conseguiu-se detectar a morte das células do hipocampo *in vivo* em níveis dez vezes menores de exposição à MeHg (0,6 µg/g) do que anteriormente relatado. Assim, a morte celular dependente da mitocôndria no hipocampo pode servir como um índice sensível para insultos teratogênicos para o cérebro em desenvolvimento. (FALLUEL-MOREL *et al.*, 2007)

Wu *et al.* (2016) estudaram as alterações na estrutura do hipocampo de ratos *Sprague Dawley* (SD) pela administração de cloreto de MeHg, com testes de labirinto aquático. O tempo que o grupo de alta dose de MeHg gastou na busca da plataforma foi significativamente mais longo quando comparado ao grupo N-NaCl no dia 2 ao dia 5 e ao grupo L-MMC no dia 4 ao dia 5.

Os efeitos neurotóxicos do MeHg no hipocampo é parcialmente dificultada pela diferença nas espécies estudadas, nas metodologias (estudos *in vivo* ou *in vitro*), nos regimes (aguda versus longo prazo), na dosagem e no estágio de desenvolvimento dos animais nos trabalhos realizados. Nos achados de redução no volume das camadas do hipocampo, avaliada pelo método estereológico em animais intoxicados corroboram com os achados neurotóxicos do MeHg na literatura, independente do tipo de dieta administrada. Mais estudos são necessários para avaliar melhor os mecanismos envolvidos nessas alterações.

Os achados deste estudo sugerem que, no estresse oxidativo, há uma interferência direta da dieta ocidental quando associado à exposição por MeHg, sendo possível identificar redução significativa da concentração de glutathiona (GSH) nos grupos H, NHg e HHg, e de glutathiona peroxidase (GPx) nos grupos intoxicados, relacionando-se, assim, ao aumento do estresse oxidativo.

7 CONCLUSÃO

- A dieta ocidental alterou o ganho de peso corporal no grupo experimental hiperlipídico com exposição ao MeHg quando comparado com o grupo hiperlipídico;
- A intoxicação pelo MeHg na água de beber (20mg/L) aumentou as concentrações de MeHg no pelo dos animais dos grupos normonutrido e hiperlipídico intoxicados, confirmando que a administração de MeHg na água de beber causou intoxicação crônica nos animais;
- A intoxicação pelo MeHg na água de beber (20mg/L) causou um aumento nos níveis de colesterol total sérico dos grupos normonutrido e hiperlipídico intoxicados, quando comparados com os grupos normonutrido e hiperlipídico, e um aumento nos níveis de triglicerídeos séricos do grupo hiperlipídico intoxicado, quando comprado com os grupos normonutrido e hiperlipídico, e hiperlipídico intoxicado;
- A intoxicação pelo MeHg na água de beber (20mg/L) causou uma redução na concentração de GSH no hipocampo nos grupos normonutrido e hiperlipídico intoxicados, enquanto que, no grupo hiperlipídico sem exposição ao MeHg, também houve redução, sugerindo, então, um efeito negativo da dieta ocidental. Analisando GPx, identificou-se uma redução apenas nos grupos normonutrido e hiperlipídico intoxicados;
- A intoxicação pelo MeHg na água de beber (20mg/L) causou uma redução no volume total e no volume das camadas CA1, CA2/CA3, CA4 e GD do hipocampo do hipocampo nos grupos normonutrido e hiperlipídico intoxicados, quando comparado com os grupos normonutrido e hiperlipídico;
- Evidenciou-se o aumento do estresse oxidativo como efeito da combinação da dieta ocidental com a intoxicação por MeHg no hipocampo de camundongos C57BL/6J, gerando uma redução das camadas hipocampais, sendo necessários mais estudos para se evidenciar a correlação com apoptose e neurogênese das estruturas hipocampais.

REFERÊNCIAS

AKAGI, H., MALM, O., BRANCHES, F.J.P. Human exposure to mercury due to mining in the Amazon, Brasil- a review. **Environmental Science**, v. 3, p. 199-211, 1996.

ANDRADE, J. P.; MADEIRA, M. D.; PAULA-BARBOSA, M. M. Effects of long-term malnutrition and rehabilitation on the hippocampal formation of the adult rat. A morphometric study. **Journal of anatomy**, v. 187, n. 2, p. 379-93, 1995.

AMONPATUMRAT, S., SAKURAI, H., WIRIYASERMKUL, P., KHUNWEERAPHONG, N., NAGAMORI, S., TANAKA, H., PIYACHATURAWAT, P., KANAI Y. L-glutamate enhances methylmercury toxicity by synergistically increasing oxidative stress. **J Pharmacol Sci.**, v. 108, n. 3, p. 280-289, 2008.

AMORIM, M. I., MERGLER, D., BAHIA, M.O., DUBEAU, H., MIRANDA, D., LEBEL, J., BURBANO, R.R., e LUCOTTE, M. Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 72, p. 497-507, 2000.

ANA – Agência Nacional de águas. Disponível em <<http://www2.ana.gov.br>>. acessado em 25 de setembro de 2017.

ANDERSEN O., ANDERSEN H. R. Effects of Dietary α -Tocopherol and p-Carotene on Lipid Peroxidation Induced by Methyl Mercuric Chloride in Mice. **Pharmacology and toxicology**, v. 73, p. 192-201, 1993.

ASCHNER M., ASCHNER JL. Mercury neurotoxicity: Mechanisms of blood–brain barrier transport. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 14, n. 2, p. 169-176, 1990.

ASCHNER M., CLARKSON TW. Mercury 203 distribution in pregnant and nonpregnant rats following systemic infusions with thiol-containing amino acids. **Teratology**, v. 36 , n. 3, p. 321-328, 1987.

ASCHNER, M., SYVERSEN, T., SOUZA, D. O., ROCHA, J. B., FARINA, M. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 285-291, 2007.

AUGER, N., KOFMAN, O., KOSATSKY, T., e ARMSTRONG, B. Low-level methylmercury exposure as a risk factor for neurologic abnormalities in adults. **Neurotoxicology**, v. 26, p. 149-157, 2005.

BAHIA, M. O., CORVELO, T.C., MERGLER, D., BURBANO, R.R., LIMA, P.D., CARDOSO, P.C., LUCOTTE, M., e AMORIM, M.I. Environmental biomonitoring using cytogenetic endpoints in a population exposed to mercury in the Brazilian Amazon. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 44, p. 346-349, 2004.

BALLATORI, N., CLARKSON, T.W. Developmental changes in the biliary excretion of methylmercury and glutathione. **Science**, v. 216, p. 61-63, 1982.

BALU, D.T., LUCKI, I. Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. **Neurosci. Biobehav.**, v. 33, p. 232-252, 2009.

BASTOS, W. R., GOMES, J.P., OLIVEIRA, R.C., ALMEIDA, R., NASCIMENTO, E.L., BERNARDI, J.V., DE LACERDA, L.D., DA SILVEIRA, E.G., e PFEIFFER, W.C. Mercury in the environment and riverside population in the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. **Sci. Total Environ.**, v. 368, p. 344-351, 2006.

BELLÉ, L. P.; DE BONA, K. S.; ABDALLA, F. H.; PIMENTEL, V. C.; PIGATTO, A. S.; MORETTO, M. B. Comparative Evaluation of Adenosine Deaminase Activity in Cerebral Cortex and Hippocampus of Young and Adult Rats: Effect of Garlic Extract (*Allium sativum* L.) on Their Susceptibility to Heavy Metal Exposure. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 104, n. 5, p. 408–413, 2009.

BIGHAM G N., MURRAY K J., MASUE-SLOWEY Y., HENRYK E A. Biogeochemical Controls on Methylmercury in Soils and Sediments: Implications for Site Management. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 13, n. 2, p. 249–263, 2016.

BITENCOURT P. E. R.; ABDALLAF H.; DE BONA K S.; MORETTO M B. Exposição aguda ao Metilmercúrio em ratos em desenvolvimento: mini-revisão. Semina: **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 2, p. 137-148, 2013.

BISINOTI, M.C., JARDIM, W.F. O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente. **Química Nova**, v. 27, n.4, p. 553-600, 2004.

BOITARD, C., CAVAROC, A., SAUVANT, J., AUBERT, A., CASTANON, N., LAYÉ, S., FERREIRA, G. Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.40, p.9-17, 2014.

BOSE, R., ONISHCHENKO, N., EDOFF, K., LANG, A. M. J., CECCATELLI, J. Inherited Effects of Low-Dose Exposure to Methylmercury in Neural Stem Cells. **Toxicological sciences**, v.130, n. 2, p. 383–390, 2012.

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**, v. 89, n. 1/2, p. 159-62, 2002.

BRIDGES, C. C., ZALUPS RK. Transport of inorganic mercury and methylmercury in target tissues and organs. **J Toxicol Environ Health. B Crit Rev.**, v. 13, n. 5, p.385-410, 2010.

BRIGELIUS-FLOHE, R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. **Biol. Chem.**, v. 387, p. 1329–1335, 2006.

CAI, MING ET AL. The signaling mechanisms of hippocampal endoplasmic reticulum stress affecting neuronal plasticity-related protein levels in high fat diet-induced obese rats and the regulation of aerobic exercise. **Brain, behavior, and immunity**, v. 57, p. 347-359, 2016.

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

CAMERON, H. A. ; MCKAY, R. D. Restoring production of hippocampal neurons in old age. **Nat. Neurosci.**, v.2, p. 894-897, 1999.

CARVALHO, M. C.; FRANCO, J. L.; GHIZONI, H.; KOBUS, K.; NAZARI, E. M.; ROCHA, J. B.; NOGUEIRA, C. W.; DAFRE, A. L.; MULLER, Y. M.; FARINA, M. Effects of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) on methylmercury-induced locomotor deficits and cerebellar toxicity in mice. **Toxicology**, v.239, p. 195-203, 2007.

CHANG, J. W.; PAI, M. C.; CHEN, H. L.; GUO, H. R.; SU, H. J.; LEE, C. C. Cognitive function and blood methylmercury in adults living near a deserted chloralkali factory. **Environmental Research**, San Diego, v. 108, p. 334-339, 2008.

CHEN, Y.W., HUANG, C.F., TSAI, K.S., YANG, R.S., YEN, C.C., YANG, C.Y., LIN-SHIAU, S.Y., LIU, S.H.. The role of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling in low-dose mercury-induced mouse pancreatic beta-cell dysfunction in vitro and in vivo. **Diabetes**, v. 55, n. 6, p. 1614-1624, 2006.

CHOI, A. L., WEIHE, P., BUDTZ-JORGENSEN, E., JORGENSEN, P.J., SALONEN, J.T., TUOMAINEN, T.P. Methylmercury exposure and adverse cardio-vascular effects in faroese whaling men. **Environ Health Persp**, v.117, p. 367-72, 2009.

CHUU, Y. Y.; LIU, S. H.; LIN-SHIAU, S. Differential neurotoxic effects of methylmercury and mercuric sulfide in rats. **Toxicology Letters**, v. 169, p. 109–120, 2007.

CECCATELLI, S., BOSE, R., EDOFF, K., ONISCHCHEKO, N., SPULBER, S. Long-lasting neurotoxic effects of exposure to methylmercury during development. **Journal of Internal Medicine**, v. 273, n. 5, p. 490-497, 2013.

CLARKSON TW. The three modern faces of mercury. **Environ Health Perspect**, v. 110, n.1, p 11-23, 2002.

CORTE, D. C. L., WAGNER, C., SUDATI, J.H., COMPARARSI, B., LEITE, G.O, BUSANELLO, A., SOARES F.A., ASCHNER, M., ROCHA J.B. Effects of diphenyl diselenide on methylmercury toxicity in rats. **BioMed research international**, v. 1, p.1-12, 2013.

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

CRESPO-LOPEZ, M. E., LIMA DE, S.A., HERCULANO, A.M., RODRIGUEZ, B.R., e CRESPO-LOPEZ, M. E., LIMA DE, S.A., HERCULANO, A.M., RODRIGUEZ, B.R., MARTINS DO NASCIMENTO, J.L. Methylmercury genotoxicity: a novel effect in human cell lines of the central nervous system. **Environ. Int.**, v. 33, p. 141-146, 2007.

CRESPO-LOPEZ, M. E., MACEDO, G.L., ARRIFANO, G.P., PINHEIRO, M.C., DO NASCIMENTO, J.L., e HERCULANO, A.M. Genotoxicity of mercury: contributing for the analysis of Amazonian populations. **Environ. Int.**, v. 37, p. 136-141, 2011.

DI CESARE, M. et al. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. **Lancet**, v. 387, p. 1377-1396, 2016.

DO NASCIMENTO, J. L., OLIVEIRA, K. R., CRESPO-LOPEZ, M. E., MACCHI, B. M.,

MAUÉS, L. A.; PINHEIRO, M. D. A. C., SILVEIRA, L. C.; HERCULANO, A. M. Methylmercury neurotoxicity & antioxidant defenses. **Indian Journal Medical Research**, New Delhi, v. 128, n. 4, p. 373-82, 2008.

DRINGEN R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Prog Neurobiol.**, v. 62, p. 649-671, 2000.

ELAHY, MINA ET AL. Nicotine attenuates disruption of blood–brain barrier induced by saturated-fat feeding in wild-type mice. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 17, n. 12, p. 1436-1441, 2015.

EOM, S.Y., CHOI, S.H., AHN, S.J., KIM, D.K., KIM, D.W., LIM, J.A., CHOI, B.S., SHIN, H.J., YUN, S.W., YOON, H.J., ET AL., 2014. Reference levels of blood mercury and association with metabolic syndrome in Korean adults. **Int. Arch. Occup. Environ. Health** v. 87, n.5, p. 501–513, 2016.

EPA 1630; Methyl Mercury in water by distillation, aqueous ethylation, purge and trap, and C VAFS. Environmental Protection Agency: Washington, 2001.

ESTECHA, M. G., PINEDO, A. B. M., HERRERA, A. R., CLAROS, N. M. et al. Efectos sobre la salud del metilmercurio en niños y adultos; estudios nacionales e internacionales. **Nutr Hosp**, v. 5, p. 989-1007, 2014

FALLUEL-MOREL, A., SOKOLOWSKI, K., SISTI, H. M, ZHOU, X., SHORS, T. J., DICICCO-BLOOM, E. Developmental mercury exposure elicits acute hippocampal cell death, reductions in neurogenesis, and severe learning deficits during puberty, **J. Neurochem.**, v.103, n. 5, p. 1968-1981, 2007.

FARIAS, L. A., FÁVARO., D. I. T, PESSOA, A., AGUIAR, J.P.L., YUYAMA, L.K.O. Mercury and methylmercury concentration assessment in children's hair from Manaus, Amazonas State, Brazil. **Acta amazonica**, v. 42, n.2, p. 279-286, 2012.

FARINA M, FRIZZO ME, SOARES FA, SCHWALM FD, DIETRICH MO, ZENI G, ROCHA JB, SOUZA DO. Ebselen protects against methylmercury-induced inhibition of glutamate uptake by cortical slices from adult mice. **Toxicol Lett.**, v. 144, n. 3, p. 351-357, 2003.

FARINA, M., FRANCO, J. L., RIBAS, C. M., MEOTTI, F. C., MISSAU, F. C., PIZZOLATTI, M. G., DAFRE, A. L., SANTOS, A. R. Protective effects of *Polygala paniculata* extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 57, p. 1503–1508, 2005.

FARINA, M., ROCHA, J.B., e ASCHNER, M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. **Life Sci.**, v. 89, p. 555-563, 2011.

FERRARO, L.; TOMASINI, M. C.; TANGANELLI, S.; MAZZA, R.; COLUCCIA, A.; CARRATU', M. R.; GAETANI, S.; CUOMO, V.; ANTONELLI, T. Developmental exposure to methylmercury elicits early cell death in the cerebral cortex and long-term memory deficits in the rat. **International Journal Development Neuroscience**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 165–174, 2009.

FRANCO, J. L., BRAGA, H.C., STRINGARI, J., MISSAU, F.C, POSSE, R T., MENDES, B.G, LEAL, R. B., SANTOS, A.R., DAFRE, A. L., PIZZOLATTI, M. G., FARINA, M. Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain mitochondria: protective effects of quercetin. **Chem Res Toxicol.**, v. 12, p. 1919-1926, 2007.

FRANCO, J. L., POSSER, T. DUNKLEY, P. R., DICKSON, P. W., MATTOS J. J., MARTINS, R., BAINY, A. C.D., MARQUES, M. R., DAFRE, A. L., FARINA, M. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 449-457, 2009.

FRANCO, J. L., TEIXEIRA, A., MEOTTI, F.C., RIBAS, C.M., STRINGARI, J., GARCIA POMBLUM S.C., MORO, A.M., BOHRER, D., BAIRROS, A.V., DAFRE, A.L., SANTOS, A.R., FARINA, M. Cerebellar thiol status and motor deficit after lactational exposure to methylmercury. **Environ Res**, v. 102, n.1, p.22-28, 2006;

FRANKLAND e MILLER. Regenerating your senses: multiple roles for neurogenesis in the adult brain. **Nature Neuroscience**, v. 11, n. 10, p. 1117-1230, 2008.

FUJIMURA, M., USUKI, F. Site-specific neural hyperactivity via the activation of MAPK and PKA/ CREB pathways triggers neuronal degeneration in methylmercury-intoxicated mice. **Toxicology Letters**, v. 271, p. 66–73. 2017.

GUALLAR, E., SANZ-GALLARDO, M.I., VAN'T VEER, P., BODE, P., ARO, A., GOMEZ-ARACENA, J., KARK, J.D., RIEMERSMA, R.A., MARTIN-MORENO, J.M., e KOK, F.J. Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction. **N. Engl. J. Med.**, v. 347, p. 1747-1754, 2002.

GUIDA, N., LAUDATI, G., MASCOLO, L., VALSECCHI, V., SIRABELLA, R., SELLERI, C., RENZO, G., CANZONIERO, L, M, T., FORMISANO, L. p38/Sp1/Sp4/HDAC4/BDNF Axis Is a Novel Molecular Pathway of the Neurotoxic Effect of the Methylmercury. **Frontiers in neuroscience**, v.11, p. 1-10, 2017.

GUILLEMOT-LEGRIS, O., E MUCCIOLI, G. G. Obesity-Induced Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus. **Trends in Neurosciences**, v. 40, n. 4, p. 237-253, 2017.

HACHIYA N. Epidemiological update of methylmercury and Minamata disease. In: Ceccatelli S., Aschner M. (eds) Methylmercury and Neurotoxicity. **Current topics in Neurotoxicity**, v. 2, Springer, Boston, Ma., 2012.

HONG, YOUNG-SEOUB., KIM, YU-MI., LEE, KYUNG-EUN. Methylmercury Exposure and Health Effects. **Prev Med Public Health**; v.45, p. 353-363, 2012.

HOSSEINI-SHARIFABAD, M., NYENGAARD, J. R. Design-based estimation of neuronal number and individual neuronal volume in the rat hippocampus. **Journal of neuroscience methods**, v. 162, n. 1-2, p. 206–14, 15 maio 2007.

ISCASON, R. Hippocampus. In: ADELMAN, G. (Ed.). **Encyclopedia of Neuroscience**. Boston: Birkhäuser, p. 492–495, 1987.

JOHNSON, F.O. e ATCHISON, W. The role of environmental mercury, lead and pesticide exposure in development of amyotrophic lateral sclerosis. **Neurotoxicology**, v. 30, n. 5, p. 761-765, 2009.

- KASPER, D., FORSBERG, B. R., AMARAL, J. H. F., LEITÃO, R. P., PYDANIEL, S. S., BASTOS, W. R., MALM, O. **Environ. Sci. Technol.**, v. 48, p. 1032, 2014.
- KAUR, P., ASCHNER, M., SYVERSEN, T. Glutathione modulation influences methyl mercury induced neurotoxicity in primary cell cultures of neurons and astrocyte. **Neurotoxicology**, v. 27, p. 492–500, 2006.
- KEMPERMANN, G.; KUHN, H. G.; GAGE, F. H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, v.386, p. 493-495,1997.
- KEMPERMANN, G. The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for? **Trends in Neurosciences**, v.31, n.4, p. 163-169, 2008.
- KERPER L.E, BALLATORI N, CLARKSON T.W. Methylmercury transport across the blood-brain barrier by an amino acid carrier. **Am J Physiol.**, v. 262 p. 761-765, 1992.
- KIRKPATRICK, M., BENOIT, J., EVERETT, W., GIBSON, J., RIST, M., FREDETTE, N. The effects of methylmercury exposure on behavior and biomarkers of oxidative stress in adult mice. **Neurotoxicology**, v. 50, p. 170-178, 2015.
- KLAUSBERGER, T., SOMOGYI, P. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. **Science**, v. 321, p. 53-57, 2008.
- KOZAREVA, D.A., HUESTON, C. M., Ó'LEÍME, C. S., CROTTY, S., DOCKCARY, P., CRYAN, J.F., NOLAN Y. M. Absence of the neurogenesis-dependent nuclear receptor TLX induces inflammation in the hippocampus. **Journal of Neuroimmunology**, v. 165, n.17, p. 165- 177, 2017.
- KUHN, H. G.; DICKINSON-ANSON, H.; GAGE, F. H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. **J. Neurosci.**, v.16, p. 2027-2033,1996.
- LACERDA et al. Mercury distribution in fish commercialized at the mucuripe market, fortaleza, ceará state, brazil. **Arq. Ciên. Mar**, v. 49, n. 1, p. 50-54, 2016
- LADD, F. V.L. et al. Zinc and glutamine improve brain development in suckling mice subjected to early postnatal malnutrition. **Nutrition**, v. 26, p. 662–670, 2010.
- LANSENS, P.; MEULEMAN, C.; BAEYENS, W. **Anal. Chim. Acta.**, v. 234, p. 417-424, 1990.
- LEÃO, K.R., HERCULANO, A. M, MAXIMINO, C., COSTA, A.B., JR, A. R., BATISTA, E. O., ROCHA, F., CRESPO-LOPEZ, M. E., BORGES, R., OLIVEIRA, K. *Mauritia flexuosa* L. protects against deficits in memory acquisition and oxidative stress in rat hippocampus induced by methylmercury exposure. **Nutritional Neuroscience**, v. 20, n. 5, p. 297-304, 2016.
- LEE, J., DUAN, W., LONG, J. M., INGRAM, D. K., MATTSON, M. P. Dietary restriction increases the number of newly generated neural cells, and induces BDNF expression, in the dentate gyrus of rats. **J. Mol. Neurosci.**, v.15, p. 99-108,2000.

LEE, J., SEROOGY, K. B., MATTSON, M. P. Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. **J. Neurochem.**, v.80, p. 539-547,2002.

LEERMAKERS, M., LANSSENS, P., BAEYENS, W. **Fresenius J. Anal.Chem.**, v. 336, p.655-666,1990.

LI, J., LIU R., XUE H., ZHANG, G., WANG, C., CHEN, Q., XUE, F., CUI, L. Insight into the Spectrum of Coronary Atherosclerosis in Asymptomatic Urban Han Chinese Population by Coronary Computed Tomography Angiography. **PloS ONE**. v. 10 (7), 2015.

LOIS C, ALVAREZ-BUYLLA A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. **Science**, v. 264, p.1145-1148, 1994.

LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v.193, p. 265-75, 1951.

LUMENG, C.N., SALTIEL, A.R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. **J. Clin. Invest**, v.121, p. 2111–2117, 2011.

MASCARENHAS, A. F. S., BRABO, E.S., SILVA A.P., FAYAL. K. F., JESUS, I.M., SANTOS, E.C.O. Avaliação da concentração de mercúrio em sedimentos e material particulado do rio Acre, estado do Acre, Brasil. **Acta Amazônica**, V. 34, n. 1,p. 61-68, 2004.

MMA - Ministério do Meio Ambiente: **Agencia nacional de vigilância sanitária. Gerenciamento de resíduos de mercúrio nos serviços e saúde**. Brasília MMA, p.46, 2010.

MOREIRA, E. L., DE, O.J., DUTRA, M.F., SANTOS, D.B., GONCALVES, C.A., GOLDFEDER, E.M., DE BEM, A.F., PREDIGER, R.D., ASCHNER, M., e FARINA, M. Does methylmercury-induced hypercholesterolemia play a causal role in its neurotoxicity and cardiovascular disease? **Toxicol. Sci.**, v. 130, p. 373-382, 2012.

MORETTO, M. B., FUNCHAL, C., SANTOS, A. Q., GOTTFRIED, C., BOFF, B., ZENI, G., PUREUR, R. P., SOUZA, D. O., WOFCHUK, S., ROCHA, J. B. Ebselen protects glutamate uptake inhibition caused by methyl mercury but does not by Hg²⁺. **Toxicology, Amsterdam**, v. 214, n. 1/2, p. 57–66, 2005.

MORI N, YASUTAKE A, HIRAYAMA K. Comparative study of activities in reactive oxygen species production/defense system in mitochondria of rat brain and liver, and their susceptibility to methylmercury toxicity. **Arch Toxicol**, v. 81, n. 11, p. 769-776, 2007

MORON MS, DEPIERRE JW, MANNERVIK B. Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione-S-transferase activities in rat lung and liver. **Biochim Biophys Acta**,v. 582, p. 67–78. 1979.

MOTTET NK, VAHTER ME, CHARLESTON JS, FRIBERG LT. Metabolism of methylmercury in the brain and its toxicological significance. **Met Ions Biol Syst**, v. 34, p. 371-403, 1997.

NASCIMENTO, E.S, CHASIN, A. A.M. Ecotoxicologia do mercúrio e seus compostos. SALVADOR:**Cadernos de Referência Ambiental**, v.1, p. 176, 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Toxicological effects of methylmercury. Washington: National Academy Press, 2000.

O GLOBO:<<http://acervo.oglobo.globo.com/fatos-historicos/desastre-de-minamata-crime-ecologico-que-deixou-marcas-por-decadas-no-japao-10102255>>. Acessado em 10 de setembro de 2017.

O'LEARY, O.F., CRYAN, J.F. ventral view on antidepressant action: roles for adult hippocampal neurogenesis along the dorsoventral axis. **Trends Pharmacol**, v. 35, p. 675–687. 2014.

OLSON, A. K., EADIE, B. D., ERNST, C., CHRISTIE, B. R. Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways. **Hippocampus**, v.16, p. 250-260, 2006.

OMS-ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Guidance for Identifying Populations at Risk from Mercury Exposure**. 2008. Disponível em:<<http://www.who.int/foodsafety/publications/risk-mercury-exposure/en/>>. Acesso em: 09/09/2017.

OZUAH, P. O. Mercury poisoning. **Currents: Current Problems in Pediatrics**, St. Louis, v. 3, n. 3, p. 91-99, 2000.

PAXINOS, G., FRANKLIN, K. B. J. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2004. v. 2nd

PISTELL, P. J., MORRISON, C. D., GUPTA, S., KNIGHT, A. G., KELLER, J. N. INGRAM, D. K., BRUCE-KELLER, A. J. Cognitive Impairment Following High Fat Diet Consumption is Associated with Brain Inflammation. **J Neuroimmunol**, v. 219, p. 25-32, 2010.

REZENDE, A. B., NETO, N. N., FERNANDES, L. R., RIBEIRO, A. C. C., ALVAREZ-LEITE, J. I., TEIXEIRA, H. C., Splenectomy Increases Atherosclerotic Lesions in Apolipoprotein E Deficient Mice. **Journal of Surgical Research**, v. 171, p. 231-236, 2011.

ROMAN, H. A., WALSH, T. L., COULL B. A., DEWAILLY, E., GUALLAR, E., HATTIS. Evaluation of the cardiovascular effects of methylmercury exposures: current evidence supports development of a dose-res- ponse function for regulatory benefits analysis. **Environ Health Persp**, v. 119, p. 607-14, 2011.

ROY, C., TREMBLAY, P., AYOTTE, P. Is mercury exposure causing diabetes, metabolic syndrome and insulin resistance? A systematic review of the literature. **Environmental Research**, v. 156, p. 747-760, 2017.

SANTOS, A. A., HORT, M. A., CULBRETH, M., GRANERO-LÓPEZ, C., FARINA, M. ROCHA, J. B. T., ASCHNER M. Methylmercury and brain development: A review of recent literature. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 38, p. 99–107, 2016.

SANTOS F L O, GATTI R M, SOUZA P R K. Presença de mercúrio em peixes e sua correlação com a intoxicação alimentar. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, n.9, p. 37-41, 2006.

SARAFIAN, T. A.; VARTAVARIAN, L.; KANE, D. J.; BREDESEN, D. E.; VERITY, M. A. Bcl-2 expression decreases methylmercury-induced free-radical generation and cell killing in a neural cell line. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 74, n. 2, p. 149–155, 1994.

SHANKER, G.; MUTKUS, L. A.; WALKER, S. J.; ACHNER, M. Methylmercury enhances arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 expression in primary cultures of neonatal astrocytes. **Molecular Brain Research**, Amsterdam, v. 106, p. 1-11, 2002.

SHEN, A. N., CUMMINGS, C., HOFFMAN, D., POPE, D., ARNOLD, M., NEWLAND, M. C. Aging, motor function, and sensitivity to calcium channel blockers: An investigation using chronic methylmercury exposure. **Behavioural Brain Research**, v. 315, p.103–114, 2016.

SINAN – Sistema de informações e agravos de notificação. <<http://portalsaude.saude.gov.br>>. Acessado em 10 de setembro de 2017.

SILVA, S. B., SARMENTO, I. B., BARGUT, T. C. L., SOUZA-MELLO, V., AGUILA, M. B., MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Animal Models of Nutritional Induction of Type 2 Diabetes Mellitus. **Int. J. Morphol**, v. 32, p. 279-293, 2104.

SMALL, D. M., COOMBES, J. S., BENETTE, N., JOHNSON, D.W., GOBE, G. C. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. **Nephrology** (Carlton), v. 17, n. 4, p. 311–21, 2012.

SOKOLOWSKI, K., FALLUEL-MOREL, A., DICICCO-BLOOM, E, Methylmercury (MeHg) elicits mitochondrial-dependent apoptosis in developing hippocampus and acts at low exposures, **Neurotoxicology**, v. 32, n. 5, p. 535-544, 2011.

SALONEN, J.T., SEPPANEN, K., LAKKA, T.A, SALONEN, R., KAPLAN, G.A. Mercury accumulation and accelerated progression of carotid atherosclerosis: a population-based prospective 4-year follow-up study in men in eastern Finland. **Atherosclerosis**, v. 148, p.265-73, 2000.

SPALDING, K.L., BERGMANN, O., ALKASS, K., BERNARD, S., SALEHPOUR, M., HUTTNER, H.B., BOSTROM, E., WESTERLUND, I., VIAL, C., BUCHHOLZ, B.A., POSSNERT, G., MASH, D.C., DRUID, H., FRISEN, J. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. **Cell**, v. 153, p. 1219–1227, 2013.

STRINGARI, J., NUNES, A.K., FRANCO, J.L., BOHRER, D., GARCIA, S.C., DAFRE, A.L., MILATOVIC, D., SOUZA, D.O., ROCHA, J.B., ASCHNER, M., e FARINA, M. Prenatal methylmercury exposure hampers glutathione antioxidant system ontogenesis and causes long-lasting oxidative stress in the mouse brain. **Toxicol. Appl. Pharmacol**, v. 227, p. 147-154, 2008.

TOZUKA, Y, WADA E, WADA K. Diet-induced obesity in female mice leads to peroxidized lipid accumulations and impairment of hippocampal neurogenesis during the early life of their offspring. **FASEB J.**, v. 26, n. 6, p.1920-1934, 2009.

TOXICOLOGICAL EFFECT OF METHYLMERCURY. National Academy of Science, Committee on the Toxicological Effects of Methylmercury, Board on Environmental Studies and Toxicology, **National Research Council**, National Academies Press; Washington, DC: 2000.

UNIFESP.<<http://www2.unifesp.br/reitoria/residuos>>. Acesso em 15 de julho de 2017.

VASCONCELOS, S. M. L., GOULART, M. O. F., MOURA, J. B. F., MANFREDINI, V., BENFATO M. S., KUBOTA, L. T. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: main analytical methods for their determination. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.

VÁSQUEZ, M. J., ALBUÍN, M., CARRO, A. M., LORENZO, R. A., CELA, R. **Chemosphere**, v.4, p. 2-09,1999.

VAN, P. H., SCHINDER, A. F., CHRISTIE, B. R., TONI, N., PALMER, T. D., GAGE, F. H. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. **Nature.**, v.415, p. 1030-1034,2002.

VAHTER M, MOTTET NK, FRIBERG L, LIND B, SHEN DD, BURBACHER T. SPECIATIONof mercury in the primate blood and brain following long-term exposure to methyl mercury. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 9, p. 124-221. 1994

VIRTANEN, J. K., RISSANEN, T. H., VOUTILAINEN, S., TUOMAINEN, T. P. Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases. **J Nutr Biochem**. v.18, p.75-85, 2007.

VISWANADH, E. K., RAO, B. N., RAO, B. S. Protective Effect of Grapefruit Juice on the Teratogenic and Genotoxic Damage Induced by Cadmium in Mice. **Human and experimental toxicology**, v. 29, p. 409-418, 2010.

WAKABAYASHI, K.; KAKITA, A.; SAKAMOTO, M.; SU, M.; IWANAGA, K.; IKUTA, F. Variability of brain lesions in rats administered methylmercury at various postnatal development phases. **Brain Research**, Amsterdam, v. 705, p. 267-72, 1995.

WALTER, J., KEINER, S., WITTE, O. W., REDECKER, C. AGE-RELATED EFFECTS ON HIPPOCAMPAL PRECURSOR CELL SUBPOPULATIONS AND NEUROGENESIS. **Neurobiol. Aging.**, v.32, p. 1906-1914,2011.

WARNER-SCHMIDT, J. L., DUMAN, R. S. Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. **Hippocampus**, v.16, p. 239-249,2006.

WEST, J. M.,Introduction to Stereology.**Cold Spring Harbor Protocols**,p. 843-851, 2012.

WHO – World Health Organization. Preventing Disease Through Healthy Environments. Exposure to Mercury: A Major Public Health Concern. 2007.

WHO - World health Organisation 2013. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>.Acesso em 15 de setembro de 2017.

WITTER, M. Connectivity of rat hippocampus. In: chan-palay, v.; kohler, c. (eds.). The Hippocampus - New Vistas.**Neurology and Neurobiology**. New York: Alan Liss, p. 53–69. 1989.

WU, J., CHENG, G., LU, Z., WANG, M., TIAN, J. Effects of Methyl Mercury Chloride on Rat Hippocampus Structure. **Biol Trace Elem Res**, v. 171, p. 1240130. 2016.

XU, M., YAN, C., TIAN, Y., YUAN, X., SHEN, X. Effects of low level of methylmercury on proliferation of cortical progenitor cells. *Brain Research*, Amsterdam, v. 1359, p. 272-280, 2010.

YIN, Z., JIANG, H., SYVERSEN, T., ROCHA, J.B., FARINA, M., ASCHNER, M. The methylmercury-L-cysteine conjugate is a substrate for the L-type large neutral amino acid transporter. *J Neurochem.*, v. 107, n. 4, p. 1083-1090, 2008.

YOSHIDA, S. MATSUMOTO, S., KANCHIKA, T., HAGIWARA, T., MINAMI, T. The organic mercury compounds, methylmercury and ethylmercury, inhibited ciliary movement of ventricular ependymal cells in the mouse brain around the concentrations reported for human poisoning. **NeuroToxicology**, v. 57, p. 69–74. 2016.

YOSHIKAWA, T., NAITO, Y., KISHI, A., TOMII, T., KANEKO, T., IINUMA, S., ICHIKAWA, H., YASUDA, M., TAKAHASHI, S., KONDO, M. Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats. **Gut**, v. 34, p. 732–737, 1993.

ANEXO



FUNDAÇÃO EDSON QUEIROZ
UNIVERSIDADE DE FORTALEZA
ENSINANDO E APRENDENDO

UNIVERSIDADE DE FORTALEZA
VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA

PARECER N°. 015/2015

Projeto de Pesquisa: Integração da pesquisa em neurociência e bioquímica para redução do impacto da Hiperlipidemia e intoxicação mercurial no desenvolvimento infantil.

Pesquisador Responsável: Ramon da Silva Raposo

Finalidade de Proposta: Pesquisa

Data de apresentação ao CEUA: 17/04/15

Registro no CEUA: 15-006

Tipo de Animal: Roedores

Espécie: Camundongo Heterogênico

Linhagem: C57BL6J

Quantidade: 80 (80 machos)

Idade e Peso: 28 dias / 8 a 11 gramas

Vigência da autorização: 01/07/16 a 01/07/17

Parecer: Aprovado na data de 19/06/16

Prof. Saulo Ellery Santos
Coordenador Adjunto da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA