



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

DANIEL VIEIRA PINTO

**PAPEL DO METILMERCÚRIO NO ESTRESSE OXIDATIVO NO
HIPOCAMPO, CEREBELO E FÍGADO E ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM
CAMUNDONGOS C57BL/6J LACTENTES**

FORTALEZA

2018

DANIEL VIEIRA PINTO

**PAPEL DO METILMERCÚRIO NO ESTRESSE OXIDATIVO NO
HIPOCAMPO, CEREBELO E FÍGADO E ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM
CAMUNDONGOS C57BL/6J LACTENTES**

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

2018

DANIEL VIEIRA PINTO

**PAPEL DO METILMERCÚRIO NO ESTRESSE OXIDATIVO NO
HIPOCAMPO, CEREBELO E FÍGADO E ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM
CAMUNDONGOS C57BL/6J LACTENTES**

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

Aprovado em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá (Orientador)

Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof^a. Dra. Flávia Almeida Santos

Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. João José Oliveira Malva

Universidade de Coimbra - UC

(Página deixada em branco para anexar a ficha catalográfica)

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)

P1p PINTO, DANIEL VIEIRA.
PAPEL DO METILMERCÚRIO NO ESTRESSE OXIDATIVO NO HIPOCAMPO,
CEREBELO E FÍGADO E ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM CAMUNDONGOS C57BL/6J
LACTENTES : ESTUDO EXPERIMENTAL / DANIEL VIEIRA PINTO. – 2018.
79 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. REINALDO BARRETO ORIÁ.

Coorientação: Profa. Dra. FLÁVIA ALMEIDA SANTOS.

1. metilmercúrio. 2. aleitamento materno. 3. neuroinflamação. 4. estresse oxidativo. 5.
metabolismo. I. Título.

CDD 610

AGRADECIMENTOS

Antes de todos devo agradecer ao Senhor Deus, que me proporcionou inteligência e sabedoria para conduzir a experimentação desenvolvida deste trabalho de pesquisa.

À família que Deus me presenteou, na figura de minha esposa, Ana Araújo Lobo, e filha, Yasmin Pinto Araújo. Sem estas nada disso seria possível pois me deram força e apoio, além de muito amor, quando precisava.

Aos meus pais, Francisco Danúcio Pinto e Maria Stelia Vieira Pinto, a família que Deus me permitiu ter, pela educação e ensinamentos sobre ética e moral, os quais se perfazem de forma intrínseca em meus atos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá, pela confiança em me aceitar como orientando de mestrado e por apoiar as decisões que tomei no curso deste projeto, em vista da distância que nos separou durante o último ano.

Ao Prof. Dr. Ramon da Silva Raposo, um antigo professor de Histologia de minha primeira graduação e que veio a se tornar um amigo pessoal durante essa jornada. Sem o qual a parceria NuBEx – Labicone não existiria.

À Profa. Dra. Flávia Almeida Santos pelo auxílio nas análises feitas em parceria e conselhos sobre o trabalho aqui proposto.

Ao Prof. Dr. João José Oliveira Malva, pelos conselhos e auxílio na análise dos resultados encontrados.

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 Profa. Dra. Elisabeth de Francesco Daher, pelos conselhos pessoais e calorosos, além do incentivo nessa etapa de vida; tornando possível uma parceria que, espero, perdurará muito.

Ao amigo Prof. Dr. Márcio Wilker Campelo pelo apoio e amizade dentro e fora do ambiente experimental, me auxiliando a reduzir a preocupação com a saúde de uma pessoa muito querida e me aconselhando muitas vezes mais de forma paterna que profissional.

Enfim, gosto da frase, ‘se vi mais longe, foi por estar sobre os ombros de gigantes’, e fico feliz em dizer que estes foram os ‘gigantes’ que me incentivam e me inspiram nessa jornada.

Aos amigos que fiz durante essa jornada, Leonardo Lobo, Robson Matos e Júlio César, e todas as vezes que trocamos ideias mesmo sem ao menos ter uma ideia.

À amiga Juliana Rego pelos conselhos, paciência e amizade, afinal, “todo dado é um dado!”.

Às colegas Cristhyane Aquino, Lianna Cavalcante, pelo companheirismo de laboratório e pelos bolos.

À colega Ana Flávia Seraíne que muitas vezes trabalhando juntos conseguimos tornar a pesquisa mais leve e tranquila.

Ao amigo Raul Freitas pela ajuda em etapas cruciais da experimentação e de preparação de publicações.

À amiga Carol Benício pela ajuda na parte experimental e em compreender um pouco mais de vários idiomas.

Aos amigos de laboratório, Kildere Canuto, Jardlon Albino, Felipe Moura, José Carlos Rodrigues, Dulci Maria Nascimento, Paulo Iuri Gomes pelo companheirismo.

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

Ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (Procad) da CAPES e o Projeto Pesquisador Visitante (PVE) do CNPq pelo financiamento para realização dessa pesquisa.

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

“Os ventos sopram para o sul, depois viram para o norte; dão voltas e mais voltas e cessam no ponto de partida. Todas as atividades humanas geram cansaço. Nenhum ser humano é capaz de dar uma boa explicação sobre isso. Mas os olhos nunca se saciam de ver, nem os ouvidos de escutar.”

Eclesiastes 1: 6,8 (BKJ)

RESUMO

A intoxicação por metilmercúrio (MeHg) ganhou destaque após desastres de repercussão global como o relatado na Baía de Minamata, Japão. A intoxicação mercurial pode ter ocorrido após desastres ambientais e despejo ilegal de resíduos em mananciais hídricos no Brasil. Apesar dos efeitos neurotóxicos do MeHg serem bem conhecidos na literatura, poucos estudos têm explorado o impacto da exposição do MeHg no hipocampo, cerebelo e fígado em camundongos lactentes. Este trabalho teve como escopo avaliar o impacto da intoxicação por MeHg (20mg/L) em camundongos C57BL6J lactentes, do 4^o ao 18^o dia pós-natal, sendo administrado às matrizes e transferido aos lactentes (MeHg) pelo leite materno e comparar seus efeitos com filhotes cujas matrizes não foram intoxicadas (GC). Foram coletadas amostras de pelo dos lactentes para quantificar a intoxicação pelo MeHg. O delta do peso e o perfil metabólico dos animais foram avaliados, incluindo análises séricas de glicemia, colesterol total e triglicerídeos. O efeito do MeHg no estresse oxidativo no hipocampo, cerebelo e fígado foi avaliado analisando a atividade das enzimas antioxidantes catalase, glutathione peroxidase (GPx), glutathione (GSH), superóxido dismutase (SOD) e peroxidação lipídica (MDA/ TBARS). O efeito neuroinflamatório do MeHg foi avaliado medindo os níveis de IL-1 β , IFN- γ , TNF- α e KC no hipocampo e cerebelo. Os valores de concentração de mercúrio nas amostras de pelo do grupo MeHg mostraram-se 3x mais elevados que em GC, confirmando intoxicação ($p < 0,0001$). A intoxicação mercurial aumentou a glicemia ($p = 0,01$), colesterol total sérico ($p = 0,0003$), atividade das enzimas catalase (hipocampo, $p = 0,0003$, e cerebelo, $p = 0,04$), SOD (hipocampo, $p = 0,0006$, e fígado, $p = 0,0002$) e GPx (hipocampo, $p = 0,005$, e fígado, $p = 0,009$) e das concentrações de GSH (hipocampo, $p = 0,01$) e MDA (hipocampo, $p = 0,01$) quando comparado ao controle. Por sua vez não foi comprovada neuroinflamação associada a esse modelo de intoxicação, tendo IL-1 β , IFN- γ , TNF- α e KC valores semelhantes entre os grupos. Dessa forma, nossos resultados sugerem que a exposição ao MeHg por 14 dias em camundongos lactentes tem um importante efeito deletério em duas regiões do SNC com importante plasticidade pós-natal e acompanhado de alterações metabólicas precoces. Mais estudos são necessários para avaliar se esses efeitos têm repercussão cognitiva e cardiovascular no adulto.

Palavras-chave: metilmercúrio; aleitamento materno; neuroinflamação, estresse oxidativo, metabolismo

ABSTRACT

Methylmercury (MeHg) intoxication was highlighted with global repercussion such as that reported in Minamata Bay, Japan. Mercury poisoning may have occurred following environmental disasters and illegal dumping of waste into water sources in Brazil. Although the neurotoxic effects of MeHg are well-known in the literature, few studies have explored the impact of MeHg exposure to the hippocampus, cerebellum and liver in infants. The objective of this study was to evaluate the impact of MeHg (20mg/L) intoxication in C57BL6J suckling mice, from the 4th to the 18th postnatal days, being administered to the mothers and transferred to the pups through breast milk (MeHg), after, compared with non-intoxicated offspring pups (GC). Hair samples were harvested from pups to quantify MeHg intoxication. The weight delta and the metabolic profile of the animals were evaluated, including serum glucose, total cholesterol and triglycerides. The effect of MeHg on oxidative stress in the hippocampus, cerebellum and liver was evaluated by analyzing the activity of antioxidant enzymes, including catalase, glutathione peroxidase (GPx), glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) and lipid peroxidation (MDA/TBARS). The neuroinflammatory effect of MeHg was measured by assessing levels of IL-1 β , IFN- γ , TNF- α and KC in hippocampus and cerebellum. The levels of mercury concentration in the hair samples were 3x higher in MeHg compared with GC, confirming intoxication ($p < 0.0001$). Mercury intoxication increased serum glucose ($p = 0.01$), total serum cholesterol ($p = 0.0003$), activity of the catalase (hippocampus, $p = 0.0003$, and cerebellum, $p = 0.04$), SOD hippocampus, $p = 0.005$, and liver, $p = 0.009$) and the concentrations of GSH (hippocampus, $p = 0.01$) and MDA (hippocampus, $p = 0.01$) and GPx (hippocampus, $p = 0.01$, and cerebellum, $p = 0.01$) when compared to the controls. In other hand, neuroinflammation was not associated to this intoxication model, IL-1 β , IFN- γ , TNF- α and KC levels were not different between two groups. Altogether, our results suggest that exposure to MeHg for 14 days in suckling mice has an important deleterious effect in two regions of the CNS with important postnatal plasticity accompanied with early metabolic changes. More studies are needed to assess whether these effects have cognitive and cardiovascular repercussions in adulthood.

Keywords: methylmercury; breastfeeding; neuroinflammation, oxidative stress, metabolism

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema da via principal de entrada do MeHg no sistema nervoso central. 23
- Figura 2.** Diagrama dos efeitos citotóxicos do MeHg no sistema nervoso central. 27
- Figura 3.** Mecanismos de neurotoxicidade induzida pelo MeHg em neurônios e células gliais. 28
- Figura 4.** Identificação dos microisoladores contaminados. 39
- Figura 5.** Efeito da intoxicação por MeHg durante 14 dias no ganho de peso ($PN_{\text{final}} - PN_4$) de animais C57BL6J lactentes. 46
- Figura 6.** Efeito da intoxicação por MeHg durante 14 dias na concentração de Hg no pelo de animais C57BL6J lactentes. 47
- Figura 7.** Efeito da intoxicação por MeHg durante 14 dias na glicemia, colesterol total e triglicérides séricos de animais C57BL6J lactentes. 48
- Figura 8.** Ação de enzimas e agentes antioxidantes no hipocampo e cerebelo de camundongos C57BL6J lactentes submetidos à intoxicação por MeHg. 51
- Figura 9.** Níveis de IL1- β , TNF- α , KC e IFN- γ (pg/mg de tecido) em amostras de hipocampo e cerebelo de animais C57BL6J lactentes intoxicados com MeHg. 54
- Figura 10.** Valores da atividade das enzimas anti-oxidantes SOD e GPx, mensuração dos níveis de GSH e MDA em amostras de fígado de animais C57BL6J lactentes submetidos à intoxicação por MeHg. 55

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 , Demonstrativo geral dos valores máximos da concentração de Hg ²⁺ em músculos de peixes carnívoros no litoral do Ceará, no período de 2006-2016.	22
Tabela 1 . Demonstrativo dos grupos utilizados, período de experimentação e número de filhotes	35
Tabela 2 . Valores médios encontrados para o delta de ganho de peso, concentração de Hg no pelo, glicemia, colesterol total e triglicérides em animais submetidos à intoxicação por MeHg em leite materno quando comparados com um controle não intoxicado.	49
Tabela 3 . Atividade antioxidante nos tecidos hipocampal e cerebelar em animais C57BL6J submetidos à intoxicação por MeHg em leite materno quando comparados com um controle não intoxicado.	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(CH₃)₂Hg – dimetilmercúrio

µg – micrograma

ABCC2 – transportadores de membrana de influxo

ABESO – Associação Brasileira de Sobrepeso e Obesidade

ALT - alanina aminotransaminase

ANA – Agência Nacional de Águas

AST - aspartato aminotransaminase

ATP – trifosfato de adenosina

Bax - Proteína X associado a bcl-2

Bcl2- células B de linfoma 2

BHC – barreira hematoencefálica

Ca²⁺ - íon cálcio

CAT – catalase

CEUA – Comitê de Ética para Uso Animal

CH₃Hg⁺ - metilmercúrio

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

COX 2- ciclo oxigenase 2

Cys – cisteína

D2R - receptor cerebral de dopamina 2

EROs – espécies reativas de oxigênio

FATP1 - transportador de ácidos graxos 1

g – grama

GABA - ácido gama-aminobutírico

GFAP – proteína ácida gliofibrilar

GGT - gama glutamil transpeptidase

GLUT3 – transportador de glicose 3

GPx1 - glutationala peroxidase 1

GR - glutationala redutase

GSH - glutationala reduzida

GSSG - glutationala oxidada

H₂O₂ - peroxido de hidrogênio

Hg- elemento químico mercúrio

Hg⁰ – mercúrio elementar

Hg²⁺ - íon mercúrico

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

KC – quimiocina derivada de queratinócito

IL-10 – interleucina-10

IL1-β – interleucina 1-β

IL-4 – interleucina-4

IL-6 – interleucina-6

iNOS – óxido nítrico sintetase induzida

IP₃ - fosfatidil inositol 3

IRS1 - receptor de substrato de insulina 1

K⁺ - íon potássio

Keap1 – proteína 1 associada a ECH-Kelch símile

kg – kilograma

L – litro

LAT 1 - Aminoácido L Transportador

MDA – malondialdeído

MeHg – metilmercúrio

MPO – mieloperoxidase

MRPs - proteínas de resistência múltipla a fármacos

Na⁺ - íon sódio

NF-κB - fator nuclear-kappa B

ng – nanograma

NMDA - N-metil D-Aspartato

Nmol – nanomol

Nrf2 –fator 2 relacionado a fator nuclear eritróide

OAT 1 – transportador de ânions orgânicos 1

PA – pressão arterial

PLA2 - fosfolipase A2

PN – pós-natal

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD – superóxido dismutase

TGI - trato gastrointestinal

TLR4 – receptor do tipo *Toll-4*

TNF-α – fator de necrose tumoral α

TUNEL – método de marcação de “nicks” por dUTP e desoxinucleotidil transferase terminal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Contaminação Ambiental pelo Mercúrio	18
1.1.1. <i>Contaminação por mercúrio em peixes da orla cearense</i>	20
1.2. Metabolismo e neurotoxicidade do metilmercúrio	22
1.2.1. <i>Toxicidade do metilmercúrio no hipocampo</i>	28
1.2.2. <i>Toxicidade do metilmercúrio no cerebelo</i>	30
1.3. Alterações metabólicas e hepatotoxicidade do metilmercúrio	31
2. JUSTIFICATIVA	33
3. OBJETIVOS	34
3.1. Objetivos Gerais	34
3.2. Objetivos Específicos	34
4. METODOS	35
4.1. Experimentação em animais	35
4.1.1. <i>Protocolo de intoxicação com mercúrio</i>	36
4.2. Manejo e descarte de material contaminado	37
4.3. Quantificação do mercúrio presente no pelo dos animais	39
4.4. Avaliação do perfil metabólico	41
4.5. Avaliação do estresse oxidativo em amostras de hipocampo, cerebelo e fígado	41
4.5.1. <i>Atividade da enzima catalase (CAT)</i>	41

4.5.2. Ensaio enzimático da superóxido dismutase (SOD)	41
4.5.3. Ensaio da glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona reduzida (GSH)	42
4.5.4. Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA)	43
4.6. Quantificação de citocinas pró-inflamatórias em hipocampo e cerebelo	43
4.7. Equipamentos e Materiais	43
4.8. Reagentes e soluções	45
4.9. Análise estatística	45
5. RESULTADOS	46
5.1. Avaliação do peso corporal	46
5.2. Quantificação de mercúrio no pelo dos animais	46
5.3. Avaliação do perfil metabólico dos animais	47
5.4. Avaliação do estresse oxidativo no hipocampo e cerebelo	49
5.4.1. Catalase	49
5.4.2. Glutaciona reduzida (GSH)	49
5.4.3. Superóxido Dismutase (SOD)	50
5.4.4. Malondialdeído (MDA)	50
5.4.5. Glutaciona Peroxidase (GPx)	50
5.5. Quantificação de citocinas no hipocampo e cerebelo	53
5.5.1. Interleucina-1 beta (IL-1 β)	53

<i>5.5.2. Fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α)</i>	53
<i>5.5.3. Quimiocina de queratinócito (KC)</i>	53
<i>5.5.4. Interferon-gama (IFN-γ)</i>	53
5.6. Avaliação do estresse oxidativo induzido por MeHg no tecido hepático	55
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXO I	81

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contaminação ambiental pelo mercúrio

O elemento químico mercúrio (Hg^{2+}) é um metal pesado (peso atômico 80) que pode se acumular no ambiente a partir de fontes naturais e antrópicas. As formas naturais ocorrem em erupções vulcânicas e evaporação dos cristais de mercúrio elementar. As mais comuns formas antrópicas de poluição são a queima de combustíveis fósseis, incineração de lixo, produção de acetaldeído, pesticidas, fungicidas, bem como a extração de ouro (CHÉTELAT et al., 2018). O mercúrio se apresenta na natureza tanto na forma inorgânica como orgânica. As formas inorgânicas incluem o Hg elementar (Hg^0), íon mercúrico (Hg^{2+}) e os sais de mercúrio (HgCl_2 e Hg_2Cl_2). As formas orgânicas mais comuns do mercúrio ocorrem devido ao processo de metilação do Hg^{2+} , com a formação dos compostos de metilmercúrio (CH_3Hg^+) e dimetilmercúrio [$(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$]. Esses compostos são capazes de se ligar com grupos sulfídricos e seleniol das proteínas, facilitando sua absorção por organismos vivos (MOREL, KRAEPIEL, AMYOT, 1998).

Após o depósito do mercúrio no leito de rios e oceanos, o mercúrio é metabolizado por bactérias localizadas nas algas e microorganismos formando os compostos metilados, organocompostos. Esses compostos são absorvidos por algas e plantas aquáticas e consumidos por peixes e outros animais, entrando, por conseguinte na alimentação humana (CANELA, 1995). É sabido também que a maior fonte de contaminação mercurial humana se dá pelo consumo de peixes e crustáceos com altos níveis de mercúrio (DEBES et al., 2006).

Em 19 de janeiro de 2013, ocorria a Convenção de Minamata, tendo como objetivo proteger o meio ambiente de emissões e liberações antropogênicas de mercúrio e compostos de mercúrio. Melhorando as técnicas disponíveis e as práticas ambientais para reduzir a emissão de mercúrio ao ambiente. No Brasil a Convenção de Minamata foi outorgada pelo Decreto 9.740 de 2018, trazendo à legislação nacional obrigação de maior controle sobre as emissões de mercúrio

ao ambiente, além da obrigação de retirar de circulação os produtos contendo mercúrio em sua composição (PNUMA, 2013; BRASIL, 2018).

Desde os anos 80, no Brasil, ocorre um aumento dos casos de intoxicação por mercúrio devido ao aumento das atividades de garimpagem. Esta atividade é uma das principais fontes antrópicas de contaminação (o mercúrio é utilizado pelos garimpeiros para identificar o ouro). A garimpagem do ouro é uma atividade endêmica na região amazônica, com isso, a contaminação por mercúrio afeta principalmente as populações ribeirinhas (BERZAS NEVADO et al., 2010).

Recentemente, em 2015, os mananciais do Rio Doce e Rio do Carmo, Mariana, Minas Gerais, receberam detritos tóxicos do rompimento da barragem de Rejeito, que estava sob a responsabilidade da empresa Samarco. O acompanhamento feito pelas autoridades responsáveis demonstrou um aumento na concentração de Hg^{2+} total na área de Rio Gualaxo do Norte, de 0,2 $\mu g/L$ em novembro de 2015 e de 0,51 $\mu g/L$ em janeiro de 2016 (ESTADUAL; AMBIENTE, 2017), valores considerados inadequados para consumo, abastecimento domiciliar ou criação de peixes, conforme estabelece a resolução 357/2005, do CONAMA, alterada pelas resoluções 410/2009 e 430/2011. Essa última regula que a concentração máxima de Hg para águas doces é de 0,2 $\mu g/L$.

Outra forma de contaminação por mercúrio em rios é o despejo de resíduos de amálgama oriundos de consultórios dentários, além de rejeitos industriais (BURGER CHAKRABORTY et al., 2013).

Além da contaminação dos mananciais de água doce, existem indícios de que haja contaminação também na orla das cidades pelo despejo ilegal de resíduos. O desastre da baía de Minamata, Japão, ocorrido entre 1950 e 1960, foi um bom exemplo do risco da intoxicação mercurial dos oceanos, devido à instalação de indústrias próximas à orla. Neste caso, uma empresa produtora de acetaldeído e PVC, ligada à Corporação Chisso, derramou na baía dejetos contendo mercúrio e gerou a intoxicação da população daquela localidade e de sua circunvizinhança. O desastre inicialmente foi caracterizado como uma doença não catalogada, denominada de Síndrome de Minamata. Com o avançar

das investigações, pesquisadores da Universidade de Kumamoto perceberam que, na verdade, se tratava de uma contaminação em massa por mercúrio. Até 20 anos após o desastre, seus efeitos, incluindo más formações fetais, retardo mental e paralisia corporal, ainda eram percebidos na população e relacionados como oriundos do desastre (HARADA, 1995; BOISCHIO, 2015; O'MALLEY, 2017).

Na opinião de um pesquisador contemporâneo ao incidente, Yasuko Tanaka, a intoxicação ficou real quando 'gatos domésticos se transformaram em demônios', segundo relato do mesmo. Antes de se iniciarem as consequências em humanos, esses animais passaram a ter um comportamento diferente, se mostrando hiperativos e agressivos. Posteriormente iniciaram os sintomas em humanos, como tremores nas mãos, visão turva e debilidade cognitiva (WATTS, 2001; YE et al., 2016).

Os níveis de mercúrio considerados limítrofes não tóxicos, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em humanos são de 8 µg/L, no sangue, e de 2 µg/g, nos cabelos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990). Por sua vez, a Academia Nacional de Ciências Norte Americana considera que esses valores limites são 5 µg/L, no sangue, e de 1 µg/g, no cabelo. (NATIONAL RESEARCH COUNCIL (U.S.). COMMITTEE ON THE TOXICOLOGICAL EFFECTS OF METHYLMERCURY., 2000).

1.1.1. Contaminação por mercúrio em peixes da orla cearense

Segundo a OMS, o consumo ideal de peixe por habitante é de 12kg/habitante/ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990). No Brasil, segundo o Ministério da Agricultura, houve aumento no consumo de peixes no período de 2008-2009, quando comparado com o consumo anterior, com aumento de 7,9%, com média de 9kg/ habitante/ ano. No período de 2009-2010, houve um novo aumento, de 23,7%. No ano de 2017 se manteve em 10kg/ habitante/ ano, um pouco abaixo da média preconizada pela OMS, e abaixo da média global de consumo, 20kg/ habitante/ ano.

Dados de 2010 apontam que o estado do Ceará figurou em 4º lugar na produção de pescado no país, com 92,2 mil toneladas, ficando atrás de Santa Catarina, 183,7 mil toneladas, Pará, com 143 mil toneladas e Bahia, com 114,5 mil toneladas (Ministério da Agricultura, Brasil).

No Brasil a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), ligada ao Ministério da Agricultura, estabelece na Resolução 42/2013 uma faixa de concentrações mercuriais limítrofes em peixes para consumo humano que varia de 0,5 µg/g a 1 µg/g de tecido muscular (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013).

Estudos recentes do Instituto de Ciências do Mar, da Universidade Federal do Ceará, têm documentado a concentração de mercúrio em alguns peixes do litoral cearense (**Quadro 1**). Os peixes analisados foram o *Scomberomorus cavala* (cavala) e *Scomberomorus brasiliensis* (serra), mais comumente conhecidos como cavala e serra, respectivamente. As concentrações de mercúrio tiveram uma elevação de 2006 a 2009, e se mantiveram no mesmo patamar do período seguinte, de 2009 a 2016. Estes peixes foram usados como referência por serem animais piscívoros, acumulando maior quantidade de metais pesados em seus tecidos, por biomagnificação, além de terem grande procura para consumo humano (BRAGA, 2006; LACERDA, MALM, MALM, 2008; COSTA, LACERDA, 2009;)

Com os dados apresentados por Costa *et al*, 2009, foi possível identificar níveis acima dos valores recomendados máximos (1 µg/g) em alguns exemplares de cavala, alcançando valores de 1,7 µg/g. Segundo legislação brasileira vigente, esse fato merece atenção das autoridades sanitárias (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013).

Quadro 1. Demonstrativo geral dos valores máximos da concentração de Hg^{2+} em músculos de peixes carnívoros no litoral do Ceará, no período de 2006-2016.

	Tamanho (cm)	Concentração de Hg^{2+} no músculo (ug/g peso molhado)	Referência
<i>Scomberomorus cavala</i> (cavala)	127,00	1,737	(DE LACERDA, L. et al, 2016)
	126,60	1,736	(COSTA & LACERDA, 2009)
	70,00	0,151	(BRAGA, 2006)
<i>Scomberomorus brasiliensis</i> (serra)	88,00	0,497	(DE LACERDA, L. et al, 2016)
	88,00	0,497	(COSTA & LACERDA, 2009)
	67,00	0,646	(BRAGA, 2006)

1.2. Metabolismo e neurotoxicidade do metilmercúrio

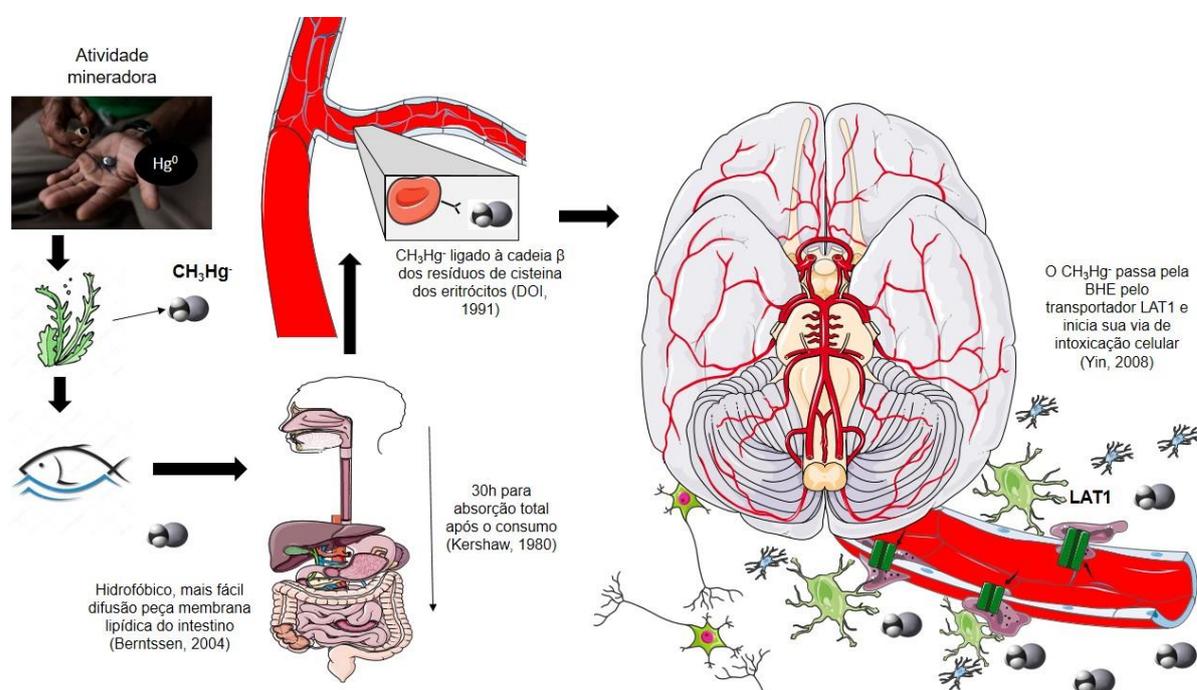
A absorção do metilmercúrio (MeHg) em humanos acontece, principalmente, ao nível do trato gastrointestinal (TGI). Cerca de 30 horas após o consumo de dieta contaminada o agente intoxicante chega à corrente sanguínea. Sua alta mobilidade no organismo deve-se a sua ligação à cisteína formando um complexo que mimetiza a metionina (MeHg-Cisteína), deste modo entrando nas células por uso de carreadores de aminoácidos (KERSHAW, DHAHIR, CLARKSON, 1980; CLARKSON, VYAS, BALLATORI, 2007; FARINA, ROCHA, ASCHNER, 2011) .

MeHg-cisteína, semelhante a metionina, é livremente transportada pelos astrócitos, componentes da barreira hemato-encefálica (BHE), dos vasos cerebrais. Esse transporte se dá pela transportador de L-aminoácidos 1 (LAT1) presente naquelas células da BHE. E uma vez no tecido cerebral, é levado ao interior de neurônios e células gliais pelo mesmo transportador (NI et al., 2012). Porém, segundo Charleston *et al*, 1994, o MeHg se concentra principalmente em astrócitos e micróglia e de forma menos intensa nos neurônios, oligodendrócitos e células endoteliais (CHARLESTON et al., 1994).

O MeHg é aparentemente eliminado do citoplasma se ligando a moléculas de GSH, formando o complexo $GSHgCH_3$, e sendo transportado para o meio

extracelular pelas proteínas de resistência múltipla a fármacos (MRPs) (RUSH et al., 2012). O MeHg é ligado à bile ou à urina, sendo captado por transportadores de ânions orgânicos 1 (OAT 1) das células epiteliais e incorporado à urina ou bile pelos transportadores apicais de proteínas de resistência múltipla a fármacos 2 (MRP2) (MADEJCZYK et al., 2007; PRINCE et al., 2014).

Figura 1. Esquema da via principal de entrada do MeHg no sistema nervoso central.



Com a atividade mineradora, o Hg é despejado no leito dos rios e oceanos. O Hg pode ser metabolizado por bactérias presentes em algas, gerando MeHg. O peixe se contamina com consumo de algas contendo MeHg, sendo posteriormente biomagnificado pela cadeia predatória de peixes, aumentando o risco de intoxicação em humanos. Após o consumo do peixe contaminado, o MeHg é absorvido no TGI, alcançando a corrente sanguínea, alcançando o SNC através do transportador LAT1 ao nível da BHE até a célula alvo, incluindo astrócitos, neurônios e micróglia. Figura desenvolvida com base nos artigos de Doi, Kershaw, Berntssen e Yin (KERSHAW; DHAHIR; CLARKSON, 1980; DOI, 1991; BERNTSSEN et al., 2004; YIN et al., 2008).

Fonte: própria

Em humanos a maior concentração de mercúrio encontrada no tecido cerebral foi de 0,19 mgHg/kg (FALNOGA et al., 2000), e de 0,18 mg/kg no córtex cerebral (BJÖRKMAN et al., 2007). Morris, et al, 2016, encontraram valores de

0,46ug/g em cérebros autopsiados de idosos, não estando correlacionados com o aparecimento de neuropatias cerebrais (MORRIS et al., 2016). O MeHg está envolvido com vários processos celulares, indução de estresse oxidativo, redução da concentração de glutathione, aumento do dano mitocondrial e inibição da via do fator nuclear-kappa B (NF-κB) (CARICCIO et al., 2019).

Uma vez no tecido cerebral, os níveis de MeHg aumentam rapidamente em células microgliciais, excedendo os níveis encontrados nos astrócitos e neurônios (GARG, CHANG, 2006b). O MeHg interage com a mitocôndria das células contaminadas inibindo a cadeia transportadora de elétrons e reduzindo o potencial de membrana, com aumento do influxo de K^+ , induzindo despolarização. Essas alterações levam a liberação de citocromo C e espécies reativas de oxigênio (EROs) das mitocôndrias (de células microgliciais) (LIMKE, ATCHISON, 2002; GARG, CHANG, 2006a).

A disfunção mitocondrial, com alteração da permeabilidade de sua membrana, desencadeia uma lenta inibição da glicólise, que depleta a produção de ATP, estimulando vias inflamatórias mediadas pelo NF-κB e aumentando a ativação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), levando a necrose e morte celular (BROWN, 2010).

A superexpressão dos receptores NMDA ocasiona aumento do influxo de Ca^{2+} e Na^+ , elevando os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (EROs), além de ativar a via de apoptose celular, conhecida como via das caspases (ALLEN, SHANKER, ASCHNER, 2001; MORI, YASUTAKE, HIRAYAMA, 2007). Os níveis elevados de Ca^{2+} por sua vez aumentam a exocitose das vesículas sinápticas, conseqüentemente aumentando os níveis de glutamato extracelular (LIU et al., 2014).

Nos neurônios, o MeHg leva à agregação dos ribossomos, à perda do retículo endoplasmático e conseqüente morte celular. Também tem efeito antimitótico, inibindo a polimerização da tubulina, a formação de microtúbulos e a síntese e reparo do DNA/RNA (MIURA et al., 1999). O MeHg também desregula a homeostase do Ca^{2+} e altera a secreção de dopamina, glutamato,

ácido gama-aminobutírico (GABA), acetilcolina e aumenta a expressão de EROs (ASCHNER et al., 1993; YUAN, ATCHISON, 1997; ALLEN, SHANKER, ASCHNER, 2001). Neurônios cultivados sem a presença de glutamato não sofreram danos relacionados à intoxicação por MeHg (BROOKES, 1992). Porém, o MeHg afeta astrócitos no que tange à recaptação de glutamato e seus precursores (DAVE et al., 1994).

Como ocorre uma redução na formação da glutatona nos astrócitos e micróglia, tem-se também uma diminuição na oferta de GSH no corpo neuronal, pois os astrócitos são os responsáveis por captar cisteína e formar glutatona, levando-a ao neurônio posteriormente (SAGARA, MIURA, BANNAI, 1993a, 1993b; DRINGEN, PFEIFFER, HAMPRECHT, 1999; ALLEN, SHANKER, ASCHNER, 2001; WANG, CYNADER, 2002).

A formação reduzida de GSH, associada à ligação promovida pelo MeHg gerando GSHgCH_3 , tem relação com a inibição do transportador X_C , transportador de cisteína e glutamato (BANNAI, 1984; TAKADA, BANNAI, 1984; RUSH et al., 2012). Estudos como o de Allen (2001) sugerem uma relação inibitória nos outros transportadores, X_{AG} e gama glutamil transpeptidase (GGT). Desses transportadores, estão presentes nos neurônios o GGT e X_{AG} , determinando a redução do influxo de cisteína também nessa célula (ALLEN; SHANKER; ASCHNER, 2001). O MeHg também age inibindo três canais de captação de cistina, GGT, X_{AG} , X_C , levando à redução da síntese de GSH (glutatona reduzida), dessa forma aumentando os níveis de EROS (ALLEN et al., 2002; ASCHNER et al., 2000) (**Figura 2**).

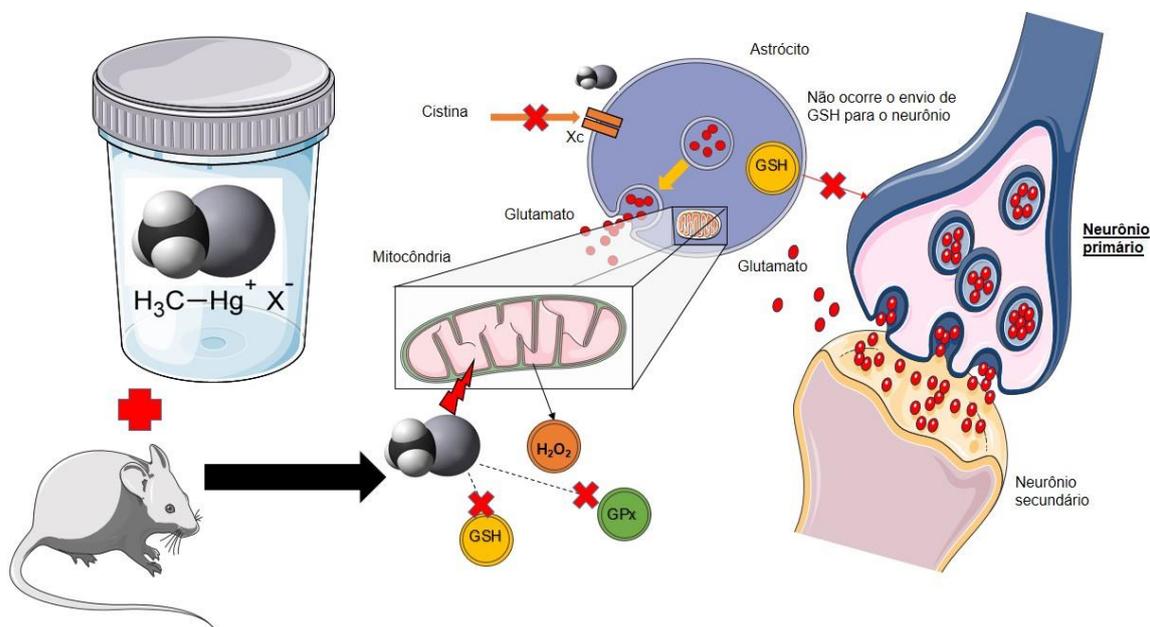
O GSH também exerce papel importante na neutralização dos EROS, se combinando com estes e formando sua forma oxidada, através da enzima glutatona redutase (GR), a glutatona oxidada (GSSG). Porém esse mecanismo se mostra prejudicado em vista da ativação dos canais de captação de cistina, aumentando a formação de EROs, ocasionando a elevação dos níveis de Na^+ e Ca^{2+} intracelular, acarretando a síntese de óxido nítrico (NO) e levando a uma inibição da enzima antioxidante glutatona peroxidase 1 (GPx-1), o que aumenta

os níveis de EROs pela redução da degradação de peróxido (ASCHNER et al., 1993; FRANCO et al., 2009b).

Além de reduzir os efeitos citotóxicos induzidos pelo MeHg, o GSH também se liga à molécula de MeHg pela cistina presente em sua composição e forma o composto GSHgCH₃, que é carreado para fora das células microgliais e astrocitárias, através das proteínas de membrana chamadas de MRPs (proteínas multidrogas resistentes) (NI et al., 2012).

Os baixos níveis de GSH induzidos pela baixa captação de cistina e a grande demanda gerada pela toxicidade do MeHg levam a baixos níveis do grupamento tiol. A alta afinidade do Hg²⁺ pelos grupos seleniol faz com que este se ligue a enzimas como o GPx, reduzindo sua forma livre e, portanto aumentando as concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (ALLEN, SHANKER, ASCHNER, 2001; SANTOS ALCÁNTARA, 2005; FRANCO et al., 2009b; LU, HOLMGREN, 2009).

Figura 2. Diagrama dos efeitos citotóxicos do MeHg no sistema nervoso central

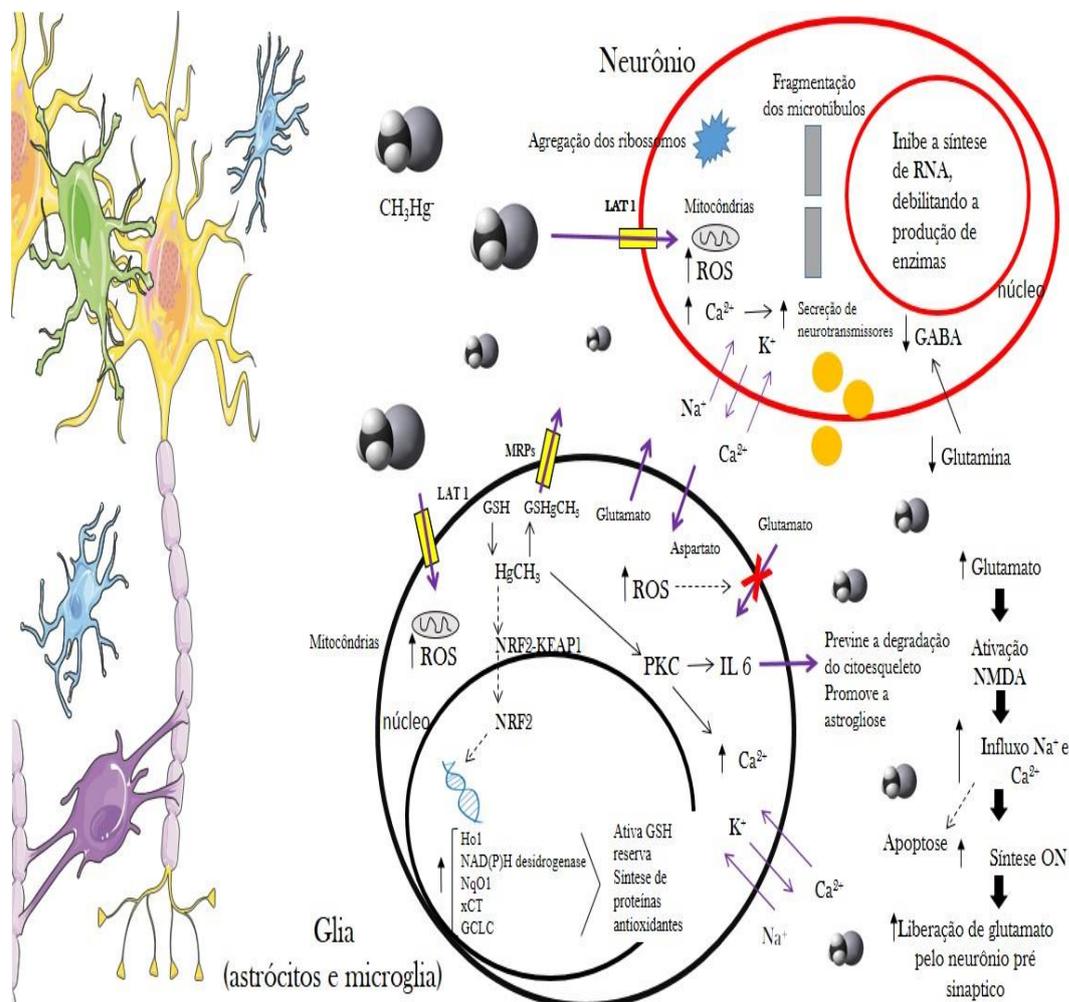


Após a intoxicação pelo MeHg existe uma forte ação sobre as mitocôndrias, elevando os níveis de EROS e aumentando a excitotoxicidade. O MeHg (CH_3Hg^+) ao ser ingerido pelos animais é absorvido no TGI e levado ao meio extracelular do tecido cerebral e internalizado pelas células lá presentes. Ao entrar no citosol astrocitário inibe o transportador Xc, captador de cistina, o que leva a um prejuízo na formação da molécula de GSH, reduzindo o envio dessa molécula às células neuronais. Ao mesmo tempo, gera dano na membrana celular mitocondrial e interrompe a cadeia de e^- , o que leva ao aumento na produção de H_2O_2 . Em outra via, ele se liga a um grupamento tiol de GPx reduzindo a ação da enzima. Ao alterar o balanço de EROS intracelular, ocorre um aumento no influxo de Ca^{2+} , aumentando a excreção de glutamato, o que leva a uma superexcitação dos receptores NMDA pelo acúmulo desse receptor nas fendas sinápticas, levando a um estado de excitotoxicidade (MORI, YASUTAKE, HIRAYAMA, 2007; RUSH et al., 2012).

Fonte: própria

O aumento nos níveis de EROS leva a oxidação da ligação do fator-2 relacionado a fator nuclear eritroide (Nrf-2) com proteína 1 associada a ECH-Kelch símile (Keap1, fator associado à regulação dos níveis citoplasmáticos de Nrf-2), aumentando os níveis citoplasmáticos de Nrf2 (LI et al., 2012), que transloca para o núcleo, induzindo a formação de GSH (KENSLER, WAKABAYASHI, 2010) (**Figura 3**).

Figura 3. Mecanismos de neurotoxicidade induzida pelo MeHg em neurônios e células gliais.



O CH_3Hg é transportado para o interior de neurônios e células da glia pelo transportador LAT1. Nos neurônios o agente intoxicante promove a agregação mitocondrial e fragmentação dos microtúbulos, ao chegar no núcleo celular ele inibe a síntese de RNA, debilitando a produção de enzimas. Na mitocôndria ele promove uma desordem na cadeia de produção de elétrons, aumentando a produção de EROS e com isso aumentando a entrada de Ca^{2+} e induzindo à ativação das vias das caspases, devido a uma desregulação na entrada de Na^+ e K^+ . Com o aumento nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} ocorre uma maior secreção de glutamato, gerando uma excitotoxicidade dos receptores NMDA quando somada à grande secreção astrocitária de glutamato. Por sua vez nas células gliais além dos danos na parede mitocondrial, há, com o aumento nas concentrações de EROS no meio intracelular, uma dissociação de duas proteínas ligadas à regulação do metabolismo REDOX, Keap1-NRF2, induzindo a transcrição de enzimas antioxidantes.

Fonte própria

1.2.1. Toxicidade do metilmercúrio no hipocampo

A toxicidade do MeHg no tecido hipocampal é bem documentada na literatura. Os danos induzidos pelo organo-metal são causados principalmente

pela produção excessiva de EROS. Fujimura e Usuki, 2017, administraram 1,5mg/dia de MeHg (água de beber) em camundongos jovens. Os autores encontraram que no hipocampo a atividade da SOD aumentou de acordo com o tempo de intoxicação até a 4ª semana, onde houve redução da atividade da enzima. Por sua vez a atividade da GPx foi reduzida nas semanas 6 e 8 e, ao mesmo tempo, verificou-se aumento da atividade da catalase (FUJIMURA, USUKI, 2017).

O aumento na concentração intracelular EROS está associado com a ruptura da membrana mitocondrial. Estudo de Sokolowsky *et al*, 2011, demonstrou que em animais com 4 dias de nascidos a dose única de 0,6 mg/kg foi suficiente para elevar a quantidade de células imunomarcadas para capase-3 no hipocampo, substrato final da ativação da apoptose celular (SOKOLOWSKI *et al.*, 2011).

No mesmo trabalho de Sokolowsky *et al*, 2011, foi verificado ainda que a dose única de 5mg/kg promoveu aumento da expressão de proteínas ligadas à cascata de apoptose, incluindo a Bcl-2 associado à proteína X (Bax), citocromo C, caspase 9 e caspases 8 e 3, após a exposição pelo MeHg (SOKOLOWSKI *et al.*, 2011).

Bax é uma proteína de membrana da mitocôndria, que ao se ligar com elementos pró-apoptóticos facilita a translocação do citocromo C da mitocôndria para o citosol (DE GIORGI *et al.*, 2002). Uma vez no citosol, o citocromo C se liga a uma holoenzima, apoptossomo, que cliva a caspase 9 (GREEN, KROEMER, 2004). A clivagem das caspases 8 e 9 está diretamente relacionada à ativação da caspase 3, elemento responsável pela apoptose celular. A ativação da caspase 3 também foi percebida como mecanismo indutor importante na apoptose celular em cérebros em desenvolvimento (KUIDA *et al.*, 1998).

Falluel-Morel *et al*, 2007, demonstraram perda de neurônios no giro denteado do hipocampo de animais recém-nascidos que receberam doses intraperitoneais de 5mg/kg de MeHg. Essa perda foi caracterizada pela redução em mais de 50% na síntese de DNA de neurônios, com consequente redução da

neurogênese, verificada pela técnica de imunomarcação por BrdU. Essa redução encontrada refletiu na redução das áreas de CA-1-3 do hipocampo (FALLUEL-MOREL et al., 2007).

1.2.2. Toxicidade do metilmercúrio no cerebelo

Ataxia, perda do controle muscular ou mesmo de equilíbrio, é um dos sintomas atribuído à intoxicação por MeHg. Dados observados em cadáveres autopsiados revelaram estágio de degeneração cerebelar em alguns casos oriundos do desastre de Minamata (TAKEUCHI, 1968; TAKEUCHI, 1982; MACEDO-JÚNIOR et al., 2017; HEIMFARTH et al., 2018).

Christinal e Sumathi, 2013, ao intoxicar ratos de 6 semanas com 5mg/kg de MeHg por 21 dias, perceberam aumento da imobilidade no teste de suspensão pela cauda, além de reduzido comportamento em campo aberto (CHRISTINAL, SUMATHI, 2013). Além disso, a resposta no teste de resposta do movimento de cauda (*tail flick response*) foi aumentada. Zhao *et al*, 2014, ao intoxicar ratas, com 2 ppm de MeHg na água de beber, do 6º dia gestacional ao 21º dia de aleitamento, não observaram prejuízo motor no rotarod. Os resultados de reflexo de postura (*righting reflex*), recuo do precipício (*cliff avoidance*), geotaxia negativa (*negative geotaxis*) e labirinto aquático de Morris não apresentaram diferença quando comparados aos animais controles (ZHAO et al., 2014). Esta discrepância de resultados pode estar associada à idade dos animais e à diferente concentração de MeHg administrada pelos pesquisadores.

Na avaliação histopatológica realizada no estudo de Christinal e Sumathi 2013, houve redução na contagem de neurônios de Purkinje da camada de Purkinje, além de alterações na estrutura de astrócitos presentes. Também foi apresentada redução na síntese de DNA na área avaliada (CHRISTINAL, SUMATHI, 2013). De forma bastante semelhante à comparação exposta acima, Fujimura, Cheng e Zhao, 2012, ao intoxicar ratos do 1º dia gestacional ao 21º dia de aleitamento, com dose de 5ppm de MeHg, não observaram aumento da expressão da proteína ácido gliofibrilar (GFAP) ou da apoptose no ensaio de

TUNEL, sugerindo que as doses testadas de MeHg não foram suficientes para gerar alterações neuropatológicas, apesar de verificarem prejuízo motor no rotarod e labirinto em Y (*Y maze test*). Esses autores também demonstraram que 15 dias após o final do protocolo de intoxicação de 21 dias, o cerebelo ($0,08 \pm 0,01\text{ppm}$) apresentou menor concentração de MeHg que o hipocampo ($0,11 \pm 0,01\text{ppm}$) (FUJIMURA, CHENG, ZHAO, 2012a).

Zhao *et al*, 2014, não observaram alterações na atividade das enzimas SOD e GPx, bem como das concentrações de GSH no cerebelo, entretanto no hipocampo os valores de GSH foram menores após a intoxicação com MeHg (ZHAO *et al.*, 2014).

No estudo conduzido por Zemolin *et al*, 2012, onde foi administrado 40mg/L de MeHg por 21 dias a camundongos jovens, observou-se redução na atividade de GPx e aumento na atividade de GR, catalase e SOD no cerebelo. Esses autores também documentaram a redução dos níveis de GPx-1 e GPx-4, localizada na membrana mitocondrial, das células cerebelares (ZEMOLIN *et al.*, 2012).

Semelhantemente ao já observado no hipocampo, o efeito neurotóxico a nível do cerebelo é associado ao dano na parede mitocondrial. A peroxidação lipídica parece afetar os níveis de glutathiona peroxidase (CONRAD *et al.*, 2007). No tecido cerebelar ocorre ainda uma menor concentração de GSH e maior consumo de oxigênio pelas mitocôndrias, fato que torna o tecido susceptível a danos associados ao balanço oxidativo com aumento dos níveis de EROS (MORI, YASUTAKE, HIRAYAMA, 2007).

1.3. Alterações metabólicas e hepatotoxicidade do metilmercúrio

A ação do MeHg nos hepatócitos se assemelha em parte ao mecanismo de neurotoxicidade verificado no tecido cerebral. Reduzindo os níveis de GSH e inativando a enzima GPx. Porém, como verificado por Bragadin *et al*, 2002, o MeHg promove um aumento na permeabilidade da membrana mitocondrial das

células hepáticas, sendo visto como mecanismo importante indutor da apoptose (BRAGADIN et al., 2002).

Mela e colaboradores, 2007, avaliaram o efeito da intoxicação por MeHg (0.075 µg/g, por 5 dias) na histologia do fígado de peixes. Onde foi percebida a presença de áreas de necrose, condizentes com o fato de que o mercúrio induz um aumento na produção de EROs e consequente dano celular (MELA et al., 2007). O dano e morte dos hepatócitos se relacionam também ao prejuízo no metabolismo lipídico desses animais (ARELLANO, STORCH, SARASQUETE, 1999; ROOS et al., 2011).

Também foi percebido no estudo de Joshi *et al* aumento nos níveis de colesterol em ratos adultos que receberam MeHg (1mg/kg, 5 dias por semana, 12 semanas), relacionou-se esse achado ao acúmulo de triglicerídeos induzido pela morte dos hepatócitos. Encontrou-se também a redução de GSH e GPx, bem como maior concentração de Hg no fígado que no tecido cerebral (JOSHI et al., 2014).

Em outro estudo, Macedo-Junior *et al*, 2017, documentaram, em camundongos adultos intoxicados com MeHg (40mg/L) pela água de beber durante 14 dias, níveis séricos elevados de colesterol total, colesterol não-HDL e das enzimas aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT), demonstrando alteração no metabolismo hepático (MACEDO-JÚNIOR et al., 2017).

A ação do MeHg no fígado e cerebelo também foi verificada quanto à produção de EROS pelas mitocôndrias. Houve maior produção de EROS nas mitocôndrias de células cerebelares, porém maior atividade de SOD e GPx no tecido hepático (MORI, YASUTAKE, HIRAYAMA, 2007).

1. JUSTIFICATIVA

A intoxicação pela forma metilada do Hg veio ao conhecimento do grande público brasileiro inicialmente pelos garimpos ilegais na região Amazônica. Recentemente após o desastre ocorrido em Minas Gerais o assunto da contaminação ambiental ganhou novamente destaque com o despejo de toneladas de detritos no leito do Rio Doce. Especialistas afirmam que os efeitos desse desastre só serão percebidos em décadas. Em outra região do país, no Nordeste Brasileiro, pesquisadores encontraram níveis elevados de Hg em músculo de peixes vendidos em um popular mercado público.

Apesar do efeito neurotóxico do metilmercúrio ser bem conhecido na literatura, poucos estudos têm se debruçado sobre os efeitos do metilmercúrio no estresse oxidativo e em marcadores neuroinflamatórios no hipocampo e cerebelo, duas regiões do sistema nervoso central, com um forte componente de plasticidade pós-natal, além de alterações metabólicas em camundongos no período do aleitamento materno (que ocorre nas duas primeiras semanas pós-natais em camundongos).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da intoxicação induzida por MeHg no estresse oxidativo e marcadores inflamatórios do hipocampo e cerebelo, além de alterações metabólicas nos filhotes (C57BL/6J) que foram intoxicados através do leite materno, após suas matrizes terem recebido 20 mg/L de MeHg na água de beber por 14 dias.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar se a exposição ao MeHg alterou o ganho de peso dos animais.
- Avaliar a concentração de MeHg no pelo dos animais intoxicados.
- Analisar níveis de glicose, colesterol e triglicérides no soro após intoxicação mercurial.
- Avaliar as concentrações de glutathione, atividade das enzimas antioxidantes, incluindo glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase e peroxidação lipídica em amostras de hipocampo, cerebelo e fígado após intoxicação mercurial.
- Analisar os níveis de interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), quimiocina de queratinócito (KC) e interleucina-1 beta (IL-1 β), em amostras de hipocampo e cerebelo após intoxicação mercurial.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Experimentação em animais

Foram utilizados oitenta (100) camundongos C57BL6J, incluindo fêmeas e machos (reprodutores) e filhotes provenientes do biotério central do Núcleo de Experimentação Animal (NUBEX) da Universidade de Fortaleza (UNIFOR), protocolo de aprovação no Comitê de Ética para Uso Animal (CEUA) 015/2016.

Após a confirmação da gestação (diagnóstico por inspeção visual), camundongos da linhagem C57BL/6J (fêmeas) foram aclimatadas em microisoladores individuais, permanecendo em estante com sistema automático de ventilação, filtragem do ar e controle de luminosidade. Após o nascimento, as ninhadas foram ajustadas em número de 4 a 6 filhotes por cada matriz. Os animais (incluindo a matriz e sua ninhada) foram aleatoriamente divididos em dois grupos experimentais, a saber: grupo controle, recebendo uma dieta padrão (GC) e água comum e o grupo intoxicado com MeHg (MeHg) na água de beber com água e ração *ad libitum*.

Tabela 1. Demonstrativo dos grupos utilizados, período de experimentação e número de filhotes

Grupos experimentais	Grupo Controle (GC)	Intoxicados com MeHg (MeHg)
PN	PN4-PN18	PN4-PN18
N	30	30

PN = idade pós natal

N = quantidade de animais

Os animais foram pesados no quarto dia pós-natal (PN4) em ninhadas de 4-6 filhotes (o tamanho da ninhada foi padronizado). O valor ponderal encontrado nessa data foi usado como referência para o cálculo do delta de ganho de peso final (PN 18 menos PN 4). O protocolo experimental teve duração total de 14 dias, findando ao PN18 de cada animal.

Os animais ficaram alojados em microisoladores (Alesco®), colocados em *racks* ventilados da mesma marca. Água e alimentação foram disponibilizados à vontade. O ciclo claro/escuro dos animais foi controlado por sistema de iluminação automático. Todos os procedimentos foram realizados em biotério *Specified Pathogen Free* (SPF), com Nível de Biossegurança 1. A ração, maravalha e água passaram por autoclavagem antes do acesso aos animais. Todos os microisoladores foram lavados e autoclavados a cada troca (feita 1 vez por semana).

4.1.1. Protocolo de intoxicação com mercúrio

A dose do MeHg utilizada no nosso trabalho teve como base os estudos de Andersen e Andersen (1993) que utilizaram a dose de 20mg/L de MeHg em animais pós-desmame (ANDERSEN, ANDERSEN, 1993). Evitamos utilizar o MeHg na água de beber para as mães com recém-nascidos nos primeiros dias, devido à elevada mortalidade observada em estudo piloto anterior. Dessa forma, foi feita exposição do MeHg na água de beber para mães com ninhada a partir do quarto dia pós-natal.

A intoxicação dos animais foi feita com a dose de 20mg/L de cloreto de metilmercúrio (Sigma®, Darmstadt, Alemanha) diluído em água de beber. Os animais lactentes foram intoxicados indiretamente via leite materno, já que o MeHg é presente no leite materno após intoxicação (PARK et al., 2018)

Após anestesia com ketamina® e xilazina® (0,1ml de ketamina, 0,4ml de xilazina e 1,5ml de solução fisiológica), os animais foram eutanasiados por decapitação.

Depois de anestesiado (ketamina®, 0,1ml, e xilazina®, 0,4ml e 1,5ml de solução fisiológica), o animal era alocado em béquer de vidro forrado com papel toalha de forma a deixar o ambiente confortável. Os animais foram pesados em balança analítica apenas nos dias 4 e 18 pós-natais para evitar manipulação excessiva dos filhotes.

As amostras de pelo foram retiradas do dorso do animal por tricotomia e armazenadas em *eppendorfs* identificados em temperatura ambiente.

As amostras de sangue foram coletadas, através do plexo retroorbital, por meio de capilar. Após a coleta, a amostra foi armazenada em *ependorf* até a coagulação e centrifugada em 8.000 rpm por 5 minutos, afim de sedimentar os elementos sanguíneos e deixar como sobrenadante o soro. Este foi coletado e posto em *ependorf* refrigerado em geladeira em temperatura de 4 a 8°C, para análise posterior das concentrações de glicose, colesterol total e triglicérides.

Após decapitação, o hipocampo foi imediatamente dissecado em placa de Petri sobre gelo, pesado e armazenado em criotubo e congelado por meio do contato direto com nitrogênio líquido. Posteriormente, as amostras de hipocampo foram armazenadas em freezer a -80°C.

Todos os protocolos desse estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Fortaleza, tendo como número de registro 015-2016 (ver ANEXO I).

4.2. Manejo e descarte de material contaminado

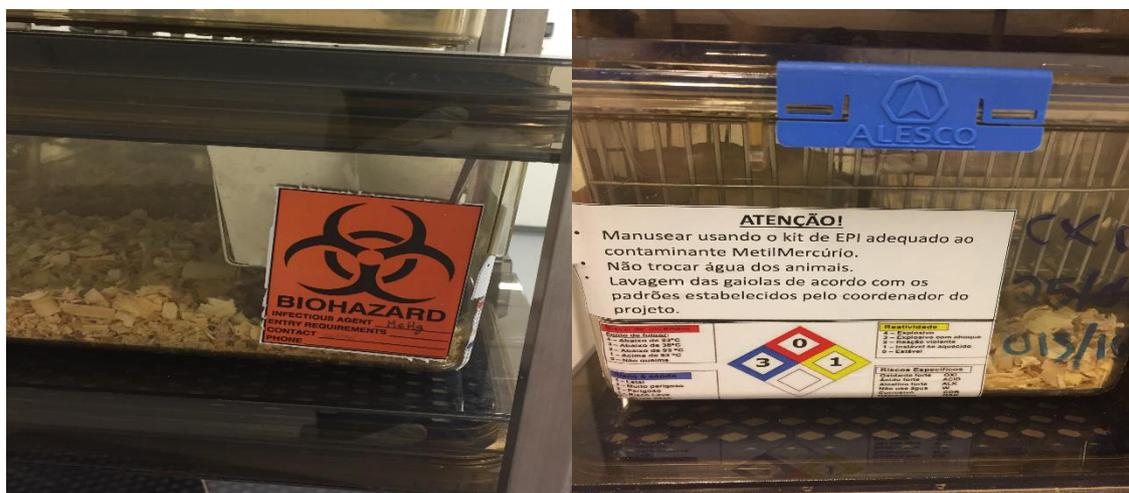
Antes de iniciar cada procedimento que envolvesse o contato direto ou indireto com o MeHg os pesquisadores passavam por um protocolo de proteção individual, contendo luvas de nitrila, aventais descartáveis e máscaras semi-faciais com filtro específico para vapor de mercúrio e óculos de proteção. Todos os procedimentos envolvendo o pó de MeHg foram realizados em cabine de biossegurança com fluxo de ar unidirecional.

Para o preparo da solução contaminada, é necessário que a balança de precisão, o vórtex e toda a vidraria foram dispostos no interior da cabine. A pesagem do MeHg foi feita sem o contato com metais, utilizando-se de papel filtro para a pesagem e lancetas de plástico para manusear o material.

O descarte da água contaminada foi feito em garrafa de plástico identificada com o diagrama de Hommel e o símbolo de contaminante biológico. Posteriormente, esta água foi encaminhada ao Setor de Química da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Os microisoladores também foram identificados com o diagrama de Hommel, o símbolo de contaminante biológico e um aviso sobre a forma de manuseio deles (**Figura 4**).

Figura 4. Identificação dos microisoladores contaminados.



Todos os profissionais do biotério, em questão, foram informados de como proceder com o material proveniente da intoxicação com o MeHg. A maravalha foi descartada em sacos brancos com o símbolo de agente tóxico, bem como a carcaça dos animais. Esses sacos foram encaminhados à Braslimp, empresa que faz a coleta de lixo do biotério, em conjunto com o material proveniente do curso de Odontologia, que faz uso de amálgamas dentários, para incineração em local específico com filtro para vapor de mercúrio.

Após o final do procedimento com os animais, e limpo o ambiente, os pesquisadores passaram por novo *checklist* para a saída do ambiente do biotério, devido às barreiras sanitárias envolvidas.

4.3. Quantificação do mercúrio presente no pelo dos animais

A quantificação do MeHg foi feita através de análise dos pelos. Cuidadosamente utilizando uma pinça plástica o material obtido foi armazenado em recipientes de vidro de borossilicato, cor âmbar, com tampas contendo batoques feitos a partir de politetrafluoretileno, garantindo a não evaporação do produto (EPA, 1998a).

O uso do vidro tem vantagens, pois pode ser reaproveitado de garrafas contendo (HCL, HNO₃, H₂SO₄), existe na cor âmbar, sendo de menor custo e

permite maior tempo de armazenagem do material. 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, 1998b, 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 um sistema Milli-Q e secos em estufa a temperatura de 50 °C.

As determinações de Hg total nas amostras foram submetidas aos procedimentos analíticos pelo método proposto por Akagi, Malm e Branches (1996) é descrito resumidamente a seguir: amostras foram pesadas e acondicionadas em frascos de digestão de aproximadamente 50 mL (AKAGI, MALM, BRANCHES, 1996).

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 à temperatura ambiente, transferidas para balão volumétrico de 50 mL, aferidas e homogeneizadas com água. Na realização das análises foram utilizados reagentes da marca Merck, suprapuro. 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 (µg Hg/kg) ± erro padrão da média (EPM), sendo comparados os valores de concentração de mercúrio dos animais expostos ao MeHg com os animais controles.

4.4. Avaliação do perfil metabólico

As amostras de sangue foram coletadas por meio do plexo retroorbital e o soro foi obtido para determinação da concentração de glicose, utilizando-se o glicosímetro da marca AccuCheck®.

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

4.5. Avaliação do estresse oxidativo em amostras de hipocampo, cerebelo e fígado

4.5.1. Atividade da enzima catalase (CAT)

Os hipocampos dos camundongos foram dissecados, pesados e armazenados em freezer (-80°C). As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio gelado (0,05 M, pH 7,4), na proporção de 10% p/v (100 mg de tecido/1 mL de tampão), utilizando um homogeneizador de tecido (*tissue lyser*, Quiagen). O homogenato foi então centrifugado a 3000 rpm, por 15 minutos, 4°C, e 10 uL do sobrenadante foi misturado a 2 mL da solução tampão/peróxido de hidrogênio (0,059 M). A absorbância foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 240 nm, durante 6 min, e a variação da absorbância do primeiro e do sexto minuto foi considerada. Os resultados foram expressos em mmol de catalase pelo tempo por miligramas de proteínas do tecido (mmol/min/mg de proteína) (BEERS, SIZER, 1952).

4.5.2. Ensaio enzimático da superóxido dismutase (SOD)

O sobrenadante proveniente da centrifugação utilizada no ensaio anterior foi novamente centrifugado (12000rpm, 20 minutos, 4°C) e aspirou-se novamente o sobrenadante. Em câmara escura e já posto 10ul do sobrenadante em tubos de ensaio de vidro, adicionou-se 1 mL do meio de reação (tampão

fosfato de potássio 50 mM, EDTA 100 nM e L-metionina 13 mM pH 7,8), 150 µL do NBT (Azul de nitrotetrazólio, 750 µM) e 300 µL de riboflavina (2 µM).

Foram então expostos à luz branca (15W de potência) por 15 minutos, logo após foi feita a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 560 nm (BEAUCHAMP, FRIDOVICH, 1971). Os resultados foram expressos como unidade da enzima, que é a quantidade de SOD necessária para inibir a taxa de redução do NBT em 50% por miligrama de proteína (U/mg). A dosagem de proteína nas amostras foi determinada pelo método descrito por Lowry *et al.* (LOWRY *et al.*, 1951).

4.5.3. Ensaio da glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona reduzida (GSH)

Para o ensaio da glutathiona peroxidase: As amostras dos homogenatos dos hipocampos foram centrifugadas a 1200rpm por 15 minutos a 4°C, e 100 µL do sobrenadante foi misturado a 150 µL do coquetel (Glutathiona redutase (1U): 50 µL; GSH: 0,0768g, NADPH: 0,0167g e peróxido de hidrogênio H₂O₂ 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). Os resultados obtidos foram expressos em µmol de glutathiona peroxidase, pelo tempo, por miligrama de proteína (µmol/min/mg de proteína).

O ensaio da glutathiona reduzida foi determinado pelo reagente de Ellman's, o ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB), segundo protocolo descrito por Sedlak e Lindsay (1968). Para isso, os homogenatos dos hipocampos foram misturado com 50 µL de água destilada, mais 10 µL de ácido tricloroacético (TCA, 50%) e centrifugados a 5000 rpm por 15 minutos, a 4 °C. O sobrenadante obtido foi pipetado em placa de 96 poços com tampão Trizma (0,4 M) mais EDTA (0,02 M, pH 8,9) e DTNB (0,01M). A absorbância foi mensurada em leitor de microplaca, dentro de 5 minutos depois da adição de DTNB, em comprimento de onda de 412 nm. Os resultados obtidos foram expressos em

micrograma de glutathione por miligrama de tecido ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de tecido) (SEDLAK, LINDSAY, 1968).

4.5.4. Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA)

As amostras foram homogeneizadas em solução de HTAB (a 0,5% diluído em tampão fosfato de sódio (Agar, 1999). Alíquotas de 100 μL do sobrenadante foram misturadas com ácido acético 20% e ácido 2-tiobarbitúrico 0,5% (diluído em ácido acético 20%, pH 2,4 - 2,6). A mistura foi transferida para o banho-maria com temperatura de 95°C, onde ficou durante 1 hora, e sequencialmente para o banho de gelo onde ficou durante 30 minutos. Em seguida recebeu SDS (8,1%) e foi imediatamente centrifugada a 12000 rpm, durante 15 min, a 25°C. A leitura da amostra foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda em 532 nm. A curva padrão foi obtida usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão. Os resultados foram expressos em nanomols de MDA por miligrama de tecido (nmol/mg tecido).

4.6. Quantificação de citocinas pró-inflamatórias em hipocampo e cerebelo

As amostras foram descongeladas e homogeneizadas em tampão fosfato salina 1x concentrado, o reagente foi diluído em solução de BSA a 1%, os anticorpos e o padrão foram diluídos em PBS 1x filtrado. Após sensibilização de placa foi realizada a etapa de bloqueio para ligações inespecíficas. As amostras foram incubadas *overnight* e adicionado o anticorpo no dia seguinte, bem como dos reagentes colorimétricos e leitura em espectrofotômetro em 450nm. Foram analisadas as citocinas interleucina1- β (IL-1 β), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-8 (IL-8) e interferon-gama (IFN- γ).

4.7. Equipamentos e Materiais

- 10 microisoladores Alesco®
- 1 Hack ventilado Alesco®

- Balança digital eletrônica para pesagem de animais – Filizola;
- Balança analítica precisa (Eletronic Balance FA-2104N);
- Cabine de segurança biológica classe II, Tecniplast;
- Ração Presence-Labina®
- Capilares vítreos
- Centrífuga refrigerada para tubos Sigma 1-14k – Uniscience;
- Espectrofotômetro UV-Visible (Shimadzu UV-260, Shimadzu Corp, Tóquio, Japão);
- Espectrofotômetro de absorção atômica (DMA-80, da Milestone Sel - Itália);
- Tubos Eppendorfs, 1,5ml;
- Criotubos, 2,0ml;
- Tubos Falcons, 15 e 50ml;
- Geladeira e freezer Thermo Scientific (-80°C);
- Instrumental cirúrgico;
- 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;
- Placas de petri
- Avental de algodão
- Avental descartável
- Propés (proteção para pés)
- Toucas
- Lanceta plástica
- Sacos plásticos, branco leitoso com símbolo de contaminante;
- Glicosímetro AccuCheck e fitas reativas;

4.8. Reagentes e soluções

- Cloreto de metilmercúrio (Sigma-Aldrich®, Brasil);
- Ketamina (Kensol® König)
- Xilazina (Vetanarcol® König)
- Kit Labstest® para dosagem de colesterol
- Kit Labstest® para dosagem de triglicérides
- PBS (tampão fosfato salino);
- HNO₃ 10%
- KMnO₄
- H₂SO₄
- NEED 0,1%
- Sulfonilamida 1%
- Ácido fosfórico 5%
- Fosfato de sódio dibásico
- Fosfato de sódio monobásico
- EDTA
- L-metionina
- Nitro Blue Tetrazolium (NBT)
- Riboflavina

4.9. Análise estatística

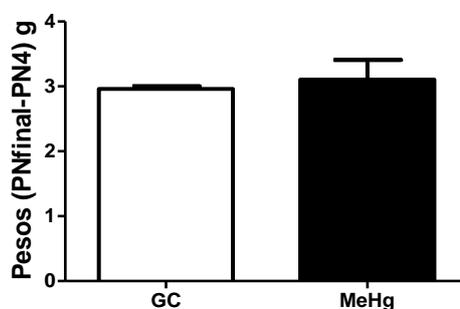
Foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism (GraphPad Prism 5 Software, San Diego, CA, USA) para fazer as análises estatísticas. As tabelas e gráficos apresentam resultados expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). Todos os valores foram testados para normalidade com o teste de Kolmogorov-Smirnov. Foi utilizado o teste T de *Student* não pareado para duas comparações. O nível de significância foi considerado com $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação do peso corporal

A intoxicação mercurial (MeHg na água de beber por 14 dias) não alterou o delta de ganho de peso dos animais quando comparado com o grupo controle não intoxicado, $p > 0,05$ (**Figura 5, Tabela 2**).

Figura 5. Efeito da intoxicação por MeHg durante 14 dias no ganho de peso de animais C57BL6J lactentes.

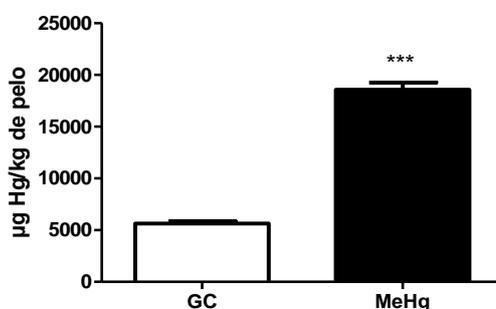


Os valores de delta do ganho de peso ($PN_{final} - PN_4$) são expressos em média \pm EPM de 10 animais em cada grupo. GC= grupo controle e MeHg= grupo intoxicado com MeHg na água de beber por 14 dias. $p=0,64$, feito pelo teste *T* de Student não pareado.

5.2. Quantificação de mercúrio no pelo dos animais

A intoxicação mercurial aumentou significativamente as concentrações de Hg no pelo (229%) dos animais intoxicados quanto comparado com o grupo controle ($p < 0,0001$) (**Figura 6, Tabela 2**).

Figura 6. Efeito da intoxicação por MeHg durante 14 dias na concentração de Hg no pelo de animais C57BL6J lactentes.

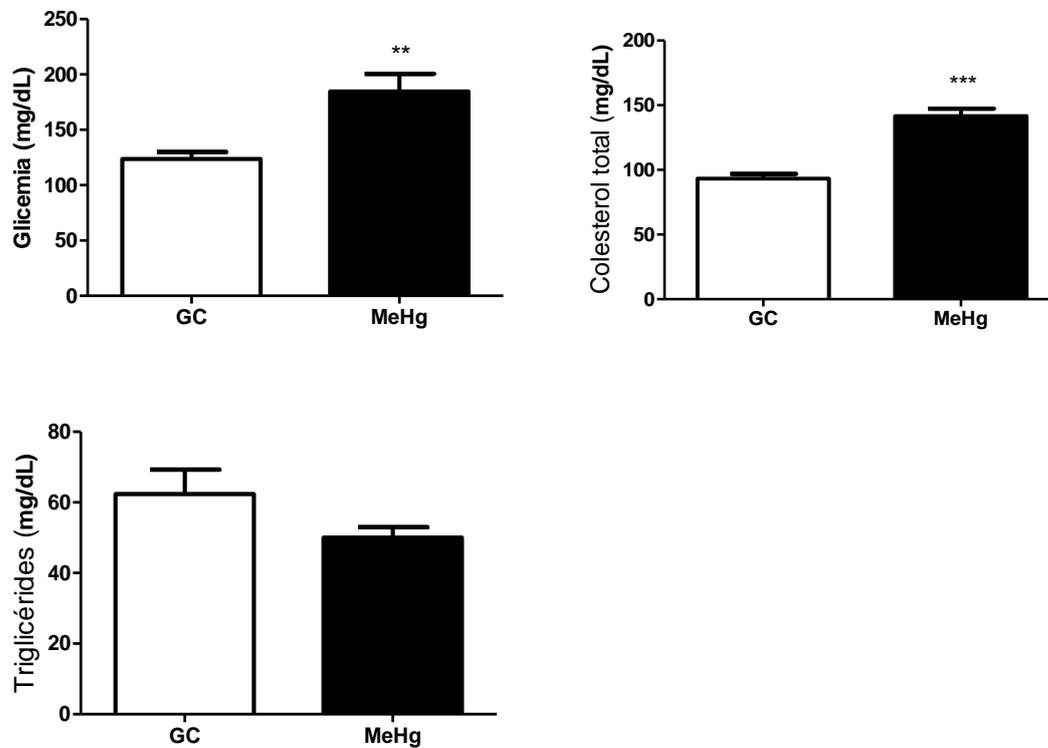


Os valores da concentração de Hg no pelo dos animais são expressos em média \pm EPM de 6 animais em cada grupo. GC= grupo controle e MeHg= grupo intoxicado com MeHg na água de beber por 14 dias. *** $p < 0,0001$ pelo teste *T* de Student não pareado.

5.3. Avaliação do perfil metabólico dos animais

A intoxicação mercurial proporcionou aumento significativo nos níveis séricos de glicose quando comparado com o grupo controle, $p=0,008$, $n=6$. O grupo que recebeu a intoxicação por metilmercúrio apresentou aumento significativo (51,8%) dos níveis séricos de colesterol total quando comparados ao controle, $p < 0,0001$, $n=10$. Não houve alteração significativa nos níveis de triglicérides séricos do grupo Hg quando comparado com o GC, $p=0,11$, $n=8$ (Figura 7, Tabela 2).

Figura 7. Efeito da intoxicação por MeHg durante 14 dias na glicemia, colesterol total e triglicérides séricos de animais C57BL6J lactentes.



Os valores foram expressos em média \pm EPM, GC=grupo controle e MeHg=intoxicados com MeHg, Hg, **p=0,008, ***p<0,001 pelo teste *T* de Student não pareado.

Tabela 2. Valores médios encontrados para o delta de ganho de peso, concentração de Hg no pelo, glicemia, colesterol total e triglicérides em animais submetidos à intoxicação por MeHg em leite materno quando comparados com um controle não intoxicado.

	n	GC	Hg	p
Δ Peso (g)	10	2,9 ± 0,1	3,2 ± 0,8	0,64
[Hg] no pelo (µg/kg)	6	5.638 ± 459,8	18.568 ± 1.717	<0,0001
Glicemia (mg/dL)	6	130,8 ± 21,7	184,3 ± 39,2	0,0153
Colesterol total (mg/dL)	10	92,3 ± 7,6	141,7 ± 12,6	0,0003
Triglicérides (mg/dL)	8	63,8 ± 18,9	55,3 ± 4,4	0,23

Valores expressos em média ± EPM. Valor de p encontrado pelo teste T de Student

5.4. Avaliação do estresse oxidativo no hipocampo e cerebelo

5.4.1. Catalase

A intoxicação mercurial promoveu aumento da atividade da enzima catalase no hipocampo ($p=0,0003$) e cerebelo ($p=0,04$) quando comparado ao controle não tratado, $n=4$. Não houve diferenças nos valores da atividade da catalase encontrados entre hipocampo e cerebelo para os animais intoxicados (**Figura 8, Tabela 3**).

5.4.2. Glutathione (GSH)

A intoxicação mercurial promoveu um aumento significativo das concentrações de GSH no hipocampo quando comparado com o grupo controle, $p = 0,018$. Os valores basais representados no grupo controle foram menores no cerebelo que no hipocampo, $p=0,01$, os valores de GSH nos grupos intoxicados com MeHg foram menores no cerebelo que no hipocampo, $p=0,003$, $n=5$ (**Figura 8, Tabela 3**).

5.4.3. *Superóxido dismutase (SOD)*

A intoxicação por metilmercúrio foi capaz de elevar a atividade da SOD no hipocampo dos animais intoxicados em relação ao controle, $p=0,0006$. Por sua vez, o mesmo padrão de contaminação reduziu a atividade da SOD no cerebelo desses animais quando comparado com o grupo controle, $p=0,005$. O hipocampo demonstrou possuir atividade da SOD mais reduzida em seu controle que o cerebelo, $p=0,002$ (**Figura 8, Tabela 3**).

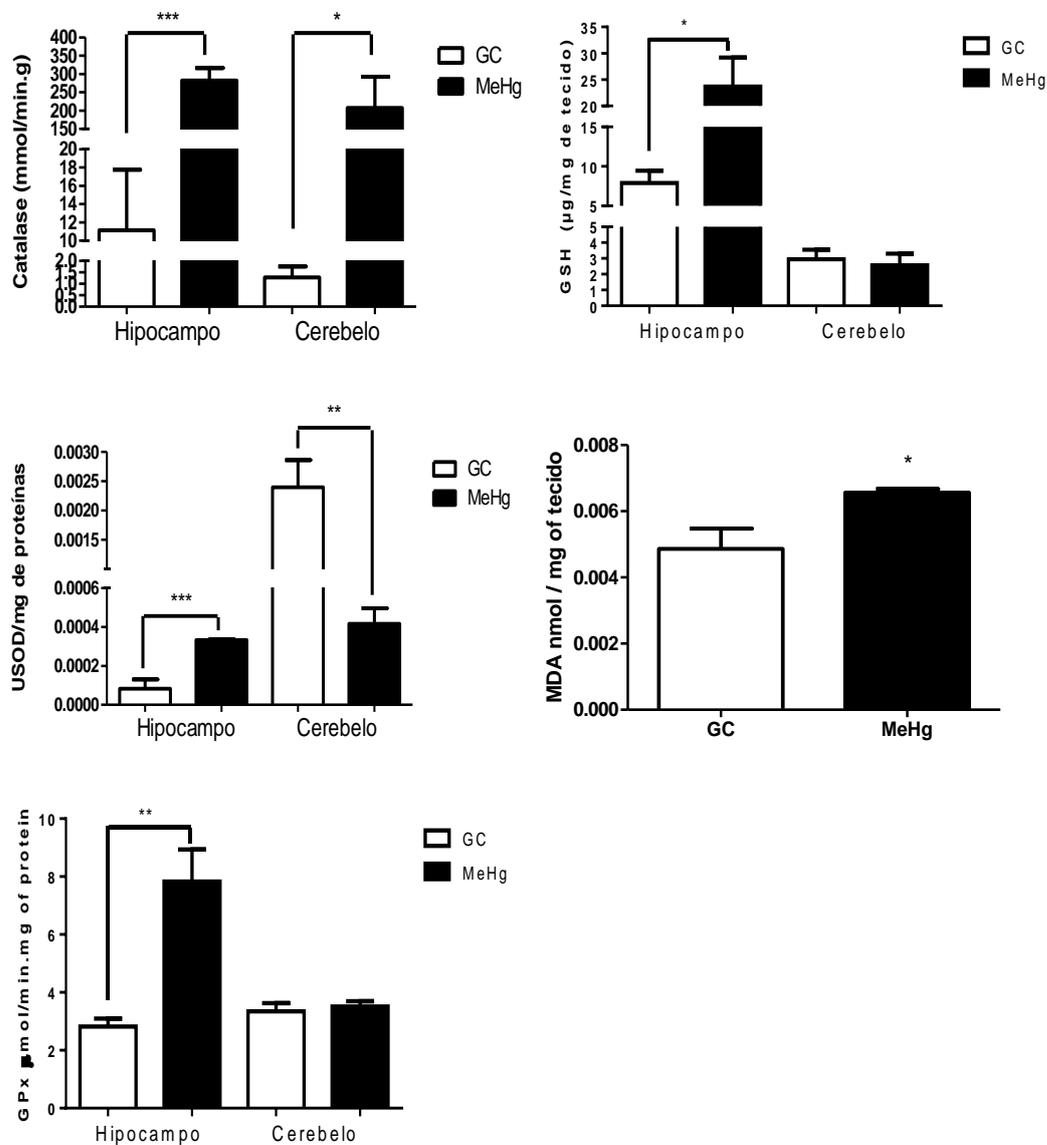
5.4.4. *Malondialdeído (MDA)*

O grupo de animais que recebeu a intoxicação por MeHg apresentou maior atividade de MDA no hipocampo que o controle não intoxicado, $p=0,01$ (**Figura 8, Tabela 3**).

5.4.5. *Glutathione peroxidase (GPx)*

O grupo que foi exposto à intoxicação mercurial demonstrou aumento na atividade da GPx no hipocampo quando comparado com o controle, $p=0,0057$. A atividade de GPx se mostrou significativamente elevada no hipocampo de animais intoxicados quando comparado com o cerebelo do mesmo grupo, $p=0,004$ (**Figura 8, Tabela 3**).

Figura 8. Ação de enzimas e agentes antioxidantes no hipocampo e cerebelo de camundongos C57BL6J lactentes submetidos à intoxicação por MeHg.



Os valores foram expressos pela média \pm EPM. As leituras para concentração de MDA foram exclusivas para o hipocampo. GC= grupo controle, e MeHg= intoxicados com MeHg, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, pelo teste *T* de Student não pareado.

Tabela 3. Atividade antioxidante nos tecidos hipocampal e cerebelar em animais C57BL6J submetidos à intoxicação por MeHg em leite materno, quando comparados com o grupo controle não intoxicado.

	Tecido	n	GC	Hg	p
Catalase (M/min.Pt)	Hip	4	11,1 ± 6,5	281,8 ± 34,8	0,0003
	Cer	5	1,2 ± 0,48	198,1 ± 90,37	0,04
GSH (µg/ml*mg de tecido)	Hip	5	7,89 ± 3,5	23,68 ± 11,08	0,018
	Cer	5	2,9 ± 0,6	2,5 ± 0,7	0,7
SOD (USOD/Pt)	Hip	4	0,82e-004 ± 0,481e-004	3,32e-0,04 ± 0,048e-004	0,0006
	Cer	4	19,81e-004 ± 5,50e-004	8,15e-004 ± 4,04e-004	0,0057
MDA (nmol/ mg de tecido)	Hip	5	4,86e-003 ± 0,6e-003	6,56e-003 ± 0,1e-003	0,017
	Cer	4	2,17e-003 ± 0,09e-003	1,31e-003 ± 0,2e-003	0,014
GPx (mmol/min/mg de tecido)	Hip	5	2,82 ± 0,27	7,83 ± 1,1	0,005
	Cer	5	3,34 ± 0,28	3,51 ± 0,18	0,63

GSH= glutaciona, SOD=Superóxido dismutase, MDA=malondialdeído, GPx=glutaciona peroxidase. Valor de p encontrado pelo teste T de Student não pareado.

5.5. Quantificação de citocinas no hipocampo e cerebelo por ensaio imunoenzimático de ELISA

5.5.1. *Interleucina 1-beta (IL1- β)*

Não houve diferença significativa nos níveis de IL1- β após a intoxicação mercurial no hipocampo ou cerebelo quando comparado aos controles, $p>0,05$, $n=5$ (**Figura 9**).

5.5.2. *Fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α)*

A intoxicação mercurial não aumentou significativamente os níveis de TNF- α no hipocampo ou cerebelo quando comparado aos controles, $p>0,05$ (**Figura 9**).

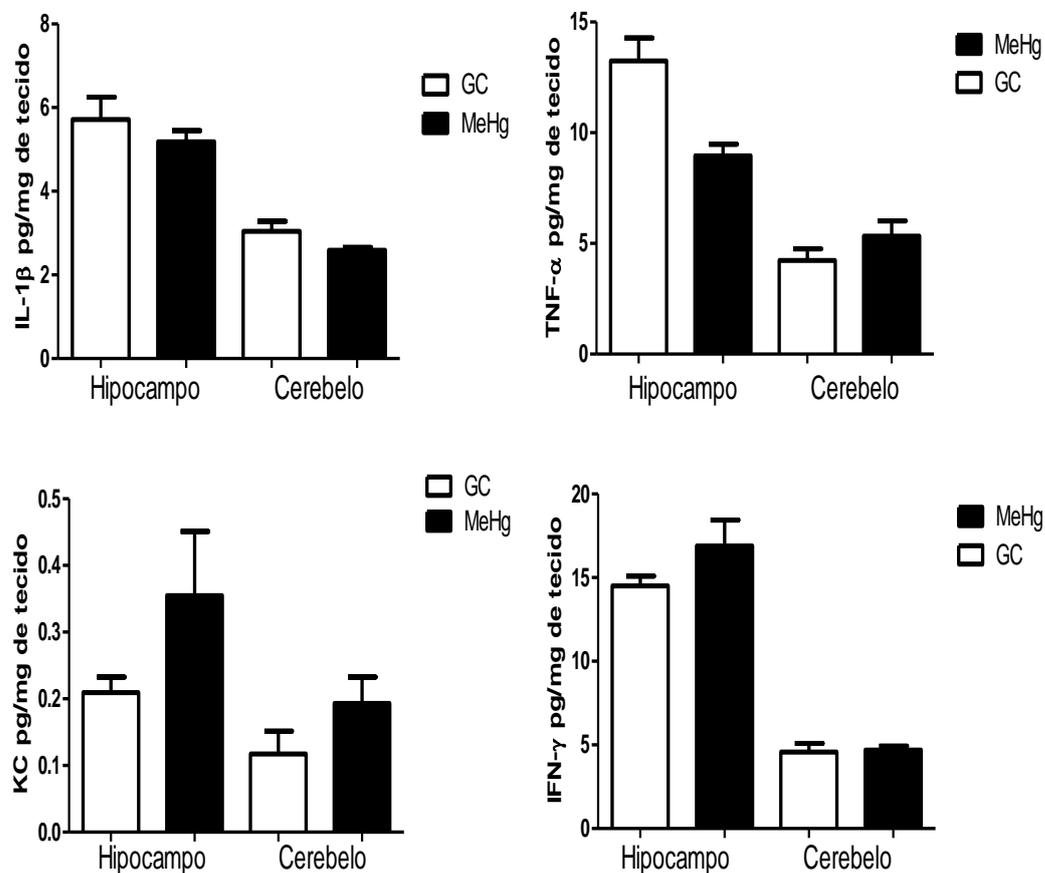
5.5.3. *Quimiocina de queratinócito (KC)*

Não foram encontradas alterações significativas no hipocampo ou cerebelo nas leituras de KC quando comparados os grupos controle e intoxicado por MeHg, $p>0,05$ (**Figura 9**).

5.5.4. *Interferon-gama (IFN- γ)*

A intoxicação mercurial não foi capaz de elevar os níveis de IFN- γ no hipocampo ou cerebelo, $p>0,05$ (**Figura 9**).

Figura 9. Níveis de IL1- β , TNF- α , KC e IFN- γ (pg/mg de tecido) em amostras de hipocampo e cerebelo de animais C57BL6J lactentes intoxicados com MeHg.

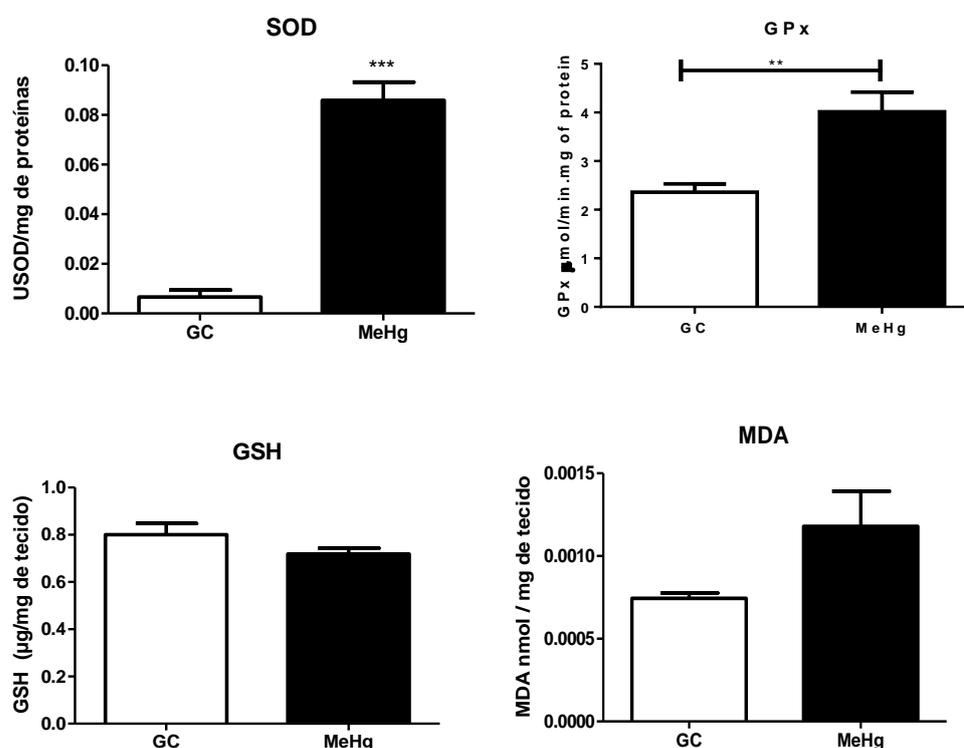


Os valores pela média \pm EPM de 5 animais em cada grupo. GC= grupo controle e MeHg= intoxicados com MeHg. $p > 0,05$ pelo teste T de Student não pareado.

5.6. Avaliação do estresse oxidativo induzido por MeHg no fígado

A intoxicação por MeHg aumentou a atividade das enzimas SOD, $p=0,0002$, e GPx, $p=0,009$, no grupo intoxicado, ao passo que as concentrações de GSH, $p=0,17$, e MDA, $p=0,09$, não foram diferentes entre os grupos (**Figura 10**).

Figura 10. Valores da atividade das enzimas anti-oxidantes SOD e GPx, mensuração dos níveis de GSH e MDA em amostras de fígado de animais C57BL6J lactentes submetidos à intoxicação por MeHg.



Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), da glutatona peroxidase (GPx), concentração de glutatona (GSH) e malondialdeído (MDA) nos grupos GC=grupo controle e MeHg=intoxicados com MeHg. Os valores são expressos pela média \pm EPM de 5 animais em cada grupo. ** $p=0,009$, *** $p=0,0002$ pelo teste *T* de Student não pareado.

6. DISCUSSÃO

A atenção para o impacto da intoxicação por MeHg, como problema de saúde pública, aumentou recentemente com o desastre ambiental na região de Mariana, MG, que potencialmente pode ter aumentado o risco para doenças neurológicas em populações ribeirinhas. Da mesma forma, na Amazônia, áreas endêmicas para intoxicação crônica por mercúrio já são conhecidas com a atividade da mineração do ouro. A magnitude do impacto da intoxicação do MeHg no desenvolvimento cognitivo em crianças é ainda pouco conhecida.

Apesar de que vários estudos terem demonstrado o efeito deletério da intoxicação do metilmercúrio no sistema nervoso central, poucos estudos têm explorado o efeito do MeHg durante o período de aleitamento materno em camundongos, um período crítico para plasticidade pós-natal, especialmente no hipocampo e cerebelo.

Em murinos, os primeiros dias pós-parto representam um período rápido de desenvolvimento cerebral (semelhante aos humanos). Este fato faz com que o tecido cerebral seja muito susceptível a distúrbios, devido à acelerada neurogênese e gliogênese, importantes na manutenção da homeostase do glutamato; ocorre também um aumento na mielinização e aumento da síntese de DNA (PÁL WEIHE et al, 2002).

Em estudo com neonatos de camundongos, Fujimura, Cheng e Zhao, 2012, administraram 5ppm de MeHg do 1º dia de confirmação da gestação até o 21º dia de lactação. O sacrifício dos animais se deu 15 dias após o fim do tratamento. Esses autores demonstraram que os rins são os órgãos em que há maior concentração de Hg ($2,37 \pm 0,25$ ppm), em ordem decrescente de concentração de Hg no tecido, o fígado ($0,23 \pm 0,01$ ppm), sangue ($0,21 \pm 0,01$ ppm), hipocampo ($0,11 \pm 0,01$ ppm), cerebelo ($0,09 \pm 0,01$ ppm) e córtex cerebral ($0,08 \pm 0,01$ ppm) (FUJIMURA, CHENG, ZHAO, 2012b).

A importante notar que num estudo com 157 mães lactantes recrutadas no estudo coorte na Coreia, as amostras de leite materno colhidas 15 e 30 dias

pós-parto (n=207) mostraram que o mercúrio foi detectado em 100% das amostras com uma concentração média de 0.59µg/L (PARK et al., 2018). Estudos em mães humanas demonstraram que o mercúrio pode se ligar a alfa e beta-lactoalbuminas, promovendo uma transferência através do leite materno (VEPRINTSEV et al., 1996). Dessa forma, indicando que o mercúrio pode ser transferido pelo leite para os filhotes, resultado confirmado pelo elevado nível de intoxicação encontrado no pelo dos animais expostos de mães intoxicadas pelo MeHg na água de beber. Entretanto, trabalhos publicados mostram que a intoxicação pelo leite materno é menos eficaz que pela transferência placentária. A explicação para isso parece simples, o contato direto com o sangue da matriz contaminado gera maiores concentrações de Hg no tecido cerebral dos animais que o contato exclusivo via leite materno (AMIN-ZAKI et al., 1976; GRANDJEAN, WEIHE, WHITE, 1995; SAKAMOTO et al., 2002; MANFROI et al., 2004; CASTOLDI et al., 2008; BIAMONTE et al., 2014)

Manfroi et al. (2004) avaliaram o dano provocado pela intoxicação mercurial no cerebelo de camundongos Swiss, com doses de 15mg/L, no período de aleitamento (21 dias de exposição). Esses autores observaram aumento nos tremores e analgesia periférica, verificada pela preensão da pata com pinça. Os filhotes mostraram menor captação de glutamato em células gliais isoladas, ao passo que as mães mostraram maior captação de glutamato. Uma atividade aumentada de catalase (CAT) foi verificada no cerebelo dos filhotes intoxicados, sem alteração dos níveis de GPx, apesar do aumento na concentração de hidroperóxido não proteico, sugerindo que estes compostos não estavam associados com as alterações dos níveis de CAT e GPx (MANFROI et al., 2004).

Alguns outros trabalhos também mostraram que a exposição pré-natal ao MeHg é mais danosa ao tecido cerebral que pós-natal pelo aleitamento (AMIN-ZAKI et al., 1976; WATANABE et al., 1999), Sakamoto et al. (2002) mostraram que ocorre uma redução dos níveis de MeHg circulantes após o parto, fato que pode ser atribuído à falta de transferência de MeHg pelo sangue umbilical (SAKAMOTO et al., 2002), entretanto, a presença do MeHg no leite materno já

foi constatada em estudos com leite humano, evidenciando a contaminação por esta via (PARK et al., 2018).

No estudo de Falluel-Morel et al. (2007), com animais recém-nascidos, em período de lactação, sete dias de idade, doses de 5 µg/g intraperitoneal induziram uma redução de mais de 50% na síntese do DNA de neurônios imaturos, de 22% na síntese de DNA do hipocampo total e aumento de 4 vezes a quantidade de células que expressavam o marcador para caspase 3. Chamando atenção mais uma vez ao modo de indução da intoxicação, pois ao contrário do trabalho desenvolvido por Manfroi *et al*, 2004, no trabalho de Falluel-Morel a intoxicação se deu de forma direta via intraperitoneal. Em animais recém-nascidos, o tempo de excreção do MeHg parece ser aumentado pela imaturidade dos transportadores presentes no fígado e nos rins (FALLUEL-MOREL et al., 2007; MADEJCZYK et al., 2007; AREMU, MADEJCZYK; BALLATORI, 2008).

Farina *et al*, 2004, intoxicaram filhotes de ratos Wistar por 21 dias, a partir do 3º dia pós-natal, com injeções subcutâneas de MeHg (2mg/kg). Perceberam uma redução no peso corporal dos animais intoxicados, além do aumento nas concentrações de malondialdeído e redução da atividade de GPx no fígado. A redução na atividade de GPx foi associada à depleção dos grupamentos tiol o que está relacionado ao aumento da formação de EROs, associado ao maior dano na membrana lipídica e demonstrando a alteração provocada pelo metal no fígado de neonatos (FARINA et al., 2004).

Neste trabalho utilizou-se dose de 20mg/L de MeHg em água de beber por 14 dias no período de lactação de camundongos C57BL6J (PN4-PN14). Para escolha da dose do MeHg utilizada nesse estudo, foi realizado um ensaio piloto quando foi testada a dose máxima sugerida previamente na literatura, de 40mg/L de MeHg na água de beber (FRANCO et al., 2009a; BISEN-HERSH et al., 2014). Porém, devido ao aumento do número de eventos neurológicos (paralisia de membros posteriores) e morte de matrizes e, em alguns casos, perda da prole completa, a dose foi então reduzida para 20mg/L, ainda dentro do padrão de palatabilidade e dano neuronal descrito por Franco *et al*, 2009. Esses autores

não perceberam redução significativa da ingestão hídrica diária de vido ao MeHg nas doses de 10 a 40mg/L (FRANCO et al., 2009a).

Manfroi *et al*, 2004, utilizaram doses de 15 mg/L por 21 dias de exposição através do leite materno. O consumo diário por estas matrizes foi estimado de 8,25mg/Hg/kg/dia, totalizando 173,25mg/Hg/kg ao final dos 21 dias (MANFROI et al., 2004). Em nosso trabalho optamos por reduzir o tempo, totalizando 14 dias (PN4 até PN18). Nesse período, a média estimada de ingestão foi de 196,12mg/Hg/kg ao final do protocolo, uma média ainda superior ao observado por Manfroi *et al*, 2004.

Nossos achados de ganho de peso corporal corroboram com Gandhi, Panchal e Dhull, 2014. Esses autores utilizando ratas Wistar e suas proles não documentaram perda de peso nos filhotes após intoxicação mercurial nas doses de 0,5; 1,0 e 2,0 mg/kg/dia por via intraperitoneal (IP). Percebeu-se apenas perda de peso das progenitoras (GANDHI; PANCHAL; DHULL, 2014).

Para efeito de comparação sobre o metabolismo do mercúrio no organismo das duas espécies, ratos Wistar no trabalho de Gandhi, Panchal e Dhull e camundongos C57BL6J neste trabalho, é importante salientar que a meia vida do MeHg no organismo do rato é de 16 dias e no camundongo de 8 dias (GANDHI; PANCHAL; DHULL, 2014), sendo necessário um maior quantidade de MeHg ingerida pelos camundongos para gerar o mesmo acúmulo previsto pelo trabalho citado (NEWLAND et al., 2006; REED; PALETZ; NEWLAND, 2006).

No nosso estudo, o aumento significativo nos níveis de colesterol sérico nos animais intoxicados foi acompanhado do aumento da glicemia. Esses achados de alterações metabólicas em animais intoxicados pelo MeHg são corroborados com estudos mostrando efeitos deletérios do MeHg nas células β -pancreáticas, fato que pode estar relacionado com a menor produção de insulina e metabolismo alterado da glicose. Chen *et al* avaliaram células β -pancreáticas em cultura expostas às doses crescentes de 1 a 20 μ M de MeHg. A partir da dose de 2 μ M houve redução significativa da viabilidade celular, além da redução da secreção de insulina (CHEN et al., 2006).

A elevação dos níveis do colesterol total induzida pelo MeHg corroboram com os dados encontrados por Macedo-Júnior *et al*, 2017, que intoxicaram camundongos Swiss adultos, 25 a 30g, com dose de 40mg/L de MeHg na água de beber por 14 dias e encontraram aumento dos níveis séricos de colesterol total e HDL (MACEDO-JÚNIOR *et al.*, 2017). Também esses autores encontraram níveis elevados da atividade enzimática de AST e ALT acompanhada por hepatomegalia. Da mesma forma a elevação nos níveis de colesterol sérico foram observados no trabalho de Joshi *et al*, 2014, onde ratos Sprague-Dawley, 150g, receberam 1mg/kg 5 vezes por semana por gavagem, durante 12 semanas. Esses autores observaram também elevação dos níveis de creatinina e ureia séricos (JOSHI *et al.*, 2014).

No nosso estudo foi encontrado aumento da atividade de enzimas antioxidantes no fígado após intoxicação mercurial, contudo não observamos aumento da atividade de peroxidação lipídica que foi encontrada tanto no hipocampo como no cerebelo. No trabalho de Kirkpatrick *et al*, 2015, usando camundongos C57BL6N com 40 dias de vida, e dando a eles dose diária de 5mg/kg de MeHg em cookies por 28 dias, encontrou-se valores de concentração de Hg maiores no fígado que no tecido cerebral (KIRKPATRICK *et al.*, 2015). Porém, os níveis de Hg encontrados no cérebro aumentavam de forma mais rápida nos dias seguintes ao início do tratamento. Isso pode ser atribuído à falta de um transportador que retire o MeHg do tecido cerebral, corroborando com nossos achados que o cérebro (hipocampo e cerebelo) apesar do aumento compensatório da atividade antioxidante ainda apresenta peroxidação lipídica detectada pelo aumento da atividade de malondialdeído após intoxicação crônica pelo MeHg.

Ao contrário dos nossos resultados, Kirkpatrick *et al* encontraram valores reduzidos de GPx no fígado, sugerindo uma inibição pelo MeHg. (KIRKPATRICK *et al.*, 2015). No nosso estudo a concentração de MeHg utilizada não foi o suficiente para inibir a ação de GPx, como descrito previamente por Franco *et al* (FRANCO *et al.*, 2009a).

Franco *et al*, demonstraram que a incubação com GPx em cultura de células de neuroblastoma humano, fez com que os níveis de peroxidação lipídica voltassem ao estado basal, combatendo a ação pró-oxidante desencadeada pelo MeHg (FRANCO et al., 2009a). No nosso estudo, foram observados valores aumentados de GPx e GSH no hipocampo (contudo não no cerebelo), sugerindo aumento da resposta antioxidante, contudo não suficiente para impedir a peroxidação lipídica.

Yadetie *et al*, 2013, utilizando-se da técnica de *microarray* para detectar genes alvo no DNA de hepatócitos de peixes verificou que a intoxicação pelo mercúrio inorgânico produziu uma superexpressão de genes relacionados à via de sinalização antioxidante Nrf2, ligadas aos genes HO1 e GSTs (YADETIE et al., 2013). Estudos de Li *et al*, 2012, também demonstraram uma alteração nessa via de sinalização celular no tecido cerebral de animais intoxicados por MeHg, sugerindo que o dano induzido pela ação oxidativa do MeHg se comporta de forma semelhante nas células dos tecidos hepático e cerebral (LI et al., 2012).

Ainda no estudo de Yadetie *et al* foi verificada superexpressão de genes ligados à atividade de gliconeogênese, fato que pode também se relacionar aos valores glicêmicos elevados encontrados em nosso trabalho, da síntese de ácidos graxos, Acetil-CoA desidrogenases mitocondriais, e da via ligada à síntese de GSH, relacionado à alteração no metabolismo de EROs (YADETIE et al., 2013).

O aumento de EROs nas intoxicações por MeHg é algo bem estudado na literatura. O desequilíbrio redox induz um descontrole no metabolismo do cálcio intracelular principalmente em astrócitos, que leva ao aumento da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (SAVASKAN, N. E., BORCHERT, A., BRÄUER, A. U., & KUHN, 2007; FARINA et al., 2009; FRANCO et al., 2009a). Outra consequência do aumento de EROs é o dano na parede mitocondrial, o que leva ainda a maior produção de peróxido de hidrogênio (MYHRE, FONNUM, 2001).

Em nossos achados as concentrações de GSH estiveram mais elevadas no hipocampo do grupo Hg, fato que contradiz o achado no estudo de Joshi *et*

al. Esses autores encontraram níveis de GSH e GPx reduzidos no cérebro total nas doses de 1mg MeHg/kg, 1 x a cada dois dias, durante 12 semanas (JOSHI et al., 2014), sugerindo que o protocolo de intoxicação utilizado não foi capaz de diminuir os níveis de glutathiona reduzida ou porque os níveis de GSH e GPX de outros regiões cerebrais foram menores que o hipocampo.

A molécula de GSH é tida como uma das mais importantes defesas contra a agressão oxidante imposta pela intoxicação mercurial. Isso se dá devido à ligação entre o GSH e o MeHg, formando, GSHgCH₃ (NI et al., 2012), que é retirado da célula pelos transportadores MRP (CLARKSON, VYAS, BALLATORI, 2007; MADEJCZYK et al., 2007). O fato de que no hipocampo dos animais intoxicados por mercúrio não tenha havido diminuição dos níveis de GSH sugere que a quantidade transferida de MeHg no leite materno ou biodisponibilidade não tenham sido suficientes para bloquear o GSH em comparação com outros trabalhos que intoxicaram os animais de forma mais direta.

Foram encontrados valores elevados de catalase e MDA no cerebelo de nossos animais. De forma semelhante, Manfroi *et al* também observaram aumento dos níveis de catalase no cerebelo em camundongos Swiss, durante a lactação, após desafio por MeHg (15 mg/L na água de beber por 21 dias). Além disso, esses autores observaram valores elevados de GSH, GPx e SOD no cerebelo no grupo intoxicado (MANFROI et al., 2004).

Apesar dos valores alterados de MDA no hipocampo dos animais intoxicados, não foram verificadas alterações nas citocinas pró-inflamatórias avaliadas. Dados do nosso estudo são corroborados com os trabalhos de Wang *et al*, 2002 e 2009, e Basset *et al*, 2012, que não observaram aumento dos níveis de TNF- α em co-cultura de astrócitos e microglia e TNF- α e IL-1 β em cultura de microglia, após desafio com MeHg (WANG et al., 2002, 2009; BASSETT, BACH, CHAN, 2012).

Além do que, quanto mais desenvolvidos os animais, eles conseguem excretar melhor o MeHg, devido à maturidade de seus transportadores que são mais expressos com a idade. O aumento significativo da peroxidação lipídica

observada no hipocampo, contudo ausente no cerebelo, após intoxicação pelo MeHg, pode ser explicada em parte pela falta de transportadores (OAT-1 e MRP-2) na BHE para remoção do MeHg após se ligar às proteínas específicas do meio extracelular cerebral, que são presentes no fígado (AREMU, MADEJCZYK, BALLATORI, 2008).

Apesar de não obtermos resultados significativos em marcadores inflamatórios, não podemos excluir que esse efeito ocorra mais tardiamente. Um achado importante desse estudo é o efeito do MeHg no metabolismo lipídico e na glicemia em camundongos lactentes, sugerindo um risco aumentado para doenças metabólicas e cardiovasculares. Mais experimentos com esse modelo são necessários para verificar se há alterações sensíveis a nível celular e quais mecanismos envolvidos no processo.

As limitações desse estudo incluem a dificuldade de controlar algumas variáveis maternas, incluindo a eficiência do aleitamento materno, qualidade do leite e cuidado com os filhotes. Para minimizar efeito do experimentador nessas variáveis maternas, todos os animais receberam o mesmo manejo, reduzindo o contato com animais de forma mínima possível.

Como inovação esse estudo, até onde se sabe, avaliou pela primeira vez o efeito de forma mais crônica da intoxicação do MeHg (por 14 dias) no hipocampo de camundongos lactentes, num período crítico de plasticidade, simulando uma condição que pode ser observada em populações expostas. Esse trabalho traz informações importantes para guiar outros estudos que avaliam a neurotoxicidade do MeHg no período de lactação.

7. CONCLUSÃO

Os principais achados desse estudo estão listados abaixo:

- Não houve alteração no delta do ganho de peso dos filhotes dos grupos experimentais;
- Os níveis de Hg no pelo dos animais intoxicados com MeHg foram 3x maiores que o do grupo controle;
- Houve aumento nos níveis de glicemia e colesterol séricos total no grupo intoxicado com MeHg (Hg), porém sem diferença na concentração sérica de triglicérides;
- Houve aumento da atividade da catalase no hipocampo e cerebelo dos animais do grupo MeHg, sem alterações no fígado;
- Houve aumento nas concentrações de glutathione no hipocampo de animais do grupo MeHg, porém sem diferença no cerebelo ou fígado;
- Houve aumento na atividade da superóxido dismutase no hipocampo e cerebelo do grupo MeHg e aumento na atividade do grupo controle no fígado quando comparado ao grupo intoxicado;
- Os níveis de malondialdeído se mostraram elevados no hipocampo dos animais do grupo MeHg, porém sem alterações no fígado;
- A atividade da glutathione peroxidase foi elevada no hipocampo e fígado dos animais do grupo MeHg, porém sem alterações no cerebelo;
- Não houve alterações nos níveis de IL-1 β , TNF- α , IFN- γ ou KC no hipocampo ou cerebelo dos animais após intoxicação por MeHg (20mg/L) na água de beber.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

(PNUMA), P. das N. U. para o M. A. No Title. (I. N. C. (INC), Ed.) In: Conferência Diplomática para Assinatura da Convenção de Minamata sobre Mercúrio, Genebra. **Anais**. Genebra: 2013.

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.

ALLEN, J. W., [SHANKER G.](#), [TAN K.H.](#), [ASCHNER M.](#) The consequences of methylmercury exposure on interactive functions between astrocytes and neurons. **NeuroToxicology**, v. 23, n. 6, p. 755–759, 2002.

ALLEN, J. W.; SHANKER, G.; ASCHNER, M. Methylmercury inhibits the in vitro uptake of the glutathione precursor, cystine, in astrocytes, but not in neurons. **Brain Research**, v. 894, n. 1, p. 131–140, 2001.

AMIN-ZAKI, L., ELHASSANI S., MAJEED M.A., CLARKSON T.W., DOHERTY R.A., GREENWOOD M.R., GIOVANOLI-JAKUBCZAK T. Perinatal Methylmercury Poisoning in Iraq. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine**, v. 130, n. 10, p. 1070, 1976.

ANDERSEN, H. R.; ANDERSEN, O. Effects of dietary alpha-tocopherol and beta-carotene on lipid peroxidation induced by methyl mercuric chloride in mice. **Pharmacol.Toxicol.**, v. 73, p. 192–201, 1993.

ARELLANO, J. M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological Changes and Copper Accumulation in Liver and Gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 44, n. 1, p. 62–72, 1999.

AREMU, D. A.; MADEJCZYK, M. S.; BALLATORI, N. N-acetylcysteine as a potential antidote and biomonitoring agent of methylmercury exposure. **Environmental health perspectives**, v. 116, n. 1, p. 26–31, 2008.

ASCHNER, M., Du Y.L., Gannon M., Kimelberg H.K. Methylmercury-induced

alterations in excitatory amino acid transport in rat primary astrocyte cultures. **Brain Research**, v. 602, n. 2, p. 181–186, 1993.

ASCHNER, M., YAO C.P., ALLEN J.W., TAN K.H. Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. **Neurochemistry International**, v. 37, n. 2–3, p. 199–206, 2000.

BANNAI, S. Transport of cystine and cysteine in mammalian cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes**, v. 779, n. 3, p. 289–306, 1984.

BASSETT, T.; BACH, P.; CHAN, H. M. Effects of methylmercury on the secretion of pro-inflammatory cytokines from primary microglial cells and astrocytes. **NeuroToxicology**, v. 33, n. 2, p. 229–234, 2012.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276–87, 1971.

BEERS, R. F.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **The Journal of biological chemistry**, v. 195, n. 1, p. 133–40, 1952.

BERNTSSEN, M. H. G. HYLLAND K., LUNDEBYE A.K., JULSHAMN K. Higher faecal excretion and lower tissue accumulation of mercury in Wistar rats from contaminated fish than from methylmercury chloride added to fish. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 42, n. 8, p. 1359–66, 2004.

BERZAS NEVADO, J. J., RODRÍGUEZ MARTÍN-DOIMEADIOS R.C., GUZMÁN BERNARDO F.J., JIMÉNEZ MORENO M., HERCULANO A.M., DO NASCIMENTO J.L., CRESPO-LÓPEZ M.E. Mercury in the Tapajós River basin, Brazilian Amazon: a review. **Environment international**, v. 36, n. 6, p. 593–608, 2010.

BIAMONTE, F., LATINI L., GIORGI FS., ZINGARIELLO M., MARINO R., DE

LUCA R., D'ILIO S., MAJORANI C., PETRUCCI F., VIOLANTE N., SENOFONTE O., MOLINARI M., KELLER F. Associations among exposure to methylmercury, reduced Reelin expression, and gender in the cerebellum of developing mice. **Neurotoxicology**, v. 45, p. 67–80, 2014.

BISEN-HERSH, E. B., FARINA M., BARBOSA F. JR., ROCHA J. B., ASCHNER M.. Behavioral effects of developmental methylmercury drinking water exposure in rodents. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 28, n. 2, p. 117–124, 2014.

BJÖRKMAN, L., LUNDEKVAM B. F., LAEGREID T., BERTELSEN B. I., MORILD I., LILLENG P., LIND B., PALM B., VAHTER M. Mercury in human brain, blood, muscle and toenails in relation to exposure: an autopsy study. **Environmental Health**, v. 6, n. 1, p. 30, 2007.

BOISCHIO, A. Developmental neurotoxicity: Methylmercury and prenatal exposure protection in the context of the Minamata Convention. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, v. 38, n. 3, p. 243–247, 2015.

BRAGA, T. M. B. **Aspectos preliminares da contaminação de mercúrio em peixes comercializados na praia do mucuripe, Fortaleza e no estuário do rio Jaguaribe, CE.** 2006. Depto. de Engenharia de Pesca, Centro de Ciências Agrária, Universidade Federal do Ceará, 2006.

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.

BROOKES, N. In vitro evidence for the hole of glutamate in the CNS toxicity of mercury. **Toxicology**, v. 76, n. 3, p. 245–256, 1992.

BROWN, G. C. Nitric oxide and neuronal death. **Nitric Oxide**, v. 23, n. 3, p. 153–65, 2010.

BURGER CHAKRABORTY, L., QURESHI A., VADENBO C., HELLWEG S. Anthropogenic mercury flows in India and impacts of emission controls. **Environmental science & technology**, v. 47, n. 15, p. 8105–13, 2013.

CANELA, M. C. **Determinação de Mercúrio**. [s.l.] Capinas: UNICAMP, 1995.

CARICCIO, V. L., SAMÀ A., BRAMANTI P., MAZZON E. Mercury Involvement in Neuronal Damage and in Neurodegenerative Diseases. **Biol Trace Elem Res.**, v. 187, n. 2, p. 341–356, 2019.

CASTOLDI, A. F., Onishchenko N., Johansson C., Coccini T., Roda E., Vahter M., Ceccatelli S., Manzo L. Neurodevelopmental toxicity of methylmercury: Laboratory animal data and their contribution to human risk assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 51, n. 2, p. 215–229, 2008.

CHARLESTON, J. S., BOLENDER R. P., MOTTET N. K., BODY R. L., VAHTER M. E., BURBACHER T. M. Increases in the number of reactive glia in the visual cortex of *Macaca fascicularis* following subclinical long-term methyl mercury exposure. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 129, n. 2, p. 196–206, 1994.

CHEN, Y. W., Huang C.F., Tsai K.S., Yang R.S., Yen C.C., Yang C.Y., Lin-Shiau S.Y., Liu SH. Methylmercury Induces Pancreatic β -Cell Apoptosis and Dysfunction. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, n. 8, p. 1080–1085, 2006.

CHÉTELAT, J., HICKEY, M.B.C., POULAIN, A.J., DASTOOR, A., RYJKOV, A., MCALPINE, D., VANDERWOLF, K., JUNG, T.S., HALE, L., COOKE, E.L.L., HOBSON, D., JONASSON, K., KAUPAS, L., MCCARTHY, S., MCCLELLAND, C., MORNINGSTAR, D., NORQUAY, K.J.O., NOVY, R., PLAYER, D., REDFORD, T., SIMARD, A., STAMLER, S., WEBBER, Q.M.R., YUMVIHOZE, E., ZANUTTIG, M. Spatial variation of mercury bioaccumulation in bats of Canada linked to atmospheric mercury deposition. **Science of The Total Environment**, v. 626, p. 668–677, 2018.

CHRISTINAL, J.; SUMATHI, T. Effect of *Bacopa monniera* Extract on

Methylmercury-Induced Behavioral and Histopathological Changes in Rats. **Biological Trace Element Research**, v. 155, n. 1, p. 56–64, 20 out. 2013.

CLARKSON, T. W.; VYAS, J. B.; BALLATORI, N. Mechanisms of mercury disposition in the body. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 50, n. 10, p. 757–764, 2007.

CONRAD, M., SCHNEIDER, M., SEILER, A., BORNKAMM, G. W. Physiological role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammals. **Biological Chemistry**, v. 388, n. 10, p. 1019–1025, 2007.

COSTA, B.G., DE LACERDA, L.D. Concentração de mercúrio total em Cavala, *Scomberomorus cavalla*, e Serra, *Scomberomorus brasiliensis*, comercializadas nas bancas de pescado do Mucuripe, Fortaleza, Ceará. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 42, n. 1, p. 22-29, 2009.

DAVE, V., MULLANEY, K. J., GODERIE, S., KIMELBERG, H. K., ASCHNER, M.. Astrocytes as mediators of methylmercury neurotoxicity: effects on D-aspartate and serotonin uptake. **Developmental neuroscience**, v. 16, n. 3–4, p. 222–31, 1994.

DE GIORGI, F., LARTIGUE, L., BAUER, M.K., SCHUBERT, A., GRIMM, S., HANSON, G.T., REMINGTON, S.J., YOULE, R.J., ICHAS, F. The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. **The FASEB Journal**, v. 16, n. 6, p. 607–609, 2002.

DE LACERDA, L. D.; BEZERRA, M. F.; COSTA, B. G. B.; BRAGA, T. M.; DE ALENCAR GOYANNA, F. A. MERCURY DISTRIBUTION IN FISH COMMERCIALIZED AT THE MUCURIBE MARKET, FORTALEZA, CEARÁ STATE, BRAZIL. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 49, n. 1, p. 50–54, 2016.

DEBES, F., BUDTZ-JØRGENSEN, E., WEIHE, P., WHITE, R.F., GRANDJEAN, P. Impact of prenatal methylmercury exposure on neurobehavioral function at age 14 years. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 28, n. 5, p. 536–547, 2006.

DOI, R. Individual Difference of Methylmercury Metabolism in Animals and Its

Significance in Methylmercury Toxicity. In: **Advances in Mercury Toxicology**. Boston, MA: Springer US, 1991. p. 77–98.

DRINGEN, R., PFEIFFER, B., HAMPRECHT, B. Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 562–9, 1999.

EPA, U. **Method 1630, Methyl mercury in water by distillation, aqueous ethylation, purge and trap, and CVAFS**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&as_sdt=0%2C5&q=%09EPA-1630%3B+Methyl+mercury+in+water+by+distillation%2C+aqueous+ethylation%2C+purge+and+trap%2C+and+CVAFS.+Environmental+Protection+Agency%3A+Washington%2C+2001&btnG=>>. Acesso em: 5 out. 2017a.

EPA, U. Method 1630, Methyl mercury in water by distillation, aqueous ethylation, purge and trap, and CVAFS. **US Environmental Protection Agency, Washington, DC**, 1998b.

ESTADUAL, S.; AMBIENTE, M. ENCARTE ESPECIAL SOBRE A QUALIDADE DAS ÁGUAS DO RIO DOCE APÓS 2 ANOS DO ROMPIMENTO DE BARRAGEM DE FUNDÃO -2015/2017. 2017. Disponível em: <<http://www3.ana.gov.br/portal/ANA/sala-de-situacao/rio-doce/documentos-relacionados/encarte-qualidade-da-gua-do-rio-doce-dois-anos-apos-rompimento-de-barragem-de-fundao-1.pdf>>. Acesso em: 1 jul. 2018.

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. **Journal of Neurochemistry**, v. 103, n. 5, p. 1968–1981, 2007.

FALNOGA, I., TUŠEK-ŽNIDARIČ, M., HORVAT, M., STEGNAR, P. Mercury, selenium, and cadmium in human autopsy samples from Idrija residents and mercury mine workers. **Environmental Research**, v. 84, n. 3, p. 211–218, 2000.

FARINA, M., SOARES, F.A.A., ZENI, G., SOUZA, D.O., ROCHA, J.B.T. Additive

pro-oxidative effects of methylmercury and ebselen in liver from suckling rat pups. **Toxicology letters**, v. 146, n. 3, p. 227–35, 2004.

FARINA, M., CAMPOS, F., VENDRELL, I., BERENQUER, J., BARZI, M., PONS, S., SUÑOL, C. Probucol increases glutathione peroxidase-1 activity and displays long-lasting protection against methylmercury toxicity in cerebellar granule cells. **Toxicological Sciences**, v. 112, n. 2, p. 416–426, 2009.

FARINA, M.; ROCHA, J. B. T.; ASCHNER, M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: Evidence from experimental studies. **Life Sciences**, v.89, n.15–16, p. 555-63, 2011.

FRANCO, J. L. et al. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 4, p. 449–457, 2009a.

FRANCO, J. L., POSSER, T., DUNKLEY, P.R., DICKSON, P.W., MATTOS, J.J., MARTINS, R., BAINY, A.C., MARQUES, M.R., DAFRE, A.L., FARINA, M. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 4, p. 449–457, 2009b.

FUJIMURA, M.; CHENG, J.; ZHAO, W. Perinatal exposure to low-dose methylmercury induces dysfunction of motor coordination with decreases in synaptophysin expression in the cerebellar granule cells of rats. **Brain Research**, v. 1464, p. 1–7, 2012a.

FUJIMURA, M.; CHENG, J.; ZHAO, W. Perinatal exposure to low-dose methylmercury induces dysfunction of motor coordination with decreases in synaptophysin expression in the cerebellar granule cells of rats. **Brain Research**, v. 1464, p. 1–7, 2012b.

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.

GANDHI, D. N.; PANCHAL, G. M.; DHULL, D. K. Neurobehavioral toxicity in progeny of rat mothers exposed to methylmercury during gestation. **Annali dell'Istituto superiore di sanita**, v. 50, n. 1, p. 28–37, 2014.

GARG, T. K.; CHANG, J. Y. Methylmercury causes oxidative stress and cytotoxicity in microglia: Attenuation by 15-deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2. **Journal of Neuroimmunology**, v. 171, n. 1–2, p. 17–28, 2006a.

GARG, T. K.; CHANG, J. Y. Methylmercury causes oxidative stress and cytotoxicity in microglia: attenuation by 15-deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2. **Journal of neuroimmunology**, v. 171, n. 1–2, p. 17–28, 2006b.

GOTTLIEB, A.; KEYDAR, I. K.; EPSTEIN, H. T. Rodent Brain Growth Stages: An Analytical Review. **Neonatology**, v. 32, n. 3–4, p. 166–176, 1977.

GRANDJEAN, P.; WEIHE, P.; WHITE, R. F. Milestone development in infants exposed to methylmercury from human milk. **Neurotoxicology**, v. 16, n. 1, p. 27–33, 1995.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science (New York, N.Y.)**, v. 305, n. 5684, p. 626–9, 2004.

HARADA, M. Minamata Disease: Methylmercury Poisoning in Japan Caused by Environmental Pollution. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 1–24, 1995.

HEIMFARTH, L., DELGADO, J., MIGNORI, M.R., GELAIN, D.P., MOREIRA, J.C.F., PESSOA-PUREUR, R. Developmental neurotoxicity of the hippocampus following in utero exposure to methylmercury: impairment in cell signaling. **Archives of toxicology**, v. 92, n. 1, p. 513–527, 2018.

JOSHI, D., KUMAR, M.D., KUMAR, S.A., SANGEETA, S. Reversal of methylmercury-induced oxidative stress, lipid peroxidation, and DNA damage by the treatment of N-acetyl cysteine: a protective approach. **Journal of environmental pathology, toxicology and oncology: official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer**, v. 33, n. 2,

p. 167–82, 2014.

KASPER, D., FORSBERG, B.R., AMARAL, J.H., LEITÃO, R.P., PY-DANIEL, S.S., BASTOS, W.R., MALM, O. Reservoir Stratification Affects Methylmercury Levels in River Water, Plankton, and Fish Downstream from Balbina Hydroelectric Dam, Amazonas, Brazil. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 2, p. 1032–1040, 2014.

KENSLER, T. W., WAKABAYASHI, N. Nrf2: friend or foe for chemoprevention? **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 90–99, 2010.

KERSHAW, T. G., DHAHIR, P. H., CLARKSON, T. W. The Relationship between Blood Levels and Dose of Methylmercury in Man. **Archives of Environmental Health: An International Journal**, v. 35, n. 1, p. 28–36, 1980.

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.

KUIDA, K., HAYDAR, T.F., KUAN, C.Y., GU, Y., TAYA, C., KARASUYAMA, H., SU, M.S., RAKIC, P., FLAVELL, R.A. Reduced Apoptosis and Cytochrome c–Mediated Caspase Activation in Mice Lacking Caspase 9. **Cell**, v. 94, n. 3, p. 325–337, 1998.

LACERDA, L. D. de; MALM, O.; MALM, O. Contaminação por mercúrio em ecossistemas aquáticos: uma análise das áreas críticas. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 63, p. 173–190, 2008.

LI, B., LEE, D.S., JEONG, G.S., KIM, Y.C. Involvement of heme oxygenase-1 induction in the cytoprotective and immunomodulatory activities of 6,4'-dihydroxy-7-methoxyflavanone in murine hippocampal and microglia cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 674, n. 2–3, p. 153–162, 2012.

LIMKE, T. L.; ATCHISON, W. D. Acute exposure to methylmercury opens the mitochondrial permeability transition pore in rat cerebellar granule cells.

Toxicology and applied pharmacology, v. 178, n. 1, p. 52–61, 2002.

LIU, W., XU, Z., DENG, Y., XU, B., YANG, H., WEI, Y., FENG, S. Excitotoxicity and oxidative damages induced by methylmercury in rat cerebral cortex and the protective effects of tea polyphenols. **Environmental Toxicology**, v. 29, n. 3, p. 269–283, 2014.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, 1951.

LU, J.; HOLMGREN, A. Selenoproteins. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 2, p. 723–7, 2009.

MACEDO-JÚNIOR, S.J., LUIZ-CERUTTI, M., NASCIMENTO, D.B., FARINA, M., SOARES SANTOS, A.R., DE AZEVEDO MAIA, A.H. Methylmercury exposure for 14 days (short-term) produces behavioral and biochemical changes in mouse cerebellum, liver, and serum. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 80, n. 19–21, p. 1145–1155, 2017.

MADEJCZYK, M.S., AREMU, D.A., SIMMONS-WILLIS, T.A., CLARKSON, T.W., BALLATORI, N. Accelerated urinary excretion of methylmercury following administration of its antidote N-acetylcysteine requires Mrp2/Abcc2, the apical multidrug resistance-associated protein. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 322, n. 1, p. 378–84, 2007.

MANFROI, C. B., SCHWALM, F.D., CERESER, V., ABREU, F., OLIVEIRA, A., BIZARRO, L., ROCHA, J.B., FRIZZO, M.E., SOUZA, D.O., FARINA, M. Maternal Milk as Methylmercury Source for Suckling Mice: Neurotoxic Effects Involved with the Cerebellar Glutamatergic System. **Toxicological Sciences**, v. 81, n. 1, p. 172–178, 2004.

MASCARENHAS, A.F.S., BRABO, E.D.S., SILVA, A.P.D., FAYAL, K.D.F., JESUS, I.M.D., SANTOS, E.D. Avaliação da concentração de mercúrio em sedimentos e material particulado no rio Acre, estado do Acre, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 1, p. 61–68, 2004.

MELA, M., RANDI, M.A.F., VENTURA, D.F., CARVALHO, C.E.V., PELLETIER, E., RIBEIRO, C.O. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 68, n. 3, p. 426–35, 2007.

MIURA, K., KOIDE, N., HIMENO, S., NAKAGAWA, I., IMURA, N. The Involvement of Microtubular Disruption in Methylmercury-Induced Apoptosis in Neuronal and Nonneuronal Cell Lines. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 160, n. 3, p. 279–288, 1999.

MOREL, F. M. M.; KRAEPIEL, A. M. L.; AMYOT, M. THE CHEMICAL CYCLE AND BIOACCUMULATION OF MERCURY. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, n. 1, p. 543–566, 1998.

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. **Archives of Toxicology**, v. 81, n. 11, p. 769–776, 2007.

MORRIS, M.C., BROCKMAN, J., SCHNEIDER, J.A., WANG, Y., BENNETT, D.A., TANGNEY, C.C., VAN DE REST, O. Association of seafood consumption, brain mercury level, and APOE ϵ 4 status with brain neuropathology in older adults. **JAMA**, v. 315, n. 5, p. 489–497, 2016.

MYHRE, O.; FONNUM, F. The effect of aliphatic, naphthenic, and aromatic hydrocarbons on production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in rat brain synaptosome fraction: The involvement of calcium, nitric oxide synthase, mitochondria, and phospholipase A. **Biochemical Pharmacology**, v. 62, n. 1, p. 119–128, 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (U.S.). COMMITTEE ON THE TOXICOLOGICAL EFFECTS OF METHYLMERCURY. **Toxicological effects of methylmercury**. National Academy Press, 2000.

NEWLAND, M.C., REED, M.N., LEBLANC, A., DONLIN, W.D. Brain and blood mercury and selenium after chronic and developmental exposure to

methylmercury. **NeuroToxicology**, v. 27, n. 5, p. 710–720, 2006.

NI, M., LI, X., ROCHA, J.B., FARINA, M., ASCHNER, M. Glia and Methylmercury Neurotoxicity. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 75, n. 16–17, p. 1091–1101, 2012.

O'MALLEY, G. F. The blood of my veins – mercury, Minamata and the soul of Japan. **Clinical Toxicology**, v. 55, n. 8, p. 934–938, 2017.

WEIHE, P., HANSEN, J.C., MURATA, K., DEBES, F., JØRGENSEN, P.J., STEUERWALD, U., WHITE, R.F., GRANDJEAN, P. Neurobehavioral performance of Inuit children with increased prenatal exposure to methylmercury. *International Journal of Circumpolar Health*, v. 61, n. 1, p. 41-49, 2002.

PARK, Y., LEE, A., CHOI, K., KIM, H.J., LEE, J.J., CHOI, G., KIM, S., KIM, S.Y., CHO, G.J., SUH, E., KIM, S.K., EUN, S.H., EOM, S., KIM, S., KIM, G.H., MOON, H.B., KIM, S., CHOI, S., KIM, Y.D., KIM, J., PARK, J.. Exposure to lead and mercury through breastfeeding during the first month of life: A CHECK cohort study. **The Science of the total environment**, v. 612, p. 876–883, 2018.

PRINCE, L., KORBAS, M., DAVIDSON, P., BROBERG, K., RAND, M.D. Target Organ Specific Activity of Drosophila MRP (ABCC1) Moderates Developmental Toxicity of Methylmercury. **Toxicological Sciences**, v. 140, n. 2, p. 425–435, 2014.

REED, M. N.; PALETZ, E. M.; NEWLAND, M. C. Gestational exposure to methylmercury and selenium: Effects on a spatial discrimination reversal in adulthood. **NeuroToxicology**, v. 27, n. 5, p. 721–732, 2006.

ROOS, D.H., PUNTEL, R.L., FARINA, M., ASCHNER, M., BOHRER, D., ROCHA, J.B.T., DE VARGAS BARBOSA, N.B. Modulation of methylmercury uptake by methionine: Prevention of mitochondrial dysfunction in rat liver slices by a mimicry mechanism. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 252, n. 1, p. 28–35, 2011.

RUSH, T., LIU, X., NOWAKOWSKI, A.B., PETERING, D.H., LOBNER, D. Glutathione-mediated neuroprotection against methylmercury neurotoxicity in cortical culture is dependent on MRP1. **NeuroToxicology**, v. 33, n. 3, p. 476–481, 2012.

SAGARA, J.; MIURA, K.; BANNAI, S. Cystine Uptake and Glutathione Level in Fetal Brain Cells in Primary Culture and in Suspension. **Journal of Neurochemistry**, v. 61, n. 5, p. 1667–1671, 1993a.

SAGARA, J.; MIURA, K.; BANNAI, S. Maintenance of Neuronal Glutathione by Glial Cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 61, n. 5, p. 1672–1676, 1993b.

SAKAMOTO, M. et al. Declining risk of methylmercury exposure to infants during lactation. **Environmental Research**, v. 90, n. 3, p. 185–189, 1 nov. 2002.

SANTOS ALCÁNTARA, M. 1951-. Peroxisomal Proliferation Protects From Beta-Amyloid Neurodegeneration. 2005.

SAVASKAN, N. E., BORCHERT, A., BRÄUER, A. U., KUHN, H. Role for glutathione peroxidase-4 in brain development and neuronal apoptosis: Specific induction of enzyme expression in reactive astrocytes following brain injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 2, p. 191–201, 2007.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 192–205, 1968.

SOKOLOWSKI, K., FALLUEL-MOREL, A., ZHOU, X., 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.

TAKADA, A.; BANNAI, S. Transport of cystine in isolated rat hepatocytes in primary culture. **The Journal of biological chemistry**, v. 259, n. 4, p. 2441–5, 1984.

TAKEUCHI; T. Pathology of Minamata disease. **Minamata Disease**, p. 141–228,

1968.

TAKEUCHI, T. Pathology of Minamata disease. With special reference to its pathogenesis. **Acta pathologica japonica**, v. 32 Suppl 1, p. 73–99, 1982.

VEPRINTSEV, D.B., PERMYAKOV, E.A., KALINICHENKO, L.P., BERLINER, L.J. Pb²⁺ and Hg²⁺ binding to alpha-lactalbumin. **Biochemistry and molecular biology international**, v. 39, n. 6, p. 1255–65, 1996.

WANG, L., JIANG, H., YIN, Z., ASCHNER, M., CAI, J. Methylmercury toxicity and Nrf2-dependent detoxification in astrocytes. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 107, n. 1, p. 135–43, 2009.

WANG, X. F.; CYNADER, M. S. Astrocytes Provide Cysteine to Neurons by Releasing Glutathione. **Journal of Neurochemistry**, v. 74, n. 4, p. 1434–1442, 2002.

WANG, Z., LI, D.D., LIANG, Y.Y., WANG, D.S., CAI, N.S. Activation of astrocytes by advanced glycation end products: cytokines induction and nitric oxide release. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 23, n. 11, p. 974–80, 2002.

WATANABE, C., YOSHIDA, K., KASANUMA, Y., KUN, Y., SATOH, H. In utero methylmercury exposure differentially affects the activities of selenoenzymes in the fetal mouse brain. **Environmental research**, v. 80, n. 3, p. 208–214, 1999.

WATTS, J. **Mercury poisoning of thousands confirmed | World news | The Guardian.** Disponível em: <<https://www.theguardian.com/world/2001/oct/16/japan.jonathanwatts>>. Acesso em: 27 fev. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Environmental health criteria 101: methylmercury. **Geneva, Switzerland: World Health Organization**, p. 68-69, 1990.

YADETIE, F., KARLSEN, O.A., LANZÉN, A., BERG, K., OLSVIK, P., HOGSTRAND, C., GOKSØYR, A. Global transcriptome analysis of Atlantic cod (*Gadus morhua*) liver after in vivo methylmercury exposure suggests effects on

energy metabolism pathways. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 126, p. 314–25, 2013.

YE, B. J., KIM, B. G., JEON, M. J., KIM, S. Y., KIM, H. C., JANG, T. W., CHAE, H.J., CHOI, W.J., HA, M.N. HONG, Y.S. Evaluation of mercury exposure level, clinical diagnosis and treatment for mercury intoxication. **Annals of Occupational and Environmental Medicine**, v. 28, n. 1, p. 5, 2016.

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. **Journal of Neurochemistry**, v. 107, n. 4, p. 1083–1090, 2008.

YOSHIKAWA, T., NAITO, Y., KISHI, A., TOMII, T., KANEKO, T., LINUMA, 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, n. 6, p. 732–7, 1993.

YUAN, Y.; ATCHISON, W. D. Action of methylmercury on GABA(A) receptor-mediated inhibitory synaptic transmission is primarily responsible for its early stimulatory effects on hippocampal CA1 excitatory synaptic transmission. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 282, n. 1, p. 64–73, 1997.

ZEMOLIN, A. P. P., MEINERZ, D. F., DE PAULA, M. T., MARIANO, D. O. C., ROCHA, J. B. T., PEREIRA, A. B., POSSER, T., FRANCO, J. L. Evidences for a role of glutathione peroxidase 4 (GPx4) in methylmercury induced neurotoxicity in vivo. **Toxicology**, v. 302, n. 1, p. 60–67, 2012.

ZHAO, W., CHENG, J., GU, J., LIU, Y., FUJIMURA, M., WANG, W. Assessment of neurotoxic effects and brain region distribution in rat offspring prenatally co-exposed to low doses of BDE-99 and methylmercury. **Chemosphere**, v. 112, p. 170–6, 2014.

ANEXO I



UNIVERSIDADE DE FORTALEZA
Diretoria de Pesquisa Desenvolvimento e Inovação
Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA

PARECER Nº. 015/2016

Projeto de Pesquisa: Influência da dieta hiperlipidêmica e intoxicação por metilmercúrio em marcadores de neurodegeneração cerebral em camundongos C57BL/6J lactentes.

Pesquisador Responsável: Ramon da Silva Raposo
Finalidade de Proposta: Pesquisa

Data de apresentação ao CEUA: 01/06/16

Registro no CEUA: 16-017

Tipo de Animal: Roedores

Espécie: Camundongos Heterogênico

Linhagem: C57BL/6

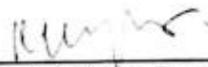
Quantidade: 120 (120 entre machos e fêmeas C57BL/6)

Idade e Peso: 4 dias / peso não definido

Vigência da autorização: 28/11/16 a 30/05/17

Origem dos Animais: Biotério de Produção do NUBEX- Núcleo de Biologia Experimental da Universidade de Fortaleza

Parecer: Aprovado na data de 28/11/16



Prof. Ramon da Silva Raposo
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA