



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

DANIEL VIEIRA PINTO

**INTOXICAÇÃO POR METILMERCÚRIO EM BAIXAS DOSES INDUZ
INFLAMAÇÃO SISTÊMICA, ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E
NEUROQUÍMICAS EM CAMUNDONGOS C57BL6/J ADULTOS**

FORTALEZA

2021

DANIEL VIEIRA PINTO

INTOXICAÇÃO POR METILMERCÚRIO EM BAIXAS DOSES INDUZ INFLAMAÇÃO
SISTÊMICA, ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS EM
CAMUNDONGOS C57BL6/J ADULTOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor. Área de Concentração: Biomedicina. Linha de Pesquisa: Patogêneses das doenças imunoinflamatórias

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá

FORTALEZA

2021

DANIEL VIEIRA PINTO

INTOXICAÇÃO POR METILMERCÚRIO EM BAIXAS DOSES INDUZ INFLAMAÇÃO
SISTÊMICA, ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS EM
CAMUNDONGOS C57BL6/J ADULTOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor. Área de Concentração: Biomedicina. Linha de Pesquisa: Patogêneses das doenças imunoinflamatórias

Aprovado em: ____ / ____ / 2021

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a Geanne Matos de Andrade
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Francisco de Assis Aquino Gondim
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ramon da Silva Raposo
Universidade de Coimbra (UC)

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)

- P727i Pinto, Daniel Vieira.
Intoxicação por metilmercúrio em baixas doses induz inflamação sistêmica, alterações comportamentais e neuroquímicas em camundongos c57bl6/j adultos / Daniel Vieira Pinto. – 2021.
143 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá.
1. Metilmercúrio. 2. Inflamação. 3. Hipocampo. 4. Neurotransmissores. 5. Memória. I. Título.

CDD 610

A Deus, primeiramente.

À família que Deus me permitiu ter, minha esposa, Ana Araújo Lobo, e filha, Yasmin Pinto Araújo.

Aos meus pais, Francisco Danúcio Pinto e Maria Stelia Vieira Pinto, a família com a qual Deus me abençoou.

AGRADECIMENTO

Ao meu orientador, Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, pela confiança no decurso de todo esse processo de aprendizado e orientações, moldando minha forma de pensar e fazer ciência.

Ao Prof. Dr. Ramon da Silva Raposo, acima de um parceiro de pesquisa, um amigo com quem pude contar inúmeras vezes. Acho até que conversamos mais sobre os problemas pessoais do que sobre os projetos. Sem o qual a parceria NuBEx – LABICONTE não existiria.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos pela presença na banca de qualificação, e pelas observações construtivas que foram feitas, e banca de defesa.

À Profa. Dra. Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos pela presença na banca de defesa e pelas contribuições a serem acrescentadas.

À Profa. Dra. Flávia Almeida Santos pela cessão do espaço no Laboratório de Produtos Naturais para que fossem feitas análises.

À Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade pelos materiais cedidos em auxílio ao desenvolvimento desta pesquisa, bem como na construção de ideias que permeiam este trabalho.

Aos Profs. Drs. João José Oliveira Malva e Carlos Alberto Fontes Ribeiro, pela ajuda na condução de todo protocolo experimental. Além de proporcionar uma parceria tão vantajosa para nós, onde pudemos aprender bastante nesse tempo.

À Profa. Dra. Elisabeth de Francesco Daher, mesmo sem ter tido muito contato com ela no período de doutoramento, seus conselhos ecoavam me guiando para boas decisões

Ao amigo Prof. Dr. Márcio Wilker Campelo pela amizade e auxílio, agora repito as palavras ditas ao Ramon, muitas vezes mais pessoal que profissional.

Aos amigos que fiz durante toda essa jornada de IC voluntário a doutorado, André Penha, Fátima Virgínia, Gabriela Matos, Cássia Roque, Juan Caminha, Ronaldo Dias, Leonardo Lobo, Robson Matos, Júlio César Chaves, José Vilar, Juliana Rêgo, Cristhyane Aquino, Kildere Canuto, José Carlos Rodrigues, Paulo Iuri Gomes pelo companheirismo.

Às colegas Juliete Tavares e Tyciane de Souza Nascimento pelo auxílio no desenvolvimento de protocolos de análises, sem os quais este trabalho não teria a relevância que se apresenta.

Aos alunos de iniciação científica André Penha, Imille Prazeres, Fernanda Tiraboschi e Ingrid Guedes pelo auxílio na parte de experimentação animal.

Às secretárias Ivone Mary Fontenele e Rita de Cássia Fernandes do Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas por toda disponibilidade e gentileza quando solicitadas.

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

Ao programa de parceria entre a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), governo do Estado do Ceará, e a Fundação para Ciência e Tecnologia (FCT), Portugal, que proporcionou o financiamento da pesquisa que gerou os resultados aqui apresentados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo incentivo e fomento da pesquisa nacional.

“Que é a vossa vida? Sois, apenas, como neblina que aparece por instante e logo dissipa.” (Tiago 4: 14)

RESUMO

O metilmercúrio (MeHg) é um organometal com forte ação neurotóxica no sistema nervoso central (SNC). A contaminação humana por MeHg se dá, em sua maioria, pelo consumo de peixes, frutos do mar ou água contaminada. No SNC, o MeHg pode causar neuroinflamação e aumento de estresse oxidativo, induzindo a morte de neurônios no hipocampo. Muitos trabalhos têm documentado o efeito deletério do MeHg no hipocampo, porém a neurotoxicidade em baixo grau e crônica do MeHg ainda não foi avaliada em camundongos adultos com foco em neurotransmissores, inflamação, estresse oxidativo no hipocampo e memória. Neste trabalho foram utilizados camundongos C57BL6J adultos intoxicados com 2mg de MeHg/L na água de beber por 30 dias e controles. Foram avaliados concentrações séricas de endotoxina (LPS), mieloperoxidase (MPO) e TNF- α , como marcadores de inflamação sistêmica e colesterol total e triacilgliceróis para avaliar dislipidemia. Concentrações no tecido hipocampal de neurotransmissores (glutamato, tirosina, taurina, ácido gama-amino butírico (GABA) e glicina), atividade da acetilcolinesterase, expressão gênica de marcadores inflamatórios (IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10), malondialdeído (MDA), estresse oxidativo, MPO e fator de crescimento derivado do cérebro (BDNF). Testes comportamentais foram realizados a fim de avaliar prejuízo motor e comportamento exploratório (campo aberto), memória de trabalho (labirinto em Y), memória espacial e de longo-prazo (labirinto de Barnes). O peso dos animais foi monitorado semanalmente. Os animais intoxicados tiveram um maior ganho de peso. O grupo intoxicado também apresentou maiores concentrações séricas de triacilgliceróis e colesterol total ($p < 0,05$) e concentrações periféricas mais elevadas de LPS ($p = 0,01$), TNF- α ($p < 0,0001$) e MPO ($p < 0,0001$) em relação aos controles. Os animais intoxicados apresentaram maiores concentrações tissulares hipocampais de MDA ($p = 0,008$) e de MPO ($p < 0,05$). A expressão gênica de IL-4 foi menor no grupo intoxicado ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. A concentração dos neurotransmissores GABA ($p < 0,05$) e glicina ($p < 0,0001$) foi mais elevada no grupo intoxicado, com redução da concentração de taurina ($p = 0,003$), porém sem alteração nos níveis de glutamato e tirosina. Os animais intoxicados apresentaram menor distância total percorrida ($p = 0,02$), menor velocidade média ($p = 0,02$), menores registros de *rearing* ($p = 0,01$) e maiores registros de *grooming* ($p = 0,01$) que o grupo controle no teste de campo aberto. Não houve diferença significativa na memória de trabalho, espacial ou de aprendizado. Os achados desse trabalho sugerem que a intoxicação de baixo grau com MeHg induz alterações bioquímicas no hipocampo, com distúrbio de neurotransmissores inibitórios associando-se à dislipidemia e inflamação sistêmica, essa última presumivelmente devido à alteração da barreira intestinal.

Palavras-chaves: Metilmercúrio; Hipocampo; Neurotransmissores; Inflamação; Estresse oxidativo; Memória.

ABSTRACT

Methylmercury (MeHg) is an organometal with strong neurotoxic action on the central nervous system (CNS). Human contamination by MeHg is mostly due to the consumption of fish, seafood or contaminated water. In the CNS, MeHg can cause neuroinflammation and increased oxidative stress, inducing the death of neurons in the hippocampus. Many studies have documented the harmful effect of MeHg in the hippocampus, but the low-grade and chronic neurotoxicity of MeHg has not yet been evaluated in adult mice with a focus on neurotransmitters, inflammation, oxidative stress in the hippocampus and memory. In this work, adult C57BL6J mice intoxicated with 2mg MeHg / L in drinking water for 30 days and controls were used. Serum concentrations of endotoxin (LPS), TNF- α and myeloperoxidase (MPO) were evaluated as markers of systemic inflammation and total cholesterol and triglycerides to assess dyslipidemia. Hippocampal tissue concentrations of neurotransmitters (glutamate, tyrosine, taurine, gamma-amino butyric acid (GABA) and glycine), acetylcholinesterase activity, gene expression of inflammatory markers (IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-6 and IL-10), malondialdehyde (MDA), oxidative stress, MPO and brain-derived growth factor (BDNF). Behavioral tests were carried out in order to assess motor impairment and exploratory behavior (open field), working memory (Y-maze), spatial memory and long-term memory (Barnes maze). The animals' weight was monitored weekly. Intoxicated animals had a greater weight gain. The intoxicated group also had higher serum concentrations of triacylglycerols and total cholesterol ($p < 0.05$) and higher peripheric concentrations of LPS ($p = 0.01$), TNF- α ($p < 0.0001$) and MPO ($p < 0.0001$) compared to controls. Intoxicated animals had higher hippocampal tissue concentrations of MDA ($p = 0.008$) and MPO ($p < 0.05$). Gene expression of IL-4 was lower in the intoxicated group ($p < 0.05$) compared to the control group. The concentration of neurotransmitters GABA ($p < 0.05$) and glycine ($p < 0.0001$) was higher in the intoxicated group, with a reduction in the concentration of taurine ($p = 0.003$), but without changes in the levels of glutamate and tyrosine. Intoxicated animals had the lowest total distance covered ($p = 0.02$), the lowest average speed ($p = 0.02$), the lowest rearing records ($p = 0.01$) and the highest grooming records ($p = 0.01$) that the group controls in the open field test. There was no significant difference in working, spatial or learning memory. The findings of this study suggest that low-grade MeHg intoxication induces biochemical changes in the hippocampus, with disturbance of inhibitory neurotransmitters associated with dyslipidemia and systemic inflammation, the latter presumably due to changes in the intestinal barrier.

Keywords: Methylmercury; Hippocampus, Neurotransmitters, Inflammation, Oxidative stress, Memory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fontes globais de contaminação por mercúrio.....	16
Figura 2 - Desastres ambientais no estado de Minas Gerais e concentrações de mercúrio no leito dos rios.	18
Figura 3 - Efeito despolarizante do LTP no neurônio pós-sináptico	26
Figura 4 - Visão geral do hipocampo de um camundongo e esquema da via de sinalização trissináptica hipocampal	32
Figura 5 - Esquema gráfico da entrada do MeHg no Sistema Nervoso Central através do trato gastrointestinal	43
Figura 6 - Esquema do efeito neurotóxico do MeHg no SNC	44
Figura 7 - Via de sinalização inflamatória mediada pela micróglia na presença de baixas doses de MeHg.....	48
Figura 8 - Descrição do aparato utilizado para o labirinto de Barnes	63
Figura 9 - A. Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na curva de ganho de peso e B. no delta de ganho de peso de camundongos C57BL6J adultos	68
Figura 10 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na média consumo hídrico e consumo hídrico diário de camundongos C 57BL6J adultos	69
Figura 11 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na concentração sérica de triacilgliceróis e colesterol total de camundongos C57BL6J adultos.....	71
Figura 12 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na inflamação sistêmica, avaliado pela concentração plasmática de TNF- α e MPO e sérica de LPS em camundongos C57BL6J adultos.....	72
Figura 13 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na neuroplasticidade, avaliada pela concentração de BDNF no hipocampo de camundongos C 57BL6J adultos.....	73
Figura 14 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na peroxidação lipídica, avaliada pela concentração de MDA no hipocampo de camundongos C57BL6J adultos	74
Figura 15 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na atividade de MPO no hipocampo de camundongos C57BL6J adultos	75

Figura 16 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na expressão gênica de IL-4, IFN- γ , IL-5, IL-6 e IL-10 no hipocampo de camundongos C57BL6J adultos.....	76
Figura 17 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na atividade da acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo de camundongos C57BL6J adultos	78
Figura 18 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na concentração de GABA, glicina, taurina, glutamato e tirosina no hipocampo de camundongos C57BL6J adultos.....	79
Figura 19 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na exploração espacial no teste de campo aberto.....	81
Figura 20 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na exploração vertical (rearing) e autolimpeza (grooming) no teste de campo aberto	83
Figura 21 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na memória de trabalho avaliada pelo labirinto em Y	84
Figura 22 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na memória espacial (aquisições) pelo labirinto de Barnes	85
Figura 23 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na memória de longo prazo (probe) pelo labirinto de Barnes	86
Figura 24 - Proposta da ação neuroprotetora da taurina na inflamação mediada pela MPO após intoxicação por MeHg em baixas doses	100

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1 - Principais neurotransmissores que atuam na memória	34
Tabela 2 - Demonstrativo do número de animais entre os grupos e protocolos	55
Tabela 3 - Sequência nucleotídica dos primers utilizados	60

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Ciclo da contaminação por metilmercúrio.....	16
1.1.1 Casos de contaminação humana por mercúrio no Brasil	19
1.1.2 Manifestações clínicas da intoxicação por metilmercúrio	21
1.2 Memória	22
1.2.1 Potencial de longa duração (LTP), aprendizado e memória.....	25
1.2.1.1 Fase de indução do LTP/LTD.....	26
1.2.1.2 Fases de expressão e transdução do LTP/LTD	28
1.2.2 Memória de trabalho.....	29
1.3 Hipocampo e memória	30
1.3.1 Função da acetilcolina na formação de memória	36
1.3.2 Papel do glutamato na formação da memória.....	37
1.3.3 Papel do GABA e glicina na formação de memória	38
1.4 A interação do MeHg com o metabolismo lipídico.....	39
1.5 Neurotoxicidade induzida pelo metilmercúrio	42
1.5.1 Aumento de espécies reativas de oxigênio e indução de apoptose pela intoxicação por MeHg.....	45
1.5.2 Lesão na BHE e neuroinflamação induzida pela intoxicação por MeHg	46
1.5.3 A ação neurotóxica do MeHg na sinalização neuronal.....	49
1.5.4 Prejuízos cognitivos e motores associados à contaminação por MeHg	51
2 JUSTIFICATIVA	53
3 OBJETIVOS	54
3.1 Objetivo geral	54
3.2 Objetivos Específicos	54
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
4.1 Experimentação animal	55
4.2 Intoxicação mercurial	56
4.3 Relação do consumo de metilmercúrio dos animais e humano	58
4.4 Avaliação do perfil lipídico	58
4.5 Ensaio imunoenzimático ELISA	59
4.6 Avaliação da peroxidação lipídica	59
4.7 Análise da expressão gênica.....	60

4.8 Avaliação da atividade da acetilcolinesterase	61
4.9 Quantificação tecidual de neurotransmissores por cromatografia líquida de alta resolução.....	61
4.10 Teste de campo aberto.....	61
4.11 Labirinto em Y	62
4.12 Labirinto de Barnes	63
4.13 Equipamentos e Materiais	64
4.14 Reagentes e soluções	66
4.15 Análise estatística	67
5 RESULTADOS	68
5.1. Avaliação do peso corporal, consumo hídrico e estimativa do consumo de MeHg no decurso do tratamento	68
5.2 Avaliação de parâmetros lipídicos dos animais.....	70
5.3 Avaliação da inflamação sistêmica.....	71
5.4. Avaliação da concentração de BDNF no hipocampo	73
5.5. Avaliação da peroxidação lipídica no hipocampo.....	73
5.6. Avaliação da atividade MPO hipocampal	74
5.7. Avaliação da expressão gênica de citocinas no hipocampo.....	75
5.8 Avaliação da atividade da acetilcolinesterase no hipocampo.....	77
5.9 Avaliação da concentração de neurotransmissores no hipocampo.....	78
5.10. Avaliação comportamental exploratória e locomotora dos animais.....	80
5.11 Avaliação da memória de trabalho pelo labirinto em Y	83
5.12. Avaliação da memória espacial e de longo prazo pelo labirinto de Barnes.....	84
6 DISCUSSÃO	87
7 CONCLUSÃO.....	102
REFERÊNCIAS.....	103
APÊNDICE A - MAPA GERAL DOS RESULTADOS	135
ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA PARA USO ANIMAL.....	136
ANEXO B - PUBLICAÇÕES DECORRENTES DA PESQUISA	137
ANEXO C - OUTRAS PUBLICAÇÕES REALIZADAS NO DECURSO DO PRAZO DE DOUTORAMENTO COM O ORIENTADOR.....	140
ANEXO D - PUBLICAÇÕES COM O ORIENTADOR SUBMETIDOS PARA APROVAÇÃO EM PERIÓDICOS.....	143

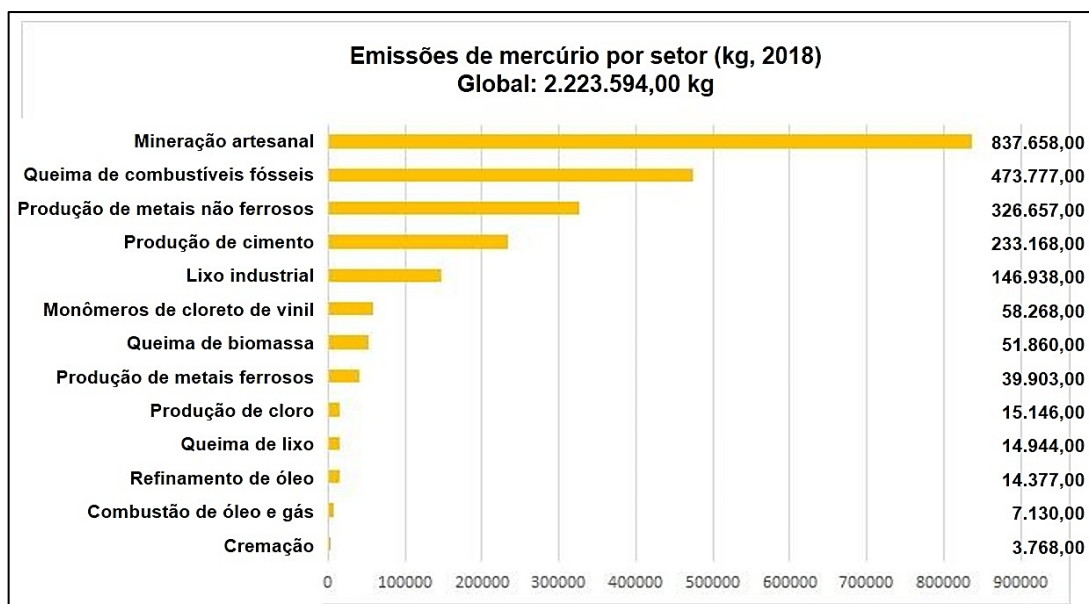
1 INTRODUÇÃO

1.1 Ciclo da contaminação por metilmercúrio

O mercúrio é um metal pesado líquido em temperatura ambiente e com ponto de ebulição relativamente baixo (356° C). Tem amplo uso na mineração de ouro, incineração de combustíveis fósseis e produção de acetaldeído (CHÉTELAT et al., 2018). É passivo de processo de metilação por bactérias, formando um organocomposto com afinidade pelos grupamentos sulfidrílicos e seleniol de proteínas. Apresenta-se sob duas formas metiladas, o metilmercúrio (CH₃Hg⁺) e o dimetilmercúrio [(CH₃)₂Hg] (MOREL; KRAEPIEL; AMYOT, 1998).

A intoxicação endêmica por metilmercúrio (MeHg) tem sido descrita na região Norte, com sua vasta riqueza e biodiversidade, em grande parte devido à mineração ilegal (KAUANO; SILVA; MICHALSKI, 2017). A atividade mineradora artesanal utiliza o mercúrio (Hg) para identificar pepitas de ouro e é a maior fonte de contaminação por mercúrio da atualidade (**Figura 1**). Um composto com Hg é separado do ouro por aquecimento e lavado nas águas dos rios. Depositando-se nos leitos, passa a sofrer processo de metilação por bactérias presentes em algas, formando o metilmercúrio (MeHg). Esta forma orgânica tem maior potencial tóxico devido sua facilidade de atravessar membranas celulares e de se ligar a aminoácidos como a cisteína, facilitando seu transporte (HUDELSON et al., 2020).

Figura 1 - Fontes globais de contaminação por mercúrio



Fonte: Adaptado de AMAP/UN Environment, 2019.

Estudos realizados em populações ribeirinhas ao longo do Rio Tapajós demonstraram que o consumo de peixe é a principal fonte de alimento e, portanto, a via potencial de intoxicação do MeHg (SAMPAIO DA SILVA et al., 2009). A análise de Hg no cabelo tem sido utilizada para avaliar o nível de intoxicação dessas populações ribeirinhas, inclusive na Amazônia. Essas análises têm confirmado níveis tóxicos crescentes de Hg na população ribeirinha do Tapajós, com valores médios aferidos em 2013 de 7,25 µg Hg/g, e em 2014 10,80 µg Hg/g. Ambos acima do valor limite pela OMS (6,0 µg Hg/g), indicando exposição crônica crescente ao MeHg nessas populações (COSTA JUNIOR et al., 2018).

Recentemente, desastres ambientais em larga escala ocorridos nos municípios de Mariana, Minas Gerais - MG (Dezembro, 2015), e Brumadinho - MG (Janeiro, 2019), chamaram atenção para possível contaminação por MeHg. Estes locais sofreram com o rompimento de barragens de rejeitos de mineração, oriundos da empresa Vale, levando toneladas de dejetos químicos ao longo do curso dos rios locais (ALMEIDA; JACKSON FILHO; VILELA, 2019; DAVILA et al., 2020).

Um mês após o desastre ambiental de Mariana, a Agência Nacional de Águas registrou em um dos tributários do Rio Doce (Rio Gualaxo do Norte) a medição de 0,89 µg Hg/L de água, posteriormente a esse registro, todas as medições seguiram o padrão máximo considerado pelo CONAMA para águas doces classe 1 (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS, 2020). A tragédia que acometeu Brumadinho ocorreu em janeiro de 2019, e as leituras registradas na estação de Mário Campos (BP068) no dia 26 de janeiro registravam 4,23 µg Hg/L, chegando ao final do mês seguinte com valores de 0,42 µg Hg/L. As leituras seguintes se mantiveram no limite detectável (0,2 µg Hg/L) ou abaixo dele (**Figura 2**) (MINAS GERAIS, 2020). A resolução 357/2005, do CONAMA regula que a concentração máxima de Hg para águas doces de classe 1 (contato primário, aquicultura e atividade de pesca) é de 0,2 µg/L. Conforme citado por Raposo *et al*, 2020, os problemas decorrentes desses desastres ambientais não serão percebidos a curto prazo e requerem atenção continuada dos serviços públicos. Acompanhamento de níveis de metais pesados no sangue e cabelo da população local, bem como medidas para reduzir os riscos da contaminação por MeHg são necessárias para evitar um maior impacto no serviço público de saúde com doenças neurodegenerativas e cardiovasculares oriundas da intoxicação por MeHg (RAPOSO et al., 2020).

Figura 2 - Desastres ambientais no estado de Minas Gerais e concentrações de mercúrio no leito dos rios.

Mariana – MG (dezembro de 2015)		Brumadinho – MG (janeiro de 2019)	
			
ÁREAS AFETADAS	MEDIÇÕES		
Mariana - MG	Janeiro de 2016	Março de 2016	
	0,89 µg Hg/L*	0,2 µg Hg/L**	
Brumadinho - MG	Janeiro 2019	Mai de 2019	
	4,23 µg Hg/L*	0,2 µg Hg/L**	

Fonte: Adaptado de (AGÊNCIA CÂMARA DE NOTÍCIAS, 2017; 2020)

*AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS, 2020. *MINAS GERAIS, 2020. **Res 357/2005, CONAMA, limites para águas doces Classe 1, 0,2 µg Hg/L.

Além da contaminação pela água e consumo de peixes intoxicados, outro potencial causador de intoxicação por Hg é o uso de amálgamas dentais. Um estudo de 2013 informa que o descarte de material odontológico é uma das principais fontes de contaminação por mercúrio encontradas na Índia, perdendo apenas para a contaminação por pesticidas (BURGER CHAKRABORTY et al., 2013). A relação entre o aumento de Hg no sangue ou cabelo com a presença de amálgamas dentais à base de Hg não é nova, devido à sua composição em torno de 50% de mercúrio. O amálgama dentário, depois de aderido ao dente, emite vapor de mercúrio e também libera frações desse metal durante a mastigação (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2009; MITCHELL et al., 2018).

O maior risco do uso de restaurações dentárias com mercúrio está nas populações mais pobres e com menos acesso a tratamentos odontológicos e de saúde, além de alimentação variada. Em particular, as crianças tornam-se mais suscetíveis a maiores danos aos dentes, necessitando de restauração, devido à alimentação ou até mesmo a precários cuidados com a higiene bucal. Com um custo menor, os amálgamas de mercúrio são os mais utilizados devido à falta de recursos financeiros dessa parcela da população (MITCHELL et al., 2018; WILBURN, 2013).

1.1.1 Casos de contaminação humana por mercúrio no Brasil

Em 1980, o Brasil passou a relatar casos de intoxicação humana por mercúrio na região amazônica (rio Tapajós), onde a mineração do ouro é uma atividade endêmica (BERZAS NEVADO et al., 2010). Nas demais regiões do país outros incidentes envolvendo contaminação por mercúrio também foram relatados, mas com outros cenários e motivos.

Os dois relatos associados à região Sudoeste estão relacionados ao uso de restaurações dentárias à base de mercúrio, amálgama e despejo ilegal de esgoto em mananciais hídricos (KUNO et al., 2013a; ALMEIDA LOPES et al., 2017). Demonstrando uma relação positiva entre a quantidade de restaurações dentárias e o aumento de metal no sangue. No entanto, esses níveis detectados não foram suficientes para promover o aumento de marcadores como o malondialdeído (MDA), um marcador de dano à membrana celular no sangue periférico desses indivíduos (KUNO et al., 2013b; ALMEIDA LOPES et al., 2017).

Apesar da contaminação das nascentes por fontes antrópicas, como o descarte de materiais de consultórios odontológicos e resíduos industriais, o maior número de relatos de contaminação por Hg no Brasil ocorre em populações ribeirinhas. Como o relatado no Centro-Oeste e Nordeste, em pessoas que tiveram contato com peixes ou farinha de peixe dos rios locais (DA CUNHA; DA COSTA; CALDAS, 2013; MILHOMEM FILHO et al., 2016).

É importante observar que os mesmos rios da Região Norte têm ramificações em outros estados brasileiros e estão associados a casos notificados em estados vizinhos. Em Brasília, 18 mães apresentaram aumento nos níveis de mercúrio total após o consumo de farinha de peixe, recomendada como aditivo na dieta (DA CUNHA; DA COSTA; CALDAS, 2013). Da mesma forma, 25 famílias no estado do

Maranhão, apresentaram altos níveis de mercúrio após comer peixes do rio Tocantins, que tem origem na região Norte do país (MILHOMEM FILHO et al., 2016). O relato de casos de contaminação em locais banhados por rios originários da Região Norte mostra que os resíduos químicos depositados no leito desses rios podem ser transportados ao longo deles, seja por peixes ou mesmo pelo escoamento da água. Outra possibilidade é a existência de novas fontes de contaminação ao longo do leito desses rios.

No entanto, a ocorrência de eventos, mesmo em locais distantes do epicentro da área de contaminação, demonstra que as populações locais precisam de mais atenção, uma vez que dependem dos rios para sua alimentação e suporte financeiro. Outros afluentes do rio Tocantins também apresentam registros de contaminação, além dos registrados nos estados do Distrito Federal (Brasília) e Maranhão (Imperatriz). Um estudo realizado no rio Tucuruí, com 37 participantes, mostrou altos níveis de mercúrio no sangue periférico dos ribeirinhos do estado do Pará (FEITOSA-SANTANA et al., 2018).

Isso fica bem demonstrado ao observar os relatórios de contaminação ao longo do rio Madeira, ocorrendo tanto no território do estado do Amazonas quanto no estado de Rondônia (RO). Na localidade de Bom Futuro (RO) foi realizado estudo com 294 crianças expostas à contaminação por mercúrio. Os pesquisadores verificaram retardo no desenvolvimento cognitivo, variável por sexo, tendo prevalência no sexo masculino (COSTA JUNIOR et al., 2018). Da mesma forma, estudo com população contaminada por mercúrio (n = 93) mostrou que os homens são mais suscetíveis à contaminação por mercúrio do que as mulheres, apenas sendo percebido em homens acima de 35 anos (FILLION et al., 2009).

Ainda no estado de RO, estudo com garimpeiros (Rio do Rato) mostrou aumento dos níveis de mercúrio no sangue e de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IFN- γ (ARRIFANO et al., 2018a, 2018b).

Acompanhando a vazão do rio Madeira, foram analisadas 1.945 amostras de cabelos de ribeirinhos. O resultado se assemelha a uma relação dose-dependente entre o consumo de peixe e os níveis de mercúrio dessas pessoas. Esses elementos são impulsionados pelas características de subsistência que a população possui em relação ao uso da água do rio e dos alimentos que dela derivam (KHOURY et al., 2015).

1.1.2 Manifestações clínicas da intoxicação por metilmercúrio

As primeiras manifestações clínicas registradas e atribuídas à contaminação por MeHg são referentes ao desastre de Minamata, em 1950. Ocorrido devido ao despejo de água contaminada com sulfeto de mercúrio, usado na fabricação de acetaldeído, por indústria local, contaminando a população da vila de Minamata (IRUKAYAMA K, 1977). A partir do estudo das manifestações clínicas da população local os sintomas forma denominados síndrome de Minamata, sendo posteriormente associado à intoxicação por MeHg.

Em 1971 outro incidente chama a atenção de autoridades do mundo para a gravidade da intoxicação causada pelo MeHg. O consumo de grãos contaminados com um fungicida a base de MeHg no Iraque provocou muitos casos de intoxicação severa e mortes (BAKIR et al., 1973).

As desordens de ordem neurológica não afetaram apenas humanos contaminados com MeHg. Apenas em 1953 ocorre o primeiro registro de efeitos da contaminação humana por MeHg, porém, em 1950 efeitos neurológicos já haviam sido descritos como um estranho fenômeno ocorrido na região de Minamata (HARADA, 1995).

Dentre os fenômenos observados estavam peixes nadando em movimentos repetitivos circulares e flutuando próximo à superfície, ostras e mariscos abrindo-se espontaneamente e entrando em decomposição e pássaros que caíam durante o voo. Porém, a alteração no comportamento dos gatos locais foi um dos elementos chave para desvendar a misteriosa doença até então chamada de doença de Minamata (HARADA, 1978). Os gatos do local apresentavam excessiva salivação, convulsões, movimentos giratórios frenéticos, eram incapazes de caminhar em linha reta e após pouco tempo morriam. Esses animais foram examinados por um grupo de pesquisadores e verificada intoxicação por Hg, com concentrações no cérebro de 18,6 mg/kg e pelo de 134,0 mg/kg (HARADA, 1995; ETO; MARUMOTO; TAKEYA, 2010).

Os pacientes acompanhados nos desastres de Minamata e no Iraque apresentavam por sua vez sintomas semelhantes, como confusão mental, depressão, irritabilidade (MCALPINE; ARAKI, 1958; MAGHAZAJI, 1974; JACKSON, 2018) redução do campo visual, prejuízo sensorial, ataxia, disartria (JACKSON, 2018), distúrbios auditivos (YORIFUJI et al., 2008), hipersalivação, tremores, rigidez muscular e reflexos tendíneos exagerados (TOKUOMI, 1960; YAMANAGA, 1983;

HARADA, 1995; ETO; MARUMOTO; TAKEYA, 2010). Análises patológicas *post mortem* apresentaram dano ao córtex cerebelar, com redução das células granulares, dano à região calcarina do lobo frontal (relacionado com a visão) (HUNTER; RUSSELL, 1954; TAKEUCHI et al., 1962), córtex pré frontal e temporal (TAKEUCHI, 1982; HARADA, 1995; ETO; MARUMOTO; TAKEYA, 2010). Nos gânglios da raiz dorsal foi percebida desmielinização afetando a comunicação do impulso nervoso (TAKEUCHI et al., 1962; HARADA, 1982). Nos pacientes autopsiados com morte decorrente de intoxicação por MeHg foram encontradas concentrações no cérebro de 2,6 a 24,8 mg/kg e no pelo de 2,46 a 705 mg/kg (HARADA, 1995; ETO; MARUMOTO; TAKEYA, 2010).

Nos estudos desenvolvidos na região da Amazônia brasileira o valor máximo detectado da concentração de Hg no pelo de moradores ribeirinhos adultos foi de 47 mg/kg, valor bem menor que o máximo encontrado em moradores da região de Minamata (RODRIGUES et al., 2007; SANTOS-SACRAMENTO et al., 2021). Ainda assim, pesquisas desenvolvidas nessa região apresentaram dados compatíveis com dano neurológico semelhante aos verificados nas populações de Minamata e do Iraque, tais como redução da destreza manual (DOLBEC et al., 2000), prejuízos cognitivos, presença de tremores, comprometimento da audição (HARADA et al., 2001; BENEFICE; LUNA-MONRROY; LOPEZ-RODRIGUEZ, 2010), comprometimento da acuidade visual e percepção de cores (FILLION et al., 2011a, 2011b), insônia, ansiedade e irritabilidade (CORBETT et al., 2007; JUNIOR et al., 2017).

O prejuízo cognitivo verificado nos sujeitos intoxicados, bem como as alterações morfológicas neuronais se relacionam com o aparecimento de doenças neurodegenerativas, bem como com o prejuízo na formação e consolidação da memória.

1.2 Memória

Memória é um processo cerebral complexo de armazenamento e recuperação de informações. As memórias de longa duração são classificadas como procedimentais ou declarativas. As memórias procedimentais são aquelas associadas a ações, como fazer, já as declarativas se relacionam com conceitos ou conhecimentos acumulados. A base para a formação da memória é a comunicação

neuronal caracterizada como potencial de longo termo (LTP). O LTP é associado à modulação da plasticidade sináptica e à modulação do armazenamento de memória (DAUGHERTY et al., 2016; SOLARI; HANGYA, 2018a; FELD; BORN, 2020).

O envelhecimento é marcado pela maturação dos processos de sinalização neuronal. Doenças neurodegenerativas como o Alzheimer promovem danos no processo de sinalização e formação da memória. O processamento e formação da memória é influenciado pelos sistemas glutamatérgico, GABAérgico, colinérgico, noradrenérgico e serotoninérgico (MYHRER, 2003).

Os potenciais de longa duração (LTP) são estímulos que se caracterizam pela sua ação sobre os receptores ionotrópicos N-metil D-aspartato (NMDA_R) e ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA_R), os quais fazem parte dos receptores presentes nas vias de sinalização glutamatérgicas. A sinalização glutamatérgica de modo geral, está relacionada diretamente ao processo de aprendizado. Os NMDA_R possuem uma participação ativa na indução do LTP, já os AMPA_R estão mais intimamente ligados à manutenção deste potencial (DINGLELINE et al., 1999). Ou seja, um bloqueio dos NMDA_R é capaz de induzir um prejuízo na aquisição de novas informações (SHINOHARA; HATA, 2018), enquanto o bloqueio de AMPA_R pode promover déficits na manutenção da informação adquirida (VOLIANSKIS et al., 2015; TORQUATTO et al., 2019).

O sistema dopaminérgico está relacionado, de modo geral com os processos de atenção, motivação e aquisição de novas informações (AALTO et al., 2005).

Os receptores dopaminérgicos são receptores membros da família de receptores acoplados a proteína G, respectivamente D1, D2, D3, D4 e D5. Os receptores D1 e D5 ativam Adenilciclase via Proteína G_s, elevando o AMPc intracelular. Já os receptores D2, D3 e D4, inibem a adenilciclase via proteína G_i (BHATIA; SAADABADI, 2019; VALENZUELA; PH; MICHAEL, 2001).

A dopamina funciona como agente regulador dos movimentos corporais, da atenção, motivação, reforço, satisfação e recompensa, no cérebro adulto já desenvolvido. No hipocampo, afeta diretamente a plasticidade neural, como a formação de memórias de acontecimentos que fujam do cotidiano, ou seja, é crucial para a formação de memórias de situações não usuais. Além das fontes de liberação hipocampal de dopamina pela via mesolímbica, há também liberação dopaminérgica advinda de fibras neuronais noradrenérgicas presentes no Locus Cerúleo, estando

também relacionada a formação de memória no hipocampo (KENTROS et al., 2004; LISMAN; GRACE, 2005; MCNAMARA et al., 2014; ROSEN; CHEUNG; SIEGELBAUM, 2015).

Por sua vez o colinérgico se relaciona com a navegação e consolidação da memória, além de estar relacionada a atenção e aprendizado (SOLARI; HANGYA, 2018b). A Acetilcolina É sintetizada a partir da acetil coenzima A (CoA) e da colina, pela ação da catalítica da enzima colina acetil transferase. A ação pós-sináptica da ACh é encerrada a partir da ação da Acetilcolinesterase. Os receptores colinérgicos podem ser ionotrópicos (receptores nicotínicos), canais iônicos dependentes de íons Na^+ , ou metabotrópicos (receptores muscarínicos), acoplados a proteína G, sendo divididos em M_1 , M_2 , M_3 , M_4 e M_5 . Os receptores M_1 , M_3 e M_5 são ligados a proteína Gq, com resposta excitatória, já os receptores M_2 e M_4 agem a partir da proteína Gi com resposta inibitória (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2016; PURVES et al., 2010).

No caso da serotonina (5-Hidroxitriptamina ou 5-HT), é sintetizada a partir do triptofano, um aminoácido essencial encontrado em alimentos com alto índice proteico como carnes, peixes e laticínios. Os receptores serotoninérgicos, em sua maioria são metabotrópicos (5-HT1 ao 5-HT7), com exceção do 5-HT3, canais catiônicos não seletivos que geram respostas excitatórias (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2016; PURVES et al., 2010). O sistema serotoninérgico está relacionado aos processos dependentes de emoções associadas no hipocampo, além de estar relacionado ao sono, apetite e humor (LÓPEZ; BALLAZ, 2020).

Myhrer et al., (2003), em meta-análise, avaliaram os sistemas relacionados a testes de memória, em trabalhos que utilizaram agonistas ou antagonistas dos receptores dos sistemas de sinalização. A memória relacionada ao aprendizado e à memória espacial foram avaliadas pelo labirinto de Morris. Os pesquisadores verificaram que os sistemas dopaminérgico, colinérgico, GABAérgico e glutamatérgico foram os mais associados a baixo desempenho nos testes de memória quando bloqueados. Sugerindo assim forte ação deles no processo de aprendizado e memória espacial. Em sua maioria, os animais apresentaram prejuízo no teste com a administração de antagonistas de receptores muscarínicos ou nicotínicos, receptores de dopamina tipo 2 ($D-2_R$) e $NMDA_R$. Além de também apresentarem baixo desempenho com a administração de agonistas de receptores A e B do ácido gama-aminobutírico ($GABA-A_R$ e $GABA-B_R$) (MYHRER, 2003).

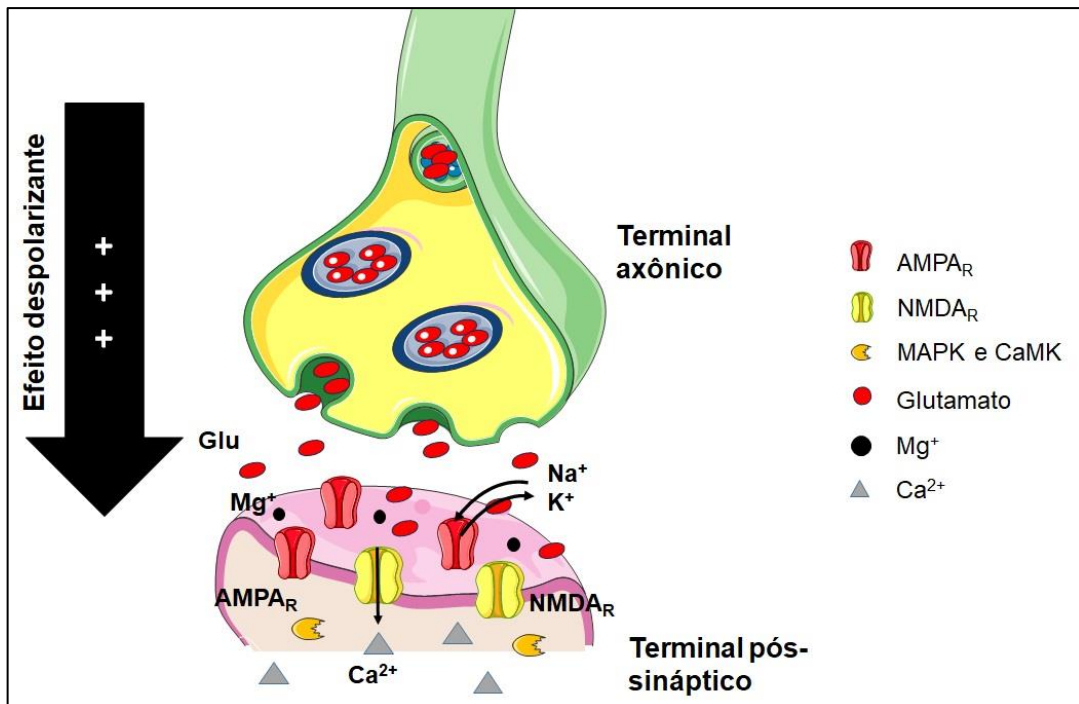
Considerando a memória de trabalho, os estudos avaliados na meta-análise que utilizaram labirinto em Y, o autor encontrou que antagonistas de receptores muscarínicos, NMDA_R, além da depleção de receptores dopaminérgicos e agonistas de GABA-A_R e GABA-B_R induziram prejuízo no teste, com menores valores de alternância espontânea entre os braços.

O processamento da informação oriunda dos testes de memória é ligado a estruturas do sistema nervoso central como o hipocampo, córtex pré-frontal e estriado. O hipocampo é uma estrutura com predominância do sistema glutamatérgico. O uso de antagonistas de receptores NMDA_R, por infusão no hipocampo, demonstra que essa estrutura se relaciona diretamente com o processamento e consolidação da memória, ligando-se às regiões peririnal e entorrinal (via perfurante) (POUZET et al., 2004; GU et al., 2017). Além do hipocampo, as fases de aquisição e consolidação da memória se associam com o estriado e córtex pré-frontal. No estriado, a dopamina exerce importante papel modulador do aprendizado e comportamentos de recompensa (EAGLE et al., 1999). No córtex pré-frontal ressaltam-se os sistemas glutamatérgico, colinérgico e dopaminérgico na modulação da memória de trabalho (ROMANIDES; DUFFY; KALIVAS, 1999; HIRONAKA et al., 2001).

1.2.1 Potencial de longa duração (LTP), aprendizado e memória

O LTP é um potencial despolarizante de alta frequência que aumenta a liberação de glutamato no neurônio pré-sináptico, induzindo a remoção dos íons Mg⁺ dos NMDA_R no terminal pós-sináptico. Com isso ocorre o aumento do influxo de Na⁺ e Ca²⁺ e efluxo de K⁺, gerando um efeito despolarizante (**Figura 3**). O LTP é avaliado como sendo a base da formação da memória e do aprendizado, juntamente com a depressão de longa duração (LTD). O LTP se divide em três etapas, indução, expressão e transdução, que mantém os efeitos por meio de uma cascata de eventos predominantemente pós sinápticos (VOLIANSKIS et al., 2015). Esses eventos se relacionam com o processamento da memória e aprendizado, bem caracterizado nos neurônios da via colateral de Schaffer, CA3-CA1 (LÜSCHER; MALENKA, 2012).

Figura 3 - Efeito despolarizante do LTP no neurônio pós-sináptico



Fonte: Autoria própria.

Formação do LTP: potencial despolarizante de alta frequência aumenta a liberação de glutamato e remove o Mg^{2+} dos $NMDA_R$ no terminal pós-sináptico. Glutamato se liga aos $NMDA_R$ e aumenta o influxo de Ca^{2+} e Na^+ e efluxo de K^+ , depolarizando o neurônio pós-sináptico. Ativação dos $AMPA_R$, com influxo de Na^+ e efluxo de K^+ . Com o potencial de alta frequência, ocorre inibição da liberação de GABA e bloqueio dos receptores GABA no terminal pós-sináptico. O aumento da excitabilidade pós-sináptica da origem ao EPSP.

1.2.1.1 Fase de indução do LTP/LTD

O potencial originador de LTP se caracteriza por ser localizado e não difuso, além de sua permanência por um longo período (ANDERSEN et al., 2007). Os $NMDA_R$ são os receptores mais envolvidos com a indução do LTP, porém, nem todas as fibras o requerem para isso. Como as fibras musgosas que são projetadas do giro denteado para CA3, aqui, no entanto, nos focaremos no processo de indução do LTP verificado nos neurônios da via colateral de Schaffer.

Os $NMDA_R$ são canais dependentes de voltagem, sendo bloqueados por íons Mg^{2+} e modulados por estímulos elétricos de alta frequência, a saída do Mg^{2+} é estritamente dependente desses impulsos, à medida que ao cessá-los, o canal volta a ser bloqueado (NOWAK et al., 1984; BLOODGOOD; SABATINI, 2007). Com a retirada do íon Mg^{2+} , ocorre a ligação com o glutamato e o influxo de Ca^{2+} e Na^+ , e

efluxo de K^+ , no neurônio pós-sináptico, dando sequência ao processo de despolarização do LTP (MCGUINNESS et al., 2010).

A ativação de receptores ionotrópicos glutamatérgicos de uma forma geral está ligada ao efluxo de K^+ , indutor da despolarização pós sináptica (DINGLELINE et al., 1999). Os AMPA_R são responsáveis por uma rápida sinalização sináptica, sendo ativados mesmo por potenciais com baixa frequência. Estes receptores promovem o influxo de Na^+ e efluxo de K^+ (LIU; ZUKIN, 2007).

A densidade de receptores ionotrópicos pós-sináptica é mediada por proteínas ligadas aos AMPA_R, como as proteínas AMPA_R regulatórias transmembrana (TARP) e a proteína que interage com a C quinase 1 (PICK1), relacionadas com o aumento da expressão dos receptores, atuantes na modulação da plasticidade sináptica (ELIAS; NICOLL, 2007; BLAKELY; EDWARDS, 2012).

A ativação dos NMDA_R é tida como dependente de múltiplos *inputs* de potenciais de alta frequência para formação do LTP e de baixa frequência para o LTD. Isso se relaciona à necessidade de mais de uma fonte de potenciais excitatórios, removendo o Mg^{2+} e permitindo a abertura do receptor, e desencadeamento do potencial excitatório pós-sináptico (EPSP). Essa condição tem característica neuroprotetora, uma vez que impede *inputs* isolados de gerar alterações de longa duração (VOLIANSKIS et al., 2015).

Em potenciais de alta frequência os GABA-B_R são auto ativados pelo GABA, no próprio interneurônio, processo de autoregulação, inibindo em sequência GABA-A_R e GABA-B_R envolvidos no potencial inibitório pós-sináptico (IPSP) (DAVIES; DAVIES; COLLINGRIDGE, 1990). Com o aumento da concentração de K^+ extracelular, contribuindo para a despolarização pós-sináptica, ocorre também uma redução da resposta de GABA-A_R (DAVIES; COLLINGRIDGE, 1993).

Por sua vez, potenciais de baixa frequência apenas induzem o EPSP via AMPA_R, mas não é capaz de retirar o bloqueio por Mg^{2+} dos NMDA_R, induzindo a um EPSP mais prolongado. Esse potencial de baixa frequência soma-se a outros potenciais para atingir o limiar necessário para ativação dos NMDA_R, porém com menor influxo de Ca^{2+} (VOLIANSKIS et al., 2015).

Quando muitas fibras são ativadas simultaneamente por potenciais de baixa frequência, o EPSP é regulado pela inervação de interneurônios GABAérgicos, induzindo um potencial inibitório pós-sináptico (IPSP) através da abertura de canais de Cl^- , levando à hiperpolarização do neurônio pós-sináptico. Este potencial inibitório

hiperpolariza o neurônio pós-sináptico e impede que íons Mg^{2+} sejam removidos dos $NMDA_R$, regulando a o EPSP (VOLIANSKIS et al., 2015).

Por outro lado, se alguns potenciais de baixa frequência forem somados pode haver a abertura dos $NMDA_R$, com um baixo influxo de Ca^{2+} . Isso se relaciona com a formação do LTD (BAEZ; CERCATO; JERUSALINSKY, 2018). Outra forma de indução do LTD, que o difere do LTP, é o tempo de pico de frequência entre o neurônio pré-sináptico e pós-sináptico, caso ambos estejam prontos no momento do pico, um LTP é gerado, no caso de falha, um LTD é gerado. Isso é traduzido pelas condições fisiológicas e ambientais que desencadeiam os picos (DAN; POO, 2006; CAPORALE; DAN, 2008).

1.2.1.2 Fases de expressão e transdução do LTP/LTD

O aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular no LTP pela abertura do canal de $NMDA_R$ (influxo de Ca^{2+} e Na^+ e efluxo de K^+), na espinha dendrítica, ativa a calmodulina dependente de quinase II (CaMK II). A ativação da CaMK II se relaciona com a fosforilação de subunidades de $AMPA_R$, aumentando o influxo e efluxo de íons pelo canal (BENKE et al., 1998). Outras quinases também são ativadas, como a proteína quinase dependente de cAMP (PKA), proteína quinase C (PKC), tirosinas quinases e quinases dependentes de mitógeno (MAPK) (MULKEY et al., 1994; SALTER; KALIA, 2004; SWEATT, 2004).

Essas quinases irão atuar no processo de sinalização celular para síntese proteica, modulando a espinha dendrítica onde o LTP ocorreu e a plasticidade sináptica. Induzindo o aumento da largura da espinha dendrítica, pelo aumento da quantidade de proteínas ancoradoras de $AMPA_R$, assim como o número de espinhas dendríticas, com o aumento da indução de LTP (TONI et al., 1999, 2001; LÜSCHER et al., 2000).

Quando, por outro lado, ocorre um menor influxo de Ca^{2+} , devido a potenciais com baixa frequência e menor abertura de $NMDA_R$, é desencadeado o processo de LTD. Esse processo também ativa enzimas, porém, elas requerem menor concentração de Ca^{2+} na espinha dendrítica pós-sináptica. Elas são baseadas em fosfatases, como a calcineurina (uma calmodulina dependente de fosfatase) e a proteína fosfatase 1 (PP1), mais sensíveis a baixas concentrações de cálcio

intracelular (MULKEY; HERRON; MALENKA, 1993; MULKEY et al., 1994; CARROLL et al., 2001).

Essas duas fosfatases parecem estar relacionadas com a fosforilação de AMPA_R, semelhantemente ao que ocorre no LTP. Porém, a repetição da formação de LTD parece se relaciona com a ativação da via das caspases, por dano mitocondrial e ativação da caspase 3 (LI et al., 2010) e redução da superfície da fenda pós-sináptica (KASAI et al., 2010).

1.2.2 Memória de trabalho

O termo memória de trabalho foi cunhado originalmente para abordar a memória de execução de tarefas. Essa memória era essencialmente evocada para a execução de tarefas em paralelo ou manter informações disponíveis por um breve espaço de tempo disponíveis (MILLER; GALANTER; PRIBRAM, 1960).

O processo de atenção e a exposição a objetos ou ambientes novos fazem parte do início deste estímulo. A coordenação da recepção e armazenamento temporário da informação parece estar associada ao córtex pré-frontal, enquanto a seletividade da atenção ao córtex parietal superior (ERIKSSON et al., 2015). O córtex parietal superior pode ser dividido em três regiões relacionadas à memória de trabalho e vinculadas à ações específicas. O lado direito se associa mais às tarefas relacionadas ao espaço ao redor, o lado esquerdo se associa a tarefas e estímulos verbais, enquanto a região ventral se relaciona com a linguagem (KOENIGS et al., 2009).

O estriado por sua vez se relaciona a esse processo atuando como gatilho do córtex pré-frontal, regido pela liberação de dopamina, controlando quais memórias devem ser mantidas e quais atualizadas (FRANK; O'REILLY, 2006).

A dopamina é um neurotransmissor sintetizado a partir de L-3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA), oriunda da ação da tirosina descarboxilase sobre a tirosina, pela ação da enzima descarboxilase dos aminoácidos L. A dopamina pode sofrer a ação das enzimas catecol O-metiltransferasa (COMT), sendo convertida em 3-metoxitiramina (3 MT), ou da monoamina oxidase (MAO), sendo convertida em ácido 3,4 dihidroxifenilacético (DOPAC). Ambos, 3 MT e DOPAC, podem ser degradados em ácido homovanílico (HVA) pelas enzimas MAO e COMT (RANG et al., 2008).

A maioria dos receptores de dopamina se encontra fora da região sináptica. Na região do córtex pré-frontal a dopamina atua principalmente sob receptores D1 (D-1_R), e em menor quantidade em D-2_R, fora da região sináptica. Por outro lado, na área do estriado, existe uma maior expressão de D-2_R, localizados na fenda pós sináptica e fora da região sináptica (CARLSSON et al., 2001; ARNSTEN; WANG; PASPALAS, 2015). A dopamina exerce uma função auto regulatória, uma vez que seus receptores pré sinápticos D-2_R atuam modulando a quantidade de dopamina na fenda e possibilitando a ação das enzimas MAO e COMT, bem como a receptação por um transportador de dopamina (DAT) (CRAGG; RICE, 2004).

A regulação das concentrações de dopamina nas fendas sinápticas do córtex pré frontal podem ser moduladas por aferências GABAérgicas de circuitos neuronais próximos (como do estriado). O glutamato por sua vez, também atua sobre os neurônios dopaminérgicos por aferências do córtex frontal e pré-frontal. O aumento de glutamato induz os neurônios dopaminérgicos VTA, a liberarem mais e recaptarem menos dopamina, estimulando também interneurônios GABAérgicos, que promovem em seguida uma *downregulation* da liberação de dopamina, *downregulation* da liberação de dopamina (CARLSSON et al., 2001).

1.3 Hipocampo e memória

O hipocampo é uma pequena estrutura do Sistema Nervoso Central relacionada com a memória, cognição, aprendizado e navegação espacial. É composto de quatro áreas denominadas de cornu de Ammonis (CA), CA1, CA2, CA3 e CA4 (hilo), e giro denteado. Essas regiões são formadas por basicamente dois tipos de neurônios, os piramidais e granulares (DAUGHERTY et al., 2016; ABUHASAN; SIDDIQUI, 2019).

A região do giro denteado (GD) é formada pela camada molecular e por uma camada de células granulares, fazendo fronteira com o hilo, permeado pelas fibras musgosas neuronais. Nas regiões CA1 a CA3 predominam células piramidais, os interneurônios, de característica predominantemente inibitória e GABAérgicos. A formação em cadeia dessas regiões gera um circuito unidirecional de sinalização (AMARAL; LAVENEX, 2007).

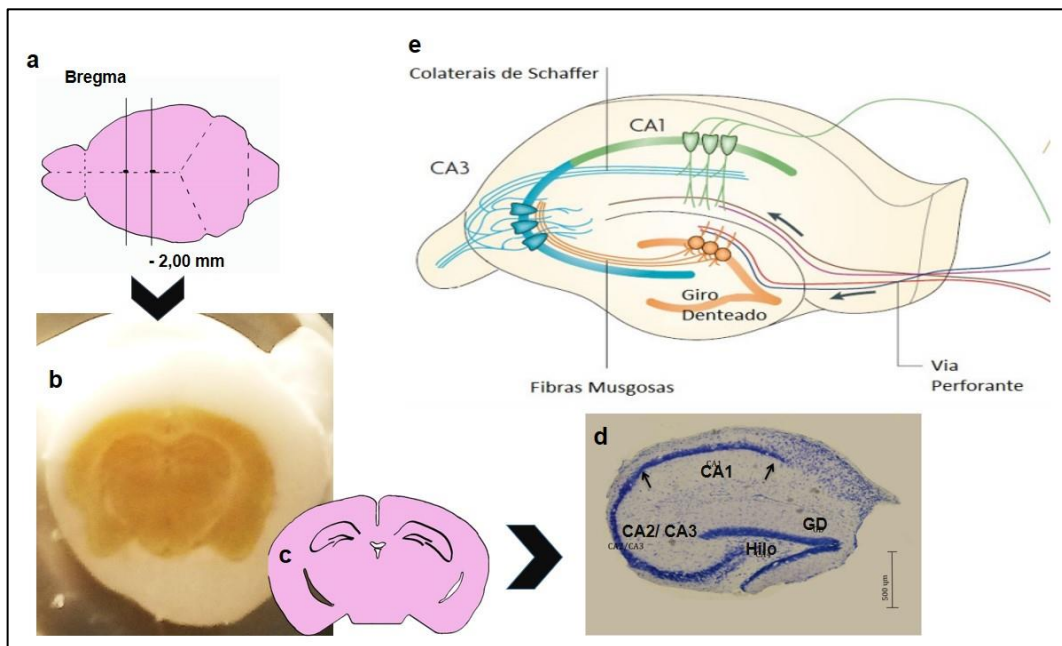
A formação da memória está intimamente associada aos LTP. Esses potenciais induzem respostas de longa duração no neurônio pós-sináptico, produzindo também alterações estruturais como já abordado anteriormente. Um dos principais mecanismos pelos quais o LTP induz alterações significativas e mesmo a modulação da plasticidade sináptica é o aumento do influxo de Ca^{2+} intracelular.

Um dos agentes reguladores da homeostase do Ca^{2+} , além das quinases e fosfatases abordadas anteriormente, é a taurina. A taurina está presente em todos os tecidos do corpo humano, com ações específicas a nível de SNC. Sua ação neuroprotetora tem sido estudada; achados envolvendo interações com a modulação do volume do corpo celular (LAMBERT, 2004) e metabolismo do Ca^{2+} (EL IDRISSEI, 2008a), levam a diversas aplicações junto às células do SNC como neurotransmissor, a taurina atua ainda como agonista de GABA_R e receptores de glicina (Gly_R) (ALBRECHT; SCHOUSBOE, 2005). Sua ação inibitória tem sido relacionada com melhoras nos processos de memória e aprendizado (EL IDRISSEI, 2008b; NEUWIRTH; VOLPE; EL IDRISSEI, 2013).

Duas vias principais caracterizam a sinalização unidirecional relacionada ao LTP. A via trissináptica e a via dissináptica. A via trissináptica leva esse nome devido sua interação entre três áreas distintas, as células granulares do giro denteado (GD) recebem a informação, pela via perfurante do córtex entorrinal, e se comunicam com os neurônios piramidais de CA3 pelas fibras das células musgosas neuronais. O último elo dessa via é feito pela via colateral de Schaeffer, atingindo a zona de CA1 (**Figura 4**) (AMARAL; WITTER, 1989).

Por sua vez, a via dissináptica é mais simples e envolve a participação de CA2, onde estes neurônios piramidais recebem poucas aferências do córtex entorrinal e enviam estímulos excitatórios para a zona de CA1 (CHEVALEYRE; SIEGELBAUM, 2010).

Figura 4 - Visão geral do hipocampo de um camundongo e esquema da via de sinalização trissináptica hipocampal



Fonte: Adaptada de Neves, Cooke e Bliss (2008).

Esquema gráfico demonstrando o cérebro do camundongo adulto visão superior, imagem (a). Feito o corte em micrótomo à distância de 2mm do bregma com fixação em TissueTek, obtém-se a imagem (b), com representação gráfica na imagem (c). A imagem (d) mostra o corte histológico corado com azul de toluidina, apresentando as áreas CA1-CA3, hilo e GD. Na imagem (d) é demonstrada a via de sinalização trissináptica com a via perfurante oriunda do córtex entorinal, ligação das fibras musgosas de GD com CA3 e ligação de CA3 através da via colateral de Schaeffer até CA1

A navegação espacial, associada à formação de memória, é relacionada com pontos chave do trajeto entre neurônios. De forma que novos pontos formam um novo trajeto. Ou seja, o aprendizado ocorre pela formação de caminhos conhecidos, novos caminhos são formados a partir da inserção de um novo elemento (LISMAN et al., 2017).

Mesmo o comportamento exploratório é influenciado por esse sistema de aprendizagem, impelindo à exploração e ao conhecimento do novo ambiente. O uso no futuro de informações adquiridas no passado pode resgatar essa memória parcialmente, mas forma uma nova memória a partir das novas percepções do ambiente. Isso é bem percebido em testes de comportamento com a vertente reversa (LEE; NADER; SCHILLER, 2017), consolidação de memória (DONGAONKAR et al.,

2013), atualização de memória (HUPBACH; GOMEZ; NADEL, 2009) e aprendizado integrado (SCHLICHTING; PRESTON, 2015).

A comunicação entre neurônios, ocorre por mensageiros, os neurotransmissores. Estes são alterados em resposta a estímulos externos e internos. Estresse, maturação biológica, aprendizado, são apenas alguns pontos onde a modulação dos neurotransmissores é realizada, e por sua vez modula o tipo de resposta celular final e a formação de memória (**Tabela 1**) (PALACIOS-FILARDO; MELLOR, 2019).

Tabela 1 - Principais neurotransmissores que atuam na memória

Neurotransmissor	Síntese	Receptores	Funções	Referências
Glutamato	Sintetizado a partir da ação da enzima glutaminase, sintetizada nas mitocôndrias, sobre a glutamina captada no terminal pré-sináptico ou a partir da transaminação do α -cetoglutarato presente no ciclo de Krebs.	Receptores metabotrópicos (MGLUR) acoplados a proteína G (GPCRs), com 7 domínios transmembrana (respostas mais lentas, propagando sinais de aumento ou redução da excitabilidade celular). Receptores ionotrópicos (IGLUR) NMDA (canais iônicos permeáveis a Ca^{2+}) e receptores Não-NMDA (AMPA e Cainato), os quais geram potenciais de ação que são necessários para a abertura dos receptores NMDA. Dentre os receptores NMDA, GluN1, GluN2A e GluN2B são os subtipos mais comuns nas áreas do hipocampo e córtex pré-frontal.	Papel crucial nas transmissões sinápticas rápidas e na potenciação de longo prazo, exercendo papel de substrato molecular relacionado a aprendizagem e memória. Uma parte do glutamato sintetizado é utilizada ao se ligar nos receptores, outra porção é recaptada, principalmente pelas células gliais, onde é reconvertido em glutamina pela enzima glutamina-sintetase. O glutamato está associado ao aprendizado e a memória por repetição possivelmente, tendo como via principal os receptores GluN1. No hipocampo, as células granulares e piramidais, são glutamatérgicas de ação excitatória.	(BROSNAN; BROSNAN, 2013; CRUZAT et al., 2018; WALKER; VAN DER DONK, 2016).
GABA	É sintetizado a partir da ação das enzimas glutamato descarboxilase, GAD65 e GAD67, convertendo aminoácidos excitatórios em GABA a partir da interação com a Vitamina B6 ativa.	Receptores ionotrópicos, GABAA e GABAC, majoritariamente inibitórios, atuam promovendo uma hiperpolarização celular quando ativados, pela abertura de canais Cl^- . Receptores metabotrópicos, GABAB, também inibitórios, atuando na ativação de canais de K^+ e bloqueio de canais Ca^{2+}	O GABA é relacionado a neurotransmissão quando sintetizado pela GAD65, ou atua como agente sinaptogênico e protetor contra lesões neurais, quando sintetizado pela GAD67, além de promover o crescimento de neuritos por vias dependentes de Ca^{2+} . Os receptores ionotrópicos GABAA são os mais encontrados no hipocampo tendo suas subunidades espalhadas em toda região. Suas subunidades $\alpha 2$ e $\alpha 3$ são mais concentradas nas sinapses, enquanto $\alpha 4$ e $\alpha 5$ são mais expressas na região extrasináptica	(AHNERT-HILGER; JAHN, 2011; HÖRTNAGL et al., 2013; OLSEN; DELOREY, 2015).
Glicina	É sintetizada a partir da serina, pela ação da serina hidroximetiltransferase.	Os receptores de Glicina também são canais de Cl^- , semelhantes aos receptores GABAA. Permitindo a	Metade das respostas inibitórias da medula espinhal possuem a glicina como neurotransmissor. No hipocampo, o	(ZHANG et al., 2008a).

	Após sintetizada, é transportada para vesículas sinápticas pelos mesmos transportadores vesiculares gabaérgicos.	entrada de íons Cl^- e promovendo uma despolarização celular, com consequente resposta inibitória.	transportador GlyT1 é expresso principalmente em neurônios e astrócitos de sinapses glutamatérgicas, quando bloqueado pode facilitar a plasticidade sináptica. O papel da glicina é questionado, pela pouca expressão de seus receptores específicos, sendo ainda pouco conhecido seu papel sobre a memória.	
Dopamina	A síntese dopaminérgica se dá a partir de uma cadeia de reações enzimáticas. Inicialmente se forma DOPA, pela hidroxilação da Tirosina. Por sua vez DOPA é descarboxilado pela ação da enzima DOPA-descarboxilase formando por fim, a Dopamina como produto final.	Os receptores dopaminérgicos são membros da família dos receptores acoplados a proteína G. Sendo eles D1, D2, D3, D4 e D5. D1 e D5 agem a partir da adenilciclase, aumentando a disponibilidade de AMPc intracelular, já os receptores D2, D3 e D4, agem inibindo essa reação.	De modo geral, a dopamina regula movimentos corporais, atenção, motivação, reforço, satisfação e recompensa. No hipocampo, essa monoamina afeta reações neurais relacionadas a plasticidade, como a formação de memórias de situações não usuais, ou seja, aquelas que não estão presentes no cotidiano. Além disso, a liberação dopaminérgica advinda das fibras noradenérgicas presentes no Locus Cerúleo, está ligada formação de memória.	(KENTROS et al., 2004; LISMAN; GRACE, 2005; MCNAMARA et al., 2014; ROSEN; CHEUNG; SIEGELBAUM, 2015).
Acetilcolina	É sintetizada a partir da Acetil-CoA e da colina, ao sofrerem a ação da enzima colina-acetiltransferase. Após a síntese, é captada por transportadores vesiculares de Ach. Após enviar a resposta a partir de seus receptores, é degradada pela Acetilcolinesterase presente na fenda sináptica.	Os receptores colinérgicos podem ser ionotrópicos ou metabotrópicos. Sendo os ionotrópicos denominados receptores nicotínicos, canais iônicos dependentes de ligante Na^+ . Os metabotrópicos, receptores muscarínicos são acoplados a proteína G, sendo denominados de M1 a M5. M1, M3 e M5, agem via proteína Gq, com respostas excitatórias, já os receptores M2 e M4 agem via proteína Gi, com resposta inibitória.	Além de estar presente nas sinapses entre nervos e músculos esqueléticos e cardíacos, e controlar algumas funções do SNparassimpático, a acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor diretamente relacionado ao aprendizado e memória, atuando no hipocampo como modulador da plasticidade neuronal, ao ativar principalmente receptores muscarínicos (M1) acoplados à proteína G.	(BEAR; CONNORS; PARADISO, 2016).

1.3.1 Função da acetilcolina na formação de memória

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor diretamente relacionado ao aprendizado e memória. Em resposta a estímulos ambientais, fibras colinérgicas da área de Broca lançam ACh no hipocampo. O bloqueio de receptores colinérgicos está diretamente relacionado com a redução da capacidade de aprendizado (HANGYA et al., 2015; TELES-GRILLO RUIVO et al., 2017). A atuação da ACh ocorre pela ativação de receptores nicotínicos e muscarínicos (M1) acoplados à proteína G, atuando junto aos LTP, moduladores da plasticidade neuronal (PALACIOS-FILARDO; MELLOR, 2019).

Um dos receptores colinérgicos mais associados à modulação da plasticidade neuronal é o M1_R, atuando pela despolarização pós-sináptica e a maior expressão dos NMDA_R, aumentando a excitabilidade celular pela inibição dos canais de K⁺ e ativação dos canais de Ca⁺⁺ (BUCHANAN et al., 2010). Como efeito regulador da neuroexcitabilidade, a ACh também promove a excitação de interneurônios, aumentando a liberação de GABA, porém esse mecanismo ainda não foi totalmente esclarecido (TANG et al., 2011).

Na zona CA1 a ACh tem ação potenciadora da via colateral de Schaefer, ligando CA1 a CA3, pela ativação de receptores nicotínicos ($\alpha 7$ ou não- $\alpha 7$) nos neurônios piramidais e interneurônios GABAérgicos (LEÃO et al., 2012). Porém essa via não é plenamente aceita, isso ocorre devido à ação tempo dependente da ACh, sendo relacionada à razão tempo de estímulo colinérgico e tempo de estímulo glutamatérgico em CA1 (GU; YAKEL, 2011). No giro denteado, a ACh é relacionada à ativação astrocitária (PABST et al., 2016) e aumento do potenciação de longo termo pela ativação de receptores muscarínicos (WELSBY; ROWAN; ANWYL, 2009).

Ham e Yakel (2017), citam quatro formas pelas quais a ACh atua modulando a memória, das quais três delas estão destacadas. A primeira delas é que afeta apenas a memória de aprendizado dependente do hipocampo, memória declarativa, de episódios ou de sequência de eventos, por sua vez não afetando a memória de procedimentos, ações (VON LINSTOW ROLOFF et al., 2007; HAAM; YAKEL, 2017).

A ação da ACh está diretamente relacionada à liberação de GABA e glutamato pelos neurônios colinérgicos, ou seja, não se tem uma clara percepção de qual real ação de cada um. Dessa forma, resultados de estudos com foco nas

vesículas de ACh (PRADO et al., 2017) ou com o uso de antagonistas de receptores de ACh (VON LINSTOW ROLOFF et al., 2007) foram distintos daqueles que investigaram o uso de neurotoxinas específicas para neurônios colinérgicos (CAI; GIBBS; JOHNSON, 2012).

O estímulo ambiental sensorial é, inicialmente captado pelo córtex e enviado ao hipocampo, onde a memória temporária é codificada e transferida de volta ao córtex para o armazenamento de longo prazo, consolidação (CHROBAK; LRINCZ; BUZSÁKI, 2000). Desse modo, a terceira forma postulada de modulação da ACh na memória é pela sua maior atuação na fase de codificação, com a presença de maiores níveis de ACh no hipocampo durante esse estágio do que na fase de consolidação da memória (HASSELMO; MCGAUGHY, 2004). Corroborando com a afirmação, foi observado que a escopolamina, um antagonista de receptores muscarínicos, promoveu um prejuízo na codificação da memória, porém sem efeitos na memória previamente consolidada quando administrada em ratos wistar, enquanto a administração de fisostigmina, inibidor de acetilcolinesterase, promoveu uma consolidação de memória deficitária (NEWMAN; GOLD, 2016; KUKOLJA; THIEL; FINK, 2009).

1.3.2 Papel do glutamato na formação da memória

Os receptores para glutamato podem ser, de uma forma geral divididos como receptores AMPAR, NMDAR e kainato. O LTP dependente dos receptores glutamatérgicos é a forma mais conhecida de transmissão sináptica, diretamente relacionada com o aprendizado. Os NMDAR são normalmente bloqueados por íons magnésio, sendo desbloqueados por estímulo via despolarização celular por ligações com AMPAR. Os NMDAR são os mais comuns em neurônios glutamatérgicos, sendo divididos em di e triheterométrico a depender da combinação de subunidades presentes (PAOLETTI; BELLONE; ZHOU, 2013; KUMAR, 2015). Desses subtipos, os GluN1, GluN2A e GluN2B são os mais comuns nas áreas do hipocampo e córtex pré-frontal, regiões relacionadas às funções cognitivas (PAOLETTI; BELLONE; ZHOU, 2013; SANZ-CLEMENTE; NICOLL; ROCHE, 2013).

A redução da expressão dessas subunidades está relacionada com prejuízo na plasticidade neuronal e ativação da LTD, bem como seus aumento se relaciona com eventos de aprendizado e requisição de memória. A expressão delas

pode ser afetada por tratamentos com corticosterona (TSE et al., 2011) e condições patológicas como o Alzheimer (DINAMARCA; RÍOS; INESTROSA, 2012) e o Parkinson (LOOPUIJT; SCHMIDT, 1998).

Desses receptores, os GluN1 e GluN2A parecem estar mais relacionados com o aprendizado. Em estudo com a exposição de animais a ambientes novos, como campo aberto (BAEZ et al., 2013) e labirinto aquático de Morris (CAVALLARO et al., 2002), houve aumento da expressão desses receptores logo após a sessão, com retorno aos níveis do grupo controle cerca de 90 minutos após o fim do teste. Em estimulação prolongada, de 10 dias, em labirinto radial, foi encontrado aumento da expressão de GluN1 e GluN2B no hipocampo e GluN1 e GluN2A no córtex pré-frontal, seis horas após a estimulação (SHANMUGASUNDARAM et al., 2015). Porém, a superexcitação de receptores GluN2B tem sido associada a vias de sinalização de apoptose (LIU et al., 2007).

1.3.3 Papel do GABA e glicina na formação de memória

Interneurônios são encontrados em todo tecido hipocampal, sendo os principais deles GABAérgicos, atuando como moduladores inibitórios. Os receptores ionotrópicos GABA-A_R são os mais encontrados no hipocampo tendo suas subunidades espalhadas em toda região (HÖRTNAGL et al., 2013). Suas subunidades $\alpha 2$ e $\alpha 3$ são mais concentradas nas sinapses, enquanto $\alpha 4$ e $\alpha 5$ são mais expressas na região extrasináptica (KASUGAI et al., 2010). Nos dendritos de CA1, $\alpha 1$ se encontra mais expressa na região distal de dendritos e $\alpha 2$ na porção inicial, atuando como reguladores do potencial de ação (PRENOSIL et al., 2006; KERTI-SZIGETI; NUSSER, 2016).

A subunidade $\alpha 2$ presente no giro denteado e CA3 se relaciona com o aprendizado do medo (ENGIN et al., 2016), enquanto $\alpha 5$ possui baixa expressão apenas no giro denteado e se relaciona com o controle da inibição fásica, principalmente quando existe alta concentração de GABA (GLYKYS; MANN; MODY, 2008; ZARNOWSKA et al., 2009). A subunidade $\alpha 5$ também se relaciona com a indução do LTP na região ventral do hipocampo, região mais relacionada com a formação de memória de longa duração (POFANTIS; PAPTHEODORPOULOS, 2014).

Animais nocautes em $\alpha 5$ apresentaram prejuízo cognitivo no aprendizado pelo labirinto aquático de Morris (ENGIN et al., 2015), bem como modelos de inibição desse receptor por inibidores específicos apresentaram déficit cognitivo (RUDOLPH; MÖHLER, 2014). Além disso, após testes de memória e aprendizado foram percebidos aumentos na expressão das subunidades $\alpha 5$ e $\alpha 1$, demonstrando uma possível interação deles no processo de aprendizado (GHAFARI et al., 2017).

Por sua vez, a inibição da subunidade $\alpha 2$ em neurônios piramidais de CA1 melhora o aprendizado de medo em testes de condicionamento de medo (MÒDOL; DARBRA; PALLARÈS, 2011) e esquiva passiva (ENGIN et al., 2016). Já a redução dela no giro denteado promove uma melhora na reação nos testes de reconhecimento de novos objetos (FAN et al., 2013) e memória espacial (ENGIN et al., 2015, 2016).

A glicina é um neurotransmissor inibitório de ampla ação no SNC, sua ação no hipocampo é questionada devido à baixa expressão de receptores específicos. O receptor de glicina presente no hipocampo é o Gly_R, porém, além de se ligar a ele, a glicina pode se ligar a NMDA_R e reduzir a expressão de receptores GABA_A, tendo atuação no controle excitatório/inibitório (LI; XU, 2002; ZHANG et al., 2008b).

Animais nocautes para presença de transportadores de glicina (GlyT1 e GlyT2) em neurônios glutamatérgicos apresentaram efeitos diversos na regulação sináptica, com prejuízos motores e da musculatura respiratória (GOMEZA et al., 2003a, 2003b). No hipocampo, o transportador GlyT1 é expresso principalmente em neurônios e astrócitos de sinapses glutamatérgicas, quando bloqueado podem facilitar a plasticidade sináptica (ZHANG et al., 2008a).

1.4 A interação do MeHg com o metabolismo lipídico

Alguns estudos vêm abordando a toxicidade do MeHg como agente pró-aterosclerótico. Aumento da pressão arterial (PA), glicemia, triacilglicerois e colesterol total, são alguns parâmetros associados à intoxicação por MeHg em achados recentes (BARROS, 2017; LACERDA LEOCÁDIO et al., 2020).

Quando comparados os efeitos experimentais da intoxicação por 20mg/L de MeHg por 21 dias com os do consumo de uma dieta com 62% de lipídeos por 40 dias, percebeu-se o aumento da PA, dislipidemia e redução da atividade da paraoxanase no grupo intoxicado (LACERDA LEOCÁDIO et al., 2020). Efeito semelhante foi relatado em residentes de Minamata expostos à contaminação por

MeHg. Conforme relatado por Inoue et al., (2012), e Yorifuji et al., (2010), indivíduos residentes em Minamata intoxicados com MeHg tiveram sintomas de hipertensão arterial, dislipidemia e aterosclerose.

O aumento nas concentrações séricas de colesterol total se relaciona com o metabolismo hepático dos lipídeos. Com o aumento das concentrações séricas de colesterol, ocorre uma maior ativação da via de transporte reverso. Essa via tem como molécula carreadora a fração HDL, através da ligação de apo A1 com moléculas de colesterol oriundas das células dos tecidos para o fígado (LIMA; CARVALHO; SOUSA, 2007). A lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) atua no processo de esterificação do colesterol, tornando a molécula de HDL mais esférica, mantendo um núcleo lipídico. Essa molécula de HDL modificada sofre com a ação da enzima lipase hepática e entra no tecido hepático por ligantes específicos, como o receptor de sequestrador classe B tipo 1 (SR-B1) para iniciar o ciclo hepático do colesterol (LIMA; COUTO, 2006).

O MeHg induziu, no estudo de Lacerda Leocadio et al., (2020), a aumento da expressão gênica de LCAT e redução da expressão de 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase (HMG CoAr) no fígado, podendo indicar uma autorregulação do organismo. Uma vez que os animais apresentaram altas concentrações séricas de colesterol, houve maior expressão da LCAT, pelo maior transporte reverso e menor síntese de colesterol pela ação da HMG CoAr sobre a HMG CoA, precursora na gênese do colesterol.

Outros estudos corroboram com o aumento de marcadores de risco cardiovascular em indivíduos contaminados por MeHg. Estudo realizado pela Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição Coreana, com 3951 adultos, demonstrou aumento nos níveis séricos de colesterol total e lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) (CHO, 2017). Raymond et al., (2016), também demonstraram essa correlação em pescadores norte-americanos com mais de 50 anos. De forma semelhante, Zhang et al., (2018), demonstraram a relação da intoxicação por MeHg e o aumento de colesterol total em 1129 adolescentes (12 a 19 anos).

O aumento da PA pode se relacionar com mais de um fator, a seguir serão apresentados três fatores. O primeiro a ser destacado é o dano renal promovido pelo MeHg. Moreira et al., (2012), ao administrar 40mg de MeHg/L na água de beber de camundongos C57BL6J por 28 dias, percebeu dano renal em análise histológica. Demonstrando redução dos corpúsculos renais e encolhimento dos glomérulos, além

do aparecimento de vacúolos nas células do epitélio tubular. O dano renal pode por sua vez estimular a atividade simpática, através do sistema renina-angiotensina-aldosterona (DONG et al., 2015).

O segundo fator relacionado é a interação do MeHg com a formação de placas de ateroma e regulação do metabolismo lipídico. No estudo de Lacerda Leocadio et al., (2020), percebeu-se que o MeHg reduziu os níveis séricos de paraoxonase (PON1). Esta enzima está associada à redução de placas de ateroma, reduzindo a oxidação de LDL e evitando dano vascular. A redução dos níveis séricos de PON1 está diretamente associada ao desenvolvimento de doença cardiovascular (MURILLO-GONZÁLEZ et al., 2020). A formação de placas ateroscleróticas após a intoxicação por MeHg (20mg/L por 21 dias) foi verificada mesmo sem a presença de uma dieta rica em lipídeos. Os danos se localizaram tanto no arco aórtico como na aorta torácica, sugerindo que o MeHg pode estar associado a um dano endotelial. Além do dano aórtico, o MeHg também provocou a formação de áreas de estenose em carótidas, com dano significativo epitelial (SILVA et al., 2020). Esse dano endotelial pode estar associado ao dano oxidativo, que promove redução da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), aumentando a resistência periférica dos vasos e a tensão local (ISLAM et al., 2016).

O terceiro elemento que pode se associar a alterações metabólicas promovidas pela intoxicação por MeHg é a alteração da microbiota intestinal e o subsequente dano à barreira intestinal. Essa ação deve ser destacada devido à influência na absorção de nutrientes e na proteção contra infecção bacteriana (XIA et al., 2019; ZHAO et al., 2020). Com isso, níveis mais elevados de lipopolissacarídeos (LPS) podem atingir o sistema nervoso, promovendo um estado de neuroinflamação, aumentando os níveis de citocinas pró-inflamatórias e levando à ativação de vias apoptóticas (PINTO et al., 2020).

O LPS é um subproduto presente na membrana celular de bactérias Gram-negativas, aumentando na circulação em casos de infecções bacterianas localizadas (translocação) ou sistêmicas, além de contaminação alimentar ou pela água. O aumento do LPS sérico está associado a uma condição chamada de endotoxemia, que por sua vez é ligada a doenças crônicas como Alzheimer, dislipidemias e sepse (MUNFORD, 2016). Níveis mais elevados de LPS no sangue periférico também estão associados à redução da neurogênese hipocampal em camundongos (VALERO et al., 2014).

1.5 Neurotoxicidade induzida pelo metilmercúrio

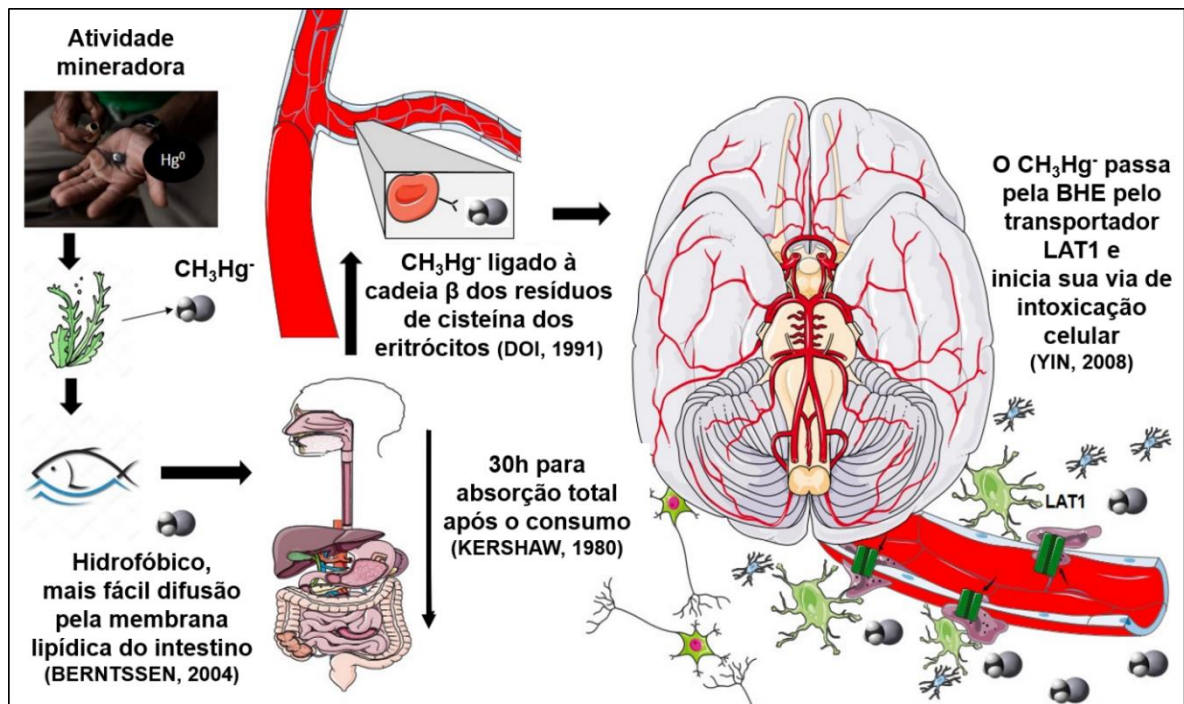
Após a absorção pelo trato gastrointestinal, o MeHg atinge a corrente sanguínea, sendo também transportado por transportadores apicais como, transportadores de ânions orgânicos 1 (OAT 1), transportadores proteínas resistentes a multidrogas 2 (MRP2) e transportadores de membrana de influxo (ABCC2) (MADEJCZYK et al., 2007a; PRINCE et al., 2014a). Seu transporte é facilitado devido à ligação com a cisteína, formando o complexo MeHg-S-Cys e se ligando ao radical tiol da cadeia β da hemoglobina, nos eritrócitos (KERSHAW; DHAHIR; CLARKSON, 1980; FARINA; ROCHA; ASCHNER, 2011).

Ao atingir o sistema nervoso central (SNC), o MeHg é transportado através da barreira hematoencefálica (BHE) pelo transportador de L-aminoácidos 1 (LAT1) presente nos astrócitos, componentes da BHE, e neurônios. Parte dele é então retirada do meio intracelular desses astrócitos e lançada no meio extracelular cerebral, sendo absorvido por neurônios e principalmente células da glia (**Figura 5**) (NI et al., 2012).

A retirada do MeHg do meio intracelular se dá pelos transportadores MRPs, após se ligarem a moléculas de glutathiona (GSH), formando o complexo GSHgCH₃ (**Figura 6**) (RUSH et al., 2012).

O comprometimento neurológico de intoxicados por MeHg há algum tempo é alvo de muitos estudos e pesquisas. Estudos desenvolvidos com crianças expostas ao organometal demonstraram atrasos no desenvolvimento neurológico, relacionando os níveis de mercúrio com baixos índices na Escala de Desenvolvimento Infantil Bayley (FILLION et al., 2013; COSTA JUNIOR et al., 2018).

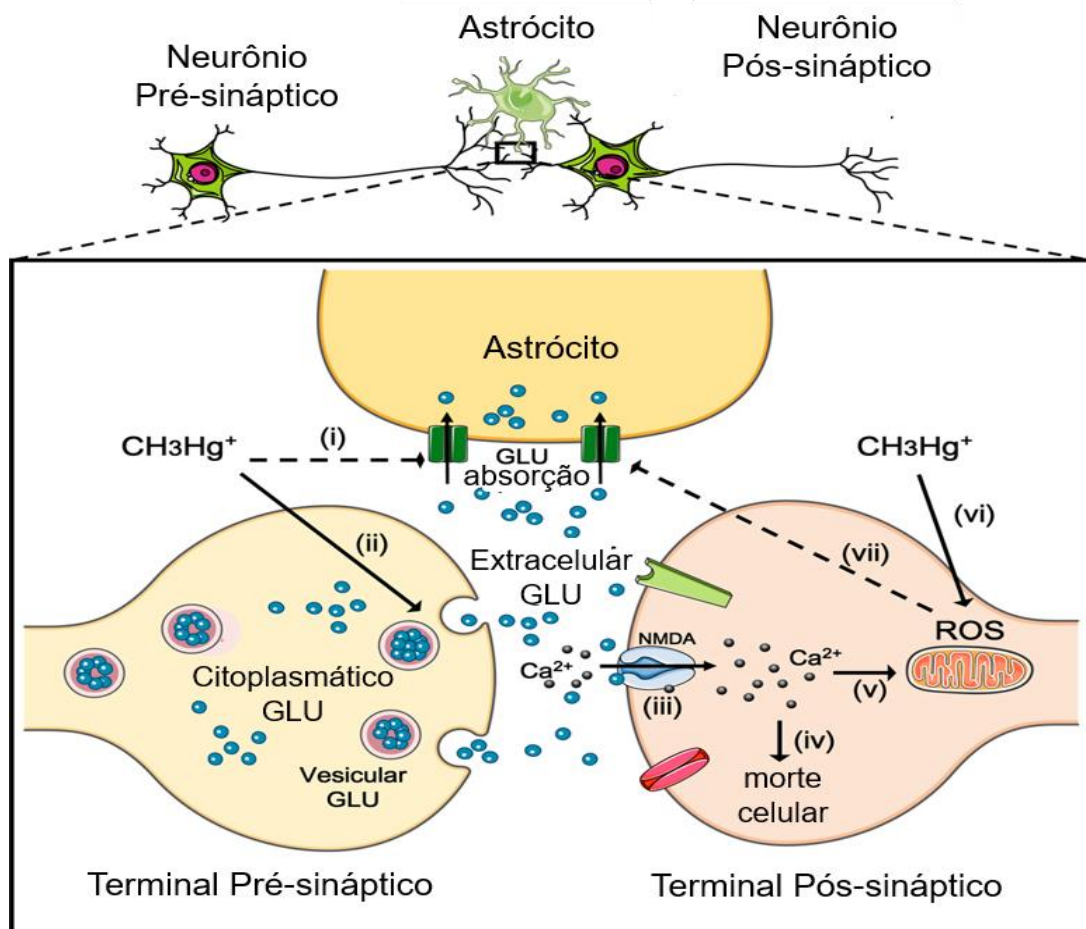
Figura 5 - Esquema gráfico da entrada do MeHg no Sistema Nervoso Central através do trato gastrointestinal



Fonte: Pinto, (2018).

O Hg é depositado no leito de rios pela atividade mineradora ilegal e metilado por bactérias, se acumulando no músculo de peixes e sofrendo acúmulo por magnificação trófica. Após entrar no organismo humano pelo trato gastrointestinal, ele atravessa a membrana lipídica das células epiteliais, componente lipofílico, atingindo a corrente sanguínea. Onde se liga com resíduos de cisteína nos eritrócitos. Após atingir o SNC atravessa a BHE pelos transportadores LAT-1 dos astrócitos (PINTO, 2018).

Figura 6 - Esquema do efeito neurotóxico do MeHg no SNC



Fonte: Adaptado de Farina, Rocha e Aschner, (2011).

O estresse oxidativo induzido por MeHg, Ca^{2+} , quebra da homeostase glutamatérgica e sua repercussão nos circuitos trisináptico hipocampal. O metilmercúrio (CH_3Hg^+ ; MeHg) inibe a captação do glutamato liberado por astrócitos (i) além de provocar aumento na liberação (ii), levando ao aumento de glutamato extracelular. Como consequência, ocorre uma hipertativação de receptores glutamatérgicos (NMDA) (iii). Levando ao aumento do influxo de Ca^{2+} no neurônio pós-sináptico, promovendo uma cascata de ativação de vias pró-apoptóticas. Além disso, o Ca^{2+} absorvido pela mitocôndria, pode gerar um desequilíbrio na cadeia transportadora de elétrons, com consequente aumento da liberação de EROs (v). Este último evento também é estimulado diretamente pelo MeHg (vi). O aumento na liberação de EROs (principalmente H_2O_2) pode reduzir a capacidade de captação do glutamato, com consequente excitotoxicidade glutamatérgica (vii) (FARINA, ROCHA E ASCHNER, 2011).

1.5.1 Aumento de espécies reativas de oxigênio e indução de apoptose pela intoxicação por MeHg

Uma vez no meio intracelular, o MeHg promove o aumento da expressão de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) na membrana celular, aumentando o influxo de cátions como Ca^{2+} e Na^+ (BROWN, 2010). O aumento da concentração de Ca^{2+} eleva a excitabilidade celular, aumentando a liberação de neurotransmissores, como glutamato e GABA (ASCHNER et al., 1993; YUAN; ATCHISON, 1997b; ALLEN; SHANKER; ASCHNER, 2001).

Por outra via citotóxica, o MeHg age promovendo a disfunção da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, induzindo a despolarização da membrana e rompimento, pelo aumento do influxo de íons como o Ca^{2+} e o K^+ . essa ação promove o aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) no meio intracelular (LIMKE; ATCHISON, 2002; GARG; CHANG, 2006). Como forma de reação à intoxicação por MeHg, aumenta no citoplasma a concentração de GSH, promovendo a retirada do organometal do meio intracelular e se ligando às EROs, gerando glutathiona oxidada (GSSG). Esse mecanismo porém se mostra impactado pela intoxicação por MeHg, uma vez que a síntese de Gpx fica comprometida, pelo aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular e conseqüente maior síntese de óxido nítrico (ON) (KIM et al., 2007; FRANCO et al., 2009b; ISLAM et al., 2016).

Outro mecanismo pelo qual o MeHg promove prejuízo ao ciclo antioxidante GSH-GSSG é a inibição dos canais captadores de cistina (ASCHNER et al., 2000b; ALLEN et al., 2002b), aminoácido que participa da síntese do GSH (YIN et al., 2016).

A administração oral de 1,5mg por dia de MeHg promoveu redução na atividade de Gpx após seis e oito semanas de intoxicação, porém com aumento da atividade da catalase (FUJIMURA; USUKI, 2017). Aparentemente a administração oral promove uma ação reduzida e retardada sobre o momento da intoxicação por MeHg. Em estudo com dose única via intraperitoneal de 0,6 e 5,0 mg de MeHg/kg de peso, camundongo com 4 dias de nascido, verificou-se aumento da imunomarcção para caspase 3 em neurônios hipocampais (SOKOLOWSKI et al., 2011a).

O aumento da expressão de caspase 3 pelos neurônios hipocampais está associado ao dano na membrana mitocondrial e liberação de citocromo C, além do aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} . Isso se comprova devido ao aumento da razão de Bax/Bcl2 percebida por Skolowski et al., (2011a).

Bcl2 é uma proteína anti-apoptótica, que atua na membrana mitocondrial. Desempenha um papel antioxidante, aumentando sua expressão com o aumento de EROs ou redução de GSH no citosol. O aumento da sua expressão promove o aumento da concentração de GSH no citosol pelo aumento da síntese e redução do efluxo (WILKINS et al., 2012). Logo, sua relação é inversamente direta ao aumento da caspase 3.

1.5.2 Lesão na BHE e neuroinflamação induzida pela intoxicação por MeHg

Além de danos relacionados ao estresse oxidativo nas células do SNC, o MeHg é capaz de promover dano na BHE, também pela redução da atividade de agentes antioxidantes. Takahashi et al., (2017), ao demonstrarem que a dose de 20mg de MeHg/L na água de beber por três semanas é suficiente para promover um acúmulo de 10µg de MeHg/g do cérebro e de cerca de 15µg de MeHg/g do cérebro de ratos Wistar. Verificaram que houve aumento de expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) em astrócitos do cerebelo e da região occipital mas não da região frontal do cérebro. O dano na BHE também só foi percebido com quatro semanas de intoxicação por MeHg, com extravasamento de IgG no cerebelo dos animais e diminuição da expressão de antígeno celular endotelial de rato 1 (RECA-1).

Esses dados demonstram a capacidade do MeHg de gerar lesão na BHE por dano astrocitário, gerando aumento da neuroinflamação e perda da integridade da barreira, facilitando a passagem de proteínas e bactérias agressivas ao SNC. O VEGF regula a permeabilidade vascular e pode estar envolvido na formação de edemas (TAKAHASHI; SHIMOHATA, 2019). O mesmo aumento da expressão de VEGF foi verificado em ensaio *in vitro* feito por Hirooka et al., (2013), quando estes cultivaram células do endotélio microvascular cerebral e pericitos, apresentando aumento da expressão de VEGF nas duas linhagens.

O dano à BHE é outro elemento na complexa cadeia de neurotoxicidade induzida pelo MeHg. A concentração de MeHg nas células gliais tende a ser superior à dos neurônios. Isso se deve à função protetora desses componentes, absorvendo elementos tóxicos ao SNC. Quando comparada a concentração entre astrócitos e micróglia, percebe-se uma maior concentração nestas, uma vez que possuem um menor corpo celular (GARG; CHANG, 2006).

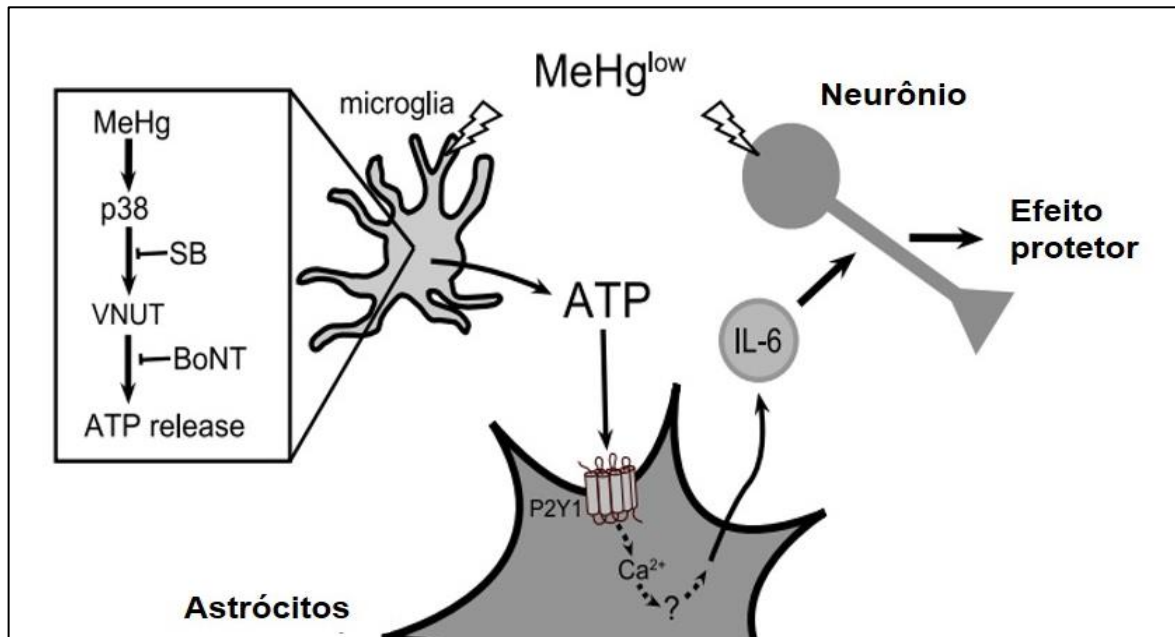
Outro possível fator influente na maior concentração de MeHg no meio intracelular da micróglia é a maior disponibilidade de grupamentos tiol no citoplasma delas. Com a ligação do MeHg a esses grupamentos tiol e seleniol, ocorre uma maior formação de EROs, devido à menor ação de agentes antioxidantes, como o GSH e Gpx (ALLEN; SHANKER; ASCHNER, 2001; SANTOS ALCÁNTARA; INESTROSA CANTÍN, 2005; FRANCO et al., 2009b; LU; HOLMGREN, 2009). O GSH contém moléculas –SH, tiol, e a enzima Gpx moléculas de –SeH, seleniol, ambos alvos da ligação do MeHg, inviabilizando a atuação dessas enzimas (FARINA; ROCHA; ASCHNER, 2011).

Em co-culturas de micróglia, concentrações acima de 1µM exibiram morte celular, porém, naquelas com concentrações abaixo de 1µM as células apresentaram sinalização extracelular com ATP via mecanismos dependentes de MAPK p38 e transportador de nucleotídeo vesicular (VNUT), condição aumentada em respostas inflamatórias (SHINOZAKI et al., 2014). Esta sinalização extracelular ativa os receptores de membrana P2Y₁ dos astrócitos, que lançam IL-6 como resposta à agressão sinalizada, promovendo proteção neuronal (NOGUCHI et al., 2013).

Em casos mais acentuados de neuroinflamação, a IL-6 é secretada pela própria micróglia, mas é dependente de concentração de ATP maiores que 100µM, ativando o receptor P2X₇ expresso na superfície celular da micróglia (SHIGEMOTO-MOGAMI et al., 2001). Fato que não foi percebido por Shinozaki et al., (2014), uma vez que mesmo em concentrações de 3 µM de MeHg de co-culturas de astrócitos e micróglia não se percebeu tão alta liberação de ATP.

A maior expressão de MAPK p38 foi então associada à liberação de ATP como sinalizador. Porém, esta proteína também se relaciona com a liberação da metaloproteinase-9 e mieloperoxidase (MPO) em neutrófilos, sendo ativada por mecanismo associado ao aumento de EROs no meio (**Figura 7**) (KURATA, 2000; ZHUANG; DEMIRS; KOCHEVAR, 2000; MESHKI et al., 2004; EHRENFELD et al., 2009; SHINOZAKI et al., 2014).

Figura 7 - Via de sinalização inflamatória mediada pela micróglia na presença de baixas doses de MeHg



Fonte: Adaptado de Shinozaki et al., (2014).

Via de sinalização micróglia-astrócito, em cocultura de células. Na presença de baixas concentrações de MeHg (3 μ M) a micróglia secreta ATP, via MAPK p38, ativando o receptor P2Y1 astrocitário. Essa ação induz ao astrócitos a liberação de IL-6 como sinalizador anti inflamatório para os neurônios (SHINOZAKI et al., 2014).

Além da neurotoxicidade induzida pelo MeHg ao atravessar a BHE, o dano no epitélio intestinal e alteração na microbiota podem estar associados com o aumento no LPS circulante (PINTO et al., 2020). Essa condição se associa a um quadro de endotoxemia, elevando os níveis de marcadores inflamatórios no sangue e induz a danos na BHE (BANKS et al., 2015).

Estudo de Banks et al., (2015), testaram a integridade da BHE 24h após injeção intraperitoneal de 3mg/kg de LPS em camundongos. Encontrando redução do peso corporal, aumento de permeabilidade capilar (redução da ¹⁴C-Sucrose sérica), aumento das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 no cérebro, aumento da concentração de albumina no cérebro, aumento de IBA-1 e GFAP cerebral e de TREM2 plasmático. A molécula de TREM2 é um sinalizador de superfície presente em macrófagos e monócitos, atuando como regulador do estímulo pro-inflamatório (SCHMID et al., 2009). A ação deletéria do LPS está diretamente associada ao aparecimento de Alzheimer e outras doenças crônico degenerativas (WANG et al., 2018b; KIRK et al., 2019).

1.5.3 A ação neurotóxica do MeHg na sinalização neuronal

As vias de sinalização neuronal verificadas para a formação da memória são o sistema glutamatérgico, GABAérgico, dopaminérgico, colinérgico, serotoninérgico e noradrenalinérgico (MYHRER, 2003). O MeHg tem conhecida ação nos sistemas colinérgico, glutamatérgico e GABAérgico, com aumento da liberação de neurotransmissores e inibição da ação da acetilcolinesterase.

No estudo de Han et al., (2017), foi demonstrado que injeções intraperitoneais diárias de 5µg de MeHg/kg em ratos por 20 dias induziu aumento da peroxidação lipídica, redução de GSH e atividade de Gpx, além de aumentar a concentração de citocromo C e de células apoptóticas, também reduzindo a atividade da acetilcolinesterase e da Na⁺/K⁺ ATPase no córtex desses animais.

O citocromo C é lançado no citosol celular como consequência de dano à membrana mitocondrial. Krishna Chandran et al., (2019), administraram 4mg de MeHg/kg/dia via gavagem em camundongos Swiss de sete semanas de vida por 15 dias e observaram no cérebro a redução da atividade dos complexos II, I+III e IV da cadeia produtora de elétrons mitocondrial. Além de aumento das concentrações de MDA e redução de GSH e glutathione S-transferase.

Devido sua ligação com grupamentos tiol, o MeHg também interage com a acetilcolinesterase (AChE), inibindo-a, dessa forma, atua prejudicando o processo de sinapse, o metabolismo de beta amiloide e proteína tau, além do processo de aprendizado e memória (SILMAN; SUSSMAN, 2005; FARINA; ROCHA; ASCHNER, 2011; HAN et al., 2017). Além dessa enzima, o MeHg inibe a Na⁺/K⁺ ATPase, responsável pela manutenção da homeostase celular, propagação do impulso nervoso e liberação de neurotransmissores (FARINA; ROCHA; ASCHNER, 2011; ARNAIZ; ORDIERES, 2014; HAN et al., 2017).

Resultados semelhantes de prejuízo na ação da AChE também foram encontrados por Agrawal, Bhatnagar e Flora (2015), porém, estes administraram cloreto de mercúrio a ratos em 30mg/L por seis meses na água de beber. Encontrando diminuição da atividade da AChE, e da concentração de dopamina e norepinefrina no cérebro total. O prejuízo na atividade da AChE se relaciona com a diminuição da plasticidade neuronal, uma vez que essa enzima hidrolisa a ACh em neurônios colinérgicos, para os terminais sinápticos (SOREQ, 2001).

Com a redução da atividade da AChE, aumenta a concentração de ACh da fenda sináptica, fato que em alguns modelos de doenças neurológicas é bem aceito, porém, se de forma patológica, pode gerar dano cognitivo ao indivíduo. A diminuição da atividade da AChE parece estar relacionada com o aumento da expressão de BDNF, ou seja, com o aumento da concentração de ACh (CHEN et al., 2018). O prejuízo no sistema colinérgico está relacionado com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (TODA; KANEKO; KOGEN, 2010).

Em ação concomitante, o MeHg bloqueia a bomba Na^+/K^+ ATPase, importante regulador do potencial de membrana (FARINA; ROCHA; ASCHNER, 2011; ARNAIZ; ORDIERES, 2014; HAN et al., 2017). Com o aumento do influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular ocorre o dano mitocondrial, já comentado, e a alteração do potencial de membrana, promovendo despolarização e maior expressão de NMDA_R na fenda pós-sináptica, além de maior liberação de vesículas contendo glutamato pelo neurônio pré-sináptico (ALLEN; SHANKER; ASCHNER, 2001; MORI; YASUTAKE; HIRAYAMA, 2007b).

Após a intoxicação por MeHg o neurônio então exibe uma conformação despolarizante, com aumento da excitabilidade pela maior concentração de glutamato na fenda sináptica. Este quadro é agravado devido à inibição da receptação do glutamato pelos astrócitos (DAVE et al., 1994; ASCHNER et al., 2000a; ALLEN et al., 2002a; MANFROI et al., 2004).

O aumento da excitabilidade neuronal com maior ativação dos NMDA_R se relaciona com o aumento do influxo de Ca^{2+} no neurônio pós-sináptico e sinalização de vias apoptóticas. Essa sinalização é compreendida pelo dano na membrana mitocondrial (MORI; YASUTAKE; HIRAYAMA, 2007b; RUSH et al., 2012). O dano mitocondrial induz a liberação do citocromo C no citosol, com seguinte aumento da expressão de Bcl2 e ativação da via das caspases (SOKOLOWSKI et al., 2011b).

De fato, existem poucos estudos que investigam a ação do MeHg no sistema glutamatérgico e GABAérgico hipocampal, e alguns não são recentes. Um deles é o estudo de Yuan e Atchison (1997b), onde o MeHg foi testado em lâmina de hipocampo de ratos, em concentração de $100\mu\text{M}$. Observou-se que uma ação inibitória nos receptores GABA_A , esses receptores se localizam no corpo celular e no axônio, atuando na hiperpolarização e despolarização de neurônios piramidais de CA1. Outra ação do MeHg foi percebida nos receptores GABA_B , localizados nos neurônios pré e pós sinápticos. A inibição dos receptores GABA teve início mesmo

nas fatias com menor concentração de MeHg, com inibição da transmissão glutamatérgica de forma retardada, foram usadas para isso concentrações crescentes de 20 a 500µM de MeHg (YUAN; ATCHISON, 1995, 1997b).

Esses receptores são associados a canais de K⁺, influenciados pela elevação na concentração intracelular de Ca²⁺, promovida pela intoxicação por MeHg. Devido a atuação bloqueadora do MeHg nos receptores GABAérgicos, verificou-se um aumento na excitabilidade celular pela redução do potencial inibitório pós sináptico, com aumento da concentração de GABA na fenda sináptica, isso foi verificado em fatias de hipocampo e cerebelo (YUAN; ATCHISON, 1997b, 2003; HERDEN et al., 2008).

1.5.4 Prejuízos cognitivos e motores associados à contaminação por MeHg

Estudos sobre os efeitos da intoxicação por MeHg com animais adultos são encontrados em menor escala. Isso ocorre devido ao estágio do desenvolvimento neuronal, sendo o adulto mais resistente a alterações que o cérebro em desenvolvimento. Outro fator importante é que, em sua maioria, a população afetada é exposta de forma bem precoce, devido a alimentação à qual está sujeita.

Estudos de Kendricks et al., (2020), e Kendricks, Boomhower e Newland (2020), apresentaram efeitos de um modelo de contaminação via oral por 0,5 e 5 mg/L de MeHg na água de beber em animais do dia pós natal (PND) 21 até o 60. Os autores perceberam uma redução na memória de trabalho (curto prazo) dos animais. Sugeriram que esta alteração poderia estar relacionada com um prejuízo no sistema dopaminérgico, se assemelhando a modelos de transtornos de déficit de atenção. Propuseram então tratamento com a administração via ip de d-anfetamina (0,3, 1 e 1,7 mg/kg). Perceberam então uma melhora no prejuízo cognitivo dos animais, sugerindo dano dopaminérgico.

Outros estudos também avaliaram a memória de trabalho, como o de Zahir et al., (2006), ao administrarem 1mg/kg de MeHg a ratos jovens por sete dias, perceberam redução do percentual de acertos da alternância espontânea no labirinto em Y e redução da coordenação motora, rotarod. Além dos prejuízos verificados nos testes comportamentais, os autores também verificaram aumento da peroxidação lipídica e redução do DNA total no cerebelo e cérebro dos animais intoxicados, associando os prejuízos comportamentais ao dano celular percebido.

Além do prejuízo no labirinto em Y, foi percebido por Christinal e Sumathi, (2013b), ao administrarem 5mg de MeHg/kg/dia via gavagem a ratos no PND 21, maior quantidade de erros na sequência do labirinto radial de oito braços e redução da atividade locomotora no campo aberto. Os animais intoxicados apresentaram também redução nas células de Purkinje e alterações degenerativas nos astrócitos do córtex cerebral. A redução das células de Purkinje justifica também o achado de Zahir et al., (2006), com a redução na coordenação motora.

Em relação à memória espacial e ao aprendizado, dois estudos se destacam pelo modelo de intoxicação utilizado. O estudo de Krishna Chandran et al., (2019), onde foram intoxicados camundongos Swiss, sete semanas de vida, com 4mg de MeHg/kg/dia via gavagem por 15 dias e o estudo de Bittencourt et al., (2019), que administraram 0,04mg de MeHg/kg/dia via gavagem por 60 dias a ratos do PND90 ao 150. Ambos estudos se utilizaram do teste de reconhecimento de novos objetos, reconhecimento social e do labirinto aquático de Morris para verificar a memória declarativa, espacial e aprendizado.

Em ambos estudos a intoxicação por MeHg induziu prejuízo na memória declarativa, com redução no índice de discriminação de novos objetos e do reconhecimento social. Além de aumento do tempo de latência dos animais na fase de aquisição e redução do tempo no quadrante alvo (probe) do labirinto de Morris.

Além dos achados comportamentais, Bittencourt et al., (2019), encontraram aumento das concentrações de MDA e nitritos, redução da capacidade antioxidante contra radicais peroxi e da densidade neuronal e astrocitária em CA1, CA3, hilus e GD dos animais desafiados por MeHg. Enquanto Chandran et al, 2019, encontraram aumento das concentrações de MDA e redução das concentrações de GSH e glutathiona S-transferase no cérebro dos animais intoxicados (KRISHNA CHANDRAN et al., 2019).

2 JUSTIFICATIVA

Muitos estudos têm avaliado a neurotoxicidade do MeHg no Sistema Nervoso Central. Efeitos neurotóxicos do MeHg no hipocampo são bem relatados na literatura, mostrando aumento do estresse oxidativo, excitotoxicidade do glutamato e perda neuronal. Porém, a intoxicação de MeHg por via oral, de forma crônica, em baixas doses ainda é pouco explorada em camundongos adultos. A intoxicação mercurial tardia em humanos tem como principal meio a ingestão de água e alimentos contaminados.

Desse modo a administração oral do MeHg em animais adultos jovens pretende mimetizar esse fato, além de tornar possível uma avaliação dos parâmetros neurofisiológicos e imunológicos antes do que seria o início da ocorrência de patologias típicas de idades avançadas como, Alzheimer e Parkinson. Sendo possível, inclusive abrir precedentes para o mapeamento de eventos e potencial regressão de sintomas neurológicos de forma precoce.

Até onde se sabe, nenhum estudo avaliou o impacto do MeHg em doses baixas nas concentrações de neurotransmissores no hipocampo do camundongo adulto (~4 meses de idade) e comportamento de memória e de locomoção espontânea.

Este trabalho visa lançar luz sobre o efeito da intoxicação por MeHg em baixas doses em camundongos adultos, avaliando parâmetros de inflamação sistêmica e perfil lipídico, peroxidação lipídica e alteração de neurotransmissores hipocampais e seu impacto no comportamento exploratório espontâneo e de memória de trabalho, espacial e aprendizagem.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da intoxicação induzida por baixa dosagem de MeHg (2mg/L) por 30 dias na concentração de marcadores inflamatórios sistêmicos, peroxidação lipídica, neuroplasticidade e neurotransmissão no hipocampo e avaliar memória de trabalho, espacial e de longa duração de camundongos C57BL6J adultos.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos da intoxicação por MeHg (2mg/L) por 30 dias na água de beber em camundongos C57BL6J sob os aspectos de:

- Ganho de peso e consumo de água.
- Concentração sérica de colesterol total e triacilgliceróis.
- Inflamação sistêmica por dosagem plasmática de TNF- α e mieloperoxidase (MPO) e sérica de endotoxinas (LPS).
- Concentração do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo.
- Peroxidação lipídica através das concentrações de malondialdeído (MDA) no hipocampo.
- Inflamação através de citocinas pró e anti-inflamatórias (pela expressão gênica de IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) e imunoenensaio de MPO no hipocampo.
- Atividade da acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo.
- Concentração dos neurotransmissores (glutamato, GABA, glicina, taurina e tirosina) no hipocampo.
- Comportamento exploratório e locomotor dos animais (campo aberto).
- Memória de trabalho (labirinto em Y).
- Memória espacial e de longo-prazo (labirinto de Barnes).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Experimentação animal

Foram utilizados 120 camundongos C57BL6J, com 3 meses de vida e faixa de peso entre 25 e 30g, seis desses animais morreram durante a fase de experimentação (**Tabela 2**). Os animais foram provenientes do biotério de produção do Núcleo de Biologia Experimental da UNIFOR (NuBEx), da Universidade de Fortaleza (UNIFOR), com protocolo de aprovação por comitê de ética: 2073110618 de 2018. O biotério do NuBEx é classificado como NB1 e dispõe da linhagem C57BL6J, mantidos sob rigoroso controle sanitário e genético.

Tabela 2 - Demonstrativo do número de animais entre os grupos e protocolos

Grupos experimentais	Controle	MeHg (2mg/L)
Peso*	20	20
Consumo hídrico*	8	8
Dosagens séricas*	5	5
BDNF	8	8
MPO	8	8
MDA	10	10
Expressão gênica	5	5
Atividade da AChE	8	8
HPLC para neurotransmissores	8	8
Testes comportamentais	10	10
Total		120 animais

As análises assinaladas com * não foram computadas para cálculo dos animais.

Os animais foram mantidos em microisoladores dispostos em estantes de ventilação forçada; com temperatura, luminosidade, umidade do ar e frequência de trocas gasosas controladas. Em cada microisolador foram dispostos cinco animais, com livre acesso à água e comida. Todos os animais receberam uma marcação na cauda, que permaneceu com eles até a data da eutanásia. A pesagem ocorreu em dias alternados, e a medição do consumo hídrico foi feita com o uso de proveta graduada estéril.

O valor inicial do peso de cada animal foi considerado como seu valor absoluto (100%). As demais pesagens foram convertidas para valores % relativos ao absoluto. Os resultados foram apresentados com gráfico de ganho de peso ao longo do tempo e delta de ganho de peso (final – 100%).

Os microisoladores, maravalha, ração e água desses animais foram desinfetados a cada troca pela equipe treinada do próprio biotério. Todas as pesagens e medições de consumo hídrico foram feitas em cabines de biossegurança com fluxo de ar, a fim de evitar a contaminação dos animais. Mantendo as barreiras sanitárias ideais para o nível de segurança do biotério.

Após os 30 dias de experimentação, os animais foram eutanasiados com sobredose de ketamina e xilazina, decapitados e o cérebro exposto para a dissecação do hipocampo, utilizados nos ensaios imunoenzimáticos, na avaliação da peroxidação lipídica, atividade da mioloperoxidase e da expressão gênica de citocinas. O sangue foi coletado através de capilares heparinizados por meio do plexo retroorbital, sendo separado em plasma e soro para as análises de parâmetros lipídicos e inflamação sistêmica. Para as análises de atividade da acetilcolinesterase e da concentração de neurotransmissores no hipocampo, os animais foram eutanasiados por decapitação sem a utilização de anestésicos.

4.2 Intoxicação mercurial

Estudo anterior deste grupo de pesquisa com dose de 40mg de MeHg/L por 21 dias na água de beber (FRANCO et al., 2009a) em camundongos C57BL6J foi observada alta taxa de mortalidade e aparecimento de prejuízo motor, ataxia, tornando inviável a avaliação do impacto do MeHg no hipocampo e neurotransmissores pela perda de animais. A dose então foi ajustada para 20mg de MeHg/L por 21 dias, protocolo proposto por Andersen e Andersen, (1993), esta dose foi bem tolerada pelos animais durante o período de 21 dias.

Esta sobredose, porém, não se assemelhava ao consumo regular de peixe pelo homem. Foi então proposta para avaliação a dose de 2mg de MeHg/L na água de beber (2.000 ppb), a fim de avaliar como se daria o consumo hídrico desses animais. Neste modelo não foram observadas mortes espontâneas dos animais intoxicados. Observou-se ao final de 30 dias que o consumo hídrico diário médio deles foi de 4,7ml por animal, consumo total de 141,22ml. Considerando o peso médio dos animais de 24,52g, foi obtido uma dose média diária de 0,38mg de MeHg/kg de peso do animal.

Foi então aplicada fórmula de conversão de dose baseada em área de superfície corporal, descrito no item 4.3 (REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2008).

Foi obtida como dose equivalente no humano a dose diária de 0,031mg de MeHg/kg de peso.

Observados os valores de concentração de mercúrio no peixe *Scomberomorus cavala* obtido no Mercado do Mucuripe (Fortaleza, CE), 1,73mg de Hg/kg (DE LACERDA, L. D.; BEZERRA, M. F.; COSTA, B. G. B.; BRAGA, T. M.; DE ALENCAR GOYANNA, 2016), e calculando um consumo diário de 1kg desse animal, verificou-se que a dose ingerida de Hg por kg em um humano de 80kg seria de 0,021mg de Hg/kg, semelhante ao proposto neste estudo.

Os animais intoxicados foram movidos para outra sala de experimentação, a fim de não contaminar o rack de ventilação, ou seus filtros. Eles se mantiveram com a mesma distribuição de animais por caixa e parâmetros dos demais. Com três meses de vida, aqueles animais com peso entre 25 e 30g foram iniciados à intoxicação por MeHg (Cloreto de Metilmercúrio - Sigma) com 2mg de MeHg/L de água de beber por 30 dias.

O valor foi uma forma de avaliar uma baixa dosagem por período longo. Tentando se assemelhar com o consumo real feito por pescadores.

As provetas, mamadeiras e microisoladores foram higienizados em local diferente dos demais animais para não haver contaminação cruzada. A maravalha trocada era reservada e ao final do protocolo experimental, ela e todos os resíduos decorrentes da eutanásia foram armazenados em saco branco leitoso, com símbolo de contaminante. Todos os resíduos foram encaminhados à empresa especializada que recolhe lixo decorrente do curso de odontologia (com resíduos de Hg do amálgama dentário), para posterior incineração com o uso de filtro específico na chaminé.

Para preparação da solução de intoxicação, foi feita diluição para 20mg de MeHg/L de água, mantida sob agitação e leve aquecimento por 20 minutos em plataforma agitadora e aquecedora mecânica. Optou-se por essa diluição pois os pesquisadores perceberam que devido a grandeza do valor alvo (2mg de MeHg), seria mais fácil de manusear, realizando uma diluição sucessiva de 1:10. Cada solução de 20 mg de MeHg/L de água era preparada semanalmente, sendo armazenada em geladeira (2-8°C) ao abrigo da luz, em garrafa de plástico. Toda manipulação do MeHg foi feita dentro de cabine de biossegurança com uso de máscaras de proteção semi-facial e óculos, além do uso de jalecos descartáveis, luvas de nitrila e o cuidado para evitar o uso de materiais metálicos no manuseio do MeHg.

Ao finalizar um grupo experimental o que restava das garrafas contendo MeHg era armazenado para ser posteriormente encaminhado ao setor de Química Analítica da Universidade Federal do Ceará (UFC). Para correto descarte do material contaminado.

4.3 Relação do consumo de metilmercúrio dos animais e humano

Utilizando-se das medições do consumo hídrico dos animais, e considerando que a perda pela excreção natural ocorre no humano e no camundongo, estipulamos a concentração ingerida e fizemos a comparação com o valor correspondente no ser humano.

Para isso, foi utilizada a fórmula de conversão de drogas proposta por Reagan-Shaw (2008), também citada por Lacerda Leocadio et al., (2020), como forma de traçar um comparativo das doses:

$$\text{DEH (mg/kg)} = \text{dose animal (mg/kg)} \times \frac{\text{Km animal}}{\text{Km humano}}$$

Na Fórmula de conversão de dose baseada na área de superfície corporal, a dose humana equivalente (DEH) é igual a dose animal (mg/kg) vezes a constante animal (Km animal) sobre a constante humano (Km humano). A fórmula utiliza como pressuposto a área corporal do animal e seu metabolismo para determinar previamente uma constante (Km) para cada espécie, conforme descrito no artigo original. A constante para o humano é Km humano = 37 enquanto a do camundongo é Km camundongo = 3.

4.4 Avaliação do perfil lipídico

As amostras de sangue foram coletadas por meio do plexo retroorbital e centrifugadas a 3500 rpm por dez minutos. O soro foi obtido para determinação da concentração de colesterol total e triacilgliceróis. Os níveis de colesterol total e triacilgliceróis séricos foram determinados por analisador semi-automático (LabQuest, Labtest, Brasil), utilizando kits de diagnóstico (Labtest, Brasil).

4.5 Ensaio imunoenzimático ELISA

O sangue foi coletado pelo plexo retroorbital e mantido em recipiente heparinizado. Posteriormente foi centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos e aspirado o sobrenadante para coleta do plasma e análise de TNF- α e MPO. A análise da concentração de endotoxinas (LPS) foi feita no soro (as amostras de sangue foram coletadas em tubo não heparinizado e centrifugadas em seguida. A análise de TNF- α foi feita em plasma e as análises para BDNF e MPO no hipocampo.

As amostras foram descongeladas e homogeneizadas em tampão fosfato salina 1x concentrada, 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 450 nm. Foram analisadas fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) sérico, fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) hipocampal, mieloperoxidase (MPO) hipocampal e quantificação sérica de endotoxinas (LPS). A técnica seguiu o protocolo disposto no kit específico de cada anticorpo, proposto pela fabricante R&D Systems.

4.6 Avaliação da peroxidação lipídica

As amostras foram homogeneizadas em solução de HTAB (a 0,5% diluído em tampão fosfato de sódio, pH 7,4. Alíquotas de 100 μ L 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 minutos, 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), protocolo adaptado de Carvalho et al., (2010).

4.7 Análise da expressão gênica

Uma alíquota de aproximadamente 20mg de hipocampo foi macerada em tampão RLT do kit comercial (RNeasy Mini Kit, Qiagen®). Após a maceração, o RNA total foi extraído conforme instruções do fabricante do kit comercial. O RNA total obtido foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific®).

Para a obtenção do cDNA foi utilizado 2 µg do RNA total. Foram utilizados iniciadores oligo (dT), dNTPs e a enzima Super Script III seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen®).

Foram utilizados *primers* para IFN-γ, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. O primer foi combinado em uma mistura de reação para produzir uma amplificação (**Tabela 3**). Cada mistura da reação com os determinados *primers* contém: SYBR Green Master mix (10 µL), *primers Forward* e *Reverse* na proporção de 1:1 (1 µL), água livre de nucleasse (7 µL) e DNA da amostra (1 µL). Controles negativos foram realizados usando água livre de nucleases. O protocolo de amplificação do PCR foi o seguinte: AmpliTaq Gold DNA Polymerase inicial - ativação a 95 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos com desnaturação a 95 °C por 15 s, anelamento a 62 °C por 30 s e extensão a 62 °C por 30 s. A amplificação foi realizada em um LightCycler® Nano em Real Time PCR System com 32 poços. Os resultados foram expressos como quantidade de gene amplificado em comparação com o gene de controle, β-actina, pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 3 - Sequência nucleotídica dos primers utilizados

Primer	Foward	Reverse
IFN-γ	CACGCCGCGTCTTGGT	TCTAGGCTTTCAATGAGT
IL-4	ACAGGAGAAGGGACGCCAT	GAAGCCCTACAGACGAGCTCA
IL-5	GACTCTCAGCTGTGTCTGGG	GGACAGCTGTGTCAAGGTCT
IL-6	CTGCAAGAGACTTCCATCCAG	AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG
IL-10	GTGAAGACTTTCTTTCAAACAAAG	CTGCTCCACTGCCTTGCTCTTATT
β-actina	GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA	CTCTTTGATGTACGCACGATTTTC

IFN-γ= interferon gama; IL= interleucina

4.8 Avaliação da atividade da acetilcolinesterase

O hipocampo foi homogeneizado em tampão fosfato salina com pH 7,4. Centrifugados em seguida por 15 minutos, 10.000 rpm, 4° C. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford, usando como padrão BSA, a concentração foi ajustada para 1mg/mL de proteínas totais.

Em placa de 96 poços foi adicionado por poço 34 µL de homogenato (1mg/mL) e 134 µL de ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB) a 0,75mM, feita a leitura em absorvância de 412 nm por 1 minuto. Logo após esse procedimento, a microplaca foi retirada do aparato e adicionado por poço 34 µL de iodeto de acetilcolina (ACTI) a 9 mM (substrato), repetindo a leitura em absorvância de 412 nm por 5 minutos. A primeira leitura é usada como fator normalizador devido à coloração do DTNB (ELLMAN et al., 1961; MENDES, 2020).

4.9 Quantificação tecidual de neurotransmissores por cromatografia líquida de alta resolução

Os tecidos foram homogeneizados em ácido perclórico (HClO₄) à 1% por aproximadamente 30 segundos e o homogenato foi colocado em tubos Eppendorf de 2 mL para centrifugação por 15 minutos em centrífuga refrigerada, 4°C, a 14.000 rpm. Uma alíquota de 20µL do sobrenadante foi então injetada no equipamento de HPLC para serem analisadas. Análises dos aminoácidos glutamato, glicina, taurina, tirosina e GABA foram quantificados por detector fluorescência seguindo as seguintes condições cromatográficas: A fase móvel foi composta por Tampão fosfato de sódio 50 mM e metanol 20% v/v (Fase A) e Metanol (Fase B), em fluxo de 1 ml/min. Foi utilizada uma coluna LUNA® C18 com comprimento de 25cm, calibre 4,6cm e diâmetro da partícula de 5µm, da Phenomenex. Nas amostras foi utilizada para detecção fluorescência uma alíquota de reagente de derivação na proporção de 1:1 composto por: o-phthaldialdeido, etanol, 2-mercapetanol e tampão borato.

4.10 Teste de campo aberto

O teste foi realizado com o auxílio de luz vermelha, a fim de minimizar o estresse sofrido pelos animais. O aparato utilizado consiste em cubo acrílico de aresta

30 cm e altura de 15 cm, com marcação de nove quadrados iguais na base, em jogo da velha. Este teste tem por finalidade verificar o comportamento exploratório e locomotor dos animais.

O animal foi colocado no centro do aparato e deixado livre para explorar o ambiente por cinco minutos. Foram avaliados parâmetros de distância total percorrida, linhas totais cruzadas, velocidade média, tempo parado, tempo no centro do aparato e tempo na periferia, bem como os comportamentos de exploração vertical (*rearing*) e autolimpeza (*grooming*) (BROADHURST, 1957).

Todas as condições experimentais envolvendo testes comportamentais foram feitas em local reservado da observação externa e com ausência de ruídos externos. Antes do teste de cada animal o aparato foi higienizado com álcool 70%, seguido de papel toalha úmido para retirar o odor do álcool. Os animais foram manipulados pelo mesmo avaliador, aquele ao qual estavam habituados durante as trocas de maravalha e pesagens. O teste contou com registro por vídeo no *software AnyMaze*.

4.11 Labirinto em Y

O teste foi realizado com o auxílio de luz vermelha, a fim de minimizar o estresse sofrido pelos animais. O aparato consiste em um construto de madeira revestido de fórmica em formato de Y (35 cm de altura, 40 cm de comprimento e 6 cm de largura). Cada braço possui laterais impedindo a visualização do meio externo pelo animal, sendo numerados de 1 a 3. O avaliador fica a uma distância de um metro do aparato realizando a anotação da alternância entre os braços (STONE et al., 1991).

O animal é inicialmente posto no braço 1 e verifica-se a quantidade de alternâncias espontâneas entre braços, avaliando a memória de trabalho do animal. Posteriormente é feita a contagem de quantas alternâncias corretas o animal teve, devendo ele não repetir os braços de forma sequenciada e sim alternar entre eles. O sucesso do animal é determinado pelo cálculo do percentual de acertos no labirinto em Y:

$$\text{Alternâncias espontâneas (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de acertos}}{\text{n}^\circ \text{ total de entradas} - 2} \times 100$$

Todas as condições experimentais envolvendo testes comportamentais foram feitas em local reservado da observação externa e com ausência de ruídos externos. Antes do teste de cada animal o aparato foi higienizado com álcool 70%, seguido de papel toalha úmido para retirar o odor do álcool. Os animais foram manipulados pelo mesmo avaliador, aquele ao qual estavam habituados durante as trocas de maravalha e pesagens.

4.12 Labirinto de Barnes

Este teste consiste na avaliação de dois tipos de memória, a espacial e a memória de longo prazo. No ambiente onde o teste foi realizado foram fixadas pistas espaciais em formatos geométricos, referentes a cada quadrante. O aparato consiste em mesa circular com 22 buracos e um túnel de escape (**Figura 8**) (PITTS, 2018; MOMENI et al., 2021).

Figura 8 - Descrição do aparato utilizado para o labirinto de Barnes



Fonte: Autoria própria

O teste consiste em expor o animal a um estímulo aversivo (luz e som) induzindo-o à fuga, proporcionada por um túnel de escape, local onde se coloca papel

toalha e onde o som é interrompido, uma vez que o animal o adentra. O animal parte do centro do aparato, sendo levado até o local em superfície branca e deixado lá para explorar o ambiente. O som é caracterizado por um ruído branco de 90 decibéis controlado remotamente, acionado quando o teste começa e interrompido a cada vez que o animal entra no túnel de escape.

Inicialmente os animais passaram por um período de habituação ao aparato, onde foi permitido que explorassem livremente a mesa por dois minutos, além de permanecerem por um minuto no interior do túnel de escape.

A memória espacial foi verificada pelas aquisições, um ciclo de 4 dias, com dois testes por dia, totalizando 8 testes. Entre cada teste foi dado um intervalo de uma hora. Cada aquisição consistiu em período de dois minutos, onde o animal, previamente habituado ao aparato, deveria encontrar o túnel de escape no menor tempo possível. A distância percorrida, velocidade média, tempo até entrar no escape, bem como a quantidade de buracos checados (erros totais) foi verificada.

Após os quatro dias iniciais foi dado intervalo de 48 horas sem manipulação dos animais e em seguida realizado teste para avaliar a memória dos animais. O túnel de escape foi retirado e os animais foram postos na mesa para explorar por dois minutos. Foi verificado então o tempo de latência no quadrante alvo (onde estava o escape) e o tempo de latência nos demais quadrantes.

Todas as condições experimentais envolvendo testes comportamentais foram feitas em local reservado da observação externa e com ausência de ruídos externos. Antes do teste de cada animal o aparato foi higienizado com álcool 70%, seguido de papel toalha úmido para retirar o odor do álcool. Os animais foram manipulados pelo mesmo avaliador, aquele ao qual estavam habituados durante as trocas de maravalha e pesagens. O teste contou com registro por vídeo no *software AnyMaze*.

4.13 Equipamentos e Materiais

- 10 microisoladores (Alesco®, São Paulo, Brasil);
- 1 *Hack* ventilado (Alesco®, São Paulo, Brasil);
- Balança digital eletrônica para pesagem de animais (Filizola, São Paulo, Brasil);
- Balança analítica eletrônica de precisão (Precisa, Belo Horizonte, Brasil);

- Centrífuga refrigerada para tubos (Sigma, Steinheim, Alemanha);
- Espectrofotômetro UV-Visible (Shimadzu UV-260, Tóquio, Japão);
- Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Braunschweig, Alemanha);
- Espectrofotômetro de absorção atômica – DMA80 (Milestone, Bergamo Itália);
- Cabine de segurança biológica classe II, ARIA LS48 (Tecniplast, Varese, Itália);
- Microisoladores, GM 500 (Tecniplast, Varese, Itália);
- Rack ventilado DGM (Tecniplast, Varese, Itália);
- Geladeira e freezer -80°C (Thermo Scientific, Braunschweig, Alemanha);
- *LightCycler Nano* (Basel, Switzerland);
- Cromatógrafo (Waters, modelo Alliance, Massachusetts, United States);
- LabQuest (Labtest, Lagoa Santa, Brasil);
- Vórtex Maxi Mix II (Thermolyne, Iowa, Estados Unidos);
- Observatório de Campo aberto;
- Labirinto em cruz elevada;
- Labirinto em Y;
- Labirinto de Barnes;
- Câmera USB LifeCam (Microsoft, Washington, Estados Unidos);
- Ração Presence-Labina (São Paulo, Brasil);
- Capilares vítreos heparinizados;
- Microplacas de 96 poços;
- Tubos Eppendorfs, 1,5ml;
- Criotubos, 2,0ml;
- Tubos Falcons, 15 e 50ml;
- Instrumental cirúrgico;
- Ponteiras para pipetas;
- Seringas;
- Tubos de polipropileno para centrífuga;
- Vidraria: béqueres, pipetas manuais e tubos de ensaio;
- 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;
- Sacos plásticos para descarte, com símbolo de contaminante;
- *AnyMaze* versão única (Stoelting, Co, Illinois, EUA);

4.14 Reagentes e soluções

- Cloreto de metilmercúrio (Sigma, Steinheim, Alemanha);
- Ketamina - Kensol (König, Santana de Parnaíba, Brasil);
- Xilazina - Vetanarcol (König, Santana de Parnaíba, Brasil);
- Kit Labstest® para dosagem de colesterol (Labtest, Lagoa Santa, Brasil);
- Kit Labstest® para dosagem de triacilgliceróis (Labtest, Lagoa Santa, Brasil);
- Kit ELISA Duo-Set TNF- α (R&D Systems, Minesota, EUA);
- Kit ELISA Duo-Set BDNF (R&D Systems, Minesota, EUA);
- Kit ELISA Duo-Set MPO (R&D Systems, Minesota, EUA);
- Pierce Chromogenic Endotoxin Quant Kit (Thermo Scientific, Braunschweig, Alemanha);
- RNeasy Mini-Kit (Qiagen, Düsseldorf, Alemanha);
- Super Script III (Invitrogen, São Paulo, Brasil);
- AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Thermo Scientific, Braunschweig, Alemanha);
- SYBR Green Master mix (Thermo Scientific, Braunschweig, Alemanha);
- Primers Bax, Bcl2, IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e β -actina (Invitrogen, São Paulo, Brasil);
- Fosfato de sódio dibásico (Dinâmica, Indaiatuba, Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico (Dinâmica, Indaiatuba, Brasil);
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) 8,1% (Dinâmica, Indaiatuba, Brasil);
- Iodeto de acetilcolina (ACTI);
- PBS (tampão fosfato salino);
- HTAB 0,5%;
- HNO₃ 10%;

- KMnO_4 ;
- H_2SO_4 ;
- Sulfonilamida 1%;
- Ácido fosfórico 5%;
- Ácido acético 20%;
- Ácido 2-tiobarbitúrico 0,5%;
- Ácido ditiobisnitrobenzoico (DTNB)
- Ácido perclórico 1%;

4.15 Análise estatística

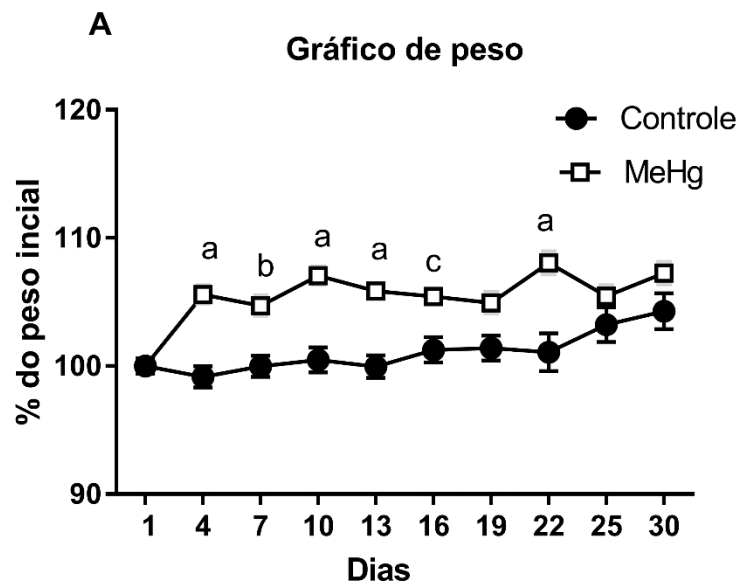
Foi utilizado o programa estatístico *GraphPad Prism* (*GraphPad Prism 5 Software*, San Diego, CA, USA) para fazer as análises e comparações. Todos os valores foram testados para normalidade com o teste de Kolgomorov-Smirnov, considerando $p < 0,05$ e verificadas as significâncias nas comparações utilizando-se o teste T de *Student* não pareado ou de teste de Mann Whitney para dados não paramétricos. Para análise de ganho de peso ao longo do experimento foi utilizado o teste *two-way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

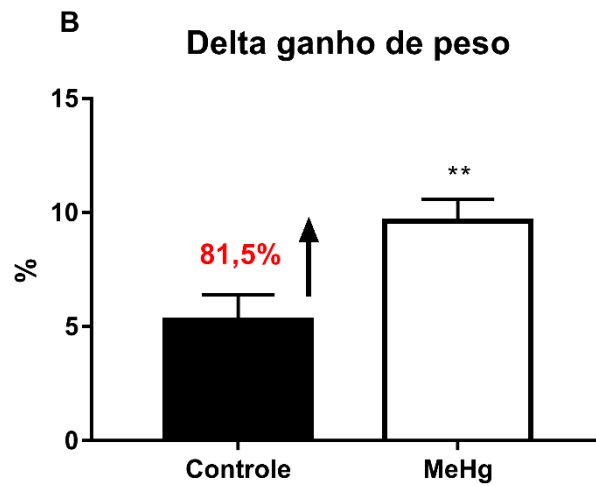
5 RESULTADOS

5.1. Avaliação do peso corporal, consumo hídrico e estimativa do consumo de MeHg no decurso do tratamento

Os camundongos C57BL6/J desafiados por 2mg/L de MeHg por 30 dias na água de beber apresentaram ganho de peso significativamente maior que o grupo controle não desafiado nos dias 4, 7, 10, 13, 16 e 22, porém sem alteração nos valores de peso finais (**Figura 9A**). Os animais intoxicados apresentaram maior ganho de peso, quando comparados com o grupo controle, $p=0,008$ (**Figura 9B**).

Figura 9 - A. Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na curva de ganho de peso e **B.** no delta de ganho de peso de camundongos C57BL6J adultos

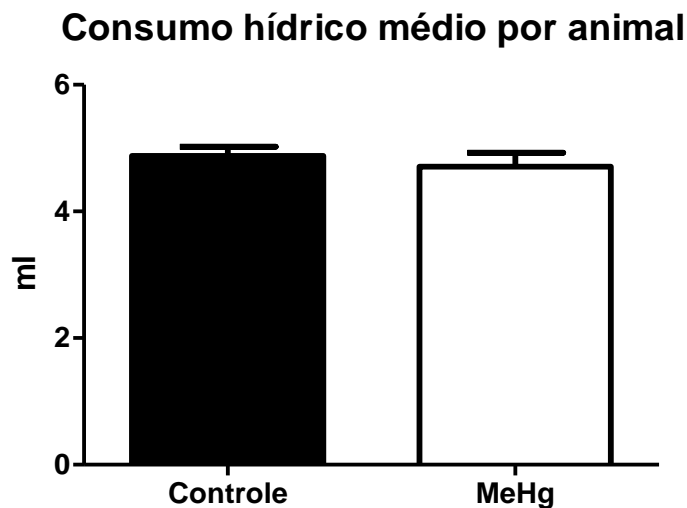


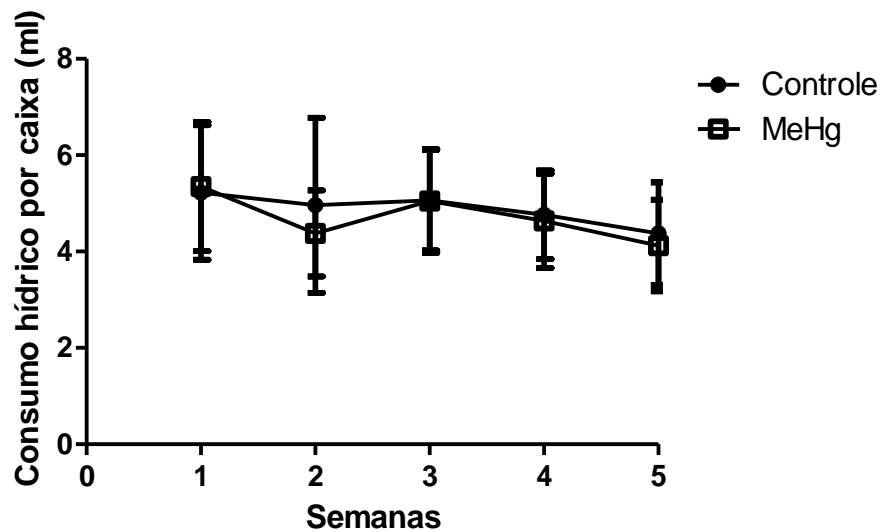


Os valores foram expressos em média \pm EPM, $n=20$ por grupo. **A.** a. $p < 0,0001$, b. $p=0,002$ e c. $p=0,01$; teste *two-way* ANOVA com correção de múltiplas comparações de Bonferroni. **B.** $**p=0,008$; teste T de *Student* não pareado.

Os camundongos C57BL6/J desafiados por 2mg/L de MeHg por 30 dias não apresentaram diferença no consumo hídrico na média geral por animal ou na média diária por animal (**Figura 10**).

Figura 10 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na média consumo hídrico e consumo hídrico diário de camundongos C 57BL6J adultos





Os valores foram expressos em média \pm EPM, n= 10 por grupo. $p^{****} < 0,0001$, teste T de *Student* não pareado.

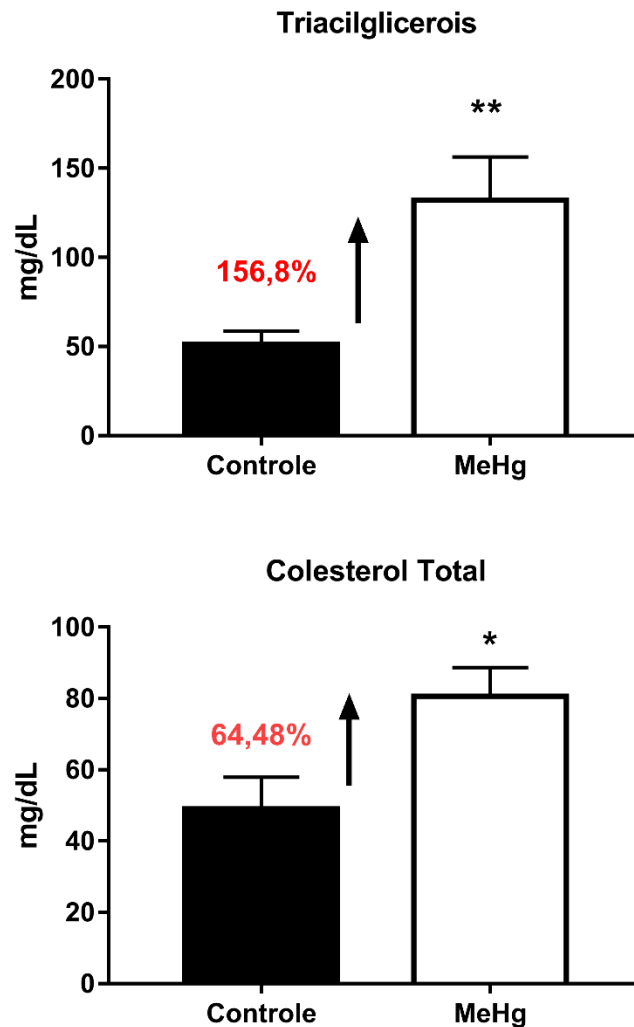
Considerando, a média diária individual dos animais desafiados por MeHg (2mg/L) apresentaram valor de 4,7 mL, os 30 dias de intervenção e a concentração de 2mg/L usados, tem-se um valor aproximado de 0,282 mg de MeHg consumido por animal. Consumo total de 11,50mg de MeHg/kg de peso ou consumo diário de 0,38 mg de MeHg/kg de peso.

Ao considerarmos o cálculo de conversão de dose proposto por Reagan-Shaw, Nihal e Ahmad, 2008, baseada na área de superfície corporal, obtemos a correlação da dose administrada aos camundongos (0,38 mg de MeHg/kg diário) para o humano de 0,031mg de MeHg/kg de peso corporal.

5.2 Avaliação de parâmetros lipídicos dos animais

Os camundongos C57BL6/J desafiados por 2mg/L de MeHg por 30 dias na água de beber apresentaram níveis séricos de triacilgliceróis ($p= 0,01$) e colesterol total ($p= 0,03$) significativamente maiores que o grupo controle não desafiado (**Figura 11**).

Figura 11 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na concentração sérica de triacilgliceróis e colesterol total de camundongos C57BL6J adultos

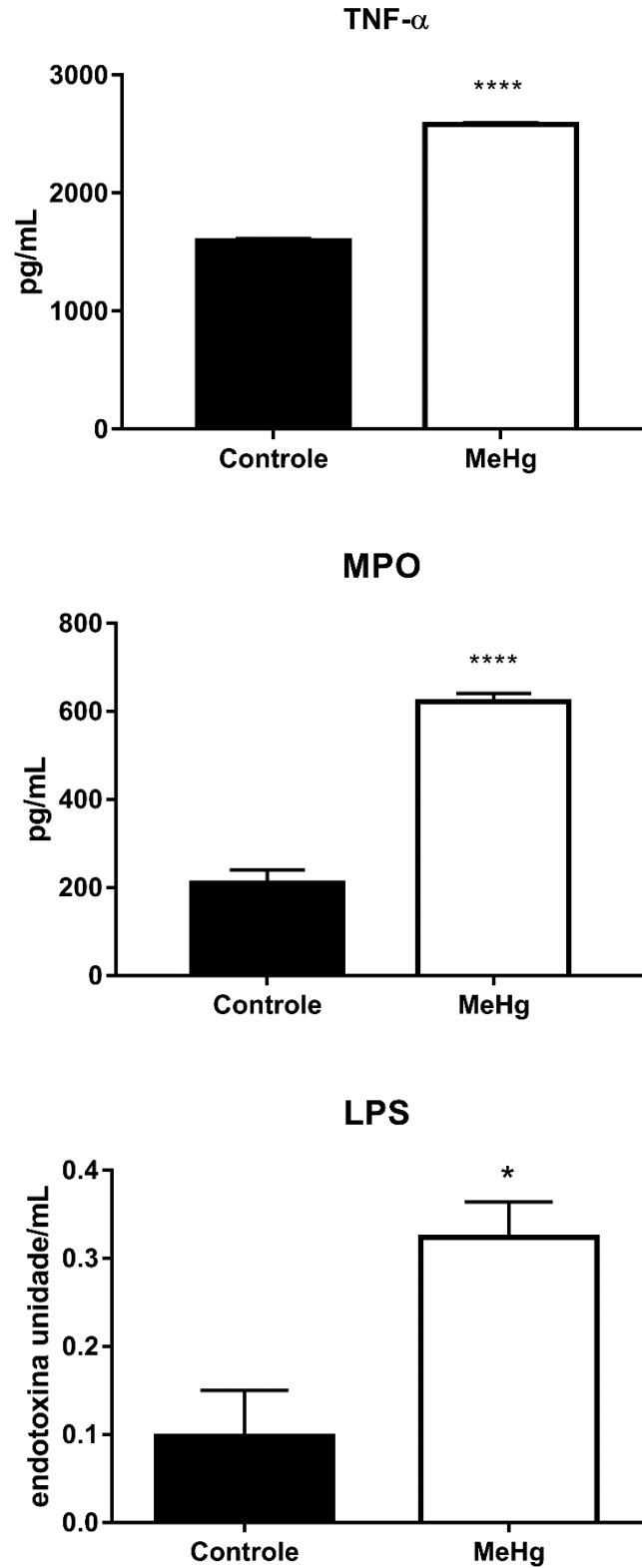


Os valores foram expressos em média \pm EPM, n= 5 por grupo. *p= 0,03, **p= 0,01, teste T de *Student* não pareado.

5.3 Avaliação da inflamação sistêmica

A intoxicação por MeHg (2mg/L na água de beber) por 30 dias causou aumento significativo nos níveis plasmáticos de TNF- α (p < 0,0001) e MPO (p < 0,0001) e séricos de LPS (p= 0,01) em camundongos C57BL6J desafiados em comparação aos controles (**Figura 12**).

Figura 12 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na inflamação sistêmica, avaliado pela concentração plasmática de TNF- α e MPO e sérica de LPS em camundongos C57BL6J adultos

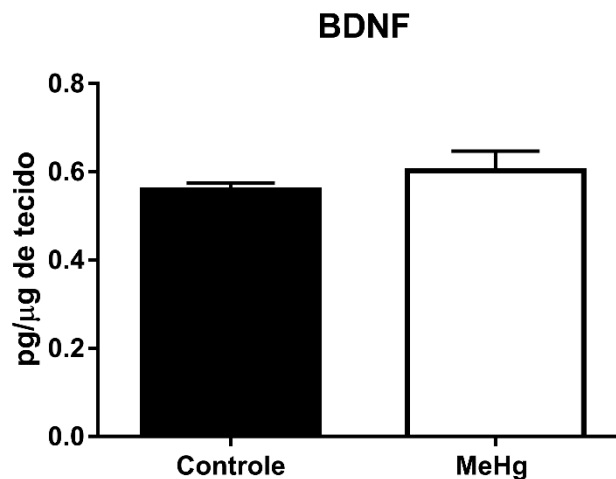


Os valores foram expressos em média \pm EPM, n= 6 por grupo. ****p < 0,0001, *p= 0,01, teste T de Student não pareado.

5.4. Avaliação da concentração de BDNF no hipocampo

Os camundongos C57BL6/J desafiados por 2mg/L de MeHg por 30 dias na água de beber não apresentaram diferença significativa nos níveis tissulares hipocampais de BDNF em relação aos animais do grupo controle não desafiado ($p > 0,05$) (**Figura 13**).

Figura 13 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na neuroplasticidade, avaliada pela concentração de BDNF no hipocampo de camundongos C 57BL6J adultos

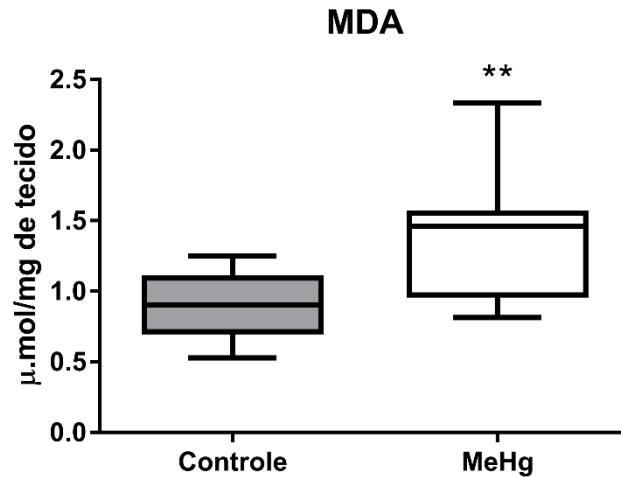


Os valores foram expressos em média \pm EPM, $n = 8$ por grupo, $p > 0,05$; teste T de *Student* não pareado.

5.5. Avaliação da peroxidação lipídica no hipocampo

Os camundongos C57BL6/J desafiados por 2mg/L de MeHg por 30 dias na água de beber apresentaram níveis de malondialdeído (MDA) no hipocampo significativamente maiores que os animais do grupo controle não desafiado, indicando aumento significativo de peroxidação lipídica ($p = 0,008$) (**Figura 14**).

Figura 14 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na peroxidação lipídica, avaliada pela concentração de MDA no hipocampo de camundongos C57BL6J adultos

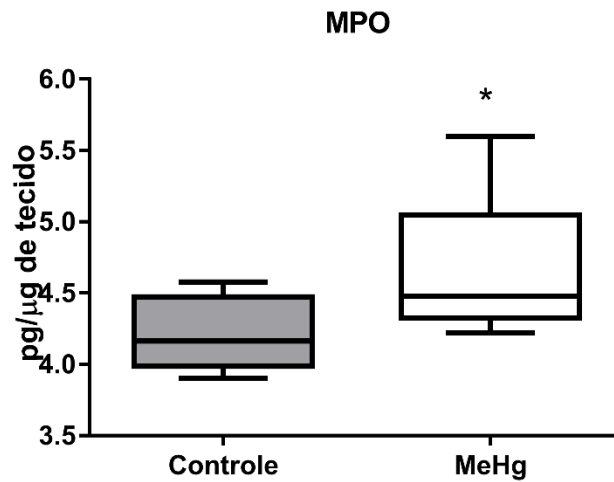


Os valores foram expressos em média \pm EPM, n=10 por grupo. **p= 0,008, teste T de *Student* não pareado.

5.6. Avaliação da atividade MPO hipocampal

Os camundongos C57BL6/J desafiados por 2mg/L de MeHg por 30 dias na água de beber apresentaram níveis hipocampais de mieloperoxidase (MPO) significativamente maiores que os animais do grupo controle não desafiado (p=0,04) (**Figura 15**).

Figura 15 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na atividade de MPO no hipocampo de camundongos C57BL6J adultos

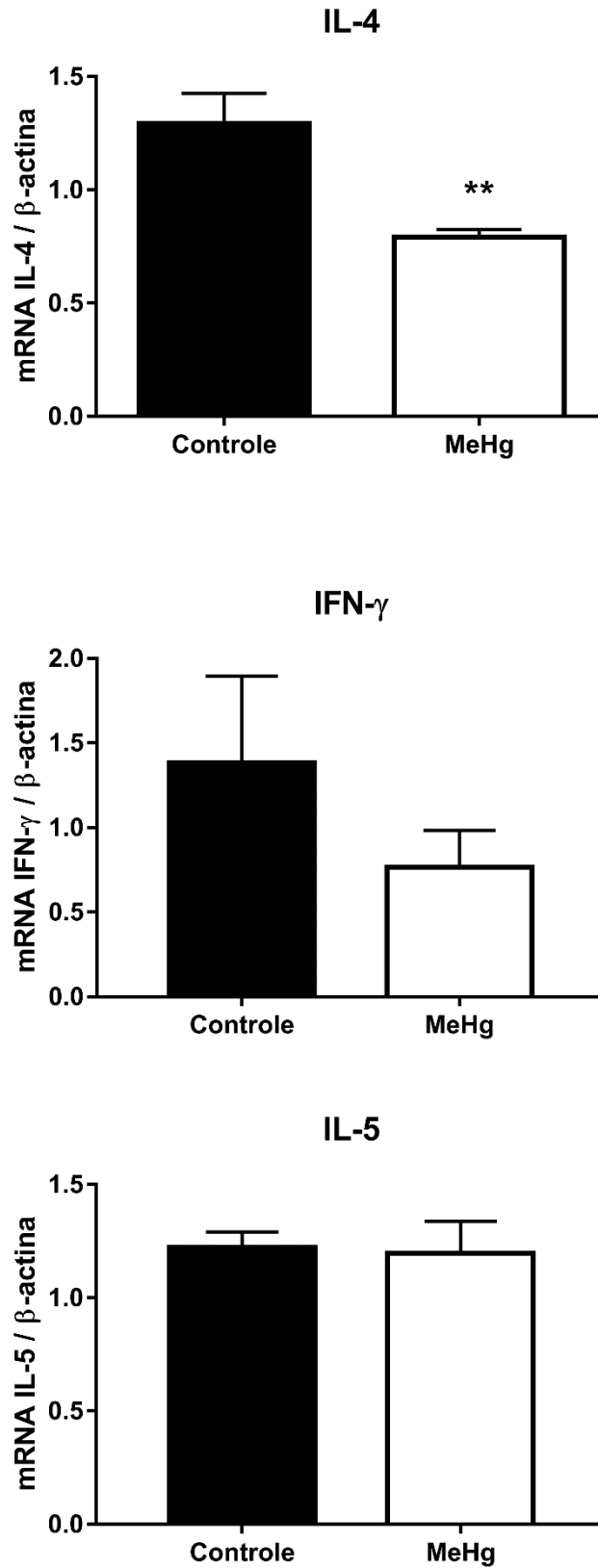


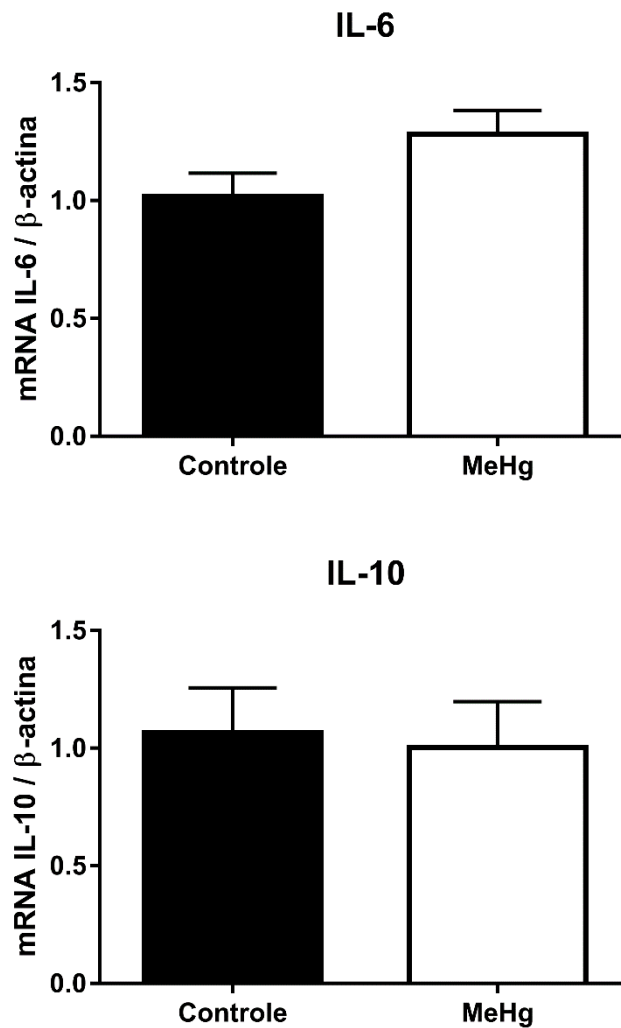
Os valores foram expressos em média \pm EPM, n= 8 por grupo. *p= 0,04 pelo teste T de *Student* não pareado.

5.7. Avaliação da expressão gênica de citocinas no hipocampo

A intoxicação pelo MeHg (2mg/L na água de beber) por 30 dias induziu menor expressão gênica de IL-4 (p= 0,004) no hipocampo, porém não determinou diferença significativa nas expressões de IFN- γ , IL-5, IL-6 e IL-10 (p > 0,05) (**Figura 16**).

Figura 16 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na expressão gênica de IL-4, IFN- γ , IL-5, IL-6 e IL-10 no hipocampo de camundongos C57BL6J adultos



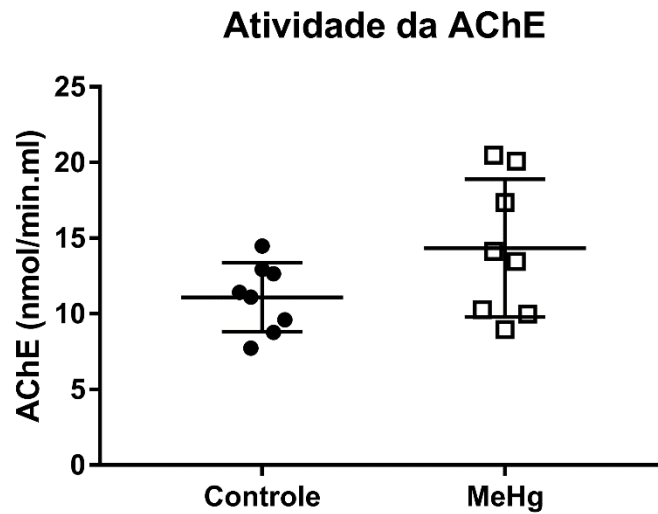


Os valores foram expressos em média \pm EPM, n= 5 por grupo. **p= 0,004; teste T de *Student* não pareado.

5.8 Avaliação da atividade da acetilcolinesterase no hipocampo

Não foi observada diferença nas concentrações de acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo de camundongos C57BL6/J desafiados por 2mg/L de MeHg por 30 dias na água de beber quando comparadas aos animais do grupo controle não desafiado (p=0,09) (**Figura 17**).

Figura 17 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na atividade da acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo de camundongos C57BL6J adultos

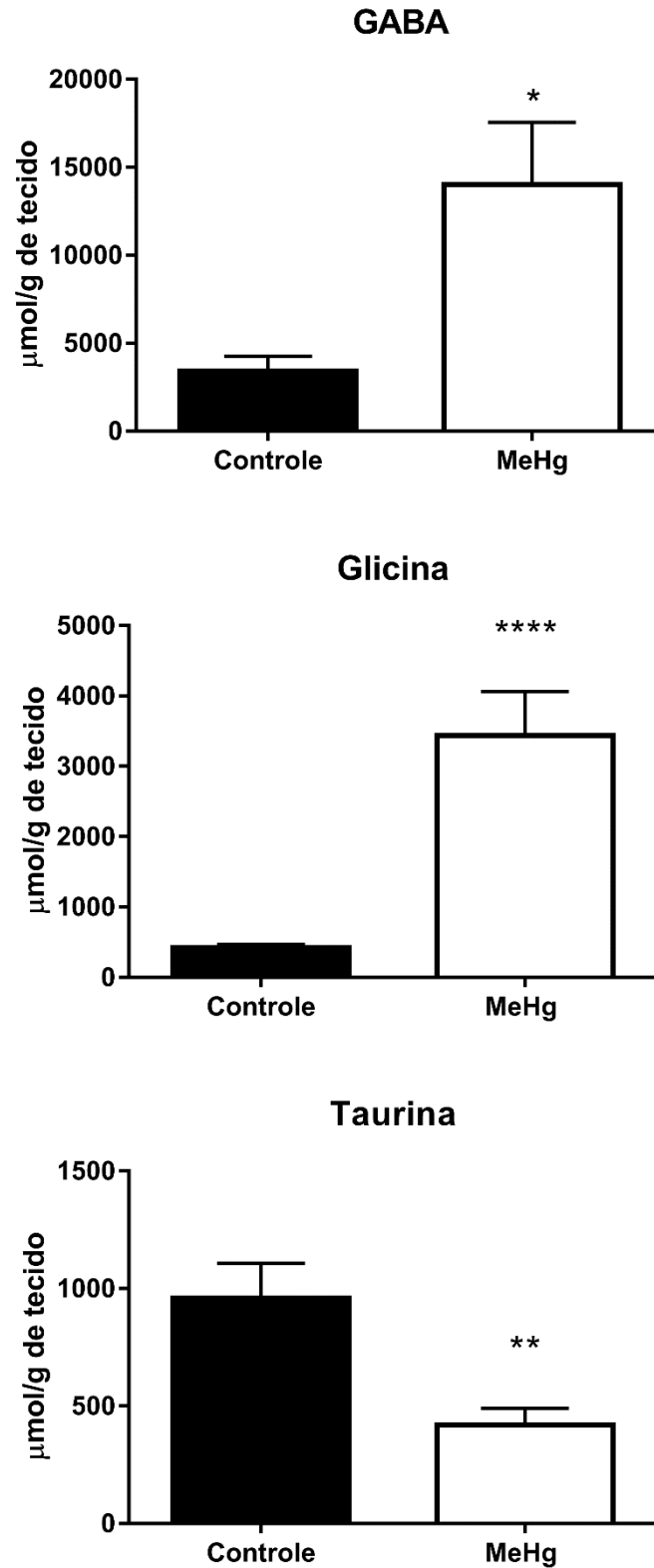


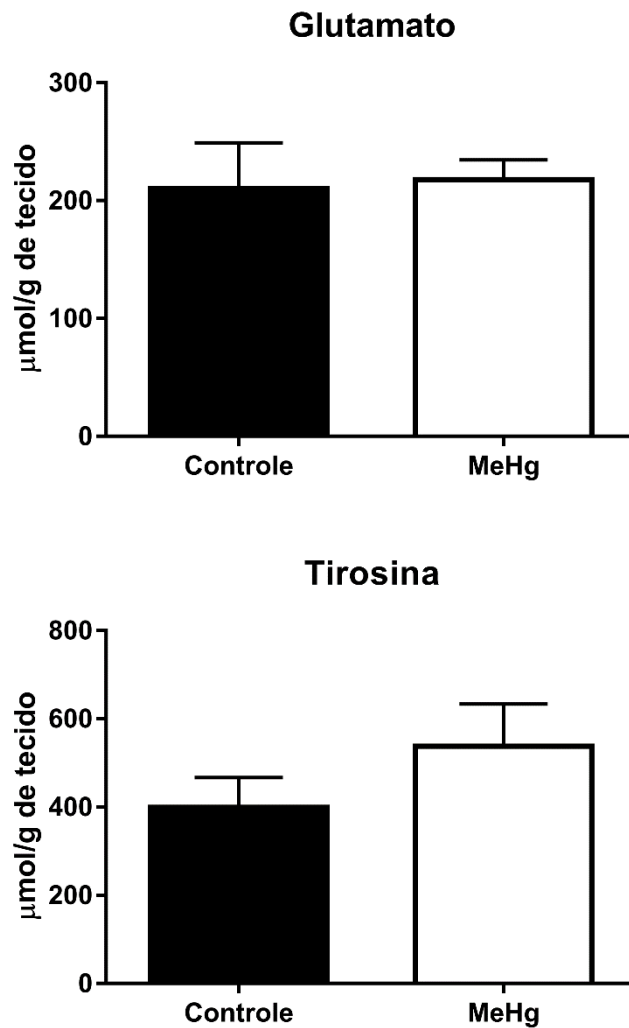
Os valores foram expressos em média \pm EPM, $n=8$ por grupo. $p > 0,05$; teste T de *Student* não pareado.

5.9 Avaliação da concentração de neurotransmissores no hipocampo

Os camundongos C57BL6/J desafiados por 2mg/L de MeHg por 30 dias na água de beber apresentaram concentrações tissulares hipocampais significativamente maiores de GABA ($p=0,01$) e glicina ($p<0,0001$) e significativamente menores de taurina ($p=0,003$), porém sem diferença significativa para glutamato e tirosina ($p>0,05$), quando comparados ao grupo controle não desafiado (**Figura 18**).

Figura 18 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na concentração de GABA, glicina, taurina, glutamato e tirosina no hipocampo de camundongos C57BL6J adultos



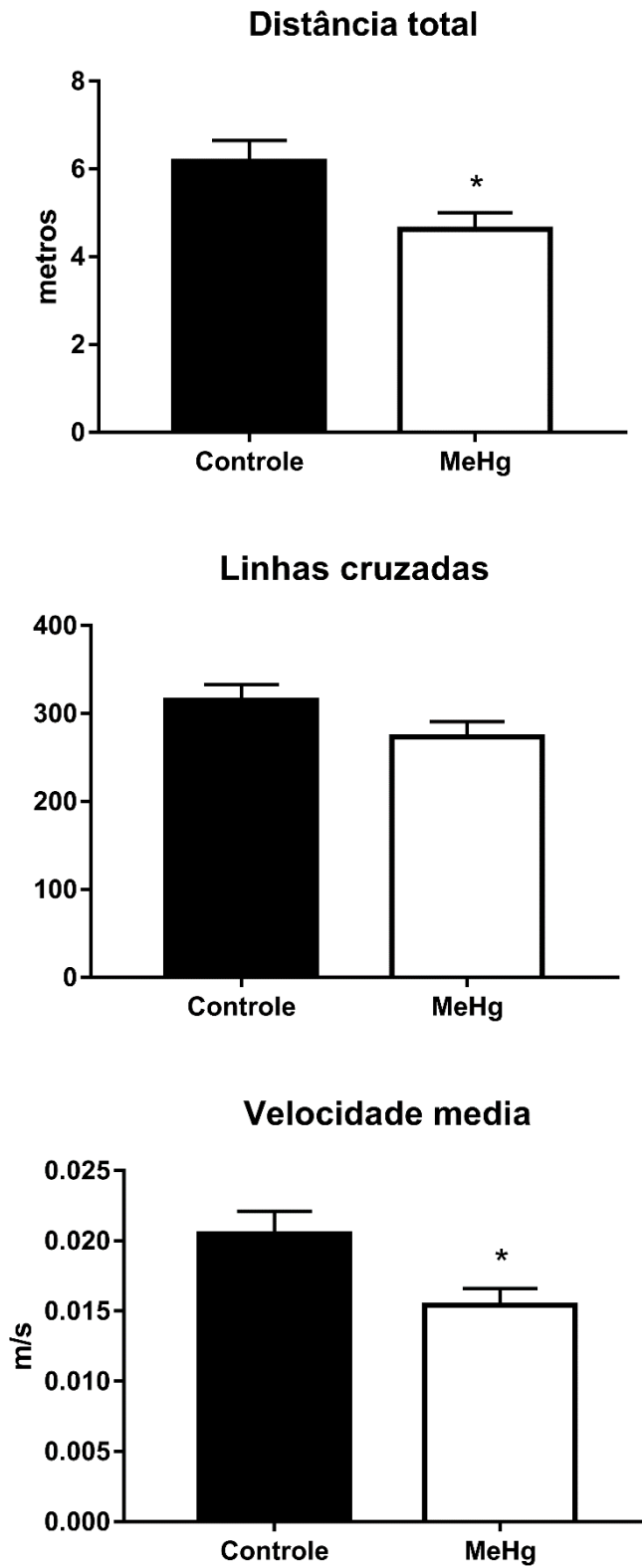


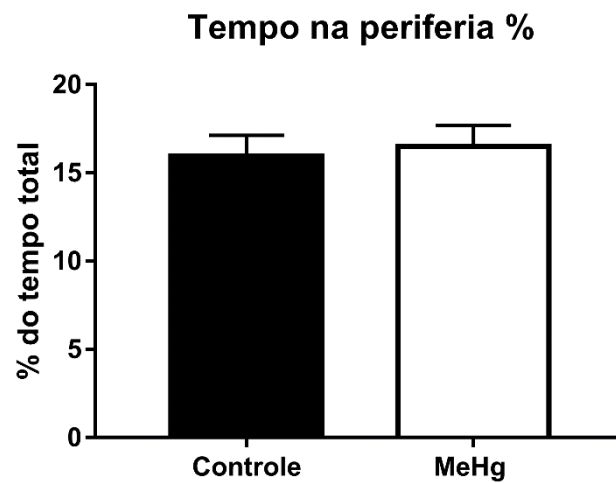
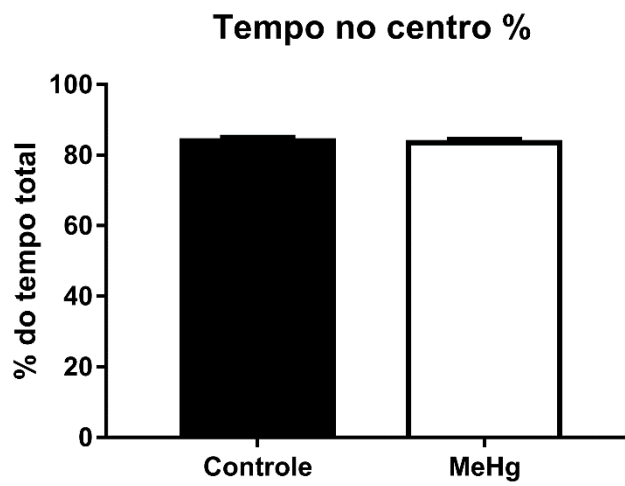
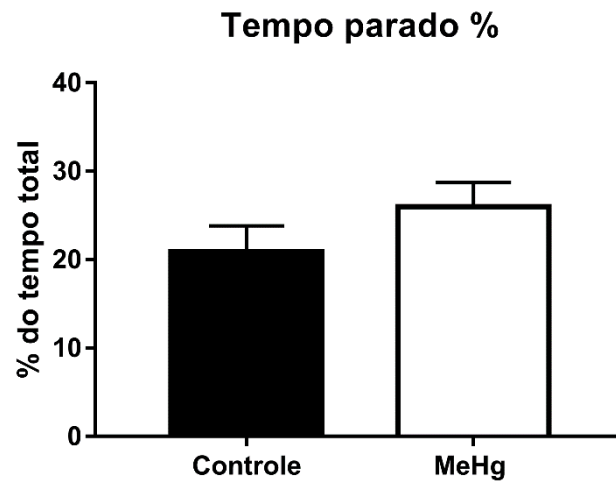
Os valores foram expressos em média \pm EPM, n=8 por grupo. *p= 0,01, **p= 0,003, ****p < 0,0001; teste T de *Student* não pareado.

5.10. Avaliação comportamental exploratória e locomotora dos animais

O teste de campo aberto indicou menor distância total percorrida (p=0,02), menor velocidade média (p=0,02) (**Figura 19**), menor taxa de exploração vertical (*rearing*) (p = 0,01) e maiores registros de autolimpeza (*grooming*) (p = 0,01) (**Figura 20**) nos camundongos C57BL6/J desafiados por 2mg/L de MeHg por 30 dias na água de beber quando comparados aos animais do grupo controle.

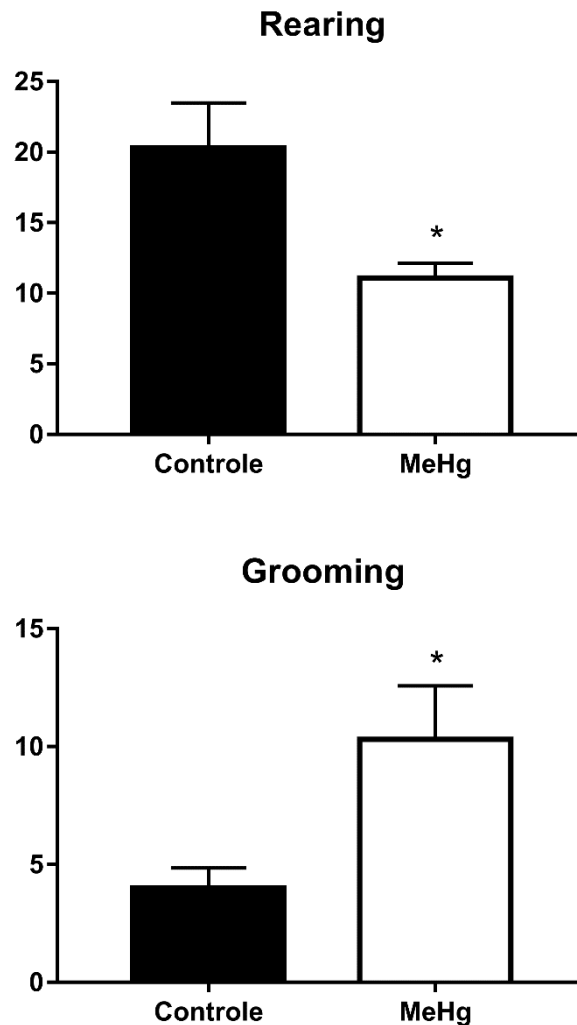
Figura 19 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na exploração espacial no teste de campo aberto





Os valores foram expressos em média \pm EPM, n= 10 por grupo. *p= 0,02; teste T de *Student* não pareado.

Figura 20 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na exploração vertical (rearing) e autolimpeza (grooming) no teste de campo aberto

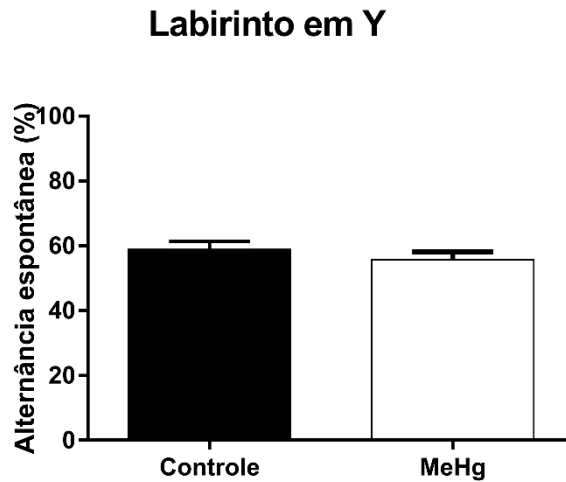


Os valores foram expressos em média \pm EPM, n= 10 por grupo. *p= 0,01 pelo teste T de *Student* não pareado.

5.11 Avaliação da memória de trabalho pelo labirinto em Y

Os camundongos C57BL6/J desafiados por 2mg/L de MeHg por 30 dias na água de beber realizaram semelhante alternância entre braços no labirinto em Y quando comparados ao grupo controle. Significando que não tiveram déficit na memória de trabalho (**Figura 21**).

Figura 21 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na memória de trabalho avaliada pelo labirinto em Y

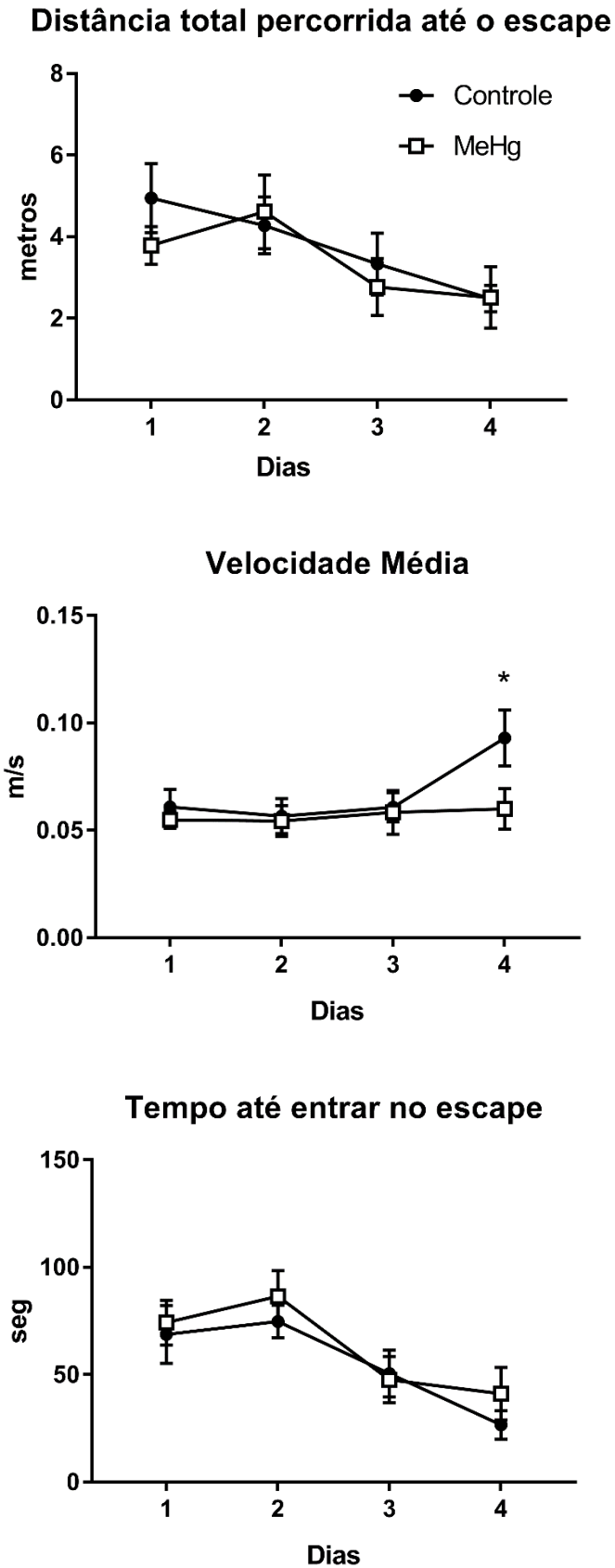


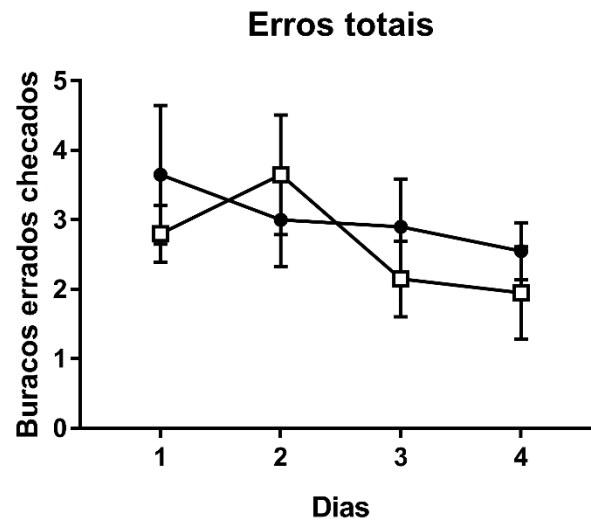
Os valores foram expressos em média \pm EPM, n= 10 por grupo. $p > 0,05$; teste T de *Student* não pareado.

5.12. Avaliação da memória espacial e de longo prazo pelo labirinto de Barnes

Os camundongos C57BL6/J desafiados por 2mg/L de MeHg por 30 dias na água de beber apresentaram menor velocidade média no 4^o dia de aquisição ($p=0,01$), porém sem diferença significativa na distância total percorrida ou buracos errados checados ao longo das aquisições no labirinto de Barnes, quando comparados ao grupo controle não desafiado (**Figura 22**). Também não houve diferença significativa entre os grupos na avaliação da memória de longo prazo (*probe*) quando comparados os tempos de latência no quadrante alvo ou demais quadrantes (**Figura 23**).

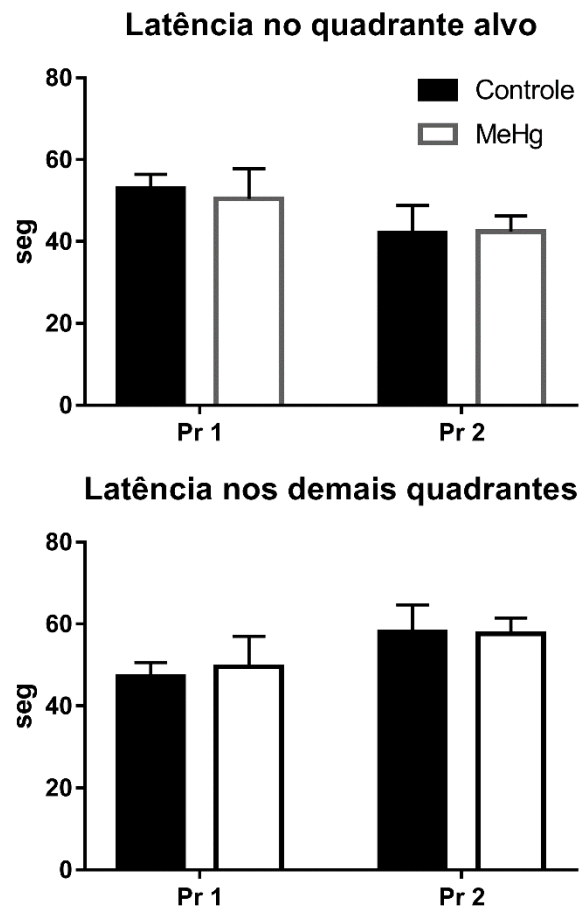
Figura 22 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na memória espacial (aquisições) pelo labirinto de Barnes





Os valores foram expressos em média \pm EPM, $n = 10$ por grupo. * $p = 0,01$ pelo teste *two-way* ANOVA com pós teste de Bonferroni.

Figura 23 - Efeito da administração oral de MeHg (2mg/L) por 30 dias na memória de longo prazo (probe) pelo labirinto de Barnes



Os valores foram expressos em média \pm EPM, $n = 10$ por grupo. Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo pelo teste T de *Student* não pareado.

6 DISCUSSÃO

Tragédias ambientais, como as que ocorreram em Brumadinho e Mariana, MG, que acarretaram despejo de rejeitos minerais, incluindo Hg, em leito de rios, e por consequência possível contaminação crônica por MeHg, podem ter impacto nocivo à saúde das populações ribeirinhas a longo prazo, mesmo em baixo grau de intoxicação, incluindo a população adulta e idosa, com aumento de doenças neurodegenerativas. Modelos experimentais podem ajudar a medir melhor o impacto da intoxicação com MeHg, em baixas doses e de forma crônica, contribuindo para definir estratégias interventivas e implementação de novas políticas públicas em áreas de maior risco.

Este trabalho utilizou doses baixas de MeHg por período de 30 dias em camundongos C57BL6/J adultos, período maior que o usual em estudos sobre a toxicidade deste organometal, avaliando parâmetros de inflamação sistêmica e neurotoxicidade, incluindo marcadores de estresse oxidativo e inflamação, no hipocampo. Até o momento, nenhum estudo avaliou o efeito da intoxicação crônica do MeHg em baixas doses nas concentrações de neurotransmissores no hipocampo em camundongos adultos.

Tendo em vista que a via de administração oral é a principal forma de intoxicação por MeHg em humanos, em nosso protocolo de intoxicação, o consumo foi de aproximadamente 0,38 mg de MeHg/Kg/dia, um consumo reduzido quando comparado a literatura, como no estudo de Moreira et al., (2012), no qual foi estimado que camundongos jovens, recebendo 40 mg/L por 21 dias na água de beber, consumiram 6 mg de MeHg/kg/dia. Apesar da discrepância aparente das doses utilizadas, os animais utilizados em nosso estudo apresentaram quadros de dislipidemia (aumento dos níveis séricos de colesterol total e triacilgliceróis) e inflamação sistêmica. Além da via oral ser a principal forma de intoxicação mercurial em humanos, o consumo de peixes carnívoros eleva ainda mais esse risco, pois estes são os organismos que mais acumulam o composto no seu organismo, devido a estarem presentes nos níveis tróficos mais altos.

A partir disto, Drude De Lacerda et al., (2016), avaliaram a concentração de Hg no peixe *Scomberomorus cavala* (popularmente conhecido como cavala) em Fortaleza - CE, obtiveram a concentração de 1,73mg de Hg/kg por músculo de peixe. Ao dividirmos essa concentração por um peso médio normal de 72 kg para um homem

adulto, e considerar o consumo diário de 1kg desse peixe, temos 0,024 mg de Hg/kg de peso corporal. No presente estudo (após cálculo de conversão de dose, sendo a dose equivalente no humano de 0,031 mg de MeHg/kg de peso corporal) as doses ingeridas quando comparados humanos e animais, se assemelham, indicando que nosso modelo de intoxicação é realístico e potencialmente relevante para estudar o impacto do MeHg sobre populações residentes em áreas de risco, principalmente em relação aos danos acarretados durante o envelhecimento, uma vez que mesmo em baixas doses, nossos animais apresentaram repercussões significativas, tanto a nível neurológico, como vascular e sistêmico.

Os danos cardiovasculares como citado acima, são um fator importante de risco atribuído à contaminação por MeHg. Em nosso estudo, achados de aumento de peso e das concentrações séricas de triacilgliceróis e colesterol total nos animais intoxicados indicam um efeito dislipidêmico do MeHg e por consequência aumento do risco cardiovascular, incluindo risco aterosclerótico. O que corrobora com os achados de pacientes oriundos da cidade de Minamata, Japão, em dois estudos de Yorifuji et al., (2010), e Inoue et al., (2012), após avaliação de prontuários médicos de pacientes intoxicados à época do desastre ambiental, 1963, os autores verificaram aumento da incidência de doença aterosclerótica e hipertensão arterial (pacientes intoxicados acima de 10 anos de idade).

Além dos estudos mencionados, modelos animais também têm demonstrado que há um aumento do risco para doença aterosclerótica a partir da intoxicação por MeHg. No estudo de Lacerda Leocadio et al., (2020), camundongos C57BL6/J com 10 semanas de vida, que receberam solução de MeHg (20mg/L na água de beber) por 14 dias, apresentaram aumento da pressão sistólica e diastólica e das concentrações séricas de colesterol total e de HDL. Além disso, o MeHg teve ação inibidora sobre a enzima paraoxonase (PON1) nesses animais. A PON1 é uma enzima que regula a oxidação da LDL. A LDL oxidada (LDLox) é altamente aterogênica. Corroborando com esses resultados, Jin et al., (2012), ao administrarem via gavagem 3mg de MeHg/kg de peso corporal a ratos jovens por 14 dias, observaram redução da atividade da PON1, aumento das concentrações séricas de LDLox, molécula de adesão intercelular 1 (ICAM 1) e proteína quimioatratadora de monócitos 1 (MCP1), demonstrando o aumento do risco cardiovascular e disfunção endotelial. Além disso, o estudo de Silva et al., (2020), com camundongos de oito semanas de vida, documentou áreas afetadas por lesões ateroscleróticas e regiões de estenose na

aorta, compatíveis com doença aterosclerótica, após serem submetidos à cirurgia de constrição carótida, e intoxicação com MeHg (20mg/L na água de beber) por 15 dias. Os achados corroboram com os dados encontrados no presente estudo, onde foi observado aumento de peso e das concentrações séricas de triacilgliceróis e colesterol total nos animais intoxicados indicam um efeito dislipidêmico do MeHg e por consequência aumento do risco cardiovascular, incluindo risco aterosclerótico. A alteração de peso dos animais intoxicados ao longo dos 30 dias indica atividade pró-obesogênica do MeHg. Esse achado pode estar relacionado à presença de alterações hormonais provocadas pelo MeHg, que podem ser mais acentuadas em camundongos adultos. Um efeito endócrino do Hg que pode estar associado ao ganho de peso é a desregulação de hormônios tireoidianos.

Além dos possíveis danos sistêmicos relatados, inclusive a nível neurológico, a partir da intoxicação por MeHg, uma vez o composto é absorvido no trato gastrointestinal, é possível observar uma grande quantidade de eliminação pelas fezes e urina (MADEJCZYK et al., 2007b; PRINCE et al., 2014b), o que desencadeia alterações na microbiota intestinal e na fisiologia do trato gastrointestinal como um todo (JIANG et al., 2018; ZHAO et al., 2020).

Como visto em estudo de Matos et al., (2020), no qual foram documentadas alterações na barreira epitelial intestinal após intoxicação por MeHg (20mg/L na água de beber por 21 dias). O dano ao epitélio intestinal pode estar associado ao aumento da translocação bacteriana e elevação dos níveis circulantes de LPS. Maiores níveis séricos de LPS e plasmáticos de TNF- α e MPO, após intoxicação por MeHg, em camundongos adultos, encontrados neste trabalho sugerem endotoxemia, de causa intestinal. Esta explicação é plausível e é sustentada pelo fato de que os animais utilizados no estudo permanecerem em biotério de barreira, livre de contato externo (NB1) e com alto rigor sanitário. Ou seja, não apresentavam uma fonte secundária para a indução da translocação bacteriana.

MeHg pode alterar a composição da microbiota intestinal, com alteração da razão Firmicutes/ Bacteroidetes (RUAN et al., 2019). Achado também visto no uso de antibióticos, agentes imunossupressores e doenças crônicas intestinais, se relacionando positivamente com obesidade, outro fator associado ao aumento do risco aterosclerótico (BHAT et al., 2017; INDIANI et al., 2018; LACERDA LEOCADIO et al., 2020).

O aumento na população de Bacteroidetes (em sua maioria Gram negativas) pode estar associado ao aumento de LPS induzido pela intoxicação mercurial, conforme publicou Zhang et al., (2019). Associado a isso, Rothenberg et al., (2016), perceberam que mulheres grávidas expostas ao MeHg tinham o tipo Akkermansia aumentado. Essas bactérias estão associadas com a redução na camada de muco intestinal, alteração frequentemente associada à inflamação intestinal e danos na barreira intestinal (BERGSTROM et al., 2010).

Como resposta ao dano na barreira intestinal e aumento de LPS circulante, ocorre neutrofilia. Um dos elementos mais relatados sobre a ação neutrofílica é a ação oxidativa desempenhada pela enzima MPO, presente em grânulos azurófilos de neutrófilos e monócitos (ERDAMAR et al., 2007). A ação da MPO é mediada pela ligação com H₂O₂ (MPO - H₂O₂), formando um composto oxidativo. A MPO - H₂O₂ induz a formação de um forte agente oxidante, o ácido hipocloroso (HOCl), que atua modificando a estrutura de lipídios e proteínas, amplificando a cascata de inflamação (KLEBANOFF, 2005; SEIDEL; HUEBBE; RIMBACH, 2019). Um dos elementos responsáveis pela regulação da ação oxidativa do HOCl é taurina. Em cobaias adultas Erdamar et al, 2007, administraram de forma concomitante taurina (300 mg/kg) e LPS (4 mg/kg) em dose única via i.p. Os autores observaram que a administração da taurina reduziu a concentração de MPO e NO₂⁻ em leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) no sangue periférico em comparação ao grupo que recebeu apenas LPS, sugerindo um efeito anti-inflamatório induzido pela administração exógena de taurina em modelo de endotoxemia.

A taurina tem ação anti-inflamatória relacionada com o HOCl, reagindo e formando o composto taurina cloroamina (TauCl). Após a apoptose dos neutrófilos, a TauCl é absorvida por macrófagos, sendo menos tóxica à célula que o HOCl e atuando como sinalizadora nuclear da via Nrf2-Keap1 (KIM et al., 2010). A translocação nuclear de Nrf2 é responsável pela ativação de genes relacionados à transcrição de enzimas antioxidantes, reduzindo a apoptose celular, níveis de H₂O₂ e aumentando as concentrações de GSH em macrófagos (PIAO; CHA; KIM, 2011). Outra atuação da taurina como reguladora da atividade oxidativa é pela sua interação com a complexo I da cadeia de elétrons mitocondrial. A redução das concentrações de taurina se relacionou com o aumento da redução de O₂ em O₂⁻ (JONG; AZUMA; SCHAFFER, 2012).

Outra consequência da translocação bacteriana e endotoxemia é a neuroinflamação decorrente. Uma das vias de neuroinflamação é o comprometimento da BHE induzido pelo LPS (BANKS et al., 2015), podendo afetar a neurogênese (VALERO et al., 2014). Injeção periférica, com única dose de LPS (10 mg/kg i.p.), em ratos com oito semanas de idade, foi suficiente para induzir aumento da permeabilidade de BHE, com aumento de β -amiloide no hipocampo, além do aumento das concentrações séricas de IL-1 β , IL-6 e TNF α (TOWNER et al., 2018; WANG et al., 2018a; KIRK et al., 2019). Em nosso trabalho, a BHE não foi investigada, mas sua alteração é plausível, como resultado da indução de intoxicação por MeHg, porém mais estudos são necessários para investigar essa possibilidade, utilizando o mesmo protocolo de intoxicação.

O aumento dos níveis de MPO e maior peroxidação lipídica (MDA) devido à intoxicação pelo MeHg, encontrados neste estudo, podem ser consequência da inflamação sistêmica com aumento de LPS circulante. O possível efeito deletério do MeHg na barreira intestinal pode induzir aumento da translocação bacteriana lúmen-sangue (SPADONI et al., 2015).

A peroxidação lipídica pode ser induzida com o transporte do MeHg para o interior das células no hipocampo, levando ao dano à membrana mitocondrial, reduzindo seu potencial de membrana e impedindo a cadeia transportadora de elétrons, levando a um aumento do influxo de K⁺ (LIMKE; ATCHISON, 2002; GARG; CHANG, 2006), liberação de citocromo C no citosol (evento pró-apoptótico via caspase 9) e aumento da liberação do ânion superóxido (O₂⁻), por meio de ação de oxirredução da NADPHox (KLEBANOFF, 2005; MORI; YASUTAKE; HIRAYAMA, 2007a).

Alterações na cadeia transportadora de elétrons ocorre devido ao acúmulo de mercúrio inorgânico (iHg) no interior das mitocôndrias. Mailloux, Yumvihoze e Chan (2015), demonstraram que em mitocôndrias isoladas, a partir de culturas de neuroblastoma humano, o aumento da produção de O₂ (Complexos I, II e III mitocondrial) foi relacionado ao aumento da desmetilação do MeHg, gerando iHg. Sugerindo aumento da concentração de iHg no interior da mitocôndria e o comprometimento da membrana mitocondrial. O aumento da conversão de MeHg para iHg também foi relacionado ao aumento da toxicidade celular, uma vez que possui baixa capacidade de transpor a bicamada lipídica e continua tendo afinidade por grupamentos tiol (FARINA; ROCHA; ASCHNER, 2011).

O processo de intoxicação por MeHg induz o aumento das concentrações intracelulares de H₂O₂. Esse aumento se relaciona com a inibição da enzima GPx pelo MeHg, reduzindo a ação antioxidante mediada pelo GSH (FARINA et al., 2009; FRANCO et al., 2009a). O MeHg também se liga diretamente às moléculas de GSH, formando o complexo GSHgCH₃, podendo ser transportado para o meio extracelular pelos transportadores proteínas multidrogas resistentes (MRP), uma forma de retirar o MeHg no meio intracelular (RUSH et al., 2012).

Como resultado do aumento de EROs, ocorre a oxidação de membranas celulares e proteínas. A partir da oxidação da dupla camada fosfolipídica, ocorre a liberação de produtos primários, como hidroperóxidos lipídicos, e secundários, como diferentes tipos de aldeídos. Dentre esses produtos secundários, estão o malondialdeído (MDA), propanal, hexanal, 4-hiroxinonenal. Sendo o MDA o mais mutagênico deles e mais usado como marcador de peroxidação lipídica (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990; AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014). Mesmo em baixas doses, o MeHg administrado foi capaz de induzir a peroxidação lipídica no hipocampo de camundongos adultos.

O aumento da concentração de MPO no hipocampo de animais intoxicados, observado em nosso estudo, pode ser devido à ativação da micróglia induzida pelo LPS periférico, em resposta a uma endotoxemia de origem intestinal. Recentemente, foi identificado que a micróglia ativada pode sintetizar e liberar MPO no tecido cerebral (RAY; KATYAL, 2016). Aslankoc et al., (2018), ao injetarem única dose de LPS (5mg/kg ip) em ratos Wistar, 12 meses de vida, encontraram aumento de infiltração neutrofílica e aumento da expressão de IL-6 e caspase-3 no cerebelo e hipocampo. O desafio com LPS induziu comprometimento da BHE nesses animais idosos e dessa forma possível aumento de MPO de origem neutrofílica no cérebro.

A presença de HOCl derivado da ação da MPO no tecido cerebral está associada ao dano na BHE, prejudicando a funcionalidade de lipoproteínas de membrana e induzindo a ativação da eNOS (ARNHOLD; FLEMMIG, 2010). Estudos têm mostrado que níveis circulantes de MPO pode induzir o aumento da permeabilidade da BHE, com neuroinflamação, afetando a unidade neurovascular, com alterações nas *tight junctions* das células endoteliais (HUH et al., 2011; ÜLLEN et al., 2013). Não sabemos se nosso estudo com animais de 3-4 meses de idade, a endotoxemia-induzida pelo MeHg é capaz de alterar a BHE e causar infiltração neutrofílica e ativação microglial. Mais estudos são necessários para confirmar qual a

contribuição da micróglia e de neutrófilos no aumento das concentrações de MPO no hipocampo no nosso protocolo.

Uma comunicação micróglia-astrocítico-neurônio pode ocorrer por aumentos dos níveis de IL-6 no hipocampo. Essa via de comunicação dependente de IL-6 foi demonstrada por Shinozaki et al., (2014), em culturas de células desafiadas com concentrações de MeHg abaixo de 1 μ M, e verificada sinalização micróglia-astrocítico por ATP, com ativação dos receptores P2Y1 astrocitários, promovendo a liberação de IL-6 no meio como sinalização anti-inflamatória, astrocítico-neurônio. Essa via poderia ter uma ação compensatória neuroprotetora para reduzir os níveis de MPO no hipocampo, porém não foi identificado o aumento da atividade transcricional de IL-6 no hipocampo após desafio pelo MeHg em nosso estudo.

Apesar da via de sinalização mediada por IL-6 parece não ter sido alterada nos animais desafiados por MeHg em nosso estudo, foi observada redução da expressão gênica de IL-4 no hipocampo. A IL-4 tem sido relacionada com a modulação do LTP e da inflamação.

A IL-4 é uma citocina com ação prioritariamente anti-inflamatória secretada por células Th2. A entrada de IL-4 no tecido cerebral pode ocorrer por difusão através dos podócitos astrocitários, após sua liberação por células Th2 presentes no líquido cerebrospinal (ENGELHARDT; RANSOHOFF, 2005). Se liga ao receptor α de IL-4 (IL4R α), sendo mimetizada por IL-13 em alguns processos, presente em neurônios e células da glia hipocampais (MAHER; NOLAN; LYNCH, 2005).

Sua via de sinalização intracelular é mediada pela fosforilação de janus quinase 1 (JAK-1) e do transdutor de sinal e ativador da transcrição 6 (STAT-6). A sinalização nuclear de STAT-6 se associa à transcrição de proteínas como o BDNF, o fator de crescimento neuronal (NGF), expressos pelos astrócitos, GATA3 (associado ao aumento da expressão de células Th2), que se relaciona com a liberação de IL-4 (LEE et al., 2003; GOENKA; KAPLAN, 2011). Por sua vez, JAK-1 fosforila os substratos 1 e 2 para receptores de insulina, se associando com a sobrevivência e o crescimento celular pela ativação das vias PI3/AKT e PKB/mTOR (LUZINA et al., 2012).

O processo de envelhecimento está diretamente relacionado com a redução da fosforilação de STAT-6, e conseqüente redução da transcrição de BDNF e da própria IL-4. A redução desses sinalizadores celulares foi relacionada com a redução da fosforilação das quinases extracelulares reguladoras de sinalização

(ERK). A atividade dessas quinases está ligada à manutenção do LTP e no processamento e consolidação da memória (MAHER; NOLAN; LYNCH, 2005; NOLAN et al., 2005).

Estudo com ratos Wistar avaliou o processo de envelhecimento, documentando aumento nas concentrações de IL-1 β e IL-6 no hipocampo de animais com 22 meses de vida quando comparado com animais com 4 meses, reduzindo as de IL-4, e prejuízo na manutenção do LTP. Esses autores ao submeter cultura de células hipocampais ao desafio por LPS observaram redução da expressão de IL-1 β após adição de IL-4 (MAHER; NOLAN; LYNCH, 2005).

Zhao et al., (2019), desafiaram camundongos C57BL6/J, com três meses de vida, com dose de LPS (500 μ g/kg e 750 μ g/kg ip) por sete dias consecutivos e verificaram aumento nas concentrações séricas e do tecido cerebral de IL-1 β , TNF- α e redução de IL-4 e IL-10, demonstrando quadro de inflamação sistêmica e neuroinflamação. Além da variação na concentração de citocinas, os autores também perceberam aumento na contagem de células imunomarcadas positivamente para β -amilóide1-42. Os animais desafiados por LPS apresentaram maior tempo de latência no labirinto aquático de Morris e prejuízo no teste de esquiva passiva, demonstrando prejuízo cognitivo e de aprendizado.

Por sua vez, Nakamura et al., (2016), desafiaram camundongos BALB/c, dois meses de vida, com intoxicação oral por MeHg em baixas doses (0,02 ou 1,0 mg/kgxdia-1), totalizando 30 processos de gavagem ao longo de seis semanas. O total ingerido por esses animais foi de 0,6 e 30mg/kg de MeHg ao final do protocolo de intoxicação, visando avaliar a influência do MeHg em baixas doses na resposta imune da células Th2. A exposição ao MeHg, em baixas doses, não foi suficiente para alterar a resposta imune de células Th2. O estudo também avaliou o efeito do MeHg em animais previamente sensibilizados com a administração oral de ovoalbumina, mimetizando efeitos de alérgenos alimentares, com elevação sérica de citocinas e anticorpos oriundos das células Th2, como IgE, IgG, IL-13 e IL-4. Os animais concomitantemente desafiados com MeHg tiveram menores ou inalteradas concentrações de IgE, IgG1, IL-13 e IL-4, além disso, nas doses de 1mg/kg/dia houve aumento da concentração sérica de IFN- γ , fator envolvido na inibição da resposta de Th2. Os autores então sugerem que o MeHg, em doses moderadas (1 mg/kg/dia), pode ter efeito depressor da resposta de Th2 (NAKAMURA et al., 2016).

Como um dos principais mediadores inflamatórios neurais, temos a micróglia. Diferente de outros macrófagos tissulares, as subpopulações microgliais possuem papel crucial na homeostase cerebral, como por exemplo, a partir da expressão de receptores dos neurotransmissores, como os receptores glutamatérgicos ionotrópicos AMPA e NMDA, e do receptor metabotrópico mGluR2. Além de receptores glutamatérgicos, é também capaz de expressar receptores para GABA, Dopamina e ACh, sendo um recurso utilizado para monitoramento do microambiente cerebral (COLONNA; BUTOVSKY, 2017). Seus padrões de comportamento são muito dinâmicos, podendo alternar entre ativação e inativação rapidamente, caso estimulada (COLONNA; BUTOVSKY, 2017; DHEEN; KAUR; LING, 2007).

Nas últimas décadas, tem se observado que a presença de IL-4 induz uma modificação do fenótipo de macrófagos e micróglia para M2, além de uma redução da produção de antígenos de MHC II induzidos por IFN- γ , estimulando dessa forma, uma resposta anti-inflamatória local (HE et al., 2020; SUZUMURA et al., 1994).

Boccardi et al., (2019), em estudo com 353 pacientes com diagnóstico positivo para Alzheimer, verificaram que a redução de IL-4 sérica estava relacionada com a redução do volume hipocampal. O aumento de placas β -amilóide no cérebro é uma característica patogênica da doença de Alzheimer. Shimizu et al., (2008), observaram que na presença de IL-4, culturas de células microgliais apresentaram um clearance de β -amiloide, sugerindo um efeito neuroprotetor mediado pela micróglia. Dessa forma a redução transcripcional de IL-4 no hipocampo em nosso estudo, após desafio com MeHg em camundongos adultos, pode indicar comprometimento da capacidade neuroprotetora na neuroinflamação relacionada ao MPO.

Ting et al., (2020), demonstraram um efeito neuroprotetor da micróglia em culturas primárias de neurônios do córtex cerebral de ratos Sprague-Dawley. Quando induzidos à excitotoxicidade, por adição de glutamato, esses neurônios apresentaram maiores concentrações de IL-4, demonstrando que o neurônio também é capaz de sintetizar e liberar IL-4 como sinalizador. Quando essa cultura foi exposta a células da micróglia, foi verificada alteração do fenótipo da micróglia, para M2. A ação da micróglia-M2 reduziu o efeito excitotóxico induzido pelo glutamato (TING et al., 2020).

He et al., (2020), avaliaram o efeito da administração de IL-4 sobre células microgliais e macrófagos, e possíveis repercussões sobre a mudança fenotípica de subpopulações M1 para M2, em um modelo in vitro e em camundongos acometidos

por hemorragia intracerebral. Os animais tratados com injeções contendo IL-4, apresentaram uma redução nos níveis citocinas inflamatórias relevantes, além de uma redução no edema cerebral e na formação de hematomas. A nível celular, foi observado uma alteração da micróglia para o fenótipo M2, com envolvimento direto da via JAK1/STAT6 no processo, especificamente em resposta a hemorragia induzida, estimulada pela presença da IL-4, tendo-se observado uma neuroproteção promovida pelas células microgliais, com repercussão anti-inflamatória e anti-apoptótica.

Corroborando com os achados de Tang et al., (2015), em estudo no qual observou-se subpopulações M2 de micróglia induzindo respostas anti-inflamatórias, com importante relação da presença de células M1/M2, uma vez, que por exemplo, na doença de Alzheimer, há um aumento da subpopulação microglial M2, porém com um aumento concomitante da subpopulação M1.

Lesões na medula espinhal induziram aumentos nos níveis teciduais de TNF- α , IL-1 β e IL-6, que foram reduzidos pela injeção via i.p. de taurina, sugerindo efeito neuroprotetor (NAKAJIMA et al., 2010). Da mesma forma, Niu et al., (2018), observaram que em co-culturas de neurônios e astrócitos a suplementação com taurina, após dano mecânico às células, induziu redução das concentrações de MDA e aumento de GSH, bem como aumento da atividade de SOD e catalase. Também verificaram redução das concentrações de TNF- α e IL-6 e da expressão gênica de caspase-3 e bax, além de aumento de bcl-2.

Yuan e Atchinson (1997, 1995), demonstraram, em fatias de hipocampo, que o MeHg em baixas doses é capaz de bloquear receptores GABAA e GABAB. Com o bloqueio dos receptores aumentou a biodisponibilidade de GABA na fenda sináptica, porém sem alterar a neurotransmissão glutamatérgica (YUAN; ATCHISON, 1995, 1997b; FONFRÍA; RODRÍGUEZ-FARRÉ; SUÑOL, 2001; HERDEN et al., 2008). Resultados que corroboraram com nosso estudo, no qual a intoxicação por MeHg aumentou as concentrações de GABA no hipocampo, também não sem alteração das concentrações de glutamato. O efeito do MeHg sobre os receptores GABAA se relacionam com a alquilação de grupamentos tiol de resíduos de cisteína no receptor, modificando a conformação do mesmo, alterando assim o fluxo de Cl⁻ e a polarização da membrana neuronal (FONFRÍA; RODRÍGUEZ-FARRÉ; SUÑOL, 2001).

Parte dos estudos envolvendo a interação do MeHg com os receptores GABAérgicos foram desenvolvidos em fatias de cerebelo. Enquanto nas fatias de hipocampo o MeHg tinha potencial de inibir correntes inibitórias pós-sinápticas (IPSC),

no cerebelo essa inibição era dependente de dose e tempo de exposição maior. Isso se deve em parte pela maior sensibilidade das fibras que inervam o hipocampo. Axônios de neurônios piramidais seriam mais sensíveis que parte das fibras que inervam o cerebelo (apesar das células de Purkinje serem sensíveis ao MeHg, as fibras trepadeiras são mais resistentes). Por isso, Yuan e Atchinson (2007), afirmam que os resultados que obtiveram em estudo com fatias de hipocampo não são comparáveis em dose e tempo de resposta com os obtidos em fatias de cerebelo (YUAN; ATCHISON, 1995, 1997a, 2003, 2007).

Estudos envolvendo o impacto do MeHg na ação da glicina ou na expressão de seus receptores não são conclusivos. A esparsa informação obtida de outros trabalhos afirma que o mercúrio, em várias apresentações, reduz a biodisponibilidade de glicina no organismo de peixes (SASTRY; RAO, 1982). Porém ao analisar fatias de cerebelo de camundongos expostas a doses crescentes de MeHg (10, 20 e 50 μ M), Reynolds e Racz (1987), perceberam aumento nas concentrações de glicina. Corroborando com esses resultados, Hirayama, Inouye e Fujisaki (1985), avaliaram a concentração de glicina no cerebelo, córtex cerebral e medula espinhal de camundongos expostos por 20 dias a dose de 5mg de MeHg /kg/dia. As concentrações de glicina estavam elevadas no cerebelo de animais atáxicos e na fração sinaptosomal da medula em animais não atáxicos.

Além da ação inibitória junto ao LTP pode ser desempenhada pelo neurotransmissor GABA e, mais recentemente descoberto, também pela glicina. Em fatias de hipocampo de ratos jovens e adultos foi percebida a ação inibitória da glicina, modulando o LTP, semelhantemente à ação desempenhada por GABA (ZHANG et al., 2008a).

O prejuízo na sinalização GABAérgica pode afetar memória e neuroplasticidade, com ações no processo de neurogênese a partir de células tronco neurais (NSC). Células-tronco neurais positivas para Hes5, produzem progenitores intermediários que dão origem a neuroblastos, os quais cessam o ciclo celular antes de diferenciarem-se em neurônios granulares. A inibição genética e/ou farmacológica dos receptores GABAB aumenta a proliferação de células-tronco Hes-5 positivas. Os dados presentes na literatura apontam para um papel inibitório dos receptores GABAB sobre a neurogênese em adultos, promovendo quiescência de células-tronco neurais presentes no GD, através de mecanismos independentes de canais iônicos (GIACHINO et al., 2014). Já os receptores GABAA, estão presentes em células-tronco

neurais quiescentes semelhantes a glia radial, (do inglês, radial glia-like quiescent neural stem cells ou RGLs), presentes no GD de adultos, atuando mediadores em situação de estresse e/ou traumáticas, além de respostas tônicas ao GABA. (ARDI et al, 2019; SONG et al., 2012).

O aumento das concentrações de GABA e glicina encontrados nos camundongos desafiados por MeHg, sugerem regulação inibitória do LTP. Porém, não foi identificado déficit cognitivo após avaliação de memória de trabalho, espacial ou de aprendizado. Sugerindo que, apesar de potencialmente nocivas, no momento não foram capazes de induzir alterações no comportamento de memória dos animais. Os déficits de exploração/locomoção espontânea encontrados em nosso estudo estão mais relacionados com a função cerebelar que a função no hipocampo. Porém, não podemos descartar que mais tempo de exposição ao MeHg (que testado nesse estudo) possa levar a alterações significativas nos testes de memória.

Muitos estudos se detiveram na avaliação do impacto cognitivo e motor induzido pelo MeHg (GRANDJEAN et al., 2014). Essa observação teve início com os casos de desordens motoras e doenças neurodegenerativas induzidos pela Doença de Minamata, o primeiro grande caso de intoxicação por MeHg amplamente estudado (O'MALLEY, 2017).

As alterações motoras por intoxicação do MeHg foram identificadas no estudo de Christinal-Sumathi et al. (2013a), com redução da quantidade de células de Purkinje e reduzida quantidade de DNA no cerebelo, sugerindo redução na quantidade de células.

Com o desafio via i.p., os animais desafiados por MeHg apresentam prejuízo na memória de trabalho - labirinto em Y - e de coordenação motora – Rota Rod - (1mg/kg/dia de MeHg por sete dias a ratos, 150 g) (ZAHIR et al., 2006), também foi observado prejuízo em teste de memória espacial e aprendizado - labirinto de Morris - e no teste de reconhecimento de novos objetos (5µg/kg/dia de dimetilmercúrio por 36 dias em ratos, com seis semanas de idade) (KIM et al., 2019).

Nos estudos com administração oral de MeHg (5mg/kg/dia de MeHg via gavagem por 21 dias em ratos, com 8-10 semanas de vida) os animais intoxicados apresentaram déficits na locomoção - teste de campo aberto; memória de trabalho – labirinto radial de 8 braços (CHRISTINAL; SUMATHI, 2013a), memória espacial e aprendizado – labirinto de Morris - e teste de reconhecimento de novos objetos (KRISHNA CHANDRAN et al., 2019). Os autores também verificaram redução da

quantidade de células de Purkinje e reduzido volume de DNA no cerebelo. Indicando redução na quantidade de células. Semelhantemente, encontramos níveis elevados de peroxidação lipídica, associada com redução das concentrações de IL-4, o que pode significar uma resposta inflamatória aguçada no hipocampo, requerendo de confirmação a nível cerebelar.

No estudo de Kendricks et al., (2020a), utilizando ratos com 21 dias de vida intoxicados com doses de 0,5 e 5,0mg/L de MeHg por 39 dias, esses autores observaram déficits na memória de curto prazo à medida que a dose de MeHg aumentou. Os pesquisadores administraram d-anfetamina, agonista dopaminérgico, a fim de verificar a influência desse sistema na redução da memória de curto prazo, e perceberam melhora nos animais que receberam de forma concomitante d-anfetamina e MeHg via oral, sugerindo envolvimento da via dopaminérgica no processo cognitivo dos animais após intoxicação por MeHg (KENDRICKS et al., 2020; KENDRICKS; BOOMHOWER; NEWLAND, 2020). Em nosso trabalho não foram verificadas alterações da atividade da AChE no hipocampo, uma enzima envolvida no catabolismo da acetilcolina.

Em nosso trabalho, a intoxicação por MeHg em baixas doses em camundongos adultos causou inflamação sistêmica e endotoxemia, com aumento dos níveis de MPO circulantes. A liberação de MPO derivada de neutrófilos pode aumentar a permeabilidade da BHE (ÜLLEN et al., 2013) e causar ativação da microglia. A microglia ativada pode liberar MPO no hipocampo, aumentando o processo neuroinflamatório.

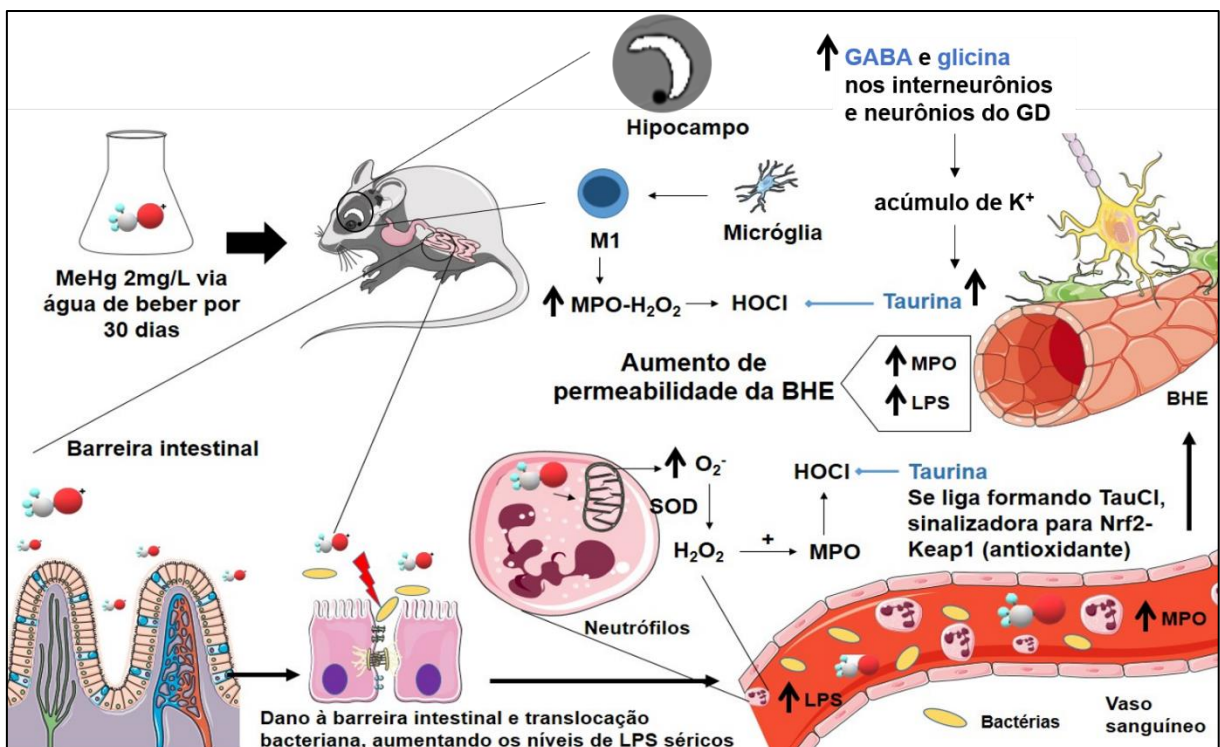
Especulamos que a redução das concentrações de taurina endógena no hipocampo dos animais desafiados, tenha sido por seu envolvimento em reações antioxidantes e atividade neuroprotetora, como resposta compensatória às elevações de MPO. O composto formado, após reação com o HOCL, de taurina cloroamina (TauCl), pode não ter sido detectado pelo HPLC, explicando a redução de taurina endógena.

Recentemente, Wang et al., (2021), mostraram que a administração periférica de taurina pode diminuir a atividade inflamatória de microglia e evitar morte neuronal no hipocampo. Além disso, a redução das concentrações de taurina nos neurônios hipocampais in vitro pode se relacionar com o aumento do processo inflamatório e maior dano celular, bem como a alteração do metabolismo do Ca²⁺ na fenda sináptica pela regulação de quinases e fosfatases (LAMBERT, 2004; EL

IDRISSI, 2008a). Dessa forma, a liberação de taurina por neurônios e por astrócitos, que também podem liberar taurina (SARANSAARI; OJA, 2008) poderia ter um efeito neuroprotetor no hipocampo na intoxicação induzida pelo MeHg em nosso modelo. Mais experimentos são necessários para confirmar essa hipótese. Esse efeito neuroprotetor pode ter resguardado a memória dos animais, após intoxicação pelo MeHg, já que os animais desafiados do nosso estudo não exibiram déficits cognitivos detectáveis pelo teste de Barnes.

Em suma, este estudo sugere que a intoxicação por MeHg em baixas doses em camundongos adultos tem efeito pró-obesogênico e dislipidêmico, além de induzir inflamação sistêmica com endotoxemia de possível origem intestinal, e alteração da microbiota intestinal (disbiose). Ainda, a intoxicação de MeHg induziu reduzida transcrição de IL-4 e alterações nas concentrações de GABA, glicina e taurina, neurotransmissores relacionados ao controle do potencial inibitórios. Não foram identificadas alterações de memória nos testes comportamentais utilizados. Esse achado pode ser explicado parcialmente pela possível ação neuroprotetora da taurina endógena no hipocampo (**Figura 24**).

Figura 24 - Proposta da ação neuroprotetora da taurina na inflamação mediada pela MPO após intoxicação por MeHg em baixas doses.



Fonte: Autoria própria

De que forma as alterações dos níveis de neurotransmissores inibitórios no hipocampo afetam o comportamento de locomoção espontânea ainda precisa ser melhor entendido. Além disso, como esses efeitos de longo prazo podem determinar o aparecimento precoce de doenças neurodegenerativas precisa de maior investigação. Esse estudo apresenta algumas limitações, incluindo a análise mais detalhada da sinalização neurotransmissora no hipocampo e expressão de receptores, além da investigação morfológicas de células imunoinflamatórias e vias de sinalização imunoprotetoras, como da IL-4. Contudo, esse estudo é o primeiro que aborda o efeito sistêmico e neurotóxico do MeHg em baixas doses em camundongos adultos (ver mapa geral de resultados em Apêndice A).

Estudos da neurogênese do adulto, barreira hematoencefálica e ainda possível desafio com LPS deverão ser investigados, juntamente com o sugerido mecanismo neuroprotetor de taurina no hipocampo, após a intoxicação crônica em baixa doses de MeHg em camundongos adultos. Esses estudos podem ter um papel significativo na compreensão do impacto de longo prazo da intoxicação mercurial em populações ribeirinhas, expostas cronicamente a esse organometal, e dessa forma contribuir para políticas de saúde pública, com planejamento de medidas preventivas e de novas estratégias de tratamento.

O presente estudo apresenta limitações em relação aos métodos experimentais da análise de aminoácidos no hipocampo. A realização de eutanásia sem sedativo não é indicada pela Comitê de Ética para Uso Animal. Todos os grupos passaram pelo mesmo procedimento. É possível que mesmo em quantidade pequena a injeção com anestésicos tenha causado alterações nos níveis de aminoácidos hipocampais *in vivo*, quando comparado aos valores em homeostasia.

7 CONCLUSÃO

- A intoxicação mercurial com 2mg de MeHg/L de água de beber por 30 dias induziu aumento do ganho de peso nos animais experimentais.
- A intoxicação mercurial induziu efeito dislipidêmico nos animais, aumentando as concentrações sérica de triacilgliceróis e colesterol total.
- A intoxicação mercurial induziu endotoxemia e inflamação sistêmica nos animais.
- A intoxicação mercurial induziu peroxidação lipídica e aumento dos níveis de mieloperoxidase no hipocampo, sugerindo dano celular e ativação microglial.
- A intoxicação mercurial induziu aumento dos aminoácidos GABA e glicina no hipocampo, sugerindo distúrbio da neurotransmissão inibitória.
- A intoxicação mercurial reduziu os níveis do aminoácido taurina no hipocampo.
- Houve prejuízo locomotor dos animais intoxicados, com diminuição da distância total percorrida, velocidade média e exploração vertical no teste de campo aberto.
- A intoxicação mercurial não alterou os escores de memória de trabalho, memória espacial e de aprendizado no teste de Barnes.

REFERÊNCIAS

AALTO, S. et al. Frontal and temporal dopamine release during working memory and attention tasks in healthy humans: A positron emission tomography study using the high-affinity dopamine D2 receptor ligand [11C]FLB 457. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 10, p. 2471–2477, 9 mar. 2005. Disponível em: <http://www.mrc-cbu.cam.ac.uk/Imaging/>. Acesso em: 8 fev. 2021.

ABUHASAN, Q.; REDDY, V.; SIDDIQUI, W. **Neuroanatomy, Amygdala**. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020.

AGÊNCIA CÂMARA DE NOTÍCIAS. **Audiência analisa ações para mitigar impactos do desastre de Mariana**. 2017. Disponível em: <https://www.camara.leg.br/noticias/527825-audiencia-analisa-acoes-para-mitigar-impactos-do-desastre-de-mariana/>.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. 2020. Disponível em: www.painel2.ana.gov.br/viewer/dashboard?dashboardguid=839b2670-0408-4e58-b1b8-b120edfa97b2&v=637180956747532472&style=Warm. Acesso em: 23 fev. 2020.

AGRAWAL, S.; BHATNAGAR, P.; FLORA, S. J. S. Changes in tissue oxidative stress, brain biogenic amines and acetylcholinesterase following co-exposure to lead, arsenic and mercury in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 86, p. 208–216, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.10.013>.

AHNERT-HILGER, G.; JAHN, R. CLC-3 splices up GABAergic synaptic vesicles. **Nature Neuroscience**, v. 14, n. 4, p. 405–407, 2011.

ALBRECHT, J.; SCHOUSBOE, A. Taurine interaction with neurotransmitter receptors in the CNS: An update. **Neurochemical Research**, dez. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16362781/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

ALLEN, J. W. et al. The consequences of methylmercury exposure on interactive functions between astrocytes and neurons. **NeuroToxicology**, v. 23, n. 6, p. 755–759, 2002a.

ALLEN, J. W. et al. The consequences of methylmercury exposure on interactive functions between astrocytes and neurons. **Neurotoxicology**, v. 23, n. 6, p. 755–9, dez. 2002b. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12520765>. Acesso em: 7 mar. 2020.

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, 9 mar. 2001. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899301019886>. Acesso em: 5 out. 2017.

ALMEIDA, I. M. de; JACKSON FILHO, J. M.; VILELA, R. A. de G. Reasons for

investigating the organizational dynamics of the Vale tailings dam disaster in Brumadinho, Minas Gerais State, Brazil. **Cadernos de saude publica**, v. 35, n. 4, 2 maio 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31066772>. Acesso em: 7 mar. 2020.

ALMEIDA LOPES, A. C. B. et al. Association of lead, cadmium and mercury with paraoxonase 1 activity and malondialdehyde in a general population in Southern Brazil. **Environmental Research**, v. 156, p. 674–682, 2017.

AMAP/UN Environment, 2019. **Technical Background Report for the Global Mercury Assessment 2018**. Arctic Monitoring and Assessment Programme, Oslo, Norway/UN Environment Programme, Chemicals and Health Branch, Geneva, Switzerland. 2019. Disponível em: <https://web.unep.org/globalmercurypartnership/technical-background-report-global-mercury-assessment-2018>.

AMARAL, D. G.; WITTER, M. P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. **Neuroscience**, v. 31, n. 3, p. 571–591, 1989. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2687721/>. Acesso em: 12 jan. 2021.

AMARAL, D.; LAVENEX, P. Hippocampal neuroanatomy. In: ANDERSEN, P. et al. (Ed.). **The Hippocampus book**. Nova York: Oxford University Press, 2007. p. 37–114.

ANDERSEN, H. R.; ANDERSEN, O. Effects of Dietary α -Tocopherol and β -Carotene on Lipid Peroxidation Induced by Methyl Mercuric Chloride in Mice. **Pharmacology & Toxicology**, v. 73, n. 4, p. 192–201, 1 out. 1993. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0773.1993.tb01563.x>. Acesso em: 3 nov. 2017.

ANDERSEN, P. et al. **The Hippocampus Book**. New York: Oxford University Press, 2007.

ARDI et al. The role of the GABAA receptor Alpha 1 subunit in the ventral hippocampus in stress resilience. **Sci Rep**. v. 9, n. 1, 2019.

ARNAIZ, G. R. de L.; ORDIERES, M. G. L. Brain Na⁺, K⁺-ATPase activity in aging and disease. **International Journal of Biomedical Science**. Master Publishing Group, 15 jun. 2014. Disponível em: www.ijbs.org. Acesso em: 26 nov. 2020.

ARNHOLD, J.; FLEMMIG, J. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, ago. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20399194/>. Acesso em: 26 nov. 2020.

ARNSTEN, A. F. T.; WANG, M.; PASPALAS, C. D. Dopamine's actions in primate prefrontal cortex: Challenges for treating cognitive disorders. **Pharmacological Reviews**, v. 67, n. 3, p. 681–696, 1 jul. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26106146/>. Acesso em: 28 jan. 2021.

ARRIFANO, G. P. F. et al. Genetic susceptibility to neurodegeneration in Amazon: Apolipoprotein e genotyping in vulnerable populations exposed to mercury. **Frontiers**

in **Genetics**, v. 9, 2018a.

ARRIFANO, G. P. F. et al. Large-scale projects in the amazon and human exposure to mercury: The case-study of the Tucuruí Dam. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p. 299–305, 1 jan. 2018b.

ASCHNER, M. et al. 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. et al. Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. **Neurochemistry International**, v. 37, n. 2–3, p. 199–206, 2000a.

ASCHNER, M. et al. Methylmercury alters glutamate transport in astrocytes. **Neurochemistry International**, Pergamon, , 1 ago. 2000b. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197018600000231>. Acesso em: 5 out. 2017.

ASLANKOC, R. et al. Hippocampus and cerebellum damage in sepsis induced by lipopolysaccharide in aged rats - Pregabalin can prevent damage. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 108, p. 1384–1392, 1 dez. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30372841/>. Acesso em: 2 fev. 2021.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. Landes Bioscience, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24999379/>. Acesso em: 20 nov. 2020.

BAEZ, M. V. et al. NMDA Receptor Subunits in the Adult Rat Hippocampus Undergo Similar Changes after 5 Minutes in an Open Field and after LTP Induction. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 1 fev. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23383317/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

BAEZ, M. V.; CERCATO, M. C.; JERUSALINSKY, D. A. NMDA receptor subunits change after synaptic plasticity induction and learning and memory acquisition. **Neural Plasticity**, Hindawi Limited, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29706992/>. Acesso em: 12 jan. 2021.

BAKIR, F. et al. Methylmercury poisoning in Iraq. **Science**, 1973. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4719063/>. Acesso em: 2 maio. 2021.

BANKS, W. A. et al. Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: Roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, n. 1, 25 nov. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26608623/>. Acesso em: 20 nov. 2020.

BARROS, L. L. S. **Efeitos da intoxicação mercurial no hipocampo e parâmetros lipídicos de camundongos submetidos à dieta ocidental**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

BEAR M. F.; CONNORS B. W.; PARADISO M. A. **Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso**. 3 ed. Artmed Editora, 2016.

BENEFICE, E.; LUNA-MONRROY, S.; LOPEZ-RODRIGUEZ, R. Fishing activity, health characteristics and mercury exposure of Amerindian women living alongside the Beni River (Amazonian Bolivia). **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 213, n. 6, p. 458–464, 1 nov. 2010.

BENKE, T. A. et al. Modulation of ampa receptor unitary conductance by synaptic activity. **Nature**, v. 393, n. 6687, p. 793–797, 25 jun. 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9655394/>. Acesso em: 28 jan. 2021.

BERGSTROM, K. S. B. et al. Muc2 protects against lethal infectious colitis by disassociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 5, maio 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20485566/>. Acesso em: 7 set. 2020.

BERZAS NEVADO, J. J. et al. Mercury in the Tapajós River basin, Brazilian Amazon: a review. **Environment international**, v. 36, n. 6, p. 593–608, ago. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20483161>. Acesso em: 7 mar. 2020.

BHAT, M. et al. Impact of Immunosuppression on the Metagenomic Composition of the Intestinal Microbiome: A Systems Biology Approach to Post-Transplant Diabetes. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

BHATIA, A.; SAADABADI, A. Biochemistry, Dopamine Receptors. **StatPearls Publishing**, 2019.

BITTENCOURT, L. O. et al. Proteomic approach underlying the hippocampal neurodegeneration caused by low doses of methylmercury after long-term exposure in adult rats. **Metallomics**, v. 11, n. 2, p. 390–403, 1 fev. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30525157/>. Acesso em: 1 fev. 2021.

BLAKELY, R. D.; EDWARDS, R. H. Vesicular and plasma membrane transporters for neurotransmitters. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 2, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22199021/>. Acesso em: 28 jan. 2021.

BLOODGOOD, B. L.; SABATINI, B. L. Nonlinear Regulation of Unitary Synaptic Signals by CaV2.3 Voltage-Sensitive Calcium Channels Located in Dendritic Spines. **Neuron**, v. 53, n. 2, p. 249–260, 18 jan. 2007.

BOCCARDI, V. et al. Differential associations of IL-4 with hippocampal subfields in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 11, n. JAN, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30705627/>. Acesso em: 2 fev. 2021.

BOUBY, N. et al. Effect of water intake on the progression of chronic renal failure in the 5/6 nephrectomized rat. **American Journal of Physiology - Renal Fluid and Electrolyte Physiology**, v. 258, n. 4 27-4, 1990. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2184677/>. Acesso em: 1 fev. 2021.

BROADHURST, P. L. DETERMINANTS OF EMOTIONALITY IN RAT: I. SITUATIONAL FACTORS. **British Journal of Psychology**, v. 48, n. 1, p. 1–12, 1957. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13413179/>. Acesso em: 27 jan. 2021.

BROSNAN, J. T.; BROSNAN, M. E. Glutamate: A truly functional amino acid. **Amino Acids**, v. 45, n. 3, p. 413–418, 18 set. 2013.

BROWN, G. C. Nitric oxide and neuronal death. **Nitric Oxide**, 1 nov. 2010. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S108986031000368X>. Acesso em: 5 out. 2017.

BUCHANAN, K. A. et al. Facilitation of Long-Term Potentiation by Muscarinic M1 Receptors Is Mediated by Inhibition of SK Channels. **Neuron**, v. 68, n. 5, p. 948–963, 9 dez. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21145007/>. Acesso em: 8 jan. 2021.

BURGER CHAKRABORTY, L. et al. Anthropogenic mercury flows in India and impacts of emission controls. **Environmental science & technology**, v. 47, n. 15, p. 8105–13, 6 ago. 2013. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es401006k>. Acesso em: 5 out. 2017.

CAI, L.; GIBBS, R. B.; JOHNSON, D. A. Recognition of novel objects and their location in rats with selective cholinergic lesion of the medial septum. **Neuroscience Letters**, v. 506, n. 2, p. 261–265, 11 jan. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22119001/>. Acesso em: 8 jan. 2021.

CAPORALE, N.; DAN, Y. Spike timing-dependent plasticity: A Hebbian learning rule. *Annual Review of Neuroscience*. **Annu Rev Neurosci**, , 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18275283/>. Acesso em: 28 jan. 2021.

CARLSSON, A. et al. Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: New evidence. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11264457/>. Acesso em: 28 jan. 2021.

CARROLL, R. C. et al. Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*. **Nat Rev Neurosci**, maio 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11331915/>. Acesso em: 28 jan. 2021.

CARVALHO, K. M. M. B. et al. The natural flavonoid quercetin ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 9, p. 1534–1539, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20823570/>. Acesso em: 27 jan. 2021.

CAVALLARO, S. et al. Memory-specific temporal profiles of gene expression in the hippocampus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 25, p. 16279–16284, 10 dez. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12461180/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

CHEN, H. et al. Tacrine(10)-Hupyrindone Prevents Post-operative Cognitive Dysfunction via the Activation of BDNF Pathway and the Inhibition of AChE in Aged Mice. **Front Cell Neurosci**, v.12, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6243707/>. Acesso em: 26 nov. 2020.

CHÉTELAT, J. et al. Spatial variation of mercury bioaccumulation in bats of Canada linked to atmospheric mercury deposition. **The Science of the total environment**, v. 626, p. 668–677, 1 jun. 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29396333>. Acesso em: 7 mar. 2020.

CHEVALEYRE, V.; SIEGELBAUM, S. A. Strong CA2 pyramidal neuron synapses define a powerful disynaptic cortico-hippocampal loop. **Neuron**, v. 66, n. 4, p. 560–572, maio 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20510860/>. Acesso em: 12 jan. 2021.

CHO, Y. M. Fish consumption, mercury exposure, and the risk of cholesterol profiles: findings from the Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2010-2011. **Environmental Health and Toxicology**, v. 32, p. e2017014, 31 ago. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28859472/>. Acesso em: 23 nov. 2020.

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, out. 2013a. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23872736>. Acesso em: 7 mar. 2020.

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. 2013b. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12011-013-9756-y>. Acesso em: 25 jun. 2018.

CHROBAK, J. J.; LRINCZ, A.; BUZSÁKI, G. Physiological patterns in the hippocamp-entorhinal cortex system. **Hippocampus**, v. 10, n. 4, p. 457–465, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10985285/>. Acesso em: 8 jan. 2021.

CIRILLO, R. et al. Ketohekinase-dependent metabolism of fructose Induces proinflammatory mediators in proximal tubular cells. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, n. 3, p. 545–553, mar. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19158351/>. Acesso em: 1 fev. 2021.

CORBETT, C. E. P. et al. Health evaluation of gold miners living in a mercury-contaminated village in serra pelada, pará, Brazil. **Archives of Environmental and Occupational Health**, v. 62, n. 3, p. 121–128, 2007. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3200/AEOH.62.3.121-128>. Acesso em: 2 maio. 2021.

COSTA JUNIOR, J. M. F. et al. Teores de mercúrio em cabelo e consumo de pescado de comunidades ribeirinhas na Amazônia brasileira, região do Tapajós. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 23, n. 3, p. 805–812, 1 mar. 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29538561>. Acesso em: 7 mar. 2020.

CRAGG, S. J.; RICE, M. E. DANCING past the DAT at a DA synapse. **Trends in Neurosciences**, v. 27, n. 5, p. 270-277, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15111009/>. Acesso em: 28 jan. 2021.

CRUZAT, V. et al. Glutamine: Metabolism and immune function, supplementation and clinical translation. **Nutrients MDPI AG**, 1 nov. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30360490/>.

DA CUNHA, L. R.; DA COSTA, T. H. M. E.; CALDAS, E. D. Mercury concentration in breast milk and infant exposure assessment during the first 90 days of lactation in a Midwestern region of Brazil. **Biological Trace Element Research**, v. 151, n. 1, p. 30-37, jan. 2013.

DAN, Y.; POO, M. M. Spike timing-dependent plasticity: From synapse to perception *Physiological Reviews*, **Physiol Rev**, v. 86, n. 3, p. 1033-48, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16816145/>. Acesso em: 28 jan. 2021.

DAUGHERTY, A. M. et al. Age differences in hippocampal subfield volumes from childhood to late adulthood. **Hippocampus**, v. 26, n. 2, p. 220-228, 1 fev. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26286891/>. Acesso em: 12 jan. 2021.

DAVE, V. et al. Astrocytes as mediators of methylmercury neurotoxicity: effects on D-aspartate and serotonin uptake. **Developmental neuroscience**, v. 16, n. 3-4, p. 222-31, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7705225>. Acesso em: 20 jun. 2018.

DAVIES, C. H.; COLLINGRIDGE, G. L. The physiological regulation of synaptic inhibition by GABAB autoreceptors in rat hippocampus. **The Journal of Physiology**, v. 472, n. 1, p. 245-265, 1 dez. 1993. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.1993.sp019945>. Acesso em: 28 jan. 2021.

DAVIES, C. H.; DAVIES, S. N.; COLLINGRIDGE, G. L. Paired-pulse depression of monosynaptic GABA-mediated inhibitory postsynaptic responses in rat hippocampus. **The Journal of Physiology**, v. 424, n. 1, p. 513-531, 1 maio 1990. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.1990.sp018080>. Acesso em: 28 jan. 2021.

DAVILA, R. B. et al. Heavy metals in iron ore tailings and floodplain soils affected by the Samarco dam collapse in Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 709, 20 mar. 2020.

DE LACERDA, L. D.; et al. Mercury distribution in fish commercialized at the Mucuripe market, Fortaleza, Ceará state, Brazil. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 49, n. 1, p. 50-54, 2016.

DERECKI, N. C.; QUINNIES, K. M.; KIPNIS, J. Alternatively activated myeloid (M2) cells enhance cognitive function in immune compromised mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 3, p. 379-385, mar. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21093578/>. Acesso em: 3 fev. 2021.

DINAMARCA, M. C.; RÍOS, J. A.; INESTROSA, N. C. Postsynaptic receptors for

amyloid- β oligomers as mediators of neuronal damage in Alzheimer's disease *Frontiers in Physiology*. **Front Physiol**, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23267328/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

DINGLELINE, R. et al. The glutamate receptor ion channels. **Pharmacol Rev**, v. 51, n. 1, p. 7–61, mar. 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10049997/>. Acesso em: 28 jan. 2021.

DOLBEC, J. et al. Methylmercury exposure affects motor performance of a riverine population of the Tapajos river, Brazilian Amazon. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 73, n. 3, p. 195–203, 2000. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s004200050027>. Acesso em: 2 maio. 2021.

DONG, T. et al. Role of the renin-angiotensin system, renal sympathetic nerve system, and oxidative stress in chronic foot shock-induced hypertension in rats. **International Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 6, p. 652–663, 26 abr. 2015.

DONGAONKAR, B. et al. Effects of psychosocial stress on episodic memory updating. **Psychopharmacology**, v. 226, n. 4, p. 769–779, abr. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23404063/>. Acesso em: 8 jan. 2021.

EAGLE, D. M. et al. Effects of regional striatal lesions on motor, motivational, and executive aspects of progressive-ratio performance in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 113, n. 4, p. 718–731, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10495080/>. Acesso em: 8 fev. 2021.

EHRENFELD, P. et al. Kinin B 1 receptor activation turns on exocytosis of matrix metalloprotease-9 and myeloperoxidase in human neutrophils: involvement of mitogen-activated protein kinase family. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, n. 5, p. 1179–1189, nov. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19641039/>. Acesso em: 26 nov. 2020.

EL IDRISSE, A. Taurine increases mitochondrial buffering of calcium: Role in neuroprotection. **Amino Acids**, v. 34, n. 2, p. 321–328, fev. 2008a. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16955229/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

EL IDRISSE, A. Taurine improves learning and retention in aged mice. **Neuroscience Letters**, v. 436, n. 1, p. 19–22, 2 maio 2008b. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18375059/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

ELIAS, G. M.; NICOLL, R. A. Synaptic trafficking of glutamate receptors by MAGUK scaffolding proteins *Trends in Cell Biology*. **Trends Cell Biol**, , jul. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17644382/>. Acesso em: 28 jan. 2021.

ELLINGSEN, D. G. et al. Effects of low mercury vapour exposure on the thyroid function in chloralkali workers. **Journal of Applied Toxicology**, v. 20, n. 6, p. 483–489, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11180271/>. Acesso em: 26 nov. 2020.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, 1961. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13726518/>. Acesso em: 27 jan. 2021.

ENGELHARDT, B.; RANSOHOFF, R. M. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: Anatomical sites and molecular mechanisms *Trends in Immunology*. **Elsevier Current Trends**, , 1 set. 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471490605001833>. Acesso em: 5 out. 2017.

ENGIN, E. et al. Tonic Inhibitory control of dentate gyrus granule cells by α 5-containing GABAA receptors reduces memory interference. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 40, p. 13698–13712, 7 out. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26446222/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

ENGIN, E. et al. Modulation of anxiety and fear via distinct intrahippocampal circuits. **eLife**, v. 5, 14 mar. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26971710/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

ERDAMAR, H. et al. The effect of taurine on polymorphonuclear leukocyte functions in endotoxemia. **Amino Acids**, v. 33, n. 4, p. 581–585, nov. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17520328/>. Acesso em: 12 fev. 2021.

ERIKSSON, J. et al. Neurocognitive Architecture of Working Memory. **Neuron**, v. 88, n. 1, p. 33-46, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26447571/>. Acesso em: 27 jan. 2021.

ERRIDGE, C. Diet, commensals and the intestine as sources of pathogen-associated molecular patterns in atherosclerosis, type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease. **Atherosclerosis**, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21439567/>. Acesso em: 26 nov. 2020.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, n. C, p. 407–421, 1 jan. 1990.

ETO, K.; MARUMOTO, M.; TAKEYA, M. The pathology of methylmercury poisoning (Minamata disease). **Neuropathology**, v. 30, n. 5, p. no-no, 1 jun. 2010. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1789.2010.01119.x> Acesso em: 2 maio. 2021.

FAN, M. et al. GABAA receptor alpha 2 but not alpha 1 subunit knock down in dentate gyrus reduces inhibition activity and improves learning abilities of rats. **J Mol Neurosc**, v. 51, n. S1, p. 36, 2013.

FARINA, M. et al. 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, 10 out. 2011. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320511002657>. Acesso em: 14 mar. 2018.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). NFR-Notice of Final Rule (74FR38686). **Dental Devices: Classification of Dental Amalgam, Reclassification of Dental Mercury, Designation of Special Controls for Dental Amalgam, Mercury, and Amalgam Alloy; Final Rule.** Agosto 2009. Disponível em: <https://www.regulations.gov/document/FDA-2008-N-0163-0250>.

FEITOSA-SANTANA, C. et al. Color vision impairment with low-level methylmercury exposure of an Amazonian population – Brazil. **NeuroToxicology**, v. 66, p. 179–184, 1 maio 2018.

FELD, G. B.; BORN, J. Neurochemical mechanisms for memory processing during sleep: basic findings in humans and neuropsychiatric implications *Neuropsychopharmacology*. **Springer Nature**, 1 jan. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31443105/>. Acesso em: 12 jan. 2021.

FILLION, M. et al. Quality of life and health perceptions among fish-eating communities of the Brazilian amazon: An ecosystem approach to well-being. **EcoHealth**, v. 6, n. 1, p. 121–134, mar. 2009.

FILLION, M. et al. Neurotoxic sequelae of mercury exposure: An intervention and follow-up study in the Brazilian Amazon. **EcoHealth**, v. 8, n. 2, p. 210–222, jun. 2011a.

FILLION, M. et al. Visual acuity in fish consumers of the Brazilian Amazon: Risks and benefits from local diet. **Public Health Nutrition**, v. 14, n. 12, p. 2236–2244, dez. 2011b.

FILLION, M. et al. Toxic risks and nutritional benefits of traditional diet on near visual contrast sensitivity and color vision in the Brazilian Amazon. **NeuroToxicology**, v. 37, p. 173–181, 2013.

FONFRÍA, E.; RODRÍGUEZ-FARRÉ, E.; SUÑOL. Mercury interaction with the GABAA receptor modulates the benzodiazepine binding site in primary cultures of mouse cerebellar granule cells. **Neuropharmacology**, v. 41, n. 7, p. 819–833, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11684146/>. Acesso em: 21 jan. 2021.

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. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.013>.

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, 15 ago. 2009b. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584909002962>. Acesso em: 5 out. 2017.

FRANK, M. J.; O'REILLY, R. C. A mechanistic account of striatal dopamine function in human cognition: Psychopharmacological studies with cabergoline and haloperidol. **Behavioral Neuroscience**, v. 120, n. 3, p. 497–517, jun. 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16768602/>. Acesso em: 8 fev. 2021.

FUJIMURA, M.; USUKI, F. In situ different antioxidative systems contribute to the site-specific methylmercury neurotoxicity in mice. **Toxicology**, v. 392, p. 55–63, 1 dez. 2017. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X17303074>. Acesso em: 24 jun. 2018.

GAKIDOU, E. et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet**, v. 390, n. 10100, p. 1345–1422, set. 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673617323668>. Acesso em: 27 out. 2018.

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, fev. 2006. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165572805004121>. Acesso em: 5 out. 2017.

GHAFAARI, M. et al. Formation of GABAA receptor complexes containing $\alpha 1$ and $\alpha 5$ subunits is paralleling a multiple T-maze learning task in mice. **Brain Structure and Function**, v. 222, n. 1, p. 549–561, 1 jan. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27155990/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

GIACHINO, C. et al. GABA suppresses neurogenesis in the adult hippocampus through GABAB receptors. **Development (Cambridge)**, v. 141, n. 1, p. 83–90, 1 jan. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24284211/>. Acesso em: 8 fev. 2021.

GLYKYS, J.; MANN, E. O.; MODY, I. Which GABAA receptor subunits are necessary for tonic inhibition in the hippocampus? **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 6, p. 1421–1426, 6 fev. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18256262/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

GOENKA, S.; KAPLAN, M. H. Transcriptional regulation by STAT6. **Immunologic Research**, maio 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21442426/>. Acesso em: 4 fev. 2021.

GOMEZA, J. et al. Deletion of the mouse glycine transporter 2 results in a hyperekplexia phenotype and postnatal lethality. **Neuron**, v. 40, n. 4, p. 797–806, 13 nov. 2003a. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14622583/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

GOMEZA, J. et al. Inactivation of the glycine transporter 1 gene discloses vital role of glial glycine uptake in glycinergic inhibition. **Neuron**, v. 40, n. 4, p. 785–796, 13 nov. 2003b. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14622582/>. Acesso em: 13

jan. 2021.

GRANDJEAN, P. et al. Neurotoxicity from prenatal and postnatal exposure to methylmercury. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 43, p. 39–44, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24681285/>. Acesso em: 1 fev. 2021.

GU, Z. et al. Hippocampus and Entorhinal Cortex Recruit Cholinergic and NMDA Receptors Separately to Generate Hippocampal Theta Oscillations. **Cell Reports**, v. 21, n. 12, p. 3585–3595, 19 dez. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29262336/>. Acesso em: 8 fev. 2021.

GU, Z.; YAKEL, J. L. Timing-Dependent Septal Cholinergic Induction of Dynamic Hippocampal Synaptic Plasticity. **Neuron**, v. 71, n. 1, p. 155–165, 14 jul. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21745645/>. Acesso em: 8 jan. 2021.

HAAM, J.; YAKEL, J. L. Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. **Journal of Neurochemistry**, 1 ago. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28791706/>. Acesso em: 8 jan. 2021.

HAN, J. et al. Hydrogen sulfide may attenuate methylmercury-induced neurotoxicity via mitochondrial preservation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 263, p. 66–73, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.12.020>.

HANGYA, B. et al. Central Cholinergic Neurons Are Rapidly Recruited by Reinforcement Feedback. **Cell**, v. 162, n. 5, p. 1155–1168, 27 ago. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26317475/>. Acesso em: 8 jan. 2021.

HARADA, M. Minamata disease as a social and medical problem. **Japan Quarterly**, v. 25, n. 1, p. 20, 1978. Disponível em: <https://search.proquest.com/openview/66b1d75a30c164c0e8796a3d792e613f/1?pq-origsite=gscholar&cbl=1821452>. Acesso em: 2 maio. 2021.

HARADA, M. Minamata Disease. In: **Adverse Effects of Foods**. Boston, MA: Springer US, 1982. p. 135–148.

HARADA, M. Minamata Disease: Methylmercury Poisoning in Japan Caused by Environmental Pollution. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 1–24, 25 jan 1995. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10408449509089885>. Acesso em: 5 out. 2017.

HARADA, M. et al. Mercury pollution in the Tapajos River basin, Amazon mercury level of head hair and health effects. **Environment International**, v. 27, n. 4, p. 285–290, 1 out. 2001.

HASSELMO, M. E.; MCGAUGHY, J. High acetylcholine levels set circuit dynamics for attention and encoding and low acetylcholine levels set dynamics for consolidation. **Progress in Brain Research**, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14650918/>. Acesso em: 8 jan. 2021.

HERDEN, C. J. et al. Differential effects of methylmercury on γ -aminobutyric acid type A receptor currents in rat cerebellar granule and cerebral cortical neurons in culture. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 324, n. 2, p. 517–528, fev. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17977981/>. Acesso em: 26 nov. 2020.

HIRAYAMA, K.; INOUE, M.; FUJISAKI, T. Alteration of putative amino acid levels and morphological findings in neural tissues of methylmercury-intoxicated mice. **Archives of Toxicology**, v. 57, n. 1, p. 35–40, abr. 1985. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2861802/>. Acesso em: 8 fev. 2021.

HIRONAKA, N. et al. Memory-related acetylcholine efflux from rat prefrontal cortex and hippocampus: A microdialysis study. **Brain Research**, v. 901, n. 1–2, p. 143–150, 18 maio 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11368961/>. Acesso em: 8 fev. 2021.

HIROOKA, T. et al. Expression of VEGF-related proteins in cultured human brain microvascular endothelial cells and pericytes after exposure to methylmercury. **Journal of Toxicological Sciences**, v. 38, n. 6, p. 837–845, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24213003/>. Acesso em: 25 nov. 2020.

HÖRTNAGL, H. et al. Patterns of mRNA and protein expression for 12 GABAA receptor subunits in the mouse brain. **Neuroscience**, v. 236, p. 345–372, 16 abr. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23337532/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

HUDELSON, K. E. et al. Mercury methylation and demethylation potentials in Arctic lake sediments. **Chemosphere**, v. 248, p. 126001, 1 jun. 2020. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32041063>. Acesso em: 7 mar. 2020.

HUH, S. H. et al. Ethyl Pyruvate Rescues Nigrostriatal Dopaminergic Neurons by Regulating Glial Activation in a Mouse Model of Parkinson's Disease. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 2, p. 960–969, 15 jul. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21685323/>. Acesso em: 2 fev. 2021.

HUNTER, D.; RUSSELL, D. S. Focal cerebellar and cerebellar atrophy in a human subject due to organic mercury compounds. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 17, n. 4, p. 235–241, 1 nov. 1954. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC503192/>. Acesso em: 3 maio. 2021.

HUPBACH, A.; GOMEZ, R.; NADEL, L. Episodic memory reconsolidation: Updating or source confusion?. **Memory**, v. 17, n. 5, p. 502–510, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19468955/>. Acesso em: 8 jan. 2021.

INDIANI, C. M. D. S. P. et al. Childhood Obesity and Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Gut Microbiota: A Systematic Review. **Childhood Obesity**, v. 14, n. 8, p. 501–509, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30183336/>.

INOUE, S. et al. Short-term effect of severe exposure to methylmercury on atherosclerotic heart disease and hypertension mortality in Minamata. **Science of the Total Environment**, v. 417–418, p. 291–293, 15 fev. 2012.

IRUKAYAMA K. **Minamata disease. Methylmercury poisoning in Minamata and Niigata, Japan: Case history of Minamata.** 1. ed. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1977. v. 1

ISLAM, M. Z. et al. Methylmercury affects cerebrovascular reactivity to angiotensin II and acetylcholine via Rho-kinase and nitric oxide pathways in mice. **Life Sciences**, v. 147, p. 30–38, 15 fev. 2016.

JACKSON, A. C. Chronic Neurological Disease Due to Methylmercury Poisoning Canadian Journal of Neurological Sciences. **Cambridge University Press**, 1 nov. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30278852/>. Acesso em: 2 maio. 2021.

JIANG, X. et al. Lactobacillus brevis 23017 relieves mercury toxicity in the colon by modulation of oxidative stress and inflammation through the interplay of MAPK and NF- κ B signaling cascades. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30369917/>. Acesso em: 7 set. 2020.

JIMENEZ, C. A. R. et al. Fructokinase activity mediates dehydration-induced renal injury. **Kidney International**, v. 86, n. 2, p. 294–302, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24336030/>. Acesso em: 1 fev. 2021.

JIN, X. et al. Dietary selenium (Se) and Vitamin E (VE) supplementation modulated methylmercury-mediated changes in markers of cardiovascular diseases in rats. **Cardiovascular Toxicology**, v. 12, n. 1, p. 10–24, mar. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21822669/>. Acesso em: 31 jan. 2021.

JONG, C. J.; AZUMA, J.; SCHAFFER, S. Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: Prevention of mitochondrial oxidant production. **Amino Acids**, v. 42, n. 6, p. 2223–2232, jun. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21691752/>. Acesso em: 14 fev. 2021.

JUNIOR, J. M. F. C. et al. Manifestações emocionais e motoras de ribeirinhos expostos ao mercúrio na Amazônia. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 20, n. 2, p. 212–224, 1 abr. 2017. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415790X2017000200212&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 2 maio. 2021.

KASAI, H. et al. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. **Trends in Neurosciences**, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20138375/>. Acesso em: 28 jan. 2021.

KASUGAI, Y. et al. Quantitative localisation of synaptic and extrasynaptic GABAA receptor subunits on hippocampal pyramidal cells by freeze-fracture replica immunolabelling. **European Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 11, p. 1868–1888, dez. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21073549/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

KAUANO, É. E.; SILVA, J. M. C.; MICHALSKI, F. Illegal use of natural resources in

federal protected areas of the Brazilian Amazon. **PeerJ**, v. 5, n. 10, p. e3902, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29038758>. Acesso em: 7 mar. 2020.

KENDRICKS, D. R. et al. Adolescent methylmercury exposure alters short-term remembering, but not sustained attention, in male Long-Evans rats. **NeuroToxicology**, v. 78, p. 186–194, 1 maio 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32199988/>. Acesso em: 1 fev. 2021.

KENDRICKS, D. R.; BOOMHOWER, S. R.; NEWLAND, M. C. Methylmercury, attention, and memory: baseline-dependent effects of adult d-amphetamine and marginal effects of adolescent methylmercury. **NeuroToxicology**, v. 80, p. 130–139, 1 set. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32726658/>. Acesso em: 1 fev. 2021.

KENTROS, C. G. et al. Increased attention to spatial context increases both place field stability and spatial memory. **Neuron**, v. 42, n. 2, p. 283–295, 2004.

KERSHAW, T. G.; DHAHIR, P. H.; CLARKSON, T. W. The relationship between blood levels and dose of methylmercury in man. **Archives of Environmental Health**, v. 35, n. 1, p. 28–36, 1980.

KERTI-SZIGETI, K.; NUSSER, Z. Similar GABAA receptor subunit composition in somatic and axon initial segment synapses of hippocampal pyramidal cells. **eLife**, v. 5, 18 ago. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27537197/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

KHOURY, E. D. T. et al. Somatosensory psychophysical losses in inhabitants of riverside communities of the Tapajós River Basin, Amazon, Brazil: Exposure to methylmercury is possibly involved. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, 1 dez. 2015.

KIM, C. et al. Taurine chloramine induces heme oxygenase-1 expression via Nrf2 activation in murine macrophages. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 4, p. 440–446, abr. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20074672/>. Acesso em: 14 fev. 2021.

KIM, H. J. et al. Calcium-influx increases SOD1 aggregates via nitric oxide in cultured motor neurons. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 39, n. 5, p. 574–582, 31 out. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18059133/>. Acesso em: 24 nov. 2020.

KIM, W. et al. Leaf extracts from *Dendropanax morbifera* Léveillé mitigate mercury-induced reduction of spatial memory, as well as cell proliferation, and neuroblast differentiation in rat dentate gyrus. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 1, 2 maio 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31046739/>. Acesso em: 1 fev. 2021.

KIRK, R. A. et al. Lipopolysaccharide exposure in a rat sepsis model results in hippocampal amyloid- β plaque and phosphorylated tau deposition and corresponding behavioral deficits. **GeroScience**, v. 41, n. 4, p. 467–481, 1 ago. 2019.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, n. 5, p. 598–625, maio 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15689384/>. Acesso em: 26 nov. 2020.

KOENIGS, M. et al. Superior parietal cortex is critical for the manipulation of information in working memory. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 47, p. 14980–14986, 25 nov. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19940193/>. Acesso em: 8 fev. 2021.

KRISHNA CHANDRAN, A. M. et al. Neuroprotective role of naringenin against methylmercury induced cognitive impairment and mitochondrial damage in a mouse model. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 71, 1 out. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31376681/>. Acesso em: 1 fev. 2021.

KUKOLJA, J.; THIEL, C. M.; FINK, G. R. Cholinergic stimulation enhances neural activity associated with encoding but reduces neural activity associated with retrieval in humans. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 25, p. 8119–8128, 24 jun. 2009. Disponível em: <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk>. Acesso em: 8 jan. 2021.

KUMAR, A. NMDA receptor function during senescence: Implication on cognitive performance. **Frontiers in Neuroscience**, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26732087/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

KUNO, R. et al. Reference values for lead, cadmium and mercury in the blood of adults from the metropolitan area of Sao Paulo, Brazil. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 2013a.

KUNO, R. et al. Reference values for lead, cadmium and mercury in the blood of adults from the metropolitan area of Sao Paulo, Brazil. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 216, n. 3, p. 243–249, jun. 2013b.

KURATA, S. I. Selective activation of p38 MAPK cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 31, p. 23413–23416, 4 ago. 2000. Disponível em: <http://www.jbc.org/>. Acesso em: 26 nov. 2020.

LACERDA LEOCÁDIO, P. C. et al. Pollutants and nutrition: Are methylmercury effects on blood pressure and lipoprotein profile comparable to high-fat diet in mice?. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 204, p. 111036, 1 nov. 2020.

LAMBERT, I. H. Regulation of the Cellular Content of the Organic Osmolyte Taurine in Mammalian Cells. **Neurochemical Research** 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14992263/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

LEÃO, R. N. et al. OLM interneurons differentially modulate CA3 and entorhinal inputs to hippocampal CA1 neurons. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 11, p. 1524–1530, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23042082/>. Acesso em: 8 jan. 2021.

LEE, G. R. et al. Regulation of the Th2 cytokine locus by a locus control region.

Immunity, v. 19, n. 1, p. 145–153, 1 jul. 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12871646/>. Acesso em: 4 fev. 2021.

LEE, J. L. C.; NADER, K.; SCHILLER, D. An Update on Memory Reconsolidation Updating. **Trends Cogn Sci.** v. 21, n.7, p. 531-545, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28495311/>. Acesso em: 8 jan. 2021.

LEOCÁDIO, P. C. L. et al. Obesity: More Than an Inflammatory, an Infectious Disease?. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 14 jan. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31993062/>. Acesso em: 7 set. 2020.

LI, Y.; XU, T. Le. State-dependent cross-inhibition between anionic GABAA and glycine ionotropic receptors in rat hippocampal CA1 neurons. **NeuroReport**, v. 13, n. 2, p. 223–226, 11 fev. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11893914/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

LI, Z. et al. Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization. **Cell**, v. 141, n. 5, p. 859–871, maio 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20510932/>. Acesso em: 28 jan. 2021.

LIMA, E. S.; COUTO, R. D. Structure, metabolism and physiologic functions of high-density lipoproteins. **J Bras Patol Med Lab**, v. 42, n. 3, p. 169–178, jun. 2006.

LIMA, L. M.; CARVALHO, M. D. G.; SOUSA, M. O. Índice Apo B/Apo A-I e predição de risco cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, jun. 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066782X2007000600014&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 31 jan. 2021.

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, 1 jan. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11781080>. Acesso em: 7 mar. 2020.

LISMAN, J. et al. Viewpoints: How the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition. **Nature Neuroscience**, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29073641/>. Acesso em: 8 jan. 2021.

LISMAN, J. E.; GRACE, A. A. The hippocampal-VTA loop: Controlling the entry of information into long-term memory. **Neuron**, v. 46, n. 5, p. 703–713, 2005.

LIU, S. J.; ZUKIN, R. S. Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. **Trends in Neurosciences**, mar. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17275103/>. Acesso em: 28 jan. 2021.

LIU, Y. et al. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 11, p. 2846–2857, 14 mar. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17360906/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using

real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT. **Method methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOOPUIJT, L. D.; SCHMIDT, W. J. The role of NMDA receptors in the slow neuronal degeneration of Parkinson's disease. **Amino Acids**, v. 14, n.1-3, p. 17-23, 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9871436/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

LÓPEZ, D. E.; BALLAZ, S. J. The Role of Brain Cyclooxygenase-2 (Cox-2) Beyond Neuroinflammation: Neuronal Homeostasis in Memory and Anxiety. **Mol Neurobiol**, v.57, n.12, p. 5167-5176, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32860157/>. Acesso em: 8 fev. 2021.

LU, J.; HOLMGREN, A. Selenoproteins. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 2, p. 723–7, 9 jan. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18757362>. Acesso em: 5 out. 2017.

LÜSCHER, C. et al. Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. **Nat Neurosci**, v. 3, n. 6, p. 545-50, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10816309/>. Acesso em: 28 jan. 2021.

LÜSCHER, C.; MALENKA, R. C. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 6, p. 1–15, jun. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22510460/>. Acesso em: 28 jan. 2021.

LUZINA, I. G. et al. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives”. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, n. 4, p. 753–764, out. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22782966/>. Acesso em: 4 fev. 2021.

MADEJCZYK, M. S. et al. 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, jul. 2007a. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17429056>. Acesso em: 7 mar. 2020.

MADEJCZYK, M. S. et al. 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, 1 jul. 2007b. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/702347>. Acesso em: 5 out. 2017.

MAGHAZAJI, H. I. Psychiatric aspects of methylmercury poisoning. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 37, n. 8, p. 954–958, 1974. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4420813/>. Acesso em: 2 maio. 2021.

MAHER, F. O.; NOLAN, Y.; LYNCH, M. A. Downregulation of IL-4-induced signalling in hippocampus contributes to deficits in LTP in the aged rat. **Neurobiology of Aging**, v. 26, n. 5, p. 717–728, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15708447/>. Acesso em: 3 fev. 2021.

MAILLOUX, R. J.; YUMVIHOZE, E.; CHAN, H. M. Superoxide produced in the matrix of mitochondria enhances methylmercury toxicity in human neuroblastoma cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 289, n. 3, p. 371–380, 15 dez. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26545714/>. Acesso em: 2 fev. 2021.

MANFROI, C. B. et al. 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, 24 maio 2004. Disponível em: <https://academic.oup.com/toxsci/article-lookup/doi/10.1093/toxsci/kfh201>. Acesso em: 5 out. 2017.

MARSHALL, J. C. Lipopolysaccharide: An endotoxin or an exogenous hormone? In: Clinical Infectious Diseases, SUPPL. 7, **Clin Infect Dis**, 15 nov. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16237650/>. Acesso em: 26 nov. 2020.

MATOS, G. A. **Efeitos da intoxicação mercurial no estresse oxidativo e em marcadores inflamatórios no duodeno de camundongos c57bl/6j submetidos à dieta ocidental**. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/55408>. Acesso em: 1 fev. 2021.

MCALPINE, D.; ARAKI, S. Minamata disease an unusual neurological disorder caused by contaminated fish. **The Lancet**, v. 272, n. 7047, p. 629–631, 20 set. 1958. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13588955/>. Acesso em: 2 maio. 2021.

MCGUINNESS, L. et al. Presynaptic NMDARs in the Hippocampus Facilitate Transmitter Release at Theta Frequency. **Neuron**, v. 68, n. 6, p. 1109–1127, 22 dez. 2010. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S0896627310009396/fulltext>. Acesso em: 28 jan. 2021.

MCNAMARA, C. G. et al. Dopaminergic neurons promote hippocampal reactivation and spatial memory persistence. **Nature Neuroscience**, v. 17, n. 12, p. 1658–1660, 2014.

MENDES, T. S. **Via colinérgica anti-inflamatória: um alvo terapêutico no curso da mucosite intestinal induzida experimentalmente por 5-fluorouracil**. 2019. 111f. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

MERKE, A. et al. Free thyroid hormones and mortality in caucasians undergoing angiography: The Ludwigshafen risk and cardiovascular health (LURIC) study. **Endocrine Practice**, v. 23, n. 3, p. 288–298, 1 mar. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27849383/>. Acesso em: 1 fev. 2021.

MESHKI, J. et al. Molecular mechanism of nucleotide-induced primary granule release in human neutrophils: Role for the P2Y2 receptor. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 286, n. 2 55-2, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14613890/>. Acesso em: 26 nov. 2020.

MILHOMEM FILHO, E. O. et al. A ingestão de pescado e as concentrações de

mercúrio em famílias de pescadores de Imperatriz (MA). **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 19, n. 1, p. 14–25, 1 jan. 2016.

MILLER, G. A.; GALANTER, E.; PRIBRAM, K. H. **Plans and the structure of behavior**. New York: Henry Holt and Co, 1960.

MINAS GERAIS. SECRETARIA DE ESTADO DE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL (SEMAD). **Informativo dos parâmetros de qualidade das águas nos locais monitorados ao longo do Rio Paraopeba**. 2020. Disponível em: www.meioambiente.mg.gov.br/component/content/article/13-informativo/3744-informativo-diario-dos-parametros-de-qualidade-das-aguas-nos-locais-monitorados-ao-longo-do-rio-paraopeba-apos-o-desastre-na-barragem-b1. Acesso em: 23 fev. 2020.

MITCHELL, M. et al. Is Dental Amalgam Toxic to Children of Color?. **Journal of the National Medical Association**, 1 ago. 2018 .

MÒDOL, L.; DARBRA, S.; PALLARÈS, M. Neurosteroids infusion into the CA1 hippocampal region on exploration, anxiety-like behaviour and aversive learning. **Behavioural Brain Research**, v. 222, n. 1, p. 223–229, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21463656/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

MOMENI, Z. et al. Hyperglycemia induces RAGE-dependent hippocampal spatial memory impairments. **Physiology and Behavior**, v. 229, 1 fev. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33316294/>. Acesso em: 21 jan. 2021.

MOREIRA, E. L. et al. Does Methylmercury-Induced Hypercholesterolemia Play a Causal Role in Its Neurotoxicity and Cardiovascular Disease? **Toxicological Sciences**, v. 130, n. 2, p. 373–382, 1 dez. 2012. Disponível em: <https://academic.oup.com/toxsci/article-lookup/doi/10.1093/toxsci/kfs252>. Acesso em: 5 out. 2017.

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, 28 nov. 1998. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.543>. Acesso em: 5 out. 2017.

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, 29 out. 2007a. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00204-007-0209-2>. Acesso em: 25 jun. 2018.

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. 769–76, 29 nov. 2007b. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00204-007-0209-2>. Acesso em: 18 jun. 2018.

MULKEY, R. M. et al. Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. **Nature**, v. 369, n. 6480, p. 486–488, 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7515479/>. Acesso em: 28 jan. 2021.

MULKEY, R. M.; HERRON, C. E.; MALENKA, R. C. An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. **Science**, v. 261, n. 5124, p. 1051–1055, 1993. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8394601/>. Acesso em: 28 jan. 2021.

MUNFORD, R. S. Endotoxemia-menace, marker, or mistake?. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 100, n. 4, p. 687–698, out. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27418356/>. Acesso em: 19 nov. 2020.

MURILLO-GONZÁLEZ, F. E. et al. PON1 lactonase activity and its association with cardiovascular disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 500, p. 47–53, 1 jan. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31626760/>. Acesso em: 23 nov. 2020.

MYHRER, T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: A meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. **Brain Research Reviews**, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12663083/>. Acesso em: 26 nov. 2020.

NAKAJIMA, Y. et al. Taurine reduces inflammatory responses after spinal cord injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 27, n. 2, p. 403–410, 1 fev. 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19831872/>. Acesso em: 14 fev. 2021.

NAKAMURA, R. et al. Immunotoxic effect of low-dose methylmercury is negligible in mouse models of ovalbumin or mite-induced Th2 allergy. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 8, p. 1353–1358, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27476942/>. Acesso em: 3 fev. 2021.

NEUWIRTH, L. S.; VOLPE, N. P.; EL IDRISSEI, A. Taurine effects on emotional learning and memory in aged mice: Neurochemical alterations and differentiation in auditory cued fear and context conditioning. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 775, p. 195–214, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23392936/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

NEVES, G.; COOKE, S. F.; BLISS, T. V. P. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: A neural network approach to causality. **Nature Reviews Neuroscience**, jan. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18094707/>. Acesso em: 12 jan. 2021.

NEWMAN, L. A.; GOLD, P. E. Attenuation in rats of impairments of memory by scopolamine, a muscarinic receptor antagonist, by mecamylamine, a nicotinic receptor antagonist. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 5, p. 925–932, 1 mar. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26660295/>. Acesso em: 8 jan. 2021.

NI, M. et al. Glia and Methylmercury Neurotoxicity. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 75, n. 16–17, p. 1091–1101, 15 ago. 2012. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15287394.2012.697840>.

Acesso em: 6 out. 2017.

NIU, X. et al. Protective effects of taurine against inflammation, apoptosis, and oxidative stress in brain injury. **Molecular Medicine Reports**, v. 18, n. 5, p. 4516–4522, 1 nov. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30221665/>. Acesso em: 20 nov. 2020.

NOGUCHI, Y. et al. Astrocytes Protect Neurons against Methylmercury via ATP/P2Y1 Receptor-Mediated Pathways in Astrocytes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 28 fev. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23469098/>. Acesso em: 26 nov. 2020.

NOLAN, Y. et al. Role of interleukin-4 in regulation of age-related inflammatory changes in the hippocampus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 10, p. 9354–9362, 11 mar. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15615726/>. Acesso em: 3 fev. 2021.

NOTÍCIAS, A. C. de. **Comissão faz encontro virtual com atingidos por desastre em Brumadinho**. Meio Ambiente e Energia. 2020. Disponível em: <https://www.camara.leg.br/noticias/712211-comissao-faz-encontro-virtual-com-atingidos-por-desastre-em-brumadinho/>.

NOWAK, L. et al. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. **Nature**, v. 307, n. 5950, p. 462–465, 1984. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/307462a0>. Acesso em: 28 jan. 2021.

OLSEN, R. W.; DELOREY, T. M. **GABA Receptor Physiology and Pharmacology**. Lippincott-Raven, 2015.

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, 14 set. 2017. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15563650.2017.1326606>. Acesso em: 3 maio. 2018.

PABST, M. et al. Astrocyte Intermediaries of Septal Cholinergic Modulation in the Hippocampus. **Neuron**, v. 90, n. 4, p. 853–865, 18 maio 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27161528/>. Acesso em: 8 jan. 2021.

PALACIOS-FILARDO, J.; MELLOR, J. R. Neuromodulation of hippocampal long-term synaptic plasticity. **Current Opinion in Neurobiology**, 1 fev. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30212713/>. Acesso em: 8 jan. 2021.

PAOLETTI, P.; BELLONE, C.; ZHOU, Q. NMDA receptor subunit diversity: Impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, 1 jan. 2013. Disponível em: www.nature.com/reviews/neuro. Acesso em: 13 jan. 2021.

PIAO, S.; CHA, Y. N.; KIM, C. Taurine chloramine protects RAW 264.7 macrophages against hydrogen peroxide-induced apoptosis by increasing antioxidants. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 49, n. 1, p. 50–56, jul. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21765607/>. Acesso em: 14 fev. 2021.

DANIEL, V. P. **Papel do metilmercúrio no estresse oxidativo no hipocampo, cerebelo e fígado e alterações metabólicas em camundongos C57BL/6J lactentes**. 2018. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/40939>. Acesso em: 12 jan. 2021.

PINTO, D. V. et al. Methylmercury Interactions With Gut Microbiota and Potential Modulation of Neurogenic Niches in the Brain. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, 3 nov. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33224022/>. Acesso em: 25 nov. 2020.

PITTS, M. Barnes Maze Procedure for Spatial Learning and Memory in Mice. **BIO-PROTOCOL**, v. 8, n. 5, 5 mar. 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29651452>. Acesso em: 7 mar. 2020.

POFANTIS, H.; PAPTAEODOROPOULOS, C. The α 5GABAA receptor modulates the induction of long-term potentiation at ventral but not dorsal CA1 hippocampal synapses. **Synapse**, v. 68, n. 9, p. 394–401, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24823837/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

POUZET, B. et al. Latent inhibition is spared by n-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced ventral hippocampal lesions, but is attenuated following local activation of the ventral hippocampus by intracerebral nmda infusion. **Neuroscience**, v. 124, n. 1, p. 183–194, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14960350/>. Acesso em: 8 fev. 2021.

PRADO, V. F. et al. Cholinergic circuits in cognitive flexibility. **Neuroscience Elsevier Ltd**, 14 mar. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27641830/>. Acesso em: 8 jan. 2021.

PRENOSIL, G. A. et al. Specific Subtypes of GABA A Receptors Mediate Phasic and Tonic Forms of Inhibition in Hippocampal Pyramidal Neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 96, n. 2, p. 846–857, ago. 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16835366/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

PRINCE, L. et al. Target organ specific activity of drosophila MRP (ABCC1) moderates developmental toxicity of methylmercury. **Toxicological sciences**, v. 140, n. 2, p. 425–35, 1 ago. 2014a. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24863968>. Acesso em: 7 mar. 2020.

PRINCE, L. et al. Target Organ Specific Activity of Drosophila MRP (ABCC1) Moderates Developmental Toxicity of Methylmercury. **Toxicological Sciences**, v. 140, n. 2, p. 425–435, 1 ago. 2014b. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24863968>. Acesso em: 20 jun. 2018.

PURVES D. et al. **Neurociências**. 4 ed. Jones & Bartlett, 2010.

RANG, H. et al. **Rang and Dale's Pharmacology**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. v. 2

RAPOSO, R. da S. et al. Methylmercury Impact on Adult Neurogenesis: Is the Worst Yet to Come From Recent Brazilian Environmental Disasters?. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 12, 23 nov. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33328968/>. Acesso em: 20 jan. 2021.

RAY, R. S.; KATYAL, A. Myeloperoxidase: Bridging the gap in neurodegeneration. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 1 set. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27343997/>. Acesso em: 2 fev. 2021.

RAYMOND, M. R. et al. Associations between fish consumption and contaminant biomarkers with cardiovascular conditions among older male anglers in Wisconsin. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 58, n. 7, p. 676–682, 17 ago. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27253229/>. Acesso em: 23 nov. 2020.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 3, p. 659–661, 1 mar. 2008. Disponível em: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1096/fj.07-9574LSF>. Acesso em: 24 nov. 2020.

REYNOLDS, J. N.; RACZ, W. J. Effects of methylmercury on the spontaneous and potassium-evoked release of endogenous amino acids from mouse cerebellar slices. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 65, n. 5, p. 791–798, 1987. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3621041/>. Acesso em: 8 fev. 2021.

RODRIGUES, A. R. et al. Mercury toxicity in the Amazon: Contrast sensitivity and color discrimination of subjects exposed to mercury. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, mar. 2007. Disponível em: www.bjournal.com.br. Acesso em: 2 maio. 2021.

ROMANIDES, A. J.; DUFFY, P.; KALIVAS, P. W. Glutamatergic and dopaminergic afferents to the prefrontal cortex regulate spatial working memory in rats. **Neuroscience**, v. 92, n. 1, p. 97–106, ago. 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10392833/>. Acesso em: 28 jan. 2021.

RONCAL-JIMENEZ, C. et al. Mechanisms by which dehydration may lead to chronic kidney disease. **Annals of Nutrition and Metabolism**, 23 jun. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26088040/>. Acesso em: 1 fev. 2021.

ROSEN, Z. B.; CHEUNG, S.; SIEGELBAUM, S. A. Midbrain dopamine neurons bidirectionally regulate CA3-CA1 synaptic drive. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 12, p. 1763–1771, 2015.

ROTHENBERG, S. E. et al. The role of gut microbiota in fetal methylmercury exposure: Insights from a pilot study. **Toxicology letters**, v. 242, p. 60–67, 3 fev. 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26626101>. Acesso em: 7 mar. 2020.

RUAN, Y. et al. High Doses of Copper and Mercury Changed Cecal Microbiota in Female Mice. **Biological Trace Element Research**, v. 189, n. 1, p. 134–144, 15 maio

2019.

RUDOLPH, U.; MÖHLER, H. GABAA receptor subtypes: Therapeutic potential in down syndrome, affective disorders, schizophrenia, and autism. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, jan. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24160694/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

RUSH, T. et al. Glutathione-mediated neuroprotection against methylmercury neurotoxicity in cortical culture is dependent on MRP1. **NeuroToxicology**, v. 33, n. 3, p. 476–481, jun. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22464990>. Acesso em: 20 jun. 2018.

SALTER, M. W.; KALIA, L. V. **SRC kinases: A hub for NMDA receptor regulation** *Nature Reviews Neuroscience* Nature Publishing Group, , 2004. . Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15034556/>. Acesso em: 28 jan. 2021.

SAMPAIO DA SILVA, D. et al. Influence of ecological factors and of land use on mercury levels in fish in the Tapajós River basin, Amazon. **Environmental Research**, v. 109, n. 4, p. 432–446, maio 2009.

SÁNCHEZ-LOZADA, L. G. et al. Mild hyperuricemia induces vasoconstriction and maintains glomerular hypertension in normal and remnant kidney rats. **Kidney International**, v. 67, n. 1, p. 237–247, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15610247/>. Acesso em: 1 fev. 2021.

SANTOS-SACRAMENTO, L. et al. Human neurotoxicity of mercury in the Amazon: A scoping review with insights and critical considerations. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 15 jan. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33396018/>. Acesso em: 2 maio. 2021.

SANTOS ALCÁNTARA, M.; INESTROSA CANTÍN, N. Peroxisomal Proliferation Protects From Beta-Amyloid Neurodegeneration. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 49, p. 41057-41068, 2005. Disponível em: <https://repositorio.uc.cl/handle/11534/20955>. Acesso em: 5 out. 2017.

SANZ-CLEMENTE, A.; NICOLL, R. A.; ROCHE, K. W. Diversity in NMDA receptor composition: Many regulators, many consequences. **Neuroscientist**, fev. 2013. . Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22343826/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

SARANSAARI, P.; OJA, S. S. Taurine in Neurotransmission. **Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology**, p. 325–342, 2008.

SASTRY, K. V.; RAO, D. R. Effect of mercuric chloride on the intestinal absorption of an amino acid, glycine, in the freshwater murrel, *Channa punctatus*. **Toxicology Letters**, v. 11, n. 1–2, p. 11–15, 1982. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6211801/>. Acesso em: 8 fev. 2021.

SCHLICHTING, M. L.; PRESTON, A. R. Memory integration: Neural mechanisms and implications for behavior. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, 1 fev. 2015. . Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25750931/>. Acesso em: 8 jan. 2021.

SCHMID, C. D. et al. Differential gene expression in LPS/IFN γ activated microglia and macrophages: In vitro versus in vivo. **Journal of Neurochemistry**, maio 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19393017/>. Acesso em: 26 nov. 2020.

SEIDEL, U.; HUEBBE, P.; RIMBACH, G. Taurine: A Regulator of Cellular Redox Homeostasis and Skeletal Muscle Function. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 63, n. 16, p. 1800569, 7 ago. 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mnfr.201800569>. Acesso em: 14 fev. 2021.

SHANMUGASUNDARAM, B. et al. Frontal cortex and hippocampus neurotransmitter receptor complex level parallels spatial memory performance in the radial arm maze. **Behavioural Brain Research**, v. 289, p. 157–168, 1 ago. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25930220/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

SHIGEMOTO-MOGAMI, Y. et al. Mechanisms underlying extracellular ATP-evoked interleukin-6 release in mouse microglial cell line, MG-5. **Journal of Neurochemistry**, v. 78, n. 6, p. 1339–1349, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11579142/>. Acesso em: 26 nov. 2020.

SHIMIZU, E. et al. IL-4-Induced Selective Clearance of Oligomeric β -Amyloid Peptide 1–42 by Rat Primary Type 2 Microglia . **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 9, p. 6503–6513, 1 nov. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18941241/>. Acesso em: 3 fev. 2021.

SHINOHARA, K.; HATA, T. Post-acquisition hippocampal blockade of the NMDA receptor subunit GluN2A but not GluN2B sustains spatial reference memory retention. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 147, p. 1–8, 1 jan. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29127002/>. Acesso em: 8 fev. 2021.

SHINOZAKI, Y. et al. Microglia trigger astrocyte-mediated neuroprotection via purinergic gliotransmission. **Scientific Reports**, v. 4, 1 abr. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24710318/>. Acesso em: 25 nov. 2020.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: “Classical” and “non-classical” functions and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, 1 jun. 2005.

SILVA, J. L. et al. Oral methylmercury intoxication aggravates cardiovascular risk factors and accelerates atherosclerosis lesion development in ApoE knockout and C57BL/6 mice. **Toxicological Research**, p. 1–11, 5 nov. 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s43188-020-00066-x>. Acesso em: 23 nov. 2020.

SOKOLOWSKI, K. et al. Methylmercury (MeHg) elicits mitochondrial-dependent apoptosis in developing hippocampus and acts at low exposures. **Neurotoxicology**, v. 32, n. 5, p. 535–44, out. 2011a. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161813X11001070>. Acesso em: 18 jun. 2018.

SOKOLOWSKI, K. et al. Methylmercury (MeHg) elicits mitochondrial-dependent apoptosis in developing hippocampus and acts at low exposures. **NeuroToxicology**, v. 32, n. 5, p. 535–544, out. 2011b. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161813X11001070>. Acesso em: 18 jun. 2018.

SOLARI, N.; HANGYA, B. Cholinergic modulation of spatial learning, memory and navigation. **European Journal of Neuroscience**, 1 set. 2018a. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30055067/>. Acesso em: 27 jan. 2021.

SOLARI, N.; HANGYA, B. Cholinergic modulation of spatial learning, memory and navigation. **European Journal of Neuroscience**, 1 set. 2018b. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30055067/>. Acesso em: 12 jan. 2021.

SONG, J. et al. Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. **Nature**, v. 489, n. 7414, p. 150–154, 6 set. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22842902/>. Acesso em: 8 fev. 2021.

SOREQ, H. Acetylcholinesterase — new roles for an old actor. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 4, p. 294–302, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11283752/>. Acesso em: 26 nov. 2020.

SPADONI, I. et al. A gut-vascular barrier controls the systemic dissemination of bacteria. **Science**, v. 350, n. 6262, p. 830–834, 13 nov. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26564856/>. Acesso em: 10 fev. 2021.

STONE, W. S. et al. Scopolamine- and Morphine-Induced Impairments of Spontaneous Alternation Performance in Mice: Reversal With Glucose and With Cholinergic and Adrenergic Agonists. **Behavioral Neuroscience**, v. 105, n. 2, p. 264–271, abr. 1991. Disponível em: <https://psycnet.apa.org/journals/bne/105/2/264>. Acesso em: 27 jan. 2021.

SWEATT, J. D. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. **Current Opinion in Neurobiology**, jun. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15194111/>. Acesso em: 28 jan. 2021.

TAKAHASHI, A. et al. Hypothalamic cholinergic systems in mercuric chloride-induced hyperglycemia. **Brain Research Bulletin**, v. 34, n. 1, p. 47–52, 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7910776/>. Acesso em: 26 nov. 2020.

TAKAHASHI, T. et al. Methylmercury Causes Blood-Brain Barrier Damage in Rats via Upregulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression. **PloS one**, v. 12, n. 1, p. e0170623, 1 jan. 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28118383>. Acesso em: 7 mar. 2020.

TAKAHASHI, T.; SHIMOHATA, T. Vascular dysfunction induced by mercury exposure. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, 2 maio 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31100949/>. Acesso em: 25 nov. 2020.

TAKEUCHI, T. et al. A pathological study of Minamata disease in Japan. **Acta**

Neuropathologica, v. 2, n. 1, p. 40–57, jan. 1962. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00685743>. Acesso em: 2 maio. 2021.

TAKEUCHI, T. Pathology of Minamata disease. With special reference to its pathogenesis. **Acta pathologica japonica**, v. 32 Suppl 1, p. 73–99, 1982. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6765001>. Acesso em: 25 jun. 2018.

TANG, A. H. et al. Nerve terminal nicotinic acetylcholine receptors initiate quantal GABA release from perisomatic interneurons by activating axonal t-type (ca v3) ca 2+ channels and ca 2+ release from stores. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 38, p. 13546–13561, 21 set. 2011. Disponível em: <https://www.jneurosci.org/content/31/38/13546>. Acesso em: 8 jan. 2021.

TELES-GRILLO RUIVO, L. M. et al. Coordinated Acetylcholine Release in Prefrontal Cortex and Hippocampus Is Associated with Arousal and Reward on Distinct Timescales. **Cell Reports**, v. 18, n. 4, p. 905–917, 24 jan. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28122241/>. Acesso em: 8 jan. 2021.

TING, S. M. et al. Excitatory pathway engaging glutamate, calcineurin, and NFAT upregulates IL-4 in ischemic neurons to polarize microglia. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 40, n. 3, p. 513–527, 1 mar. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30890073/>. Acesso em: 4 fev. 2021.

TODA, N.; KANEKO, T.; KOGEN, H. Development of an efficient therapeutic agent for alzheimer's disease: Design and synthesis of dual inhibitors of acetylcholinesterase and serotonin transporter. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 3, p. 273–287, 2010.

TOKUOMI, H. Clinical observation and pathogenesis of Minamata disease. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 62, p. 1816–1850, 1960. Disponível em: https://scholar.google.com.br/scholar?hl=ptBR&as_sdt=0%2C5&q=Tokuomi%2C+H.%2C+Clinical+observation+and+pathogenesis+of+Minamata+disease%2C+Psychiatry+Neurol.+Jpn.%2C+62%2C+1816%2C+1960&btnG=. Acesso em: 2 maio. 2021.

TONI, N. et al. LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. **Nature**, v. 402, n. 6760, p. 421–425, 25 nov. 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10586883/>. Acesso em: 28 jan. 2021.

TONI, N. et al. Remodeling of synaptic membranes after induction of long-term potentiation. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 16, p. 6245–6251, 15 ago. 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11487647/>. Acesso em: 28 jan. 2021.

TORQUATTO, K. I. et al. Role of calcium-permeable AMPA receptors in memory consolidation, retrieval and updating. **Neuropharmacology**, v. 144, p. 312–318, 1 jan. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30449732/>. Acesso em: 8 fev. 2021.

TOWNER, R. A. et al. Assessing long-term neuroinflammatory responses to encephalopathy using MRI approaches in a rat endotoxemia model. **GeroScience**, v. 40, n. 1, p. 49–60, 1 fev. 2018. Disponível em:

/pmc/articles/PMC5832664/?report=abstract. Acesso em: 1 fev. 2021.

TSE, Y. C. et al. Modulation of synaptic plasticity by stress hormone associates with plastic alteration of synaptic NMDA receptor in the adult hippocampus. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, 1 nov. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22069501/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

ÜLLEN, A. et al. Myeloperoxidase-Derived Oxidants Induce Blood-Brain Barrier Dysfunction In Vitro and In Vivo. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

ULRICH, D.; BETTLER, B. GABAB receptors: synaptic functions and mechanisms of diversity. **Current Opinion in Neurobiology**, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17433877/>. Acesso em: 8 fev. 2021.

VALERO, J. et al. Long-term effects of an acute and systemic administration of LPS on adult neurogenesis and spatial memory. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, n. 8 APR, 2014.

VALENZUELA, C. F.; PH, D.; MICHAEL, P. Update on Brain Pathology Focus on : Neurotransmitter Systems. **Alcohol Research & Health, volume 34, issue number1**, v. 32, 2001.

VOLIANSKIS, A. et al. Long-term potentiation and the role of N-methyl-D-aspartate receptors. **Brain Research**, v. 1621, p. 5–16, 24 set. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25619552/>. Acesso em: 28 jan. 2021.

VON LINSTOW ROLOFF, E. et al. Dissociation of cholinergic function in spatial and procedural learning in rats. **Neuroscience**, v. 146, n. 3, p. 875–889, 25 maio 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17418958/>. Acesso em: 8 jan. 2021.

WALKER, M. C.; VAN DER DONK, W. A. The many roles of glutamate in metabolism. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Springer Verlag, 1 mar. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26323613/>.

WANG, K. et al. Taurine improves neuron injuries and cognitive impairment in a mouse Parkinson's disease model through inhibition of microglial activation. **NeuroToxicology**, v. 83, p. 129–136, mar. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33450328/>. Acesso em: 15 fev. 2021.

WANG, L.-M. et al. Lipopolysaccharide endotoxemia induces amyloid- β and p-tau formation in the rat brain. **American journal of nuclear medicine and molecular imaging**, v. 8, n. 2, p. 86–99, 2018a. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29755842>. Acesso em: 19 nov. 2020.

WANG, Q. et al. Ginsenoside Re Attenuates Isoproterenol-Induced Myocardial Injury in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, p. 1–8, 2018b. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29849732>. Acesso em: 14 out. 2018.

WELSBY, P. J.; ROWAN, M. J.; ANWYL, R. Intracellular mechanisms underlying the

nicotinic enhancement of LTP in the rat dentate gyrus. **European Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 1, p. 65–75, jan. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19077124/>. Acesso em: 8 jan. 2021.

WILBURN, D.R., 2013, Changing patterns in the use, recycling, and material substitution of mercury in the United States: U.S. **Geological Survey Scientific Investigations Report**, p. 32, 2013. Disponível em: <https://pubs.usgs.gov/sir/2013/5137/>. Acesso em: 9 abr. 2020.

WILKINS, H. M. et al. Bcl-2 is a novel interacting partner for the 2-oxoglutarate carrier and a key regulator of mitochondrial glutathione. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 2, p. 410–419, 15 jan. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22115789/>. Acesso em: 20 nov. 2020.

XIA, G. H. et al. Stroke dysbiosis index (SDI) in gut microbiome are associated with brain injury and prognosis of stroke. **Frontiers in Neurology**, v. 10, n. APR, 2019.

YAMANAGA, H. Quantitative Analysis of Tremor in Minamata Disease. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 141, n. 1, p. 13–22, 1983. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6636146/>. Acesso em: 2 maio. 2021.

YIN, J. et al. l-Cysteine metabolism and its nutritional implications. **Molecular Nutrition and Food Research**, 1 jan. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25929483/>. Acesso em: 24 nov. 2020.

YORIFUJI, T. et al. Long-term exposure to methylmercury and neurologic signs in Minamata and neighboring communities. **Epidemiology**, v. 19, n. 1, p. 3–9, jan. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18091411/>. Acesso em: 2 maio. 2021.

YORIFUJI, T. et al. Long-term exposure to methylmercury and its effects on hypertension in Minamata. **Environmental Research**, v. 110, n. 1, p. 40–46, 1 jan. 2010.

YUAN, Y.; ATCHISON, W. D. Methylmercury acts at multiple sites to block hippocampal synaptic transmission. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 275, n. 3, 1995.

YUAN, Y.; ATCHISON, W. D. Action of Methylmercury on GABAA Receptor-Mediated Inhibitory Synaptic Transmission Is Primarily Responsible for Its Early Stimulatory Effects on Hippocampal CA1 Excitatory Synaptic Transmission | Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. **The Journal of Pharmacology and Experimentals Therapeutics**, v. 282, n. 1, p. 64–73, jun. 1997a. Disponível em: <https://jpet.aspetjournals.org/content/282/1/64.long>. Acesso em: 26 nov. 2020.

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, jul. 1997b. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9223540>. Acesso em: 20 jun. 2018.

YUAN, Y.; ATCHISON, W. D. Methylmercury differentially affects GABAA receptor-mediated spontaneous IPSCs in Purkinje and granule cells of rat cerebellar slices. **Journal of Physiology**, v. 550, n. 1, p. 191–204, 1 jul. 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12879869/>. Acesso em: 26 nov. 2020.

YUAN, Y.; ATCHISON, W. D. Methylmercury-induced increase of intracellular Ca²⁺ increases spontaneous synaptic current frequency in rat cerebellar slices. **Molecular Pharmacology**, v. 71, n. 4, p. 1109–1121, abr. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17244699/>. Acesso em: 8 fev. 2021.

ZAHIR, F. et al. Effect of methyl mercury induced free radical stress on nucleic acids and protein: Implications on cognitive and motor functions. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 21, n. 2, p. 149–152, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23105633/>. Acesso em: 1 fev. 2021.

ZARNOWSKA, E. D. et al. GABAA receptor $\alpha 5$ subunits contribute to GABA A_s slow synaptic inhibition in mouse hippocampus. **Journal of Neurophysiology**, v. 101, n. 3, p. 1179–1191, mar. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19073796/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

ZHANG, B. Bin et al. HgS and Zuotai differ from HgCl₂ and methyl mercury in intestinal Hg absorption, transporter expression and gut microbiome in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 379, 15 set. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31175882/>. Acesso em: 7 set. 2020.

ZHANG, L. H. et al. Glycine uptake regulates hippocampal network activity via glycine receptor-mediated tonic inhibition. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 3, p. 701–711, fev. 2008a. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17522628/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

ZHANG, Y. et al. Associations between total mercury and methyl mercury exposure and cardiovascular risk factors in US adolescents. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 7, p. 6265–6272, 1 mar. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0905-2>. Acesso em: 20 ago. 2020.

ZHANG, Z. et al. Bell-shaped d-serine actions on hippocampal long-term depression and spatial memory retrieval. **Cerebral Cortex**, v. 18, n. 10, p. 2391–2401, out. 2008b. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18281302/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

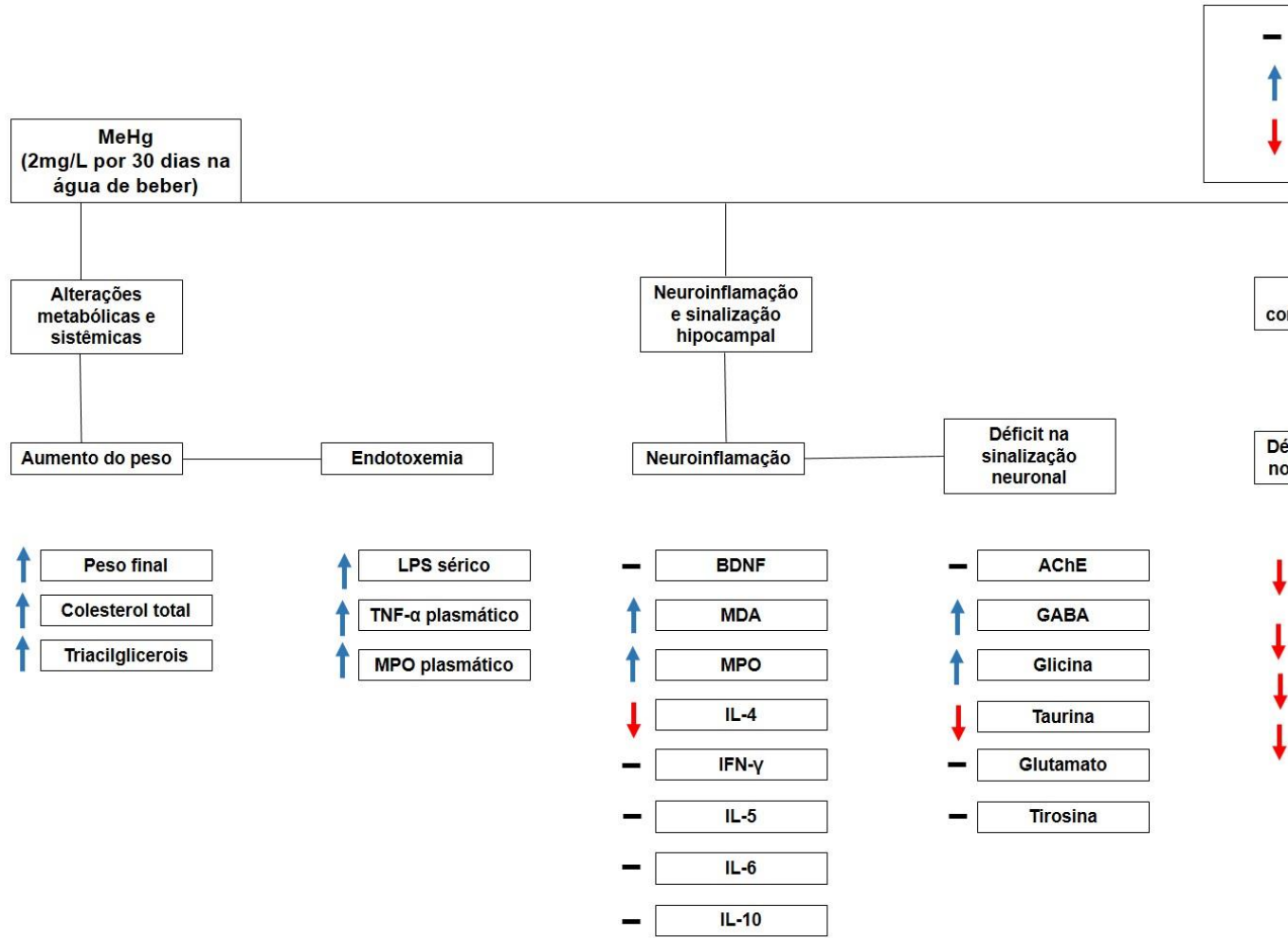
ZHAO, J. et al. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30962497/>. Acesso em: 3 fev. 2021.

ZHAO, Y. et al. Subchronic oral mercury caused intestinal injury and changed gut microbiota in mice. **Science of the Total Environment**, v. 721, 15 jun. 2020.

ZHUANG, S.; DEMIRS, J. T.; KOICHEVAR, I. E. p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 34, p. 25939–25948, 25 ago. 2000. Disponível em:

<http://www.jbc.org/>. Acesso em: 26 nov. 2020.

APÊNDICE A - MAPA GERAL DOS RESULTADOS



ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA PARA USO ANIMAL



FUNDAÇÃO EDSON QUEIROZ
UNIVERSIDADE DE FORTALEZA
 ENSINANDO E APRENDENDO

COMISSÃO DE ÉTICA
NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"Neurotoxicidade do Metilmercúrio nos nichos neurogênicos do cérebro adulto: impacto a longo prazo na neurodegeneração e no declínio da cognição"**, protocolada sob o CEUA nº 2073110618, sob a responsabilidade de **Ramon da Silva Raposo e equipe; Daniel Vieira Pinto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Fortaleza (CEUA/UNIFOR) na reunião de 09/08/2018.

We certify that the proposal **"Methylmercury neurotoxicity in neurogenic niches of the adult brain: long-term impact on neurodegeneration and decline in cognition"**, utilizing 120 Isogenics mice (males and females), protocol number CEUA 2073110618, under the responsibility of **Ramon da Silva Raposo and team; Daniel Vieira Pinto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Fortaleza's University (CEUA/UNIFOR) in the meeting of 08/09/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **09/2018** a **09/2020**

Área: **Medicina Veterinária**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **3 a 3 meses**

N: **120**

Linhagem: **C57BL6j**

Peso: **25 a 30 g**

Local do experimento: **NÚCLEO DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL (NUBEX)**

Fortaleza, 21 de agosto de 2018

Prof. Dr. Ramon da Silva Raposo
 Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade de Fortaleza

Prof. Dr. Saulo Ellery Santos
 Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade de Fortaleza

ANEXO B - PUBLICAÇÕES DECORRENTES DA PESQUISA



Methylmercury Interactions With Gut Microbiota and Potential Modulation of Neurogenic Niches in the Brain

Daniel V. Pinto¹, Ramon S. Raposo², Gabriella A. Matos¹, Jacqueline I. Alvarez-Leite³, João O. Malva⁴ and Reinaldo B. Oriá^{1*}

¹ Laboratory of Tissue Healing, Ontogeny and Nutrition, Department of Morphology, School of Medicine, Institute of Biomedicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, ² Experimental Biology Core, University of Fortaleza, Fortaleza, Brazil, ³ Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁴ Center for Innovative Biomedicine and Biotechnology (CiBB), Faculty of Medicine, Institute of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Institute for Clinical and Biomedical Research (ICBR), University of Coimbra, Coimbra, Portugal

Keywords: methylmercury, neurogenesis, brain, intestinal microbiota, neurodegenerative diseases, gut dysbiosis

INTRODUCTION

Mercury (Hg) is a well-recognized biohazard for the nervous system. Methylmercury (MeHg) is an organic methylated form of Hg, highly toxic to humans, targeting the brain, as MeHg is rapidly absorbed, and easily reaches and crosses the blood-brain barrier (Takahashi et al., 2017). Neurological symptoms may vary from acute motor and visual effects to marked behavioral and psychiatric alterations. At higher neurotoxic levels, MeHg can lead to irreversible coma and, ultimately, death. It has been highlighted that MeHg long-term and low-grade toxicity may be associated with neurodegenerative disorders and perhaps a direct causality for Alzheimer's disease (Siblerud et al., 2019).

Although MeHg harmful effects to the brain have been thoroughly documented in the literature, such as increased oxidative stress and mitochondrial dysfunction, halted glutamate uptake by astrocytes and overt glutamate excitotoxicity, and activation of neuronal apoptosis cascades (Antunes dos Santos et al., 2016), less is known how MeHg affects the hippocampal neurogenic niche.

Hence, in this opinion paper, we summarize up-to-date literature addressing MeHg effects on the intestinal microbiota, a key player influencing MeHg bioavailability and MeHg induction of intestinal dysbiosis (and vice-versa), and related intricate mechanisms during homeostasis and disease states. In addition, we discuss possible ways how MeHg may affect hippocampal neurogenesis and the potential lasting consequences for brain neurodegeneration.

INTESTINAL MICROBIOTA IS AFFECTED BY MeHg

In mammals, the intestinal microbiota is first acquired either by contact with maternal skin (if a cesarean labor) or directly maternal microbiota transfer (if by vaginal labor) immediately after birth (Shao et al., 2019) and through breast milk feeding (Pannaraj et al., 2017). The intestinal microbiota diversity is highly dynamic in the first years of post-natal life, until it reaches its "adulthood-like" characteristics in early childhood (Oriá et al., 2018). The first 2-years of life is also a time window for important early post-natal brain plasticity events, such as active synaptogenesis, myelination, and neurogenesis (Lebel and Deoni, 2018). Moreover, enteric infections may prevail early in life when individuals are exposed to enteric pathogens and pathogenic bacteria, especially in unprivileged settings of the developing world, where poor sanitation and hygiene much often occurs

OPEN ACCESS

Edited by:

Vittorio Calabrese,
University of Catania, Italy

Reviewed by:

María A. Geroja,
University of Concepcion, Chile

*Correspondence:

Reinaldo B. Oriá
reinaldo70.ora@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Neuroenergetics, Nutrition and Brain
Health,
a section of the journal
Frontiers in Neuroscience

Received: 26 June 2020

Accepted: 24 September 2020

Published: 03 November 2020

Citation:

Pinto DV, Raposo RS, Matos GA,
Alvarez-Leite JI, Malva JO and Oriá RB
(2020) Methylmercury Interactions
With Gut Microbiota and Potential
Modulation of Neurogenic Niches in
the Brain. *Front. Neurosci.* 14:576543.
doi: 10.3389/fnins.2020.576543



Methylmercury Impact on Adult Neurogenesis: Is the Worst Yet to Come From Recent Brazilian Environmental Disasters?

Ramon da Silva Raposo^{1,2}, Daniel Vieira Pinto³, Ricardo Moreira¹, Ronaldo Pereira Dias³, Carlos Alberto Fontes Ribeiro¹, Reinaldo Barreto Criá³ and João Oliveira Malva^{1*}

¹ Faculty of Medicine, Center for Innovative Biomedicine and Biotechnology (CIBB) and Institute of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (ICBP), University of Coimbra, Coimbra, Portugal; ² Experimental Biology Core, Health Sciences Center, University of Fortaleza, Fortaleza, Brazil; ³ Laboratory of Tissue Healing, Ontogeny and Nutrition, Department of Morphology, School of Medicine, Institute of Biomedicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Nibeido C. Inestrosa,
Pontificia Universidad Católica de
Chile, Chile

Reviewed by:

Muthuswamy Anusuyadevi,
Bharathidasan University, India
Nimish Sah,
Johns Hopkins University,
United States

*Correspondence:

João Oliveira Malva
jomalva@med.uo.pt

Received: 04 August 2020

Accepted: 15 October 2020

Published: 23 November 2020

Citation:

Raposo RS, Pinto DV, Moreira R, Dias RR, Fontes Ribeiro CA, Criá RB and Malva JO (2020) Methylmercury Impact on Adult Neurogenesis: Is the Worst Yet to Come From Recent Brazilian Environmental Disasters? *Front. Aging Neurosci.* 12:591601. doi: 10.3389/fnagi.2020.591601

Worldwide environmental tragedies of anthropogenic origin causing massive release of metals and other pollutants have been increasing considerably. These pollution outbreaks affect the ecosystems and impact human health. Among those tragedies, recent large-scale environmental disasters in Brazil strongly affected riverside populations, leading to high-risk exposure to methylmercury (MeHg). MeHg is highly neurotoxic to the developing brain. This toxicant causes neural stem cell dysfunction and neurodevelopmental abnormalities. However, less is known about the effects of MeHg in the postnatal neurogenic niche, which harbors neural stem cells and their progeny, in the adult brain. Therefore, taking in consideration the impact of MeHg in human health it is urgent to clarify possible associations between exposure to mercury, accelerated cognitive decline, and neurodegenerative diseases. In this perspectives paper, we discuss the neurotoxic mechanisms of MeHg on postnatal neurogenesis and the putative implications associated with accelerated brain aging and early-onset cognitive decline in populations highly exposed to this environmental neurotoxicant.

Keywords: methylmercury, neurotoxicity, neurogenesis, environmental disaster, memory, aging

INTRODUCTION

Methylmercury (MeHg) is considered extremely neurotoxic to the developing brain and chronic exposure to this environmental neurotoxicant may be associated with increased risk of accelerated cognitive decline and neurodegenerative diseases. Indeed, mercury intoxication has been implicated in the etiology of Alzheimer's dementia (Siblerud et al., 2019), putatively causing profound and lasting cognitive decline with aging. Natural and anthropogenic-related environmental disasters may increase the exposure of human populations to mercury intoxication.

Early-life and adult brain neurogenesis in the hippocampus has been claimed to contribute to the cognitive reserve and therefore potentially relevant to better cope with later-life cognitive decline due to physiological aging or under neurodegenerative conditions. In this manuscript,

Chapter 48

Inbred mouse model of brain development and intestinal microbiota

Reinaldo B. Oriá¹, Daniel V. Pinto¹, Ronaldo P. Dias¹, Ramon S. Raposo², Patricia L. Foley³, João O. Malva⁴ and Richard L. Guerrant⁵

¹Laboratory of Biology of Tissue Healing, Federal University of Ceará, Faculty of Medicine, Fortaleza, Ceará, Brazil, ²Experimental Biology Core, University of Fortaleza, Fortaleza, Ceará, Brazil, ³Division of Comparative Medicine, Georgetown University, Washington, DC, United States, ⁴Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (ICBR), Faculty of Medicine, University of Coimbra, Coimbra, Portugal, ⁵Center for Global Health, Division of Infectious Diseases and International Health, University of Virginia, School of Medicine

List of abbreviations

ADHD	Attention deficit hyperactivity disorders
BDNF	Brain-derived neurotropic factor
CA1	Cornus ammonis 1
GF	Germ-free
LPS	Lipopolysaccharide
MUC2	Mucin 2
SPF	Specific-pathogen-free

Mini-dictionary of terms

Axenic mice Animals totally free of microbiota.

Enterotypes Clusters of certain microbial communities in the gut.

Germ-free mice Synonymous with axenic mice, i.e., devoid of all microorganisms.

Gnotobiosis Animals with a specific and known microbiota (note this includes axenic).

Inbred mice Animals from at least 20 consecutive generations of mating between siblings with offspring reaching >99% homozygosity. They are also called isogenic.

Intestinal dysbiosis Disruption/impairment of microbial community equilibrium in the gut, favoring disease.

Intestinal microbiota Set of nonpathogenic microorganisms that usually live in the intestinal environment.

Outbred mice Animals intentionally generated from nonrelated mating to maximize genetic diversity (genetic makeup with a high rate of heterozygosity). They are also called heterogeneous.

Specific pathogen-free mice Animals that are free of specifically identified microorganisms and parasites that have been shown to cause either subclinical or clinical infection.

ANEXO C - OUTRAS PUBLICAÇÕES REALIZADAS NO DECURSO DO PRAZO DE DOUTORAMENTO COM O ORIENTADOR



Review

Modulation of Intestinal Immune and Barrier Functions by Vitamin A: Implications for Current Understanding of Malnutrition and Enteric Infections in Children

Pedro Henrique Q. S. de Medeiros ^{1,2}, Daniel V. Pinto ³, Juliana Zani de Almeida ³, Juliana M. C. Rêgo ^{3,4}, Francisco A. P. Rodrigues ¹ , Aldo Ângelo M. Lima ¹, David T. Bolick ², Richard L. Guerrant ² and Reinaldo B. Oriá ^{2,3,*}

¹ Laboratory of Infectious Diseases, Institute of Biomedicine, School of Medicine, Federal University of Ceara, Fortaleza 60430-270 CE, Brazil; phquintela@hotmail.com (P.H.Q.S.d.M.); delvanefapr@gmail.com (F.A.P.R.); alima@ufc.br (A.Â.M.L.)

² Division of Infectious Diseases and International Health, Department of Medicine, University of Virginia School of Medicine, Charlottesville, VA 22908, USA; dtb5w@virginia.edu (D.T.B.); rlg9a@virginia.edu (R.L.G.)

³ Laboratory of Tissue Healing, Ontogeny and Nutrition, Department of Morphology and the Institute of Biomedicine, School of Medicine, Federal University of Ceara, Fortaleza 60430-270 CE, Brazil; danielvieirapinto@gmail.com (D.V.P.); juliana_zani@yahoo.com.br (J.Z.d.A.); nutrijulianarego@gmail.com (J.M.C.R.)

⁴ Department of Nutrition, Christus University Center, Fortaleza 60190-060 CE, Brazil

* Correspondence: oria@ufc.br

Received: 12 July 2018; Accepted: 17 August 2018; Published: 21 August 2018



Abstract: The micronutrient vitamin A refers to a group of compounds with pleiotropic effects on human health. These molecules can modulate biological functions, including development, vision, and regulation of the intestinal barrier. The consequences of vitamin A deficiency and supplementation in children from developing countries have been explored for several years. These children live in an environment that is highly contaminated by enteropathogens, which can, in turn, influence vitamin A status. Vitamin A has been described to modulate gene expression, differentiation and function of diverse immune cells; however, the underlying mechanisms are not fully elucidated. This review aims to summarize the most updated advances on elucidating the vitamin A effects targeting intestinal immune and barrier functions, which may help in further understanding the burdens of malnutrition and enteric infections in children. Specifically, by covering both clinical and in vivo/in vitro data, we describe the effects of vitamin A related to gut immune tolerance/homeostasis, intestinal barrier integrity, and responses to enteropathogens in the context of the environmental enteric dysfunction. Some of the gaps in the literature that require further research are also highlighted.

Keywords: vitamin A supplementation; vitamin A deficiency; intestinal immune response; intestinal barrier function; enteric infections

1. Introduction

Vitamin A derivatives (or retinoids) are major nutrients for human health and modulate several functions, such as cell differentiation, proliferation, and apoptosis [1,2]. Retinoids are used for xerophthalmia and blindness prevention [3], and abnormal levels may be associated with teratogenic alterations [4,5]. Retinoids are also key micronutrients for improving malnutrition and enteric illnesses



Contents lists available at ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

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

Pollutants and nutrition: Are methylmercury effects on blood pressure and lipoprotein profile comparable to high-fat diet in mice?

Paola Caroline Lacerda Leocádio^{a,*}, Ronaldo Pereira Dias^c, Daniel Vieira Pinto^c, Jonas Martins Reis^a, José Carlos Rodrigues Nascimento^c, Gerly Anne de Castro Brito^c, José Telmo Valença Jr.^c, Giselle Foureaux^a, Anderson José Ferreira^a, Cláudia Carvalhinho Windmöller^a, Maria Elena Crespo-Lopez^b, Flávia Almeida Santos^c, Reinaldo Barreto Oriá^c, Jacqueline I. Alvarez-Leite^a

^a Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

^b Universidade Federal Do Pará, Belém, Brazil

^c Universidade Federal Do Ceará, Fortaleza, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords

Methylmercury
High-fat diet
Cardiovascular disease
Hypertension
Hypolipidemia
Stenosis

ABSTRACT

Human exposure to methylmercury (MeHg) due to contaminated fish intake as part of a high-fat (HFD), high-carbohydrate diets is a reality today for many populations. HFD is associated with hypertension and hyperlipidemia, primary cardiovascular disease (CVD) risk factors. Some studies suggest that MeHg induces those risk factors. We evaluated the effect of MeHg exposure in mice fed with HFD or control diet for eight weeks. In the last experimental 15 days, the half group received a MeHg solution (20 mg/L) replacing water. Blood pressure (BP), heart rate, lipoprotein concentrations, and paraoxonase activity were evaluated. Liver cholesterol, triacylglycerol, and IBA-1+ cells, as well as transcriptional levels of genes related to lipid metabolism and inflammatory response, were also assessed. HFD and both MeHg groups presented increased BP and total cholesterol (TC). In the liver, HFD but not MeHg was related to an increase in TC. Also, MeHg intoxication reduced paraoxonase activity regardless of diet. MeHg intoxication and HFD increased stenosis and the number of IBA-1+ cells and modified some gene transcripts associated with lipid metabolism. In conclusion, we demonstrated that MeHg effects on CVD risk factors resemble those caused by HFD.

1. Introduction

Human exposure to mercury is a serious public health issue in the Brazilian Amazon and worldwide (Fillion et al., 2006; Mergler et al., 2007; Roman et al., 2011). Methylmercury (MeHg) is generated by the methylation of inorganic mercury by bacteria in the aquatic environment (Handy and Noyes, 1975). Fishing and commercialization of contaminated fish lead to a chronic exposure to MeHg seen in several populations (Fagles-Smith et al., 2016; Lavoie et al., 2018; Mergler et al., 2007). Exposure to MeHg causes neurotoxicity and long-term consequences, such as genotoxicity (Farina et al., 2011; Sheehan et al., 2014).

MeHg exposure has already been related to hypertension, atherosclerosis, and infarction (Grotto et al., 2009; Yorifuji et al., 2010; Inoue et al., 2012; Islam et al., 2016; Wildemann et al., 2016; Wells et al.,

2017). High prevalence of non-communicable diseases such as hypertension or diabetes was described in chronically exposed populations (Tsai et al., 2019; Yorifuji et al., 2010), in addition to other factors such as nutritional transition (Piperata et al., 2011). Although the mercury exposure simultaneous to the consumption of a high-fat diet is a reality today for many populations worldwide, our knowledge about the possible co-morbidity is very little, and data are scarce. Since cardiovascular disease (CVD) and obesity are growing problems worldwide (Puster and Kovacic, 2014; Hanson et al., 2013; Teich et al., 2015), the influence of mercury exposure on risk factors for those diseases needs to be better understood.

Dyslipidemia, hypertension, oxidative stress, and inflammation are important CVD risk factors, closely associated with lifestyle, such as high saturated fat and sugar diets (Nelson, 2013; Roza et al., 2016; Winter

* Corresponding author. Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

E-mail address: paolaleocadio@yahoo.com.br, paolalagoinha@ufmg.br (P.C. Lacerda Leocádio).

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111036>

Received 1 March 2020; Received in revised form 10 July 2020; Accepted 11 July 2020

Available online 9 August 2020

0147-6513/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.



A Brazilian regional basic diet-induced chronic malnutrition drives liver inflammation with higher ApoA-I activity in C57BL6J mice

M.J.S. Santos¹, K.M. Canuto¹, C.C. de Aquino¹, C.S. Martins², G.A.C. Brito², T.M.R.P. Pessoa⁵, L.R. Bertolini⁵, I. de Sá Carneiro⁵, D.V. Pinto¹, J.C.R. Nascimento¹, B.B. da Silva³, J.T. Valença Jr.⁶, M.I.F. Guedes³, J.S. Owen⁴, and R.B. Oriá^{1,2}

¹Laboratório de Biologia da Cicatrização Tecidual, Ontogenia e Nutrição de Tecidos, Departamento de Morfologia e Instituto de Biomedicina, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

²Núcleo de Microscopia e Processamento de Imagens, Departamento de Morfologia e Instituto de Biomedicina, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

³Laboratório de Biologia e Biotecnologia Molecular, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

⁴Division of Medicine, Royal Free Campus, University College London Medical School, Hampstead, London, United Kingdom

⁵Ciências da Saúde, Universidade de Fortaleza, Fortaleza, CE, Brasil

⁶Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

Abstract

Malnutrition is still considered endemic in many developing countries. Malnutrition-enteric infections may cause lasting deleterious effects on lipid metabolism, especially in children living in poor settings. The regional basic diet (RBD), produced to mimic the Brazilian northeastern dietary characteristics (rich in carbohydrate and low in protein) has been used in experimental malnutrition models, but few studies have explored the effect of chronic RBD on liver function, a central organ involved in cholesterol metabolism. This study aimed to investigate whether RBD leads to liver inflammatory changes and altered reverse cholesterol metabolism in C57BL6/J mice compared to the control group, receiving a standard chow diet. To evaluate liver inflammation, ionized calcium-binding adapter protein-1 (IBA-1) positive cell counting, interleukin (IL)-1 β immunohistochemistry, and tumor necrosis factor (TNF)- α and IL-10 transcription levels were analyzed. In addition, we assessed reverse cholesterol transport by measuring liver apolipoprotein (Apo)E, ApoA-I, and lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) by RT-PCR. Furthermore, serum alanine aminotransferase (ALT) was measured to assess liver function. RBD markedly impaired body weight gain compared with the control group ($P < 0.05$). Higher hepatic TNF- α ($P < 0.001$) and IL-10 ($P < 0.01$) mRNA levels were found in RBD-challenged mice, although without detectable non-alcoholic fatty liver disease. Marked IBA-1 immunolabeling and increased number of positive-IBA-1 cells (presumably Kupffer cells) were found in the undernourished group. No statistical difference in serum ALT was found. There was also a significant increase in ApoA-I mRNA expression in the undernourished group, but not ApoE and LCAT, compared with the control. Altogether our findings suggested that chronic RBD-induced malnutrition leads to liver inflammation with increased ApoA-I activity.

Key words: Liver; Hyperlipidemia; Malnutrition; Inflammation; Kupffer cells; Apolipoprotein A-I

Introduction

Malnutrition is still endemic in many parts of the developing world where poverty coexists with infectious diseases, much of it associated with precarious sanitation and hygiene (1). Malnutrition is a health issue particularly in growing children, especially in the first two years of life, when they undergo rapid cognitive and physical development (2,3). Very often malnutrition increases the risk for enteric infections and vice-versa (4), so that the condition may create a self-amplifying vicious cycle that impairs

growth and brain function by reducing intestinal nutrient absorption and increasing nutrient loss (5). Prolonged infection/malnutrition per se may increase daily nutrient requirements much more than the needs of a healthy child. A metabolomics study from Preidis and colleagues has shown that neonatal malnutrition leads to liver inflammation and increased oxidative stress in suckling mice (6). In addition, Wistar rats receiving a low protein diet show growth impairment, edema, liver steatosis,

Correspondence: R.B. Oriá: <oria@ufc.br>

Received July 4, 2019 | Accepted March 23, 2020

Braz J Med Biol Res | doi: 10.1590/1414-431X20209031

ANEXO D - PUBLICAÇÕES COM O ORIENTADOR SUBMETIDOS PARA APROVAÇÃO EM PERIÓDICOS

1. Methylmercury chronic exposure affects telomerase and DNA repair enzymes, induces oxidative stress and chromosomal abnormalities in dyslipidemic APOE knockout mice. Autor: ITO, MN *et al.* Revista: Toxicology.
2. Acute blockage of endogenous melatonin by luzindole, with or without peripheral LPS injection, induces jejunal inflammation and morphological alterations in Swiss mice. Autor: Matos, RS *et al.* Revista: Brazilian Journal of Medical and Biological Research.
3. Nutraceutical effects of milk enriched with omega 9, 6 and 3 on burnt skin. Autor: CAMPELO, APBS. Revista: Wound Repair and Regeneration.