

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JÚLIA AIKAWA

**GLIOSE EM RETINA DE RATOS INTOXICADOS COM METILMERCÚRIO E A
AÇÃO QUIMIOPROTETORA DO ÓLEO DE PEIXE**



CURITIBA

2013

JÚLIA AIKAWA

**GLIOSE EM RETINA DE RATOS INTOXICADOS COM METILMERCÚRIO E A
AÇÃO QUIMIOPROTETORA DO ÓLEO DE PEIXE**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Fisiologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes.
Co-Orientador: Rubens Bertazolli filho.

CURITIBA

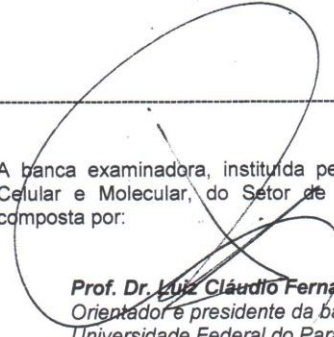
2013

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

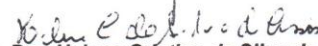
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)


PARECER

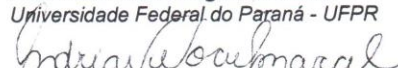
A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Prof. Dr. Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC


Profa. Dra. Helena Cristina da Silva de Assis
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Profa. Dra. Sonia Regina Grötzner
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Profa. Dra. Andréa Novais Moreno Amaral
Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR.

E tendo como suplentes,

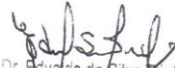
Profa. Dra. Anete Curte Ferraz
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Profa. Dra. Anita Nishiyama
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir a candidata **Júlia Aikawa**, em relação ao seu trabalho intitulado: "**Gliose em retina de ratos intoxicados com metilmercúrio e a ação quimioprotetora do óleo de peixe**", são de parecer favorável à **ANOVAÇÃO** da acadêmica, habilitando-a ao título de Doutora em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Fisiologia.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 19 de Dezembro de 2013


Prof. Dr. Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 120796

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar aqui e poder seguir meu caminho seja ele qual for.

À toda minha família pelo amor e apoio incondicional. Em especial à minha querida mãe, minha melhor amiga que sempre se fez presente mesmo distante. Pela sensatez e bons conselhos em quaisquer circunstâncias. Minha eterna gratidão nunca seria o suficiente.

Ao meu marido Marcos, pelo companheirismo, amor, muita paciência em momentos de estresse e angustias neste último ano. “Mor”, muito obrigada.

Ao meu querido “chefe” Prof. Luiz Cláudio Fernandes, pelo apoio, confiança, incentivo e muita paciência, que possibilitaram o desenvolvimento desta tese. À amizade e as suas sábias palavras que em momentos de desespero me traziam a calma. Impressionante como a paz voltava a reinar momentos depois! Muito obrigada.

Ao Prof. Rubens Bertazolli Filho por confiar a mim, o desenvolvimento de um novo projeto de estudo, pela orientação e seus conhecimentos.

À profa. Anita Nishiyama pela amizade, apoio e incentivo no momento que mais precisei. Suas palavras me fizeram repensar sobre as prioridades da vida.

Aos colegas e amigos de laboratório: Ricardo, Isa, Adri, Gina, Dani, Gleisson, Rica Chairs Tanhoffer, Aldre, Dalton, Benito, Ana Júlia, Sandro, Everson, Marcelo, Cintia, Dalva, Ana Lúcia, Raciele, Sergio, Caroline, que proporcionaram ótimo ambiente de trabalhos e ajuda nos experimentos. Agradeço-os pelo convívio, pelas bobagens ditas e momentos de descontração compartilhados ao longo desse período e pela grande ajuda nos experimentos. Agradeço de coração pela nobre amizade de meus AMIGOS que realmente fizeram toda a diferença, pelo apoio incondicional e “puxões de orelhas”. Muito obrigada. Vou sentir saudades de tudo isso!

Aos novos amigos: Taísa, Chelin, Glaucia pela companhia na hora do almoço, pelas fofocas e momentos de gargalhadas.

Ao Luiz Eduardo Rizzo de Souza pelos anticorpos produzidos e cedidos, pelos seus conhecimentos, boa vontade e por todas as discussões sobre a técnica de *Western Blotting*.

Ao prof. Silvio Marques Zanata e profa. Lia Sumie Nakao pela gentileza de empréstimos de anticorpos entre outros materiais, pelo uso da câmara fria. Aos seus alunos: Chelin, Michele, Márcia, Juliana, Ariel, Max.

À profa. Katya Naliwaiko pela amizade e seus conhecimentos, sempre me auxiliando a interpretar as revelações das primeiras expressões proteicas.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular prof. Edvaldo S. Trindade, pelo apoio e compreensão em momentos difíceis na reta final.

Ao Prof. Ciro A. de Oliveira Ribeiro, Prof. Francisco Filipak Neto, Sonia Regina Grötzner pelo uso do laboratório, empréstimos de materiais, pelos seus conhecimentos e exemplo de dedicação.

À profa. Andrea Senff Ribeiro e sua orientada Mariana Boia por ceder amostras de células Hel A, essenciais para meu estudo.

Ao prof. Ricardo Fernandez Perez pelo espaço cedido de seu laboratório.

Aos alunos do laboratório de Toxicologia Celular pela amizade, simpatia, prontidão em ajudar com os protocolos experimentais: Dandie, Izabela, Samuel, Daniele, Andressa, Flávia e Maritana.

Aos membros da minha banca de defesa de tese pelas críticas e colaborações.

À tia Maria, Lia e tio Carlos, minha nova família que sempre se preocuparam comigo,

pelos desabafos e consolos.

Ao seu Nino, por inúmeras vezes, gentilmente, me emprestar a lupa estereoscópica.
Exemplo de homem trabalhador.

Aos meus amigos de longa data e novos integrantes (“galera do Moco”): Horst, Carlos, Bandeira, Miriam, Paulinho, Viviane, Marcos, Tony, Cristiano e Allan, que sempre tiveram ao meu lado na alegria e na tristeza, pela eterna amizade. O apoio de vocês foi fundamental!

Ao meu Binho, “gatinho da mamãe”. Este sim, companheiro de todas as horas: hora me atrapalhando passando em frente ao micro, hora me fazendo sorrir...

Aos meus velhos amigos Claudinha e Hermes, pela amizade, carinho, incentivo e encorajamento nesta reta final.

A Marlene, secretária do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, pela boa vontade e simpatia.

Aos funcionários do Biotério, em especial ao Marcelo Wada pela dedicação, boa vontade e competência com que realizam seus trabalhos no cuidado com os animais.

Aos recepcionistas do Setor de Ciências Biológicas, Sr. Luis e Sr. Sebastião pelo carisma e simpático “Bom dia!” de todos os dias.

Ao departamento de Fisiologia, pelo espaço cedido ao meu trabalho.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

À Fundação Herbarium pela doação das cápsulas de óleo de peixe.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

O mercúrio é um poluente ambiental neurotóxico. Atualmente não é conhecido o sítio inicial das lesões do sistema nervoso central (SNC) nem tão pouco as bases moleculares das lesões. Em SNC de mamíferos, os astrócitos são sítio de acumulação preferencial do metilmercúrio (MeHg). Após exposição crônica, o mercúrio se acumula em diversas estruturas oculares, particularmente na retina. Os efeitos do mercúrio na retina têm sido estudados, mas as bases moleculares das alterações observadas são pobremente conhecidas. O presente trabalho objetivou estabelecer um modelo de lesão de retinas de ratos por intoxicação de cloreto de metilmercúrio (CH₃HgCl) e investigar os mecanismos celulares subjacentes ao processo de lesão ocular provocado pela intoxicação. Além disso, determinou o efeito da suplementação com óleo de peixe como possível neuroprotetor no processo de lesão supracitado. Para isso, ratos Wistar foram suplementados com óleo de peixe (ácido graxo poliinsaturado rico em n-3), na dose de 1 g/kg p.c., desde o desmame (21 dias) até a fase adulta. Ao completarem 70 dias, estes ratos receberam injeção de CH₃HgCl, na dose única de 2500 µg/kg de p.c., via administração intraperitoneal. Os efeitos da suplementação com óleo de peixe foram avaliados sobre a expressão de p ERK ½ e GFAP (marcadores de gliose) de retina dos animais intoxicados, analisados 3 e 6 dias após a exposição à droga. Expressão das proteínas COX2, caspase 3 clivada e Nrf2 também foram analisadas por ensaios de western blotting. Determinou-se a atividade da enzima catalase, glutationa e concentrações de lipoperóxidos, os quais podem refletir o estado redox celular. Os resultados obtidos demonstram que nos dias 3 e 6 após a intoxicação mercurial apresentaram maior pico de expressão de p ERK ½ e de GFAP, respectivamente, caracterizando gliose reativa no tecido retiniano. A suplementação com óleo de peixe impediu as expressões de ambas as proteínas sendo similar à do grupo controle. Não houve alteração na expressão das proteínas COX2 e caspase 3 clivada entre os grupos experimentais. A intoxicação mercurial promoveu aumento da expressão total da proteína Nrf2 e alterou o estado redox das células, uma vez que, este metal pesado foi capaz de reduzir a atividade da enzima catalase e glutationa. Com relação às concentrações de lipoperóxidos, este parâmetro foi aumentado quando exposto à droga. Nossos resultados sugerem a caracterização de gliose reativa no tecido retiniano de ratos submetidos à intoxicação por mercúrio, gerando desequilíbrio do estado redox neste modelo experimental. Notavelmente, a suplementação com óleo de peixe promoveu efeito neuroprotetor sobre o tecido retiniano lesado, levando-se em consideração as expressões proteicas de GFAP e p ERK ½.

Palavras-chaves: metilmercúrio, gliose reativa, retina, óleo de peixe.

ABSTRACT

Mercury is a highly neurotoxic environmental contaminant. Currently it is not known the initial site of injury in the central nervous system (CNS) neither the molecular basis of the lesions. In the mammalian CNS, methylmercury (MeHg) preferentially accumulates in the astrocytes. After chronic exposure mercury accumulates in several ocular structures, particularly in the retina. The effects of mercury in the retina have been studied but the molecular basis of the cell change is poorly known. This study aimed to establish an experimental model of retinal injury in rats intoxicated by methylmercury chloride (CH₃HgCl) and further investigation upon the cellular mechanisms underlying the eye injury caused by the intoxication. Also to determine the effect of fish oil supplementation as a possible neuroprotector against CH₃HgCl intoxication. To achieve those aims male Wistar rats were supplemented with fish oil (rich in n-3 polyunsaturated fatty) at a dose of 1 g/kg bw, from weaning (21 days) until adulthood. At 70 days, the rats received a single dose intravenously injection CH₃HgCl of 2500 mg/kg bw. The effect of fish oil supplementation was evaluated by measuring the expression of p ERK ½ and GFAP (glial markers) from the retina of intoxicated animals, analyzed at 3 and 6 days after the exposure to CH₃HgCl. Expression of COX2, cleaved caspase-3 and total Nrf2 proteins were also analyzed by *western blotting*. The activity of catalase, glutathione levels and concentrations of lipoperoxides were analyzed, which may reflect the cellular redox state. The results show that at the 3 and 6 days after mercurial poisoning there were higher expressions of p ERK ½ and GFAP, respectively thus characterizing reactive gliosis in retinal tissue. The fish oil supplementation prevents the higher expression of both proteins being similar to control group. There was no change in the expression of COX2 and cleaved caspase-3 proteins between experimental groups. The mercurial poisoning did induce elevation in the total Nrf2 protein expression and altered redox state of the cells, this can be because this heavy metal was able to reduce the activity of catalase and glutathione levels. When exposed to the drug there was an increase in the lipoperoxide concentration in the retina. Our results demonstrate that we succeed in to establish a model in rat for retina lesion by CH₃HgCl intoxication characterized by reactive gliosis in retinal tissue and also the poisoning promoted an imbalance of the redox status in this experimental model. Remarkably fish oil supplementation acted as a neuroprotector on the injured retinal tissue by the alterations in GFAP and p ERK ½ protein expressions.

Keywords: methylmercury, reactive gliose, retina, fish oil.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
AGPIS	Ácido graxo poliinsaturado
ALA	Ácido graxo α -linolênico
ARE	Elementos responsivos antioxidantes
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
BHT	Hidroxitolueno butilado
C	Grupo controle
CAT	Catalase
CH ₃ CH ₂ Hg	Dimetilmercúrio
CH ₃ Hg	Metilmercúrio
COX2	Ciclooxigenase 2
DHA	Ácido docosahexaenóico
ERKs	quinases reguladas por sinais extracelulares
EPA	Ácido eicosapentaenoico
Fe ²⁺	Íon ferroso
Fe ³⁺	Íon férrico
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GSH	Glutathiona reduzida
GPx	Glutathiona peroxidase
GR	Glutathiona redutase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Hg	Mercúrio
Hg ⁰	Mercúrio metálico ou elementar
Hg ²⁺	Íon mercúrico
H ₂ g ²⁺	Íon mercuroso
HgS	Sulfeto de mercúrio
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IL	Interleucina
Keap 1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
LA	Ácido graxo linoleico

LDH	Lactato desidrogenase
LOX	Lipooxigenase
LT	Leucotrieno
MeHg	Metilmercúrio
NAOH	Hidróxido de sódio
NOS	Óxido nítrico sintetase
n-3	Ácido graxo ômega 3
n-6	Ácido graxo ômega 6
ONOO ⁻	Peroxinitrito
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
Nrf2	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
P	Grupo óleo de peixe
PAF	Fator de ativação plaquetário
p.c.	Peso corpóreo
PI3 quinase	Fosfatidilinositol 3 quinase
PG	Prostaglandina
PGE2	Prostaglandina E2
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
sMAF	<i>small Maf</i>
NF-κβ	Fator de transcrição nuclear kappa β
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ácido tricloroacético
TNFα	Fator de necrose tumoral α
TPP	Trifenilfosfina

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 Representação esquemática da suplementação dos animais para análise das expressões proteicas de GFAP e p ERK $\frac{1}{2}$ 38
- FIGURA 2 Expressão de p ERK $\frac{1}{2}$ na retina dos animais não intoxicados (C) e dos animais intoxicados por mercúrio na dose de 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de p.c. e analisados em diferentes situações: 1 Dia, 3 Dias, 6 Dias e 15 Dias após a administração da droga. Dados representam valores de um experimento.....47
- FIGURA 3 Expressão de GFAP na retina dos animais controle (C), intoxicados por mercúrio na dose de 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de p.c. e analisados em diferentes situações: 1 Dia, 3 Dias, 6 Dias e 15 Dias após a administração da droga. Dados representam valores de um experimento.....48
- FIGURA 4 Imunohistoquímica para GFAP na retina do grupo controle. Seta indica marcação nos astrócitos na camada limitante interna. Aumento de 40X. Os cortes histológicos (5 μm) foram bloqueados com BSA 2% e Triton 0,1% em tampão TBS durante 1 hora. O anticorpo anti-GFAP humana (Sigma) foi usado como anticorpo primário diluído 1:200 na solução de bloqueio. A reação foi feita por 2 horas a temperatura ambiente. Como anticorpo secundário foi utilizada IgG anti-IgG de camundongo empregando-se o kit VectaStain. A reação com este anticorpo no tampão de bloqueio durou 1 hora a temperatura ambiente. A reação foi revelada com DAB a 7,5% e peróxido de hidrogênio 0,003%. GCL – camada de células ganglionares, IPL – camada plexiforme interna, INL – camada nuclear interna, OPL – camada plexiforme externa e ONL - camada nuclear externa.49
- FIGURA 5 Imunohistoquímica para GFAP nas retinas dos grupos intoxicados com mercúrio na dose de 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c e analisados 5 dias após (painel esquerdo) e 7 dias após (painel direito). As cabeças de seta indicam a marcação na camada limitante interna. Aumento de 40X. Os cortes histológicos (5 μm) foram bloqueados com BSA 2% e Triton 0,1% em tampão TBS durante 1 hora. O anticorpo anti-GFAP humana (Sigma) foi usado como anticorpo primário diluído 1:200 na solução de bloqueio. A reação foi feita por 2 horas a temperatura ambiente. Como anticorpo secundário foi utilizada IgG anti-IgG de camundongo empregando-se o kit VectaStain. A reação com este anticorpo no tampão de bloqueio durou 1 hora a temperatura ambiente. A reação foi revelada com DAB a 7,5% e peróxido de hidrogênio 0,003%. GCL – camada de células ganglionares, IPL – camada plexiforme interna, INL – camada nuclear interna, OPL – camada plexiforme externa e ONL - camada nuclear externa.50
- FIGURA 6 Expressão da p ERK $\frac{1}{2}$ na retina dos animais controle (C; n=15) e dos animais intoxicados por mercúrio na dose de 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de p.c. e analisados em duas situações: 3 dias (3D; n=19) e 6 dias (6D; n=12) após a administração da droga e dos grupos intoxicados que receberam a suplementação com óleo de peixe: P3D (n=13) e P6D (n=12). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 3 experimentos. a $p < 0,05$ vs C, b $p < 0,05$ vs grupo 3D e c $p < 0,05$ vs 6D.51

FIGURA 7 Expressão de GFAP na retina dos animais controle (C; n=14) e dos animais intoxicados por mercúrio na dose de 2500 µg/kg de p.c. e analisados em duas situações: 3 dias (3D; n=19) e 6 dias (6D) após a administração da droga e dos grupos intoxicados que receberam a suplementação com óleo de peixe: P3D (n=9) e P6D (n=15). Os dados estão apresentados como média ± EPM de 3 experimentos. *a* p<0,05 vs C e *b* p<0,05 vs 6D e *c* p<0,05 vs 6D..... 52

FIGURA 8 Expressão de COX2 na retina dos animais do grupo controle (C) e dos grupos intoxicados por mercúrio na dose de 2500 µg/kg de p.c. e analisados em 2 diferentes situações: 3 Dias e 6 Dias após a administração da droga. Hel A foi utilizado como controle positivo (C⁺). Dados representam valores de dois experimentos. 55

FIGURA 9 Expressão de Caspase 3 clivada na retina dos animais do grupo controle (C) e dos grupos intoxicados por mercúrio na dose de 2500 µg/kg de p.c. e analisados em 2 diferentes situações: 3 Dias e 6 Dias após a administração da droga. Hel A foi utilizado como controle positivo (C⁺). Dados representam valores de dois experimentos. 58

FIGURA 10 Expressão de Nrf2 na retina dos animais controle (C; n=9) e dos animais intoxicados por mercúrio na dose de 2500 µg/kg de p.c. e analisados em duas situações: 3 dias (3D; n=12) e 6 dias (6D; n=15) após a administração da droga. Os dados estão apresentados como média ± EPM de 4 experimentos. *a* p<0,05 vs C. 59

FIGURA 11 Concentração de glutathiona reduzida (nmol de tióis.mg prot⁻¹) em tecido retiniano para animais dos grupos controle (C) e animais expostos ao mercúrio e analisados 3 e 6 dias após, grupos 3D e 6D, respectivamente. Os dados estão apresentados como média ± EPM de três experimentos. *a* p<0,05 vs C e 3D. 61

FIGURA 12 Atividade de catalase em tecido retiniano para animais dos grupos controle (C; n=18) e animais expostos ao mercúrio e analisados 3 e 6 dias após, grupos 3D (n=21) e 6D (n=21), respectivamente. Os dados estão apresentados como média ± EPM de três experimentos. *a* p<0,05 vs C. 63

FIGURA 13 Concentração de lipoperóxidos (mmol/µg de proteína) em tecido retiniano para animais dos grupos controle (C) e animais expostos ao mercúrio e analisados 3 e 6 dias após, grupos 3D e 6D, respectivamente. Os dados estão apresentados como média ± EPM de três experimentos. *a* p<0,05 vs C. 65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 MERCÚRIO E SUAS PARTICULARIDADES.....	13
1.2 MERCÚRIO NO MUNDO.....	16
1.3 TOXICIDADE DO MERCÚRIO.....	20
1.4 GLIOSE DAS CÉLULAS DE MÜLLER.....	24
1.5 GLIOSE COMO MODELO EXPERIMENTAL.....	26
1.6 MERCÚRIO E ESTRESSE OXIDATIVO.....	26
1.7 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS (AGPIS).....	30
1.8 DHA E RETINA.....	32
2 JUSTIFICATIVA	34
3 OBJETIVOS	35
3.1 OBJETIVO GERAL.....	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 ANIMAIS.....	36
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	36
4.3 PREPARAÇÃO DO MERCÚRIO E INTOXICAÇÃO DOS ANIMAIS.....	37
4.4 SUPLEMENTAÇÃO.....	37
4.5 DISSECÇÃO DAS RETINAS.....	39
4.6 EMBLOCAGEM DO MATERIAL E PREPARO DAS LÂMINAS.....	39
4.7 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	40
4.8 <i>WESTERN BLOTTING</i>	41
4.9 LIPOPEROXIDAÇÃO.....	42
4.10 ATIVIDADE DA CATALASE.....	44
4.11 CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH).....	44
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
6 CONCLUSÃO	67
7 REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 MERCÚRIO E SUAS PARTICULARIDADES

O mercúrio é o único metal líquido à temperatura ambiente, sendo o seu ponto de fusão de $-38,87^{\circ}\text{C}$ e o ponto de ebulição de $356,58^{\circ}\text{C}$. Elemento químico de número atômico 80, o mercúrio (Hg) pertence ao grupo IIB da tabela periódica de classificação dos elementos químicos. Ocorre no meio ambiente associado a outros elementos químicos, principalmente o enxofre, com o qual forma o minério cinabre (sulfeto de mercúrio - HgS), composto insolúvel de cor vermelha ou preta, cujas maiores reservas encontram-se na Espanha (Minas de Almadén) e na Itália. Outras fontes naturais de mercúrio são: erupções vulcânicas, evaporação natural, incêndios florestais e minas de mercúrio (CLARKSON, 1992; WHO, 2000). Suas propriedades físico-químicas o tornam elemento bastante peculiar quando comparado aos outros metais e têm fascinado o homem desde a antiguidade. Há relatos do uso do mercúrio muitos anos antes de Cristo pelos gregos, egípcios, fenícios e chineses em práticas diversas como extração do ouro, como pigmentos em tintas e pinturas rupestres e aplicação na clínica médica (SCHROEDER; MUNTHE, 1998).

Dentre todos os metais pesados lançados na natureza pelo aporte antrópico, o mercúrio é considerado altamente tóxico por ser bioacumulativo e persistente no ambiente. Mercúrio e seus compostos têm sido utilizados, durante muitos anos, em vários setores econômicos. Podem ser empregados como fungicidas e pesticidas na agricultura; antissépticos e conservantes de vacina nas indústrias farmacêuticas; amálgamas dentárias na odontologia; como catalisadores no preparo de cloreto de vinila nas indústrias químicas. É utilizado também na extração de ouro nos garimpos, na produção de lâmpadas fluorescentes; na produção de tintas e corantes e em instrumentos de medição como termômetros e barômetros, por exemplo.

Na natureza, o mercúrio pode ser encontrado sob três estados de oxidação: mercúrio metálico ou elementar (Hg^0), o qual se encontra principalmente na forma

gasosa e distribuído amplamente na atmosfera, e duas formas oxidadas, o íon mercurioso (Hg^{2+}) e o íon mercúrico (Hg^{2+}), ambas formam sais de mercúrios que são as espécies inorgânicas, predominantes em sistemas aquáticos. O mercúrio também pode se apresentar nas formas metiladas constituindo assim as espécies orgânicas, cujas características como lipossolubilidade, estabilidade e propriedade iônica são os mais relevantes do ponto de vista toxicológico. Estas diferentes espécies de mercúrio apresentam solubilidade, reatividade e propriedades tóxicas distintas, as quais causam diferentes impactos ao ambiente e a saúde do homem. Os compostos orgamercuriais como metilmercúrio (CH_3Hg ou MeHg) e dimetilmercúrio ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}$) são os mais comuns encontrados em ambientes naturais (HORVAT, 1996; SCHROEDER; MUNTHE, 1998; ATSDR, 1999; WHO, 2000, UNEP, 2002).

Mercúrio elementar, compostos de Hg^{2+} , metilmercúrio e dimetilmercúrio podem ser interconvertidos e transportados entre os compartimentos ambientais e os organismos neles presentes em processo natural chamado ciclo biogeoquímico (MOREL *et al.*, 1998). A mobilidade e reatividade do mercúrio no ambiente dependem da forma química que ele se encontra. À medida que circula entre a atmosfera, a terra e a água, o mercúrio sofre uma série de transformações físicas e químicas complexas, muitos das quais não estão completamente esclarecidos (US EPA, 1997).

Mercúrio elementar (Hg^0), forma gasosa, encontra-se predominantemente na atmosfera podendo ser emitido por fontes naturais ou antrópicas (LINDBERG *et al.* 1987). Devido à sua reatividade e solubilidade baixa em água pura, o mercúrio tem longo tempo de residência na atmosfera da ordem de um a dois anos, podendo ser transportado por grandes distâncias das fontes de origem. De fato, o mercúrio é um poluente global que afeta não somente áreas de intensas atividades industriais, mas também áreas remotas (SCHROEDER; MUNTHE, 1998; MUNTHE; MCELROY, 1992).

O mercúrio elementar Hg^0 pode sofrer reações de oxidação e gerar mercúrio mercúrico (Hg^{2+}), forma mais solúvel em água e pode ser facilmente removido da atmosfera por precipitação, depositando-se nas superfícies terrestres (água, solo e vegetação). A partir destas superfícies, o mercúrio pode retornar à atmosfera, na sua forma gasosa, após reações de redução, por processos químicos, fotoquímicos e/ou biológicos (SCHROEDER; MUNTHE, 1998).

Nas superfícies das águas, solo e sedimento, Hg^{2+} pode ser convertido em metilmercúrio ou dimetilmercúrio por processos químicos e, principalmente biológicos. Metilmercúrio também conhecido como MeHg é a espécie mais tóxica de mercúrio devido a sua capacidade de se bioacumular nos organismos, biomagnificando-se ao longo da cadeia alimentar a concentrações muito maiores que as encontradas nas águas superficiais. Assim, organismos que se encontram no topo da cadeia alimentar, como por exemplo, peixes predadores atingem concentrações máximas deste composto podendo chegar à ordem de até um milhão de vezes que o ambiente em que vivem. Em alguns pescados, 90% do mercúrio total presente encontra-se na forma metilada (RAVICHANDRAN, 2004). Isto ocorre porque a lipossolubilidade do metilmercúrio permite sua rápida difusão, atravessando facilmente membranas biológicas e acumulando-se nos tecidos da biota aquática. Portanto, a metilação do mercúrio constitui a primeira etapa do processo de bioacumulação aquática, disponibilizando para a cadeia alimentar a forma mais tóxica deste metal (BISINOTI; JARDIM, 2004).

A metilação do mercúrio ocorre pela transferência de um ou mais agrupamentos metil ao mercúrio inorgânico. A concentração de metilmercúrio no ambiente depende do balanço entre metilação e a desmetilação microbiótica. A taxa de metilação biótica do mercúrio é influenciada por uma variedade de fatores ambientais, como: temperatura, pH, potencial redox do meio, quantidade de matéria orgânica e da concentração de mercúrio biodisponível aos microorganismos (COMPEAU; BARTHA, 1984).

Do ponto de vista ecotoxicológico, ambientes aquáticos são os principais meios pelos quais a contaminação por mercúrio apresenta maior risco para a saúde humana e de animais. Em última instância, ingestão de alimentos contaminados, principalmente a de peixes faz este composto químico ser reconhecido como maior problema de poluição ambiental nas últimas décadas. Nenhum outro metal pesado despejado no meio ambiente causou grandes desastres ecológicos como o mercúrio e seus compostos.

1.2 MERCÚRIO NO MUNDO

O mercúrio é poluente altamente tóxico e reconhecido mundialmente como ameaça para a saúde humana e meio ambiente nos últimos tempos. É um metal pesado, cujas características como baixa reatividade no meio ambiente, alta hidrofobicidade e grande tendência para se bioacumular nos tecidos dos organismos vivos, o inclui na lista das substâncias tóxicas persistentes que tem sido um desafio global para as entidades internacionais.

Segundo relatório em 2002 elaborado pelo Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA/UNEP) com apoio financeiro do Fundo Mundial para o Meio Ambiente (GEF), concluiu-se que mercúrio e seus compostos são poluentes de impactos globais adversos para a saúde e para o meio ambiente, que requerem ação mundial, a fim de adotar medidas de redução ou até mesmo eliminação destes compostos das fontes antropogênicas (UNEP, 2002).

O mais novo relatório produzido pela UNEP fornece informações disponíveis para todos, sobre as emissões do mercúrio atmosférico, lançamentos para o ambiente aquático, transportes e seus destinos no meio ambiente. Estima-se que cerca de 1960 toneladas das emissões de mercúrio para a atmosfera sejam provenientes de fontes antropogênicas, o que equivale a 30% das emissões globais do mercúrio. A maior proporção de emissões de mercúrio para atmosfera de atividades antrópicas vem da Ásia, que contribui com quase metade de todo mercúrio lançado mundialmente. Isto se deve principalmente a utilização deste metal na extração do ouro em pequena escala e queima de carvão para gerar energia, principalmente. Fontes geológicas naturais correspondem a 10% e os 60% restante são de reemissões de mercúrio lançado anteriormente que se acumulou ao longo de décadas em solos superficiais e oceanos. Neste estudo conclui-se que as emissões do mercúrio para o ambiente praticamente dobraram desde 2005 com a prática da mineração do ouro. Em regiões da África-subssariana e América do Sul as emissões de mercúrio também aumentaram pelo mesmo motivo (UNEP, 2013).

A avaliação da UNEP de 2013 inclui informações, pela primeira vez, sobre o

lançamento e os impactos do mercúrio em ambientes aquáticos. O ambiente aquático é a principal via de exposição ao homem e a vida selvagem (MORAIS *et al.*, 2012). Mesmo regiões muito distantes como o Ártico, sem significativas emissões de mercúrio pela atividade humana, estão sendo afetadas. Isto porque o mercúrio pode alcançar longas distâncias da fonte geradora e persistir, por muitos anos, no meio ambiente onde circula entre os compartimentos atmosféricos, terrestres e aquáticos (SCHROEDER; MUNTHE, 1998). Estima-se que fontes antrópicas tenham lançado pelo menos 1000 toneladas de mercúrio por ano no ambiente aquático. Neste cálculo estão inclusos a mineração do ouro, em sua maioria, seguida do desmatamento e instalações industriais.

Nos últimos cem anos, as emissões antropogênicas dobraram a quantidade de mercúrio nos primeiros 100 metros de profundidade dos oceanos. As concentrações deste metal aumentaram 25% em águas intermediárias e 10% em águas profundas. Em algumas espécies de animais marinhos do Ártico, o conteúdo de mercúrio aumentou 12 vezes, em média, desde o período pré-industrial. Este aumento implica que, mais de 90% do mercúrio nesses animais marinhos são atribuídos à atividade humana no século passado (UNEP, 2013).

Ambientes aquáticos têm sido alvos de muitas pesquisas e têm despertado preocupação em escala mundial, pois representam as principais vias de exposição ao homem e aos demais seres vivos. O consumo de alimentos contaminados principalmente peixes, invertebrados entre outros com alto teor de metilmercúrio, a forma mais tóxica deste metal foi responsável por danos irreversíveis ao homem jamais imaginados.

Um dos casos mais famosos de contaminação por metilmercúrio, de repercussão mundial, ocorreu na Baía de Minamata, sudoeste do Japão, na década de 50. A indústria química Chisso Fertiliser Coporation que produzia fertilizantes, resinas sintéticas e plásticos despejava metilmercúrio, um subproduto do processo de acetaldéido, nas águas da Baía, contaminando a biota marinha, chegando até a população local pela ingestão de peixes e frutos do mar. Na época em que as pessoas começaram apresentar os sintomas decorrentes do mercúrio, não era sabido qual era a verdadeira causa e, então denominaram de “Doença de Minamata”. Estima-se que esta

indústria tenha lançado ao mar em torno de 200 a 600 toneladas metilmercúrio, até a interrupção do uso deste processo de produção de acetaldeído em 1968 (JARDIM, 1988). O número de mortes chegou a 20% e o de vítimas graves com sequelas neurológicas ultrapassou 2000 e mais de 8000 com sintomas de contaminação (HARADA, 1995). Alguns dos sintomas apresentados pelas vítimas do envenenamento mercurial incluem descontrole dos membros, perda de equilíbrio, tremores e diminuição da sensibilidade, constrição no campo visual, surdez, retardo mental, danos cerebrais, distúrbios de desenvolvimento, convulsões e distúrbios metabólicos (SAKAMOTO *et al.* 2001).

A partir deste episódio, a percepção da toxicidade do mercúrio decorrente da contaminação de pescados pelo seu efeito bioacumulativo, não apenas para o homem, mas para toda a biota, passou a ser conhecido mundialmente. Ficou evidente que a exposição ao mercúrio promove graves danos à saúde, tendo seu efeito mais devastador, principalmente, no desenvolvimento do sistema nervoso central e sistema fisiológico geral de crianças (COUNTER; BUCHANAN, 2004).

Outros acidentes relevantes ocorreram no Iraque (1956) e na Guatemala (1972) devido ao uso de pesticida contendo metilmercúrio no tratamento de sementes para o plantio. Registraram-se vários casos de intoxicação pela população que consumiram estas sementes para fabricação de pão caseiro, permitindo confirmar o problema do uso indiscriminado de mercúrio (AZEVEDO, 2003).

No Brasil, o risco de contaminação pelo uso de mercúrio dos ambientes aquáticos é alvo de preocupação na área ambiental e da saúde pública. Estima-se que descargas antropogênicas tenham sido em torno de 100 toneladas anuais na década de 70 e início da década de 80, com o desenvolvimento industrial brasileiro (LACERDA; MENESES, 1995). A crescente instalação de indústrias de cloro-soda, química, farmacêutica e eletro-eletrônicos predominante na região sudeste e a corrida do ouro nas regiões norte e centro-oeste do país caracterizaram as principais fontes distintas de mercúrio no território brasileiro (LACERDA, 1997). Nesta época, o Brasil tornou-se o quarto produtor mundial de ouro. Para suprir essa demanda, cerca de 200 toneladas de mercúrio era importado por ano, sendo que a metade era destinada ao mercado garimpeiro, particularmente os estados do Pará, Rodônia e Mato Grosso (PIRES *et al.*

1988).

Neste contexto, a região Amazônica é considerada região de amplo risco e, conseqüentemente, alvo de estudos nas últimas três décadas para pesquisadores que se propuseram investigar o comportamento do mercúrio e sua toxicidade nesta região (FADINI; JARDIM, 2001). Além das atividades de extração do ouro nos garimpos, houve um importante desmatamento para o desenvolvimento da agricultura realizado pela população local. Assim, o mercúrio lançado no ecossistema aquático proveniente das atividades minerais e a lixiviação dos solos após o desmatamento são considerados os principais fatores para a contaminação desse ecossistema (ROULET *et. al*, 1998).

Na atividade do garimpo de ouro o mercúrio é utilizado para amalgamar o ouro encontrado nos sedimentos. A liga metálica Hg-Au formada é aquecida posteriormente, liberando grande quantidade do mercúrio, por volatilização, para a atmosfera e parte é perdida na forma de mercúrio metálico nos meios aquáticos (LACERDA; MENESES, 1995). Para cada 1 kg de ouro produzido, em média cerca de 2 kg de mercúrio são perdidos para o ambiente. Este processo ocasiona a contaminação por mercúrio em diferentes compartimentos do meio ambiente (PFEIFFER, 1989).

Estudos têm sido realizados na região Amazônica e através de análises de sedimentos, de peixes de hábitos carnívoros, como em amostras de cabelo das populações de diferentes comunidades ribeirinhas. Os resultados demonstram altos teores de mercúrio, os quais foram atribuídos às atividades de garimpos de ouro (AKAGI *et. al*, 1995; MALM, *et al.*, 1995). Muitos dos peixes avaliados apresentaram níveis de mercúrio total acima do limite recomendável para o consumo humano pela Organização Mundial de Saúde, ou seja, acima de $0,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ (PINHEIRO *et. al*, 2000). De fato o consumo de peixe por essa população é a principal fonte de alimento diário, o que torna viável a exposição e contaminação humana pelo consumo de pescados contaminados.

Atualmente, com a política de redução da emissão de mercúrio para o ambiente, principalmente, pelos pólos industriais através de regulamentos e uma legislação de controle mais eficiente, implementados a partir da década de 90, o consumo industrial de mercúrio vem caindo substancialmente (LACERDA, 1997). Entretanto, há uma

grande dificuldade de fiscalização dos órgãos competentes para os diferentes setores econômicos onde o mercúrio é utilizado. Além disso, os garimpos de ouro ainda representam a maior fonte de emissão deste contaminante, embora esta atividade tenha se reduzido muito na última década (SANTOS *et. al.*, 2000).

1.3 TOXICIDADE DO MERCÚRIO

De acordo com a *Agency for Toxic Substances and Diseases Registry* (ATSDR) dos Estados Unidos, o mercúrio é listado como a terceira substância mais tóxica. Esta agência federal elaborou uma grande lista conhecida como *Priority List of Hazardous Substances*, na qual o mercúrio está incluso como um dos poluentes altamente tóxicos para a saúde humana, apenas perdendo o *ranking* para o arsênio e chumbo (ATSDR, 2011).

A toxicidade do mercúrio no organismo depende das diferentes espécies de mercúrio que se podem apresentar, da quantidade, duração e rota de exposição. O mercúrio elementar (Hg^0) e os compostos inorgânicos de mercúrio têm menor toxicidade que os compostos organometálicos (PARK; ZHENG, 2012).

O mercúrio elementar, na sua forma líquida, é pouco absorvido e apresenta riscos mínimos para a saúde se ingerido (biodisponibilidade de menos de 0,01%) ou em contato com a pele. Contudo, quando inalado, cerca de 80% do vapor de mercúrio é imediatamente absorvido nos alvéolos pulmonares e têm sido responsável por inúmeros casos de contaminação via exposição ocupacional, muito comum nos garimpos de ouro e fábricas de lâmpadas fluorescentes (CLARKSON *et al.*, 2007, WHO, 1991). Após sua absorção pelos pulmões, dois terços do mercúrio é transportado através da corrente sanguínea para demais tecidos, principalmente cérebro e rins (CLARKSON; MAGOS, 2006). Uma vez no corpo, o mercúrio metálico pode permanecer por semanas a meses. Devido as suas características de alta difusibilidade e solubilidade em lipídios, mercúrio elementar pode atravessar livremente as barreiras hematoencefálica e placentária (ATSDR, 1999). Os eritrócitos, cérebro, fígado e rins são sítios de rápida oxidação do

mercúrio elementar a forma inorgânica bivalente (Hg^{2+}) pelo sistema enzimático catalase-hidrogênio peroxidase. Urina e fezes são as principais vias de excreção de ambas as formas de mercúrio, embora pequena quantidade de vapor mercúrio inalado possa ser eliminada na respiração, suor e saliva. Hg^{2+} é menos lipossolúvel que o mercúrio elementar e impermeável às barreiras hematoencefálica e placentária. Portanto toda forma inorgânica bivalente acumulada no cérebro, provavelmente deriva da oxidação do mercúrio elementar, após ligar-se fortemente a selênio ou a grupos SH, os quais contribuem para os depósitos neste tecido e assim permanecer por longos períodos (PARK; ZHENG, apud FRIBERG; MOTTET, 2012).

Após inalação de vapor de mercúrio são observados em humanos distúrbios neurológicos e comportamentais. Os sintomas incluem tremores, irritabilidade, excitação, nervosismo, insônia, alterações musculares, dores de cabeça, parestesia, perda de memória em teste de déficits cognitivos. Danos na mucosa da boca, tosse, náuseas, vômitos e aumento da pressão arterial também são sintomas observados em casos de intoxicação aguda. Em concentrações mais elevadas, pode causar disfunção pulmonar e renal, alteração na visão e surdez (ATSDR, 1999; UNEP 2002).

A contaminação por compostos de mercúrio inorgânico (sais de mercúrio inorgânico) é dada principalmente pela ingestão e apenas cerca de 7% a 15% destes são absorvidos no trato gastrointestinal dependendo da espécie envolvida (ATSDR, 1999). Sais de mercúrio são geralmente sólidos e não solúveis, portanto a contaminação por inalação é rara.

Intoxicação por sais de mercúrio inorgânico tem como alvos principais o trato gastrointestinal e os rins. Alguns dos sintomas são: dor abdominal, náuseas, diarreia com sangue, úlceras severas e até mesmo morte decorrente de choque séptico ou hipovolêmico. Toxicidade renal pode envolver necrose tubular renal e glomerulonefrite autoimune (ATSDR, 1999; BERNHOFT, 2012). Há poucas informações sobre os efeitos destes compostos mercuriais em humanos em casos de exposição em longo prazo e em baixas concentrações de mercúrio inorgânico (ATSDR, 1999).

Metilmercúrio (MeHg), composto organomercurial, é a forma mais tóxica de mercúrio por bioacumular-se e ampliar-se ao longo da cadeia alimentar em ambientes aquáticos. Compostos de metilmercúrio podem ser absorvidos por inalação bem como

pela pele. Vapores de sais de metilmercúrio rapidamente penetram os alvéolos pulmonares e estima-se que aproximadamente 80% são absorvidos (BERLIN *et al.*, 2007). No entanto, a principal via de exposição humana ao MeHg é dada pela ingestão de alimentos contaminados, principalmente peixes, frutos do mar e derivados. Uma vez ingerido, cerca de 95% do metilmercúrio é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal (ATSDR, 1999). Parte do MeHg é metabolizado a mercúrio inorgânico pela microflora bacteriana local e sua excreção ocorre principalmente via fecal (90%) após excreção biliar e absorção intestinal. A eliminação de MeHg também ocorre através da urina e ainda via leite materno. Cerca de 5% do metilmercúrio que não foi excretado é acumulado na corrente sanguínea, 10% estão distribuídos no cérebro, podendo acumular-se também em outros órgãos como rins e fígado (CLARKSON, 2002; BERLIN, 2007).

A lipossolubilidade do MeHg permite rápida distribuição por todo o corpo, atravessando facilmente as barreiras placentária e cerebral causando lesões irreparáveis ou fatais ao organismo, tendo como alvo principal o tecido nervoso. O metilmercúrio é, portanto a forma química mais neurotóxica do mercúrio (ATSDR, 1999; US EPA, 2001).

A mobilidade do MeHg no organismo ocorre ao formar um complexo proteico, devido à sua alta afinidade por compostos sulfidrilas (-SH) presentes em aminoácidos ou peptídeos como cisteína e glutatona. No plasma, o complexo formado é então transportado ativamente através das membranas biológicas principalmente como L-cisteína via transportadores de aminoácidos neutros. O conjugado formado metilmercúrio-cisteína (CH₃Hg-S-Cys) mimetiza um aminoácido neutro, estruturalmente muito semelhante à metionina (CLARKSON *et al.*, 2007; BERLIN *et al.*, 2007). Sua distribuição no organismo é lenta e leva aproximadamente cinco dias para chegar ao equilíbrio. Cerca de 20% do metilmercúrio presente no cérebro é solúvel em água e encontrado principalmente conjugado a glutatona (MeHg-GSH).

O principal alvo do metilmercúrio é o sistema nervoso central (SNC) maduro ou em desenvolvimento. É sabido que cérebro de feto é mais susceptível aos efeitos neurotóxicos deste composto mercurial que cérebro adulto (CLARKSON, 2002). Por exemplo, a concentração de MeHg no cérebro fetal é cerca de 5 a 7 vezes maior que

no sangue materno (GUZZI; PORTA apud CERNICHIARI *et al.*, 2008). No caso de Minamata, onde mulheres grávidas expostas às baixas concentrações de MeHg através da ingestão de peixes contaminados mesmo sem apresentar quaisquer dos sintomas de intoxicação tiveram seus filhos com distúrbios neurológicos como retardo mental, déficits no desenvolvimento motor e no desenvolvimento da linguagem (WHO, 1990).

No adulto ele se acumula no SNC resultando em degeneração e atrofia do córtex sensorial cerebral, parestesia, ataxia e impedimentos visuais e auditivos (NINOMIYA *et al.*, 1995). Em crianças, a exposição leva a efeitos semelhantes à paralisia cerebral (WAGNER *et al.*, 2007), caracterizada por ataxia motora com hipoplasia e atrofia simétrica do cérebro e cerebelo. Esses sinais e sintomas são causados pela perda de células neuronais em regiões específicas do cérebro em adulto, como camada granular do cerebelo e camada granulosa do córtex calcarino (córtex visual). Diferentemente, o cérebro em desenvolvimento é caracterizado por perda neuronal generalizada e difusa do SNC. Além disso, metilmercúrio também pode causar danos hepáticos e renais, hipertensão, distúrbios metabólicos entre outros efeitos adversos ao organismo (WHO, 1990).

Atualmente não é conhecido o sítio inicial das lesões do SNC nem tão pouco as bases moleculares das lesões. No SNC de mamíferos, os astrócitos são o sítio de acumulação preferencial de MeHg (ASCHNER *et al.*, 1990), bem como o principal alvo das lesões decorrentes da acumulação de MeHg (ASCHNER *et al.*, 1999). Entre as alterações causadas pelo MeHg em astrócitos destacam-se a inibição da captação de glutamato (DAVE *et al.*, 1994), edema (GARMAN *et al.*, 1975), liberação de aminoácidos excitatórios (ASCHNER *et al.*, 1998) e aumento da captação de Na⁺, acarretando o edema celular (VITARELLA *et al.*, 1996).

Os principais mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade do metilmercúrio são devidos a sua alta afinidade por grupos sulfidrilas (-SH) levando a alterações conformacionais e funcionais de proteínas alvos (CASTOLDI *et al.*, 2001). Exposição ao MeHg pode levar a inibição da síntese proteica, assim como, interferir na síntese de macromoléculas como DNA e RNA (BERLIN *et al.*, 2007). Outros efeitos causados por este metal incluem: desorganização dos microtúbulos, cujas integridades são críticas para migração neuronal e desenvolvimento do SNC (SYVERSEN; KAUR, 2012);

aumento de Ca^{2+} intracelular com alteração da atividade mitocondrial, podendo prejudicar função sináptica e desenvolvimento neural (CECCATELLI *et al.*, 2010). Além disso, a toxicidade do metilmercúrio também tem sido atribuída à indução do estresse oxidativo ou pelo aumento na produção espécies reativas de oxigênio (ROS) ou pela redução da capacidade de defesa oxidativa do organismo ou ambos, levando a danos celulares e a morte celular por apoptose ou necrose (NASCIMENTO *et al.*, 2008).

1.4 GLIOSE DAS CÉLULAS DE MÜLLER

Os efeitos tóxicos no sistema visual em humanos decorrentes da intoxicação mercurial foram documentados em indivíduos com a doença de Minamata, os quais apresentavam em sua maioria: constrição do campo visual (EKINO *et al.*, apud IWATA, 2007; HARADA, 1995) e redução da sensibilidade ao contraste espacial, cujos sintomas foram relacionados com depósitos de mercúrio em áreas afetadas, particularmente nas fissuras calcarinas do córtex visual (KOROGI *et al.*, 1997). Observou-se perda na visão de cores em trabalhadores expostos ao mercúrio na produção de instrumentos de precisão (GOBBA; CAVALLERI, 2003). Além disso, estudos sobre os efeitos do metilmercúrio relataram disfunções da visão central com perda da sensibilidade ao contraste acromático para modulação espacial e temporal (LEBEL *et al.*, 1998, VENTURA *et al.*, 2004).

Após exposição crônica, o mercúrio se acumula em diversas estruturas oculares, particularmente na retina e no epitélio ciliar ocular (WARFVINGE; BRUUN, 1996). Os efeitos do mercúrio na retina têm sido estudados (TANAN *et al.*, 2006, VENTURA *et al.*, 2004; MELA *et al.*, 2010), mas as bases moleculares das alterações observadas são pobremente conhecidas.

Vários são os estudos que se propuseram investigar os prejuízos decorrentes da intoxicação mercurial ao sistema visual em diferentes modelos experimentais (WARFVINGE; BRUUN, 1996; VENTURA *et al.*, 2004), mas não há nenhum relato até o momento de seus efeitos sobre as células gliais da retina, particularmente as células de

Müller.

A célula de Müller é a principal célula da glia em retina de vertebrados e em retinas avasculares, o único tipo de macróglia presente. As funções da célula de Müller estão relacionadas ao suporte metabólico e nutricional dos neurônios, homeostase da água e potássio, sinalização neuronal, reciclagem de fotorpigmentos, estocagem e liberação de substâncias neuroativas e vasoativas. Destaca-se também a proteção contra o estresse oxidativo pela produção de glutatona.

A gliose ou ativação das células de Müller é resposta bem conhecida às agressões na retina, tais como o descolamento da retina, retinopatias proliferativas, retinopatia diabética, glaucoma, processos inflamatórios e de isquemia-reperfusão (BRINGMANN *et al.*, 2006). Esse processo é caracterizado por hipertrofia celular, proliferação e alterações na expressão gênica para proteção ou reparação tecidual após lesão retiniana. Células de Müller protegem os neurônios após dano, pela liberação de fatores neurotróficos e neutralização de radicais livres, captação de glutamato e facilitação de neovascularização (BRINGMANN *et al.*, 2006, 2009).

A resposta não específica mais sensível às doenças e danos da retina é a regulação positiva do filamento intermediário GFAP (proteína ácida fibrilar glial). Outra resposta à gliose reativa é a ativação das ERKs (quinases reguladas por sinais extracelulares) que podem ser observadas durante descolamento de retina, isquemia-reperfusão de retina, glaucoma (GELLER *et al.*, 2001, AKIYAMA *et al.*, 2002, TEZEL *et al.*, 2003), assim como, durante estresse oxidativo (BAYDAS *et al.*, 2004). Além destes marcadores não específicos, várias publicações têm relatado alterações no perfil de diversos genes nas células de Müller nas retinopatias. Na retinopatia diabética há o aumento na expressão de diversos genes de proteínas de fase aguda, tais como a transferrina, a ceruloplasmina, a lipocalina-2, a metioneína-1 e a transtirretina entre outras. O aumento de tais proteínas está relacionado com o metabolismo de ferro e no controle na geração de radicais livres (GERHARDINGER *et al.*, 2005). Um dos efeitos do mercúrio sobre os astrócitos é o aumento na geração de radicais livres (SHANKER *et al.*, 2004). O epitélio ciliar ocular, além de secretar o humor aquoso, expressa várias proteínas relacionadas ao controle do estresse oxidativo (ROSE *et al.*, 1998), incluindo a transferrina e a ceruloplasmina (BERTAZOLLI-FILHO, 2003; BERTAZOLLI-FILHO *et*

al., 2006). O controle da geração de radicais livres na retina é de grande importância uma vez que o estresse oxidativo está relacionado com o aumento no processo de apoptose, que é a base de uma série de retinopatias (SIU *et al.*, 2008).

1.5 GLIOSE COMO MODELO EXPERIMENTAL

Segundo a literatura, os estudos experimentais com animais utilizam doses mercuriais bastante variadas, desde doses muito elevadas e muitas vezes superiores às concentrações em que o homem é exposto na natureza a doses menores, cujo objetivo é avaliar o efeito acumulativo e sua toxicidade ao longo do tratamento.

O sistema visual é importante alvo da intoxicação mercurial e seus efeitos prejudiciais são conhecidos e mencionados na literatura desde a década de 70 nos indivíduos com diagnóstico da doença de Minamata. O comprometimento da visão é considerado problema de saúde pública e, muitas vezes, incapacitando o indivíduo de trabalhar e levando a perda na qualidade de vida.

Até o momento, nenhum modelo de gliose do tecido retiniano em animal experimental foi estabelecido. Como mencionado anteriormente, gliose das células Müller é resposta comum às agressões da retina e está onipresente nas diversas retinopatias. A pergunta que se faz é se a intoxicação mercurial promove gliose das células de Müller. Estalecer este modelo experimental permitirá melhor compreensão dos danos adversos causados na retina pela intoxicação mercurial.

1.6 MERCÚRIO E ESTRESSE OXIDATIVO

Estresse oxidativo caracteriza-se pelo desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes, cujo evento ocorre em condições fisiopatológicas com aumento de radicais livres e/ou diminuição nas defesas antioxidantes endógenas. Nesta situação,

os radicais livres podem interagir com componentes celulares como ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos causando danos moleculares (SCANDALIOS, 2005). Um radical livre refere-se a um átomo ou molécula altamente reativo que contém um ou mais elétrons desemparelhados na última camada de valência como, por exemplo, o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}) e o óxido nítrico (NO) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). O termo radical livre não é totalmente adequado, pois há algumas espécies químicas que não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada de valência, mas são agentes oxidantes. Essas substâncias são classificadas de maneira ampla como espécies reativas de oxigênio (ROS) ou espécies reativas de nitrogênio (RNS) como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$) (DRÖGE, 2002).

Várias evidências sugerem que as ROS e as RNS estão envolvidas na patogênese de muitas doenças neurodegenerativas, aterosclerose, doenças autoimunes, doenças inflamatórias, câncer, diabetes, bem como no processo de envelhecimento (SCHULZ *et al.*, 2000, DRÖGE, 2002; VALKO *et al.*, 2007). Contudo, em condições fisiológicas, as espécies reativas são críticas para a manutenção de muitas funções biológicas, podem participar em vias de sinalização intracelular para a diferenciação celular e apoptose, na imunidade e na defesa contra microorganismos. Muitas ROS são formadas como subprodutos do metabolismo aeróbico pela cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias, numa sequência de reações de oxirredução. Nesse processo, os passos intermediários da redução do oxigênio resultam na formação do radical ânion superóxido, não radical peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Outras fontes de ROS são: reações de Fenton, enzimas do citocromo P450, beta-oxidação peroxissomal e *burst* respiratório de células fagocíticas. Além disso, fontes externas como dieta, poluentes ambientais, radiação ultravioleta, envelhecimento e exercício realizado de forma extrema podem resultar na produção de ROS (DRÖGE, 2002, VALKO *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo tem papel crítico relacionado aos efeitos neurotóxicos provocados pelos compostos mercuriais. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm sugerido que o mercúrio pode exercer seus efeitos tóxicos via produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e redução de antioxidantes intracelulares, principalmente de glutathione

reduzida (GSH) em diferentes tipos celulares (SHANKER *et al.*, 2005; KAUR *et al.*, 2006). A alta afinidade do mercúrio por compostos sulfidrílicos e sua natureza pró-oxidante ao interagir com diferentes biomoléculas pode ser responsável, ao menos em parte, pela capacidade antioxidante reduzida e produção aumentada de ROS (ASCHNER *et al.* 2010; KAUR *et al.*, 2006).

Inúmeros estudos utilizando culturas de células neuronais e gliais expostas ao MeHg têm mostrado aumento na produção de ROS (YEE; CHOI, 1996, SHANKER *et al.*, 2004) e depleção de GSH, importante antioxidante intracelular não-enzimático (SARAFIAN *et al.*, 1994, SHENKER *et al.*, 1999, SHANKER *et al.*, 2005, KAUR *et al.*, 2006). É notável que MeHg acumula-se preferencialmente em astrócitos. Estas células além de apresentar maiores concentrações de GSH em seus compartimentos, eliminam com mais eficiência o MeHg intracelular e, portanto, são mais resistentes que células neuronais aos seus efeitos neurotóxicos (MIURA; CLARKSON, 1993).

Metilmercúrio altera também a atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (PINHEIRO *et al.*, 2007), além de aumentar a produção de ROS, especialmente H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ promove a peroxidação lipídica, ou seja, oxidação das bicamadas lipídicas (SHENKER *et al.*, 1999, YONAHARA *et al.*, 1983).

Estudos apontam que a atividade mitocondrial pode ser alterada após exposição ao MeHg (SHANKER *et al.*, 2005, USUKI *et al.*, 2008), podendo inibir complexos proteicos da cadeia respiratória mitocondrial e contribuir para despolarização mitocondrial. Estas alterações mitocondriais provocadas por MeHg também têm sido associadas com aumento na produção de estresse oxidativo nestas organelas (YEE; CHOI, 1996) que, em última instância, podem exacerbar os efeitos tóxicos deste metal atacando outros compartimentos subcelulares e ainda promover cascata de eventos que levam à apoptose (FARINA *et al.*, 2011).

Apoptose ou morte celular programada é evento altamente regulado e geneticamente determinado, essencial para a manutenção do desenvolvimento e homeostase tecidual de todos os organismos multicelulares. Além disso, proporciona mecanismo de defesa por meio do qual células lesadas ou potencialmente perigosas podem ser eliminadas para o bem do organismo como um todo. Por outro lado, o processo de apoptose encontra-se alterado em várias condições patológicas tais como,

doenças inflamatórias, autoimunes, neurodegenerativas e câncer (RAMÍREZ *et al.*, 1999). Uma variedade de estímulos podem desencadear a apoptose como calor, radiação, hipóxia e muitos compostos tóxicos. Há evidências que metais pesados incluindo MeHg podem induzir apoptose em células neuronais em modelos tanto *in vivo* (NAGASHIMA *et al.*, 1996) como *in vitro* (CASTOLDI *et al.*, 2000).

Resumidamente, morte celular via apoptose é caracterizada morfológicamente pela presença de condensação e fragmentação da cromatina nuclear, quebra do DNA cromossomal e formação de corpos apoptóticos contendo fragmentos de célula morta e membrana plasmática íntegra. Esses corpos apoptóticos são quimicamente atraídos por células fagocíticas que os engolfam rapidamente sem causar resposta inflamatória (PAPALIAGKAS *et al.*, 2007, FAVALORO *et al.*, 2012). Estas alterações morfológicas são mediadas, bioquimicamente, por uma família de proteases que têm cisteína no seu sítio ativo, conhecidas como caspases. A apoptose pode ocorrer por duas vias principais: extrínseca e intrínseca. A via extrínseca é controlada pela caspase 8 ou pela caspase 9 (caspases iniciadoras). É mediada por estímulo de sinais extracelulares que se ligam a receptores específicos denominados receptores de morte (TNF, TNFR1, TRAMP, TRAIL e Fas) na superfície celular, ativando caspases específicas que iniciam uma cascata de reações que culminam com a degradação de proteínas citoplasmáticas e do DNA, levando à morte celular (KUMAR, 1999). A via intrínseca, também conhecida como via mitocondrial, é ativada em resposta a hipóxia, produção de ROS, dano no DNA, entre outros. Nesta via o potencial de membrana da mitocôndria é alterado e a produção de ATP cessada, levando à liberação do citocromo c e consequente ativação da caspase 9 (caspase iniciadora) que ativarão a cascata proteolítica das caspases no citoplasma, levando à apoptose (HAIL *et al.*, 2006). A via intrínseca é regulada pela família de proteínas Bcl-2, na qual estão inclusos membros pró-apoptóticos (Bax, Bak, Bcl-xs, Bok, Bad, Bik, Bid e Bim) ou anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1) (REUBOLD *et al.*, 2012).

O tecido retiniano, uma extensão do SNC, é exposto à luz de intensidades variadas uma vez que é especializado na percepção e no processamento visual e, portanto é altamente susceptível ao estresse oxidativo, portanto há um sistema de antioxidantes para a neutralização das espécies reativas neste tecido (TANITO *et al.*,

2002). Por outro lado, concentrações intracelulares de GSH na retina encontram-se reduzidas em várias condições patológicas tais como: retinopatia diabética, glaucoma e dano foto-oxidativo retinal (OBROSOVA *et al.*, 2000, MORENO *et al.*, 2004; TANITO *et al.*, 2002).

Sob condições de estresse, a regulação da expressão gênica de enzimas antioxidantes se dá principalmente pela ativação de fatores de transcrição como o Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*). Este está normalmente localizado no citoplasma, associado ao fator Keap1, sendo mantido em concentrações basais via processo de ubiquitinação e consequente degradação no proteossoma. A proteína Keap1 é sensível à ação de diversos agentes oxidantes entre os quais os radicais livres (ROS). Após a ação do ROS sobre os grupos sulfidrilas da Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), ocorre a dissociação dela com o Nrf2 e este migra para o núcleo. No núcleo o Nrf2 fica associado ao sMAF (*small Maf*), ligando-se às regiões promotoras contendo elementos de resposta antioxidante (ARE), o que determina a transcrição de um conjunto de genes de proteínas ligadas ao controle do estresse oxidativo (OSBURN; KENSLER, 2008). A ativação do Nrf2 foi observada no processo de detoxificação de MeHg em astrócitos (WANG *et al.*, 2009), em hepatócitos (TOYAMA *et al.*, 2007) e na neuroproteção da retina (TANITO *et al.*, 2007). Uma vez que o mercúrio se acumula em diversas estruturas oculares, particularmente na retina, nervo óptico e no epitélio ciliar ocular (WARFVINGE; BRUUN, 1996; MELA *et al.*, 2010), a análise da ativação da via Nrf2 no processo de resposta à intoxicação pelo mercúrio na retina se faz pertinente, focalizando especialmente na resposta glial.

1.7 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS (AGPIS)

Os ácidos graxos estão presentes em nossa alimentação e são ingeridos principalmente como triacilgliceróis. Dieta de lipídeos é fundamental para o desenvolvimento, crescimento e maturação do organismo (HORROCKS; YEO, 1999). Além de serem fonte energética, são também os principais constituintes das

membranas celulares, participam da comunicação celular como moléculas mensageiras e como hormônios esteróides e determinam compostos biologicamente ativos como os eicosanóides (CURI *et al.*, 2002).

Ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) são ácidos carboxílicos com longas cadeias de hidrocarbonetos, contêm ao menos duas duplas ligações e são classificados pela posição da primeira dupla ligação a contar do terminal metila (carbono ômega). Quando a inserção da primeira dupla ligação está no sexto carbono a partir do terminal metila, AGPIs são chamados de ômega-6, ω_6 , or n-6 e quando a primeira dupla ligação está inserida no terceiro átomo de carbono a partir do terminal metila, AGPIs são chamados de ômega-3, ω_3 , or n-3. Estas duas famílias de AGPIs n-6 e n-3 são consideradas as mais importantes e essenciais para o organismo. Seus precursores são o ácido graxo linoléico (LA, C18:2n-6) e o ácido graxo α -linolênico (ALA, C18:3n-3), respectivamente. A essencialidade dos ácidos graxos LA e ALA devem-se ao fato que estes não podem ser sintetizados pelo organismo e, portanto, os mesmos devem ser providos pela dieta. Em mamíferos, estas duas famílias (LA e ALA) competem pelo mesmo sistema enzimático na via metabólica, assim os ácidos graxos das duas famílias não podem ser interconvertidos (CALDER, 1997, THE BRITISH NUTRITION FOUNDATION, 1999).

Uma vez ingeridos, os ácidos graxos essenciais LA (um ácido graxo ômega-6) e ALA (um ácido graxo ômega-3) são metabolizados por ação de um conjunto de enzimas (alongases e dessaturases), em que novos carbonos e insaturações são adicionados à cadeia carbônica original, produzindo ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (acima de 12 átomos de carbonos) da mesma família. Enquanto o LA é metabolizado em ácido araquidônico (AA, C20: 4n-6), o ALA é metabolizado em ácidos eicosapentaenóico (EPA, C20:5n-3) e docosahexaenóico (DHA, C22:6n-3) (ROSE; CONNOLLY, 1999). É importante ressaltar que a família n-3 (ALA) apresenta maior afinidade pelas enzimas, assim, dieta rica em n-3 é capaz de diminuir a conversão do AL em AA, elevando a quantidade de EPA e DHA (HAUGE; CRISTOFFERSEN, 1984).

As principais fontes dos ácidos graxos n-6 (LA) são os óleos vegetais e sementes, como de milho girassol, açafrão e soja. O AA está presente em produtos animais, por exemplo, em carnes e gema de ovo. Enquanto que canola, linhaça, nozes

e plantas com folhas de coloração verde escuro são fontes de ácidos graxos n-3 (ALA). Os ácidos graxos n-3 de cadeia longa, principalmente EPA e DHA são encontrados em peixes de águas frias como atum, salmão, sardinha e também nos óleos de peixes (HARDMAN, 2004).

1.8 DHA E RETINA

DHA, ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa n-3 (AGPI n-3), é o principal constituinte dos fosfolípidos de membrana do cérebro humano e retina e, essencial para o funcionamento normal do sistema nervoso central (ANDERSON, 1970; GORDON; BAZAN, 1997; BRENNAN; DIAU, 2007; KIM, 2007).

Vários trabalhos publicados anteriormente, demonstraram que DHA e ácido araquidônico (AA) são requeridos para o rápido desenvolvimento de tecidos neuronais e vasculares (CRAWFORD, 1993). Em humanos, as proporções de DHA no cérebro fetal e retina elevam-se continuamente durante o último trimestre de gestação e durante o início da infância (CONNOR *et al.*, 1996). Juntos, DHA e AA perfazem mais 30% do conteúdo de fosfolípido do cérebro e retina (WELLS, 1998). Em retina de mamíferos, DHA representa cerca de 38% a 92% dos ácidos graxos poliinsaturados (MAKRIDES *et al.*, 1994).

DHA pode ser biossintetizado a partir de seu precursor, o ácido alfa-linolênico (ALA), através dos processos de alongação e desaturação de cadeias (CALDER, 1997; ROSE; CONNOLLY, 1999). Dada a falta de desaturases necessárias a estes processos, neurônios são incapazes de sintetizar o DHA (MOORE *et al.*, 1991). As principais fontes de DHA neuronal são fornecidas pelos astrócitos que estão em íntimo contato com os neurônios (KIM *et al.*, 1999; MOORE, 2001).

Na retina, embora ocorra a biossíntese de DHA, este processo é lento e pode ser insuficiente para sustentar a atividade dos fotorreceptores (WETZEL *et al.*, 1997). GORDON e BAZAN, (1997) e LI *et al.*, (2001) demonstraram em estudos experimentais que o fígado é o principal sítio do metabolismo de AGPI n-3 a partir de seu precursor

radiomarcado (ALA) injetado intraperitonealmente ou fornecido oralmente.

Fotorreceptores são células neuronais especializadas e diferenciadas com pilhas de discos membranosos no segmento externo que contém rodopsina, bem como outras proteínas. Esta porção externa do fotorreceptor é rica em fosfolipídeos sintetizados a partir de DHA que são mantidos constantemente mesmo durante longos períodos de privação de ácidos graxos n-3 (BAZAN, 2006; SANGIOVANNI; CHEW, 2005).

Alguns estudos experimentais têm demonstrado que em modelos transgênicos de retinose pigmentar em roedores (ANDERSON *et al.*, 2001) e degeneração progressiva de cones e bastonetes em cães estão associadas a depleção de estoques de DHA na porção do segmento externo dos fotorreceptores (AGUIRRE *et al.*, 1997). Por outro lado, na síndrome de Usher, estudos têm relatado a redução plasmática nas concentrações de DHA (BAZAN *et al.*, 1986).

As propriedades biofísicas e bioquímicas do DHA conferem a funcionalidade do segmento externo dos fotorreceptores da retina, as quais afetam funções de membrana por alterar a permeabilidade, fluidez, espessura, propriedades de fase lipídica e ativação de proteínas ligadas à membrana (LITMAN *et al.*, 2001, MITCHELL *et al.*, 2001). A estrutura estereoquímica do DHA com seus 22 átomos de carbonos e inserção de 6 duplas ligações na cadeia hidrocarboneto permite uma eficiente alteração conformacional da proteína transmembrana rodopsina (proteína acoplada a proteína G), em resposta a absorção de luz. Adicionalmente, a maior fluidez de membrana permite uma resposta mais rápida aos estímulos (MITCHELL *et al.*, 2003).

Um estudo demonstrou a capacidade do ácido docosahexaenóico (DHA) em reduzir a geração de radicais livres em astrócitos em cultura submetidos à intoxicação por mercúrio (KAUR *et al.*, 2008). Isto abre a possibilidade do uso do DHA como agente neuroprotetor na intoxicação de mercúrio, seja ocupacional, seja ambiental.

Dada a importância do DHA, como o principal constituinte dos fosfolipídeos de membrana do cérebro humano e retina e, essencial para desenvolvimento normal destes tecidos neuronais, torna-se interessante investigar se a suplementação com óleo de peixe rico em ácidos graxo poliinsaturados n-3 (EPA e DHA) tem efeito neuroprotetor na intoxicação por mercúrio.

2 JUSTIFICATIVA

Metilmercúrio é potente contaminante ambiental neurotóxico que tem sido problema de saúde pública nas últimas décadas. A elucidação dos processos fisiopatológicos oculares provocados pela intoxicação por mercúrio é de grande importância no tratamento das retinopatias, uma das causas mais frequentes de cegueira.

Até o momento, não existem informações disponíveis abordando os efeitos deste metal pesado sobre a retina, uma extensão do sistema nervoso central. Além disso, o desenvolvimento de um modelo de gliose retiniano poderia ser ferramenta útil para estudo de retinopatias. Associado a estes fatos, há ausência de estudos sobre a suplementação com óleo de peixe, ricos em AGPIs n-3 sobre os efeitos deletérios no sistema visual decorrentes da contaminação por mercúrio.

Visto o fato de não apresentar fontes de estudo para os efeitos neurotóxicos do mercúrio sobre a retina e os possíveis mecanismos de substâncias neuroprotetoras, se faz necessário investigar o papel do mercúrio no estabelecimento do modelo de gliose e o papel do óleo de peixe neste modelo estabelecido.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da exposição do mercúrio em retina de ratos albinos *Wistar*, com o estabelecimento de modelo de gliose retiniano. Além disso, investigar os efeitos do óleo de peixe, rico em ácidos graxos poliinsaturados n-3, como possível neuroprotetor no processo de intoxicação por MeHg no tecido retiniano.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecimento do modelo de gliose pela avaliação da expressão de proteínas: GFAP, p ERK ½.
- Avaliar a expressão proteica de Caspase 3 e de COX2.
- Determinar a expressão de proteínas responsivas ao aumento do estresse oxidativo como Nrf2.
- Mensurar a atividade da enzima catalase.
- Identificar a concentração de glutathiona reduzida (GSH).
- Analisar a lipoperoxidação do tecido retiniano dos grupos experimentais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para a realização deste estudo foram utilizados ratos machos albinos da linhagem Wistar, obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro (12/12 horas), em ambiente com temperatura controlada a 22 ± 1 °C, com água e alimentação *ad libitum*. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Metabolismo Celular no Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO-UFPR) (n°402) (ANEXO).

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O protocolo experimental foi desenvolvido durante um estudo piloto, em que 18 animais adultos foram utilizados para estabelecer a melhor dose para a intoxicação aguda por mercúrio, via administração intraperitoneal. A dose testada de cloreto de metilmercúrio (CH_3HgCl) foi de 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corpóreo (p.c.) e as amostras foram analisadas em diferentes dias após a administração da droga. Nesta etapa, o intuito foi a caracterização da lesão no tecido retiniano pela intoxicação mercurial. Para isto, os animais foram mortos e os olhos enucleados. Partes dos olhos foram separadas, fixados em formalina 10% e emblocados em paraplast para posterior análise qualitativa pela técnica de imunohistoquímica e, a parte restante, foi isolada a retina e processada para a técnica de Western Blotting.

4.3 PREPARAÇÃO DO MERCÚRIO E INTOXICAÇÃO DOS ANIMAIS

Importante notar que o manuseio do mercúrio deve ser feito em capela com exaustão ligada, uso de luvas apropriadas (nitrila), óculos de proteção e máscaras com filtros apropriados. O composto mercurial utilizado para a intoxicação aguda dos animais foi o cloreto de metilmercúrio (CH_3HgCl) da Sigma-Aldrich Brasil Ltda. (442534-5G-A) doado gentilmente pelo professor Dr. Ciro A. Oliveira Ribeiro, do Laboratório de Toxicologia Celular. Para facilitar o manuseio deste composto e como medida de segurança, solução de cloreto de metilmercúrio foi preparada na concentração de 4 mg/mL a 1% de HCl. A seguir, a mesma foi alíquotada em *ependorfs* e armazenados cuidadosamente em freezer, livre de luminosidade.

Para a intoxicação dos animais, alíquotas de cloreto de metilmercúrio foram devidamente descongeladas em capela com exaustão ligada e neutralizadas com solução de NaOH 3,2 M.

A seguir os animais foram sedados com quetamina e xilazina, nas proporções de 70 mg/kg e 0,5 mg/kg, respectivamente, e intoxicados, intraperitonealmente, com CH_3HgCl na dose única de 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corpóreo.

Os animais do grupo controle receberam o veículo.

4.4 SUPLEMENTAÇÃO

Os efeitos da suplementação com óleo de peixe avaliou-se somente sobre os parâmetros de modelo de gliose, ou seja, analisadas pelas expressões proteicas de GFAP e p ERK $\frac{1}{2}$ outras análises, como expressão proteica de Nrf2, Caspase 3 e COX2, e indicadores do estresse oxidativo, como atividade da catalase, conteúdo de glutadiona reduzida e lipoperoxidação não foram avaliadas com a utilização de óleo de peixe via suplementação oral.

Os animais, ratos Wistar machos, após o desmame (21 dias) foram aleatoriamente distribuídos em 2 grupos distintos:

- 1) Grupo controle (C), alimentado com ração para ratos (Nuvilab CR1 – Nuvital nutrientes S/A).
- 2) Grupo óleo de peixe (P), alimentado com a mesma ração supracitada e suplementado diariamente com óleo de peixe, rico em ácidos graxos poliinsaturados n-3, na dose de 1g/kg de peso corpóreo. As cápsulas de óleo de peixe foram gentilmente doadas pela Fundação Herbarium® de Saúde e Pesquisa S/A (Curitiba, PR, Brasil) e na sua composição continham 192 mg de EPA e 124 mg de DHA.

O peso corporal dos animais foi avaliado a cada 2 dias, em balança digital (GEHAKA, 350). A suplementação com óleo de peixe foi administrada por via oral, diariamente, utilizando-se micropipetas por 55 dias. Uma semana antes do término da suplementação (aos 70 dias de idade), os animais foram distribuídos em dois subgrupos, sendo a metade intoxicada, intraperitonealmente, com cloreto de metilmercúrio (CH_3HgCl) na dose única de 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corpóreo e a outra metade, foi controle. Após a exposição à droga, os animais foram ortotansados 3 e 6 dias seguintes e então, os olhos enucleados e devidamente acondicionados (FIGURA 1)

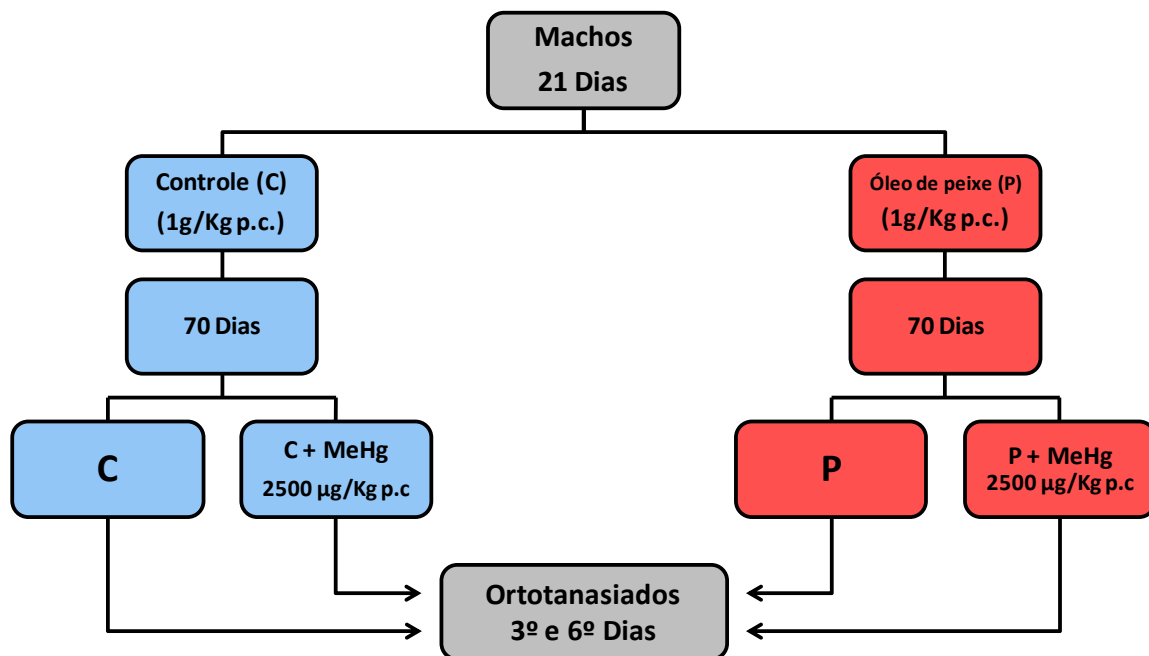


FIGURA 1 Representação esquemática da suplementação dos animais para análise das expressões proteicas de GFAP e p ERK $\frac{1}{2}$.

4.5 DISSECÇÃO DAS RETINAS

Após a enucleação dos olhos, procedeu-se rapidamente com a dissecção das retinas. Os olhos foram colocados em placa de petri (35x10mm) com tampão PBS pH 7,4 e mantidos em gelo. Cuidadosamente com auxílio de materiais cirúrgicos oftálmicos como pinça de dente de rato e microtesoura, fez-se a remoção da região anterior que compreende a íris, córnea e o cristalino, obtendo assim a cuia óptica, com a retina. Por último, a dissecção da retina foi realizada com ajuda de uma espátula sob lupa estereoscópica.

As retinas isoladas foram banhadas em novo tampão de PBS pH 7,4 para garantir tecido retiniano livre de demais tecidos. Em seguida, os tecidos foram transferidos para eppendorfs e mantidos em gelo para os procedimentos da técnica de *Western Blotting*.

4.6 EMBLOCAGEM DO MATERIAL E PREPARO DAS LÂMINAS

Os olhos enucleados, um de cada animal, foram colocados em placa de petri (35x10mm) contendo tampão PBS pH 7,4 a 4°C. Sob lupa estereoscópica, o olho pinçado foi perfurado com uma agulha na região anterior, próximo a ora serrata, não invadindo mais que 2 mm de profundidade. A seguir, foi fixado por imersão em formalina 10% por 24 horas, a 4°C. Após o processo de fixação, o material foi lavado 3 vezes por 5 minutos em tampão Sorensen 0,1 M (preparado no momento do uso) e armazenados a 4°C para os procedimentos de emblocagem do material.

Todos os procedimentos seguintes foram realizados em capela com

exaustão ligada no Laboratório de Toxicologia Celular. Os olhos foram transferidos individualmente para cassetes de plásticos e devidamente identificados. Um frasco de vidro hermeticamente fechado foi utilizado para mergulhar os cassetes de plásticos contendo o material para as outras etapas. O material foi desidratado pela passagem em bateria de álcool 70%, 80% e 90% por 1 hora em cada solução. Em álcool 95%, o material foi mantido por pernoite. Após este período, foi transferido para álcool absoluto 1 por 1 hora. Os olhos, então, foram cortados no sentido ântero-posterior passando pelo nervo óptico e, dessa maneira, dividindo-os em duas porções. Para a completa desidratação do material, fez-se a passagem pelos álcoois absolutos 2, 3 e 4 por 20 minutos. Com o material completamente desidratado, este permaneceu 20 minutos em solução álcool absoluto/xilol (1:1) seguido de xilol 1 por 20 minutos e xilol 2 por 10 minutos para a realização da diafanização. A inclusão foi feita com Paraplast Plus® derretida em estufa a 56°C por 2 horas e finalmente, a emblocagem do material com nova resina.

Após a emblocagem do material, o preparo e montagem da lâmina se realizaram com a trimagem do material, para retirar o excesso da resina. A seguir, no micrótomo, fez-se cortes de 5 µm de espessura do material trimado. Os cortes foram colados em lâminas com um preparado à base de albumina de ovo e deixados sobre placa aquecedora para a extensão dos cortes e melhor aderência à lâmina. Com as lâminas montadas, fez-se a análise qualitativa do material.

4.7 IMUNOHISTOQUÍMICA

A partir de cortes histológicos devidamente aderidos em lâminas, fez-se inicialmente a desparafinização e hidratação destes através do uso de xilol e

séries alcoólicas graduadas. A imunohistoquímica foi realizada com o emprego de anticorpo primário monoclonal específico para proteína GFAP. Solução de bloqueio, anticorpo secundário biotilado e reagentes utilizados do kit Vectastain[®] ABC.

4.8 WESTERN BLOTTING

Extratos retinianos foram homogeneizados manualmente com auxílio de um pistilo em tampão de lise gelado (RIPA), contendo 50 mM TRIS (pH 8), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% dodecil sulfato de sódio (SDS), aprotina 0,01 mg/mL, inibidores de fosfatases e proteases (*Complete TM Protease Inhibitor Cocktail Tablet*: sc-29130). Padronizou-se uma retina para cada 200 µL de tampão de lise. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm (Eppendorf centrifuge[®] 5810 R) por 30 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C. A quantificação proteica foi determinada pelo método de Bradford (1976).

Após a dosagem proteica, as amostras foram diluídas em tampão Laemmli 5X, concentrando-as para 45 µg de proteína total em um volume final de 30 µL. Em seguida, foram fervidas por 5 minutos e então submetidas à eletroforese pelo método SDS-PAGE (dodecil de sulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamida) descrito por LAEMMLI (1970). As proteínas de interesse foram separadas em gel de poliacrilamida 10%, em sua maioria, exceto a caspase 3 clivada, cujo gel foi de 15%. Para tanto, aplicou-se uma voltagem constante de 160 V por aproximadamente 90 minutos utilizando o aparato de eletroforese (BIO-RAD[®] Mini PROTEN).

A partir da separação das proteínas em SDS-PAGE, procedeu-se a identificação das proteínas específicas pelo uso de anticorpos mono ou

policlonais por *Western Blotting*, método descrito por TOWBIN *et al.*, 1979. As proteínas foram, então, eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose, em aparato para transferência imersa em tampão resfriado a 4°C, sob uma voltagem constante de 100 V por 1 hora. Terminado o processo de transferência, as membranas foram coradas com vermelho *Ponceau*, para visualizar eficiência do processo. As membranas foram bloqueadas por 1 hora à temperatura ambiente com tampão de bloqueio TBST (NaCl 4 M, TrisHCl 1 M e 0,05% Tween 20) contendo 3% de BSA (albumina sérica bovina). Posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos para proteínas de interesse, em tampão de bloqueio BSA a 3%, sob suave agitação e por um período mínimo de 3 horas em temperatura ambiente.

Os anticorpos utilizados neste estudo e suas respectivas diluições foram: p ERK ½ monoclonal (1:1500-Santa Cruz Biotechnology), GFAP monoclonal (1:1000-Sigma), Nrf2 policlonal (1:200-Santa Cruz Biotechnology), COX2 (1:500-Santa Cruz Biotechnology), β-actina monoclonal (1:800-Santa Cruz Biotechnology) e Caspase 3 clivada monoclonal (1:1000-Cell Signaling).

A incubação com anticorpo secundário conjugado à HRP (*Horseradish peroxidase*), específicos para o anticorpo primário ocorreu à temperatura ambiente, por uma hora e a detecção foi realizada pela adição do substrato quimiluminescente e registrada em filme para raio-X (Kodak®). As imagens foram analisadas por densitometria pelo programa *Image J*.

Anticorpo β-actina (1:800-Santa Cruz Biotechnology) foi utilizado como controle interno.

4.9 LIPOPEROXIDAÇÃO

A peroxidação lipídica foi mensurada pelo método descrito por NOUROOZ-

ZADEH *et al.* (1994). Este método quantifica a formação de hidroperóxido por miligrama de proteína durante a peroxidação lipídica. Baseia-se no princípio de que os hidroperóxidos oxidam íon ferroso (Fe^{2+}) a íon férrico (Fe^{3+}), o qual reage com o xilenol laranja. Para isso, *pool* de tecidos retinianos de 10 animais foram homogeneizados em 1 mL de metanol e centrifugados a 13.000 rpm por 20 minutos a 4°C. Para cada amostra, alíquotas de 90 μL do sobrenadante foram postas em 6 eppendorfs (2 mL de capacidade). Há três destes eppendorfs foram adicionados 10 μL de solução metanólica de trifenilfosfina (TPP, Sigma) 10 mM, para ocorrer a redução seletiva de hidroperóxidos. As amostras contidas nos três eppendorfs restantes receberam apenas 10 μL de metanol. Todos os eppendorfs foram agitados e então incubados em temperatura ambiente por 30 minutos. Terminada esta incubação, adicionou-se a cada eppendorf 900 μL do reagente FOX2 (xilenol laranja a 100 μM , hidroxitolueno butilado (BHT) 400 mM, ácido sulfúrico 25 mM e sulfato ferroso de amônio 250 μM , em metanol 90%). Após agitação, o meio reacional foi incubado em temperatura ambiente por mais 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro na absorvância de 560 nm.

Para o cálculo da concentração de hidroperóxidos nas amostras, subtraiu-se o valor da absorvância das amostras tratadas com TPP (sem hidroperóxidos lipídicos) do valor da absorvância das amostras sem TPP. O valor obtido foi, então, utilizado na fórmula da curva padrão de peróxido de hidrogênio, obtida com soluções padrão de diferentes concentrações (100.0, 50.0, 25.0, 12.5, 6.2, 3.1 e 1.6 μM) submetidas aos mesmos procedimentos descritos acima para a dosagem de hidroperóxidos (com exceção ao tratamento com TPP). A seguir, dividiu-se o valor da concentração de hidroperóxidos (mmol/mL) pela concentração de proteínas totais ($\mu\text{g}/\text{mL}$) do extrato retiniano. Os resultados foram expressos em mmol de lipoperóxidos/ μg de proteínas.

4.10 ATIVIDADE DA CATALASE

Este ensaio foi realizado conforme descrito por Aebi (1984). Resumidamente, *pool* de tecidos retinianos de três animais foram homogeneizados em 1mL de PBS pH 7,4, com auxílio de um homogeneizador elétrico. O homogenato foi centrifugado a 13.000 rpm por 25 minutos a 4°C. Uma alíquota de 50 µl do sobrenadante foi adicionada a 950 µl de meio reacional (solução aquosa de H₂O₂ 20m M, tris base 0,05 M e EDTA 0,25 mM, pH 7,4) a 37°C. A absorbância foi monitorada durante 2 minutos, com intervalo de 2 segundos entre cada leitura, em comprimento de onda de 240 nm.

A atividade da enzima catalase presente na amostra foi avaliada, indiretamente, pelo monitoramento da variação de absorbância em função do tempo, pela degradação do H₂O₂. Os resultados foram corrigidos pela concentração de proteínas no homogenato e expressos em nmol de H₂O₂ degradado. min⁻¹.mg proteína⁻¹.

4.11 CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

Pool de tecidos retinianos de três animais foram descongelados em gelo e homogeneizados em 250 µL de PBS pH 7,4, com auxílio de um homogeneizador elétrico. O homogenato foi centrifugado a 13.000 rpm por 25 minutos a 4°C. Alíquota de 50 µl do sobrenadante foi separada para posterior quantificação proteica. Para cada 200 µl de amostra foram adicionados 50 µl de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para a precipitação proteica. Para o branco, pipetou-se 50 µl da solução de TCA a 50% em 200 µl de PBS. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Para as leituras, foram

adicionados 50 μl do sobrenadante das amostras e 230 μl de tampão Tris-base (0,4 M, pH 8,9) em triplicata a uma microplaca em gelo. Por último, 20 μl de DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzólico) a 2,5 mM (em metanol, tampão Tris-base 0,3 M, pH 8,9) foram rapidamente acrescentados e após 5 minutos a temperatura ambiente, procederam-se a leitura a 415 nm (SEDLAK e LINDSAY, 1968).

A determinação do conteúdo de GSH foi realizada se utilizando de curva-padrão de GSH (0, 5, 10, 20, 40, 80 e 160 μL GSH) em tampão tris-base a 0,4 M e pH 8,9). A concentração de GSH nas amostras foi expressa em nmol. mg proteína⁻¹.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) dos grupos experimentais e submetidos à análise por teste de variância de uma via (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*, com nível de significância para $p < 0,05$, teste "*t*" de *Student*, quando indicado. O *Software* Prisma GraphPad versão 5.0 (*GraphPad Software*, San Diego, Califórnia, EUA.) foi utilizado para composição dos gráficos e tratamento estatístico dos resultados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos neurotóxicos da contaminação por mercúrio são bem documentados na literatura e o sistema visual é susceptível aos efeitos causados por este metal pesado. No entanto, até o momento não existe nenhum modelo experimental para o estudo da gliose reativa, caracterizando dessa forma lesão retiniana.

Para responder a nossa primeira pergunta, se a intoxicação mercurial pudesse levar a gliose reativa na retina, fez-se um estudo piloto para estabelecer a melhor dose para caracterização da lesão nestas estruturas oculares. Os animais, então, foram intoxicados por cloreto de metilmercúrio (CH_3HgCl), intraperitonealmente, na dose única de 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corpóreo (p.c.). Investigou-se inicialmente a expressão das proteínas p ERK $\frac{1}{2}$ e GFAP (marcadores inespecíficos de gliose) no tecido retiniano por ensaios de Western Blotting.

Na FIGURA 2, estão apresentados os dados da expressssão da proteína p ERK $\frac{1}{2}$ dos animais do grupo não intoxicados (C) e dos animais intoxicados por mercúrio na dose de 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de p.c. e analisados 1-3-6-15 dias após: grupos 1 D, 3 D, 6 D e 15 D, respectivamente. A expressão (unidades arbitrárias) da p ERK $\frac{1}{2}$ foi de 3974,5 no grupo controle. No grupo intoxicado com mercúrio e analisado após 1 dia teve aumento da expressão dessa proteína (7411,8). O grupo intoxicado por mercúrio e analisado após 3 dias apresentou o maior pico de expressão de p ERK $\frac{1}{2}$ (12576,5), ou seja, 3 vezes mais que comparado ao grupo contole. Nos demais grupos intoxicados 6 dias e 15 dias, a expressão de p ERK $\frac{1}{2}$ foi de 7948,6 e de 8830,3, respectivamente.

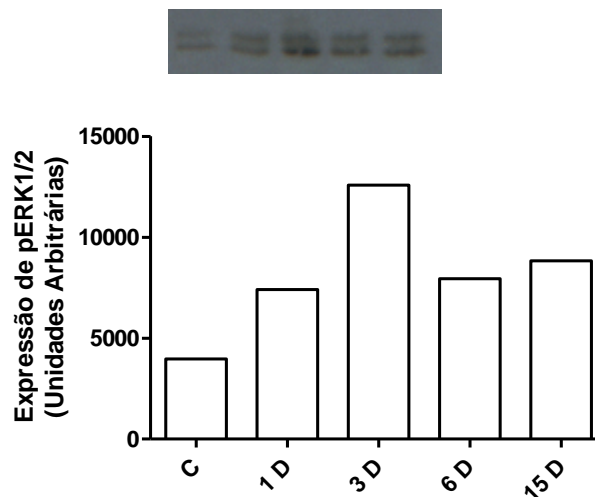


FIGURA 2 Expressão de p ERK $\frac{1}{2}$ na retina dos animais não intoxicados (C) e dos animais intoxicados por mercúrio na dose de 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de p.c. e analisados em diferentes situações: 1 Dia, 3 Dias, 6 Dias e 15 Dias após a administração da droga. Dados representam valores de um experimento.

Para a imunodeteccção para proteína GFAP, fez-se o stripping da mesma membrana de nitrocelulose utilizada para a proteína p ERK $\frac{1}{2}$.

Na FIGURA 3, estão apresentados os dados da expresssão da proteína GFAP dos animais do grupo não intoxicado (C) e dos animais intoxicados por mercúrio na dose de 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de p.c. e analisados 1-3-6-15 dias após: grupos 1 D, 3 D, 6 D e 15 D, respectivamente. A expressão da GFAP foi de 14.513 no grupo controle. No grupo intoxicado com mercúrio e analisado após 1 dia teve expressão dessa proteína similar à do grupo controle (14.305). A intoxicação mercurial no grupo 3 dias promoveu aumento da expressão de GFAP (39.496). No entanto, a maior expressão desta proteína foi observada no grupo 6 dias (56.809) com aumento de 3,9 vezes quando comparada à do grupo não intoxicado. No grupo intoxicado 15 dias, a expressão de GFAP foi de 45.906.

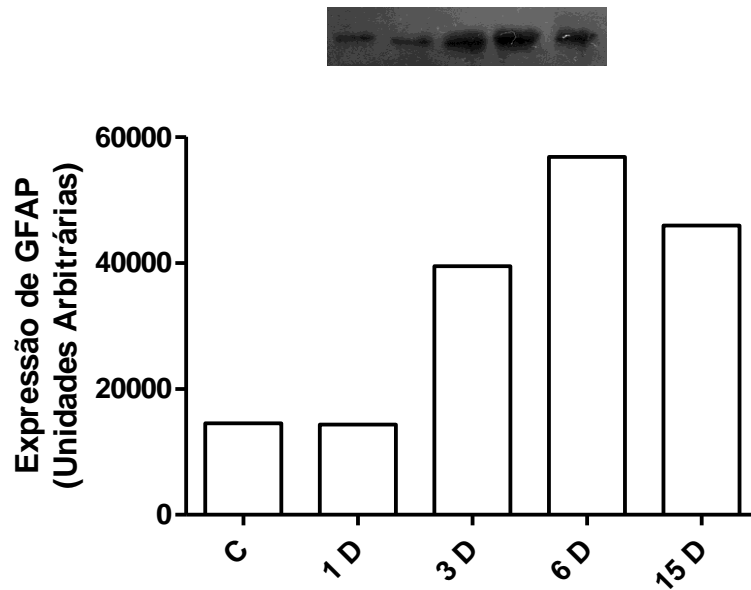


FIGURA 3 Expressão de GFAP na retina dos animais controle (C), intoxicados por mercúrio na dose de 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de p.c. e analisados em diferentes situações: 1 Dia, 3 Dias, 6 Dias e 15 Dias após a administração da droga. Dados representam valores de um experimento.

Outra maneira utilizada para caracterização da lesão em estruturas oculares por intoxicação mercurial foi a análise qualitativa das amostras de retina pela técnica de imunohistoquímica. Através desta técnica, foi possível caracterizar a gliose reativa.

Neste estudo, amostras de retina foram processadas para imunodeteção *in situ* da expressão da proteína GFAP. Para o preparo das lâminas histológicas, utilizou-se a mesma dose 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corpóreo de CH_3HgCl e as amostras foram analisadas 5 e 7 dias após intoxicação mercurial.

Na FIGURA 4, está apresentado corte histológico de uma retina do grupo não intoxicado (controle) mostrando baixa imunorreatividade para GFAP. De fato, a imunoreação é decorrente da marcação de astrócitos perivasculares na camada limitante interna. Por outro lado, cortes histológicos das retinas dos demais grupos submetidos à intoxicação mercurial (FIGURA 5) apresentaram nível de expressão de GFAP aumentado em relação à do grupo não intoxicado. Essa imunoreação pode ser observada com a precipitação do DAB (coloração marrom) nos “pés” das células de Müller nas membranas limitantes internas, situadas internamente à camada de células ganglionares. Os resultados da imunohistoquímica mostram que a gliose reativa é

melhor evidenciada nas retinas dos animais intoxicados que receberam a dose de 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de p.c. e analisadas 5 dias após a administração da droga.

Controle

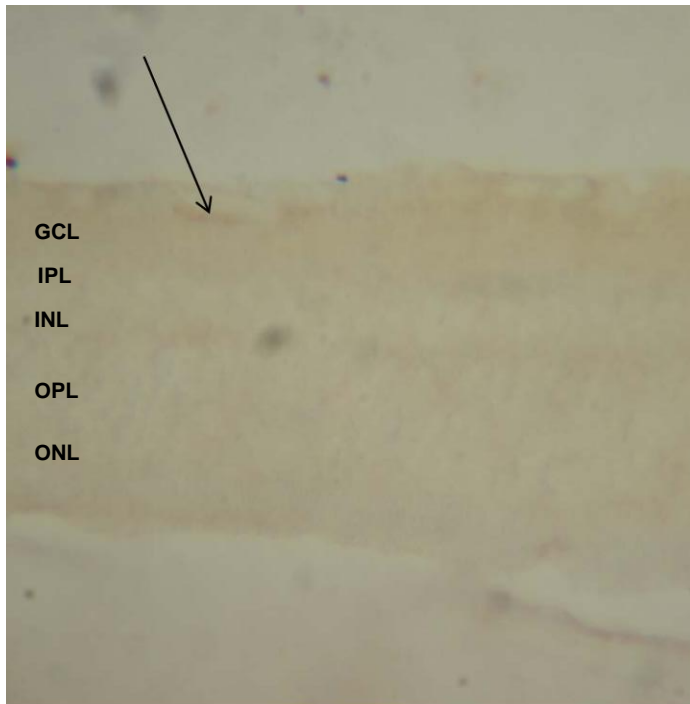


FIGURA 4 Imunohistoquímica para GFAP na retina do grupo controle. Seta indica marcação nos astrócitos na camada limitante interna. Aumento de 40X. Os cortes histológicos ($5\mu\text{m}$) foram bloqueados com BSA 2% e Triton 0,1% em tampão TBS durante 1 hora. O anticorpo anti-GFAP humana (Sigma) foi usado como anticorpo primário diluído 1:200 na solução de bloqueio. A reação foi feita por 2 horas a temperatura ambiente. Como anticorpo secundário foi utilizada IgG anti-IgG de camundongo empregando-se o kit VectaStain. A reação com este anticorpo no tampão de bloqueio durou 1 hora a temperatura ambiente. A reação foi revelada com DAB a 7,5% e peróxido de hidrogênio 0,003%. GCL – camada de células ganglionares, IPL – camada plexiforme interna, INL – camada nuclear interna, OPL – camada plexiforme externa e ONL - camada nuclear externa.

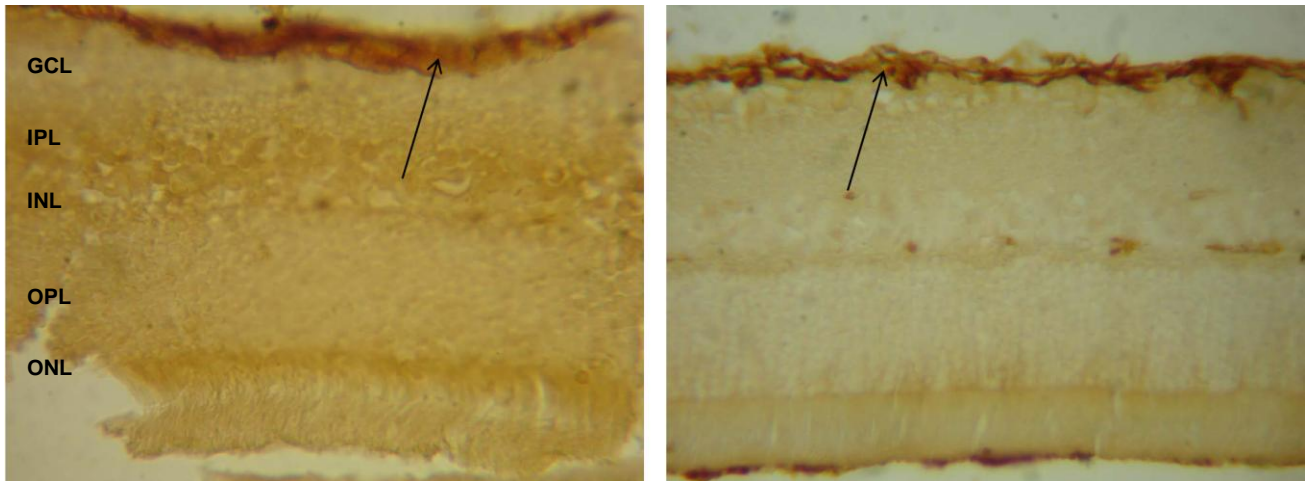
MeHg 2500 µg/kg p.c. 5 dias**MeHg 2500 µg/kg p.c. 7 dias**

FIGURA 5 Imunohistoquímica para GFAP nas retinas dos grupos intoxicados com mercúrio na dose de 2500 µg/kg p.c e analisados 5 dias após (painel esquerdo) e 7 dias após (painel direito). As cabeças de seta indicam a marcação na camada limitante interna. Aumento de 40X. Os cortes histológicos (5µm) foram bloqueados com BSA 2% e Triton 0,1% em tampão TBS durante 1 hora. O anticorpo anti-GFAP humana (Sigma) foi usado como anticorpo primário diluído 1:200 na solução de bloqueio. A reação foi feita por 2 horas a temperatura ambiente. Como anticorpo secundário foi utilizada IgG anti-IgG de camundongo empregando-se o kit VectaStain. A reação com este anticorpo no tampão de bloqueio durou 1 hora a temperatura ambiente. A reação foi revelada com DAB a 7,5% e peróxido de hidrogênio 0,003%. GCL – camada de células ganglionares, IPL – camada plexiforme interna, INL – camada nuclear interna, OPL – camada plexiforme externa e ONL - camada nuclear externa.

Com base nesses resultados preliminares do estudo piloto, optou-se por escolher os grupos intoxicados por cloreto de metilmercúrio na dose de 2500 µg/kg de peso corpóreo e analisados 3 e 6 dias após a administração da droga, uma vez que as proteínas p ERK ½ e GFAP tiveram seus maiores picos de expressão, respectivamente.

O próximo passo foi confirmar a reprodutibilidade dos mesmos, aumentando-se o número de animais de cada grupo experimental e avaliar o efeito da suplementação com óleo de peixe rico, em ácidos graxos poliinsaturados n-3 sobre a expressão das proteínas p ERK ½ e GFAP.

Na FIGURA 6, estão apresentados os dados da expressão da proteína p ERK ½ dos animais do grupo controle (C), dos animais intoxicados por mercúrio na dose de 2500 µg/kg de p.c. e analisados 3 e 6 dias após, grupos 3D e 6D, respectivamente e dos animais intoxicados por mercúrio e suplementados com óleo de peixe e analisados

3 e 6 dias após, grupos P3D e P6D, respectivamente. A expressão da p ERK ½ no grupo controle foi considerada cem por cento. A intoxicação mercurial promoveu aumento significativo na expressão de p ERK ½ em aproximadamente, 68,7% no grupo 3D e 40,3% no grupo 6D quando comparado ao do grupo não intoxicado (C). De fato, a suplementação com óleo de peixe, de alguma maneira, impediu, nos dois tempos avaliados, aumento da expressão da p ERK ½ sendo similar à do grupo controle ($p < 0,05$).

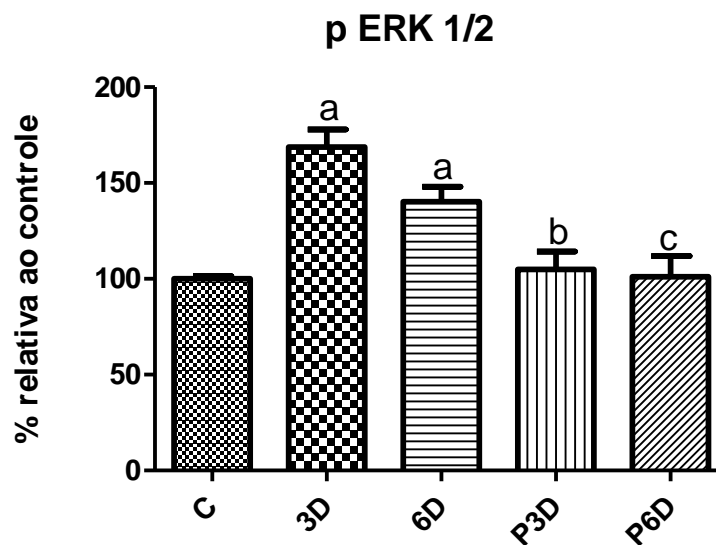


FIGURA 6 Expressão da p ERK ½ na retina dos animais controle (C; n=15) e dos animais intoxicados por mercúrio na dose de 2500 µg/kg de p.c. e analisados em duas situações: 3 dias (3D; n=19) e 6 dias (6D; n=12) após a administração da droga e dos grupos intoxicados que receberam a suplementação com óleo de peixe: P3D (n=13) e P6D (n=12). Os dados estão apresentados como média ± EPM de 3 experimentos. a $p < 0,05$ vs C, b $p < 0,05$ vs grupo 3D e c $p < 0,05$ vs 6D.

Na FIGURA 7, estão apresentados os dados da expressão da proteína GFAP dos animais do grupo não intoxicado (C) e dos animais intoxicados por mercúrio na dose de 2500µg/kg de p.c. e analisado 3 e 6 dias após: grupos 3D e 6D, respectivamente e dos grupos intoxicados que receberam a suplementação com óleo de peixe: grupo P3D e P6D. A expressão de GFAP no grupo controle foi considerada 100%. A intoxicação mercurial promoveu aumento significativo da expressão de GFAP de 86,8% no grupo 3D. No entanto, a maior expressão desta proteína foi observada no

grupo 6D (248,1%) com aumento de 2,48 vezes quando comparado ao grupo controle. A suplementação com óleo de peixe no grupo intoxicado P3D e P6D impediu elevação da expressão da GFAP sendo esta similar à do grupo controle ($p < 0,05$).

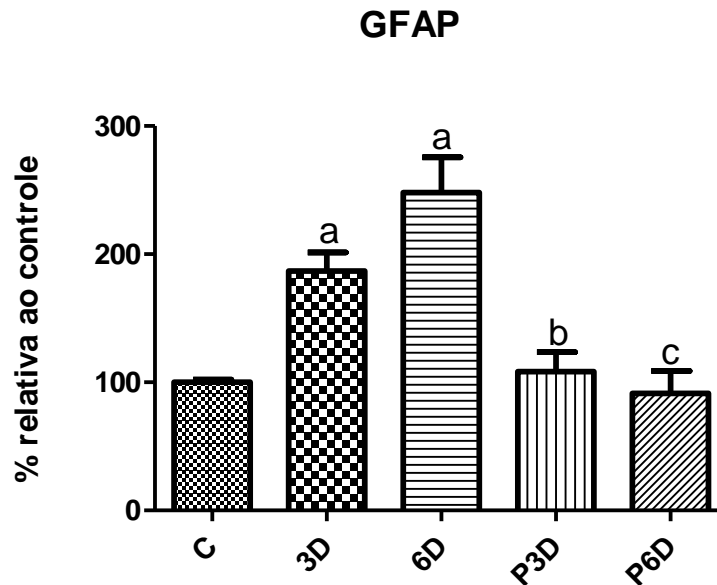


FIGURA 7 Expressão de GFAP na retina dos animais controle (C; n=14) e dos animais intoxicados por mercúrio na dose de 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de p.c. e analisados em duas situações: 3 dias (3D; n=19) e 6 dias (6D) após a administração da droga e dos grupos intoxicados que receberam a suplementação com óleo de peixe: P3D (n=9) e P6D (n=15). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de 3 experimentos. a $p < 0,05$ vs C e b $p < 0,05$ vs 6D e c $p < 0,05$ vs 6D.

Os ensaios de western blotting revelaram que a expressão das proteínas p ERK $\frac{1}{2}$ e GFAP encontram-se significativamente aumentadas após a intoxicação por mercúrio, confirmando a caracterização da gliose reativa em tecidos retinianos de ratos. De fato, sob qualquer alteração patogênica da retina, as células de Müller tornam-se ativadas e sofrem várias alterações metabólicas buscando promover a sobrevivência neuronal durante condições de estresse.

Células de Müller, principais células da glia de retina de vertebrados, desempenham importante papel para manutenção da estrutura e função da retina. A reatividade destas células normalmente está associada a elevação da expressão de proteínas do filamento intermediário, como a proteína ácida fibrilar glial (GFAP).

Portanto, a GFAP pode ser utilizada como marcador de gliose em resposta não específica a várias doenças e danos na retina (BRINGMAN *et al.*, 2006). Outro marcador inespecífico para gliose reativa é a ativação das ERKs (quinases reguladas por sinais extracelulares) que podem ser observadas durante descolamento de retina, isquemia-reperfusão de retina, glaucoma (GELLER *et al.*, 2001; AKIYAMA *et al.*, 2002; TEZEL *et al.*, 2003), assim como, durante estresse oxidativo (Barnes e Kircher; KIM *et al.*, 2002).

Pela primeira vez, pudemos demonstrar que a intoxicação mercurial induz gliose reativa em retina de ratos, portanto, estabelecendo modelo experimental para futuros estudos. Interessantemente, nossos resultados revelaram efeito protetor da suplementação com óleo de peixe, já que os dados sustentam a hipótese de que este tratamento adjuvante inibe a gliose da glia de Müller na retina dos animais que foram expostos à intoxicação por mercúrio. Uma possível explicação para o efeito neuroprotetor do óleo de peixe observado neste estudo seria as propriedades menos inflamatórias dos seus principais componentes, os ácidos graxos poliinsaturados EPA e DHA que podem alterar a funcionalidade de células do sistema imunitário (CALDER, 1998).

O sistema nervoso central frente a injúrias como doenças, lesão e inflamação responde ativando os astrócitos (população de células glias denominada macróglia), assim como a micróglia, população de macrófagos residentes. De modo semelhante, na retina, as células de Müller e micróglia deste tecido sofrem alterações em situações de lesão e doenças (BRINGMANN *et al.*, 2006). A reatividade de ambas as populações celulares podem ter efeito de proteção ou degeneração neuronal. Isto dependerá da comunicação intra e intercelulares bem como fatores moleculares liberados neste processo que não são bem compreendidos (BRINGMANN *et al.*, 2009).

Acúmulo anormal e alterações morfológicas de micróglia em retina têm sido encontrados em modelos de animais de retinopatias, incluindo descolamento de retina, retinose pigmentar, retinopatia diabéticos entre outras (LEE *et al.*, 2008).

Em danos na retina induzidos pela exposição prolongada de luz, células de Müller tornam-se reativas e interagem com as micróglias. Estas podem atuar modulando a sobrevivência de fotorreceptores, controlando a produção de fatores

neurotróficos liberados pelas células de Müller. Neste caso, células microgлияis migram até a camada de fotorreceptores danificados pelo excesso de luz aumentando secreção de fatores neurotróficos derivados de glias (CNTF), fatores neurotróficos ciliares (GDNF) e fatores de crescimento neural (NGF). Estes componentes, por sua vez, modulam as células de Müller que passam a secretar fatores neurotróficos derivados de cérebro (BDNF) e (fatores de crescimento de fibroblastos) aumentando assim, a taxa de sobrevivência dos fotorreceptores (HARADA *et al.*, 2002).

Micrógлияs apresentam importante papel na defesa do SNC, na neuroproteção e no reparo tecidual após lesão. Quando ativadas podem secretar diferentes compostos como glutamato, importante na excitotoxicidade, fatores de crescimento como NGF e TGF β , citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α , espécies reativas como óxido nítrico e ânions superóxidos e mediadores lipídicos (HANISCH, 2002). Assim como a micrógлия, as células de Müller, quando ativas em resposta a estímulos, podem secretar várias citocinas como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , além de produzir óxido nítrico e prostanóides, os quais podem agravar o dano causado por uma lesão (BRINGMANN *et al.*, 2006).

Neste cenário, ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 são conhecidos por modular a funcionalidade de células do sistema imunitário assim como o perfil de citocinas e quimiocinas por elas secretadas, diminuindo a resposta inflamatória (CALDER, 2006). A suplementação com óleo de peixe rico em AGPIs n-3 em retinas dos animais que foram intoxicados com metilmercúrio pôde ter alterado a composição de lipídios destes tecidos, aumentando a concentração de DHA, principal constituinte dos fosfolípideos de membrana de retina, protegendo-os da lesão. Kaur e colaboradores demonstraram, em cultivo celular, a capacidade de DHA em reduzir a geração de radicais livres em astrócitos submetidos à intoxicação mercurial KAUR *et al.*, 2008). Estudos adicionais serão realizados para análise da composição lipídica das retinas destes animais para melhor compreensão deste resultado.

Na tentativa de se investigar possíveis vias de sinalização celular pelas quais a intoxicação mercurial promove a gliose em células de Müller, expressão de COX-2 e Caspase 3 foram analisadas.

Análise da expressão de COX-2 poderia nos mostrar se a intoxicação por

mercúrio sinaliza vias de ativação de respostas inflamatórias no tecido retiniano lesionado (FIGURA 8). A resposta inflamatória é comum e primeira linha de defesa contra várias formas de injúria do SNC tais como infecção, lesão tecidual e doenças neurodegenerativas.

6D 6D 6D 3D 3D 3D C C C⁺

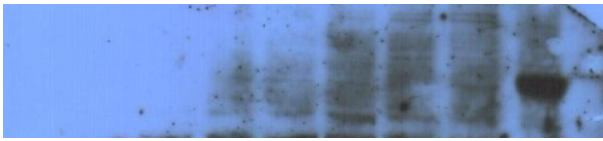


FIGURA 8 Expressão de COX2 na retina dos animais do grupo controle (C) e dos grupos intoxicados por mercúrio na dose de 2500 µg/kg de p.c. e analisados em 2 diferentes situações: 3 Dias e 6 Dias após a administração da droga. Hel A foi utilizado como controle positivo (C⁺). Dados representam valores de dois experimentos.

Vários são os mediadores químicos envolvidos no desenvolvimento do processo inflamatório como as aminas vasoativas, fator de ativação plaquetária (PAF), prostaglandinas, citocinas, óxido nítrico, neuropeptídeos, produtos de reação do sistema de coagulação sanguínea, do sistema complemento entre outros (GILMAN *et al.* 2006). No entanto, os mediadores químicos inflamatórios mais estudados são os eicosanóides, produtos do metabolismo do ácido araquidônico (AA). Frente a qualquer tipo de lesão que danifique membranas biológicas, o AA é liberado a partir de fosfolídeos de membrana pela ação da enzima fosfolipase A2 (PLA₂). Posteriormente, o AA é metabolizado ou pela via das ciclooxygenases (COX), produzindo principalmente os prostanóides (prostaglandinas e tromboxanas) ou pela via das lipooxygenases (LOX) que levam a formação de leucotrienos. Os eicosanóides são moléculas biologicamente ativas que tem importante papel na fisiopatologia da inflamação.

Mazerik e colaboradores (2007a) interessados na fisiopatologia de doenças cardiovasculares pesquisaram os efeitos do metilmercúrio sobre o endotélio vascular, importante órgão na homeostase do sistema cardiovascular. Neste estudo, foi demonstrado significativa ativação de PLA₂ e liberação de AA a partir de fosfolídeos de membrana. Alterações morfológicas celulares e extravazamento de lactato

desidrogenase (LDH) foram decorrentes da ação citotóxica da exposição à droga. Estes resultados também foram acompanhados por alterações nas concentrações de cálcio intracelular, redução de tióis totais e elevação de peroxidação lipídica.

Nessa mesma linha de pesquisa, Mazerik e colaboradores (2007b) pesquisando os efeitos do mercúrio inorgânico (HgCl_2) sobre o mesmo modelo experimental descrito acima de endotélio vascular demonstraram a liberação de AA pela ativação de PLA_2 e formação de metabólitos inflamatórios derivados do AA gerados a partir de COX-2. O tratamento com mercúrio inorgânico induziu formação de prostaglandinas, tromboxanas-B2 e 8-isoprostanos pelas células endoteliais de maneira tempo-dependente. Este estudo sugeriu também ativação de COX_2 além da ativação de PLA_2 em células endoteliais pelo mercúrio inorgânico.

Adicionalmente, ativação de PLA_2 é relatada em culturas de neurônios e de astrócitos expostas ao metilmercúrio (VERITY *et al.* 1994; ASCHNER, 2000; SHANKER *et al.* 2003).

Park e Youn (2013) trabalhando com a linhagem RAW264.7 (monócitos de camundongos) observaram que o mercúrio induz ativação do fator de transcrição NF- κ B, expressão de COX-2 e de NOS (óxido nítrico sintase). Estes autores sugerem que mercúrio pode induzir doenças inflamatórias pelas reações de defesa do hospedeiro estarem prejudicadas.

Estudos vêm demonstrando que a inflamação é importante componente na patogenia de determinadas retinopatias, como retinopatias diabética e isquêmica. Moléculas proinflamatórias como NOS, quimiocinas, moléculas de adesão e COX-2 têm sido implicadas no desenvolvimento de tais retinopatias (PORTILLO *et al.*, 2008; ZHENG *et al.*, 2007; SENNLAUB *et al.*, 2003).

Em nosso modelo experimental, embora metilmercúrio cause lesão no tecido retiniano, não foi detectada expressão de COX-2 nos animais intoxicados, evidenciando a não participação desta enzima em mecanismos envolvidos na resposta inflamatória. Experimentos adicionais em outros tempos são necessários para melhor avaliação da participação desta proteína.

O sistema visual é suscetível aos efeitos tóxicos do mercúrio (TESSIER-LAVIGNE *et al.*, 1985; BRIDGES *et al.*, 2007). Warfvinge e Bruun (1996) pesquisaram

os efeitos do vapor de mercúrio e sua distribuição em globos oculares de macacos. Estes inalaram o vapor de mercúrio por períodos diferentes em um mês, um ano e três anos. Houve acúmulo de mercúrio nos epitélios pigmentados do corpo ciliar e da retina, na camada de células ganglionares e paredes capilares da retina neural. Assim como no cérebro, é sugerido que a eliminação deste metal do tecido ocular é muito lenta e pode nele permanecer por anos.

Mela e colaboradores (2012) determinaram a distribuição mercurial e alterações morfológicas na retina. Traíra (*Hoplias malabaricus*) foi utilizada para avaliar o efeito subcrônico do metilmercúrio por via trófica. Lambaris contaminados com metilmercúrio serviram de alimento a cada cinco dias por um período de 70 dias, tempo suficiente para o processo de bioacumulação. Depósitos de mercúrio foram descritos em várias porções da retina como: camada fotorreceptora, camada plexiforme interna e camada plexiforme externa de modo dose-dependente. Ainda, análise morfológica revelou deterioração na camada fotorreceptora, alterações morfológicas nos segmentos interno e externo de bastonetes, alterações estruturais de membrana de fotorreceptores e no processo de renovação de discos membranosos.

Alterações funcionais no sistema visual também são descritas após a exposição mercurial, por exemplo, nas transmissões sinápticas (YUAN; ATCHISON, 1993), danos na visão escotópica, além de respostas inadequadas a luz por fotorreceptores (EVANS; GARMAN, 1980).

Os efeitos neurotóxicos do metilmercúrio são bem documentados na literatura e característicos de áreas específicas como: células granulares do cerebelo e neurônios do córtex visual. Contudo, os mecanismos moleculares pelos quais o metilmercúrio conduz a morte celular ainda não estão elucidados (KUNIMOTO, 1994).

Vários estudos têm sido realizados para este propósito, utilizando-se animais ou cultivos celulares. Enquanto que baixas concentrações de metilmercúrio ($<1\mu\text{mol/L}$) induzem morte celular por apoptose em vários tipos celulares, incluindo: neurônios (KUNIMOTO, 1994; NAGASHIMA *et al.*, 1996), células da glia (DARÉ *et al.*, 2001), linfócitos (SHENKER *et al.*, 1998), células de origem miogênica (USUKI; ISHIURA, 1998) entre outros; altas concentrações de MeHg promovem morte celular por necrose (CASTOLDI *et al.*, 2000).

Muitos dos eventos apoptóticos são conhecidos por serem mediados por receptores de morte, danos no DNA e estresse gerado em mitocôndrias ou retículo endoplasmático. Os estudos que avaliaram o envolvimento de caspases no processo apoptótico mediante exposição do metilmercúrio apresentam resultados bem contrastantes. Enquanto que em alguns estudos apontaram como positiva seu envolvimento (NISHIOKU *et al.*, 2000; SHENKER *et al.*, 2002) outros estudos não (DARÉ *et al.*, 2001).

Caspase 3 é uma das principais proteínas que participa na via de sinalização de morte celular por apoptose, sendo sua efetora principal. Sua ativação caracteriza a fase de execução e é responsável pela proteólise de muitos substratos celulares que culminam na morte celular (KUMAR, 2007). Para investigar se a intoxicação por metilmercúrio pudesse levar o tecido retiniano a morte por apoptose, avaliou-se a expressão de caspase 3 clivada (FIGURA 9). Entretanto, sua expressão não foi detectada neste modelo experimental. Com este resultado pode-se sugerir que, se ocorre morte por apoptose no tecido retiniano lesionado é por vias independentes de caspase. Mais estudos complementares são requeridos para aventar este achado.

6D 3D 3D C 3D 6D C C⁺



FIGURA 9 Expressão de Caspase 3 clivada na retina dos animais do grupo controle (C) e dos grupos intoxicados por mercúrio na dose de 2500 µg/kg de p.c. e analisados em 2 diferentes situações: 3 Dias e 6 Dias após a administração da droga. Hel A foi utilizado como controle positivo (C⁺). Dados representam valores de dois experimentos.

A indução do estresse oxidativo pode ser um dos efeitos neurotóxicos provocados pela exposição ao metilmercúrio (SHANKER *et al.*, 2004). A expressão proteica de Nrf2 foi avaliada para análise deste parâmetro (FIGURA 10). A expressão de Nrf2 no grupo controle foi considerada cem por cento. No grupo 3D, a expressão

desta proteína foi de 257,47% e no grupo 6D foi de 309,5%. Notavelmente, a intoxicação mercurial elevou significativamente a expressão proteica total de Nrf2 em ambos os grupos intoxicados 3D (2,57 vezes) e 6D (3,09 vezes) quando comparado ao grupo controle.

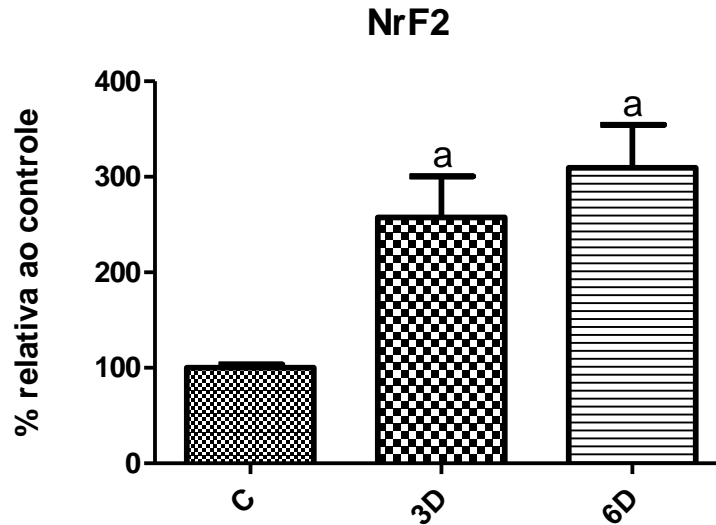


FIGURA 10 Expressão de Nrf2 na retina dos animais controle (C; n=9) e dos animais intoxicados por mercúrio na dose de 2500 µg/kg de p.c. e analisados em duas situações: 3 dias (3D; n=12) e 6 dias (6D; n=15) após a administração da droga. Os dados estão apresentados como média ± EPM de 4 experimentos. a p<0,05 vs C.

Dados da literatura sugerem que, sob condições de estresse, Nrf2 pode ser translocado para o núcleo onde interage com elementos de resposta antioxidante (ARE) nas regiões promotoras levando então, a transcrição de uma variedade de genes. Genes estes envolvidos na resposta antioxidante, tais como as enzimas SOD, catalase, na produção de proteínas *heat shock* e na homeostase da glutathiona. Em conjunto, os produtos destes genes favorecem a sobrevivência celular (KOBAYASHI; YAMAMOTO, 2005).

WANG e colaboradores (2009) demonstraram que astrócitos de tecido cortical de ratos neonatos, quando em cultura primária e expostos a diferentes concentrações de MeHg, apresentaram quantidade significativa de Nrf2 na fração nuclear e a

expressão desta proteína foi mais elevada após 90 minutos de tratamento a uma concentração de 5 μ M deste metal, evento este acompanhado de regulação positiva de genes antioxidantes (xCT, HO-1 e NQR). Neste estudo também foi mostrado que a ativação de Nrf2 é regulada por PI3 quinase (fosfatidilinositol 3 quinase), importante via de sinalização de sobrevivência.

Em nosso estudo se evidenciou aumento significativo da expressão total de Nrf2 em retinas de ambos os grupos de animais intoxicados por mercúrio (3D e 6D). Apesar de não ter sido avaliada a fração nuclear, não se pode descartar a possibilidade de translocação do Nrf2 para o núcleo celular. Experimentos adicionais são necessários para afirmar esta possibilidade e conseqüentemente a ativação deste fator de transcrição mediante exposição mercurial.

É discutido na literatura que vários são os mecanismos responsáveis pelos efeitos tóxicos do mercúrio, dentre eles destacam-se a sua alta afinidade com grupos tióis, inativando desta maneira várias proteínas e enzimas, como por exemplo, a glutathiona reduzida, glutathiona peroxidase e catalase; danos no material genético e desequilíbrio no estado redox intracelular (CLARKSON; MAGOS, 2006).

A glutathiona reduzida (GSH), tiol não proteico mais abundante nas células mamárias, é o principal sistema antioxidante no SNC (DRINGEN, 2000). O conteúdo de GSH foi quantificado para avaliar o estado redox de retinas dos animais expostos ao MeHg. Os dados de concentração de glutathiona reduzida (nmol de tióis.mg prot⁻¹) dos grupos estudados estão apresentados na FIGURA 11. A concentração de GSH quantificada no grupo controle foi de 102,1. Nos grupos intoxicados 3D e 6D, o conteúdo de GSH foi de 94,8 e de 64,2, respectivamente. A intoxicação mercurial promoveu redução de 1,59 vezes no grupo 6D quando comparada à do C. Não houve diferença significativa do conteúdo de GSH entre os grupos C e intoxicado 3D.

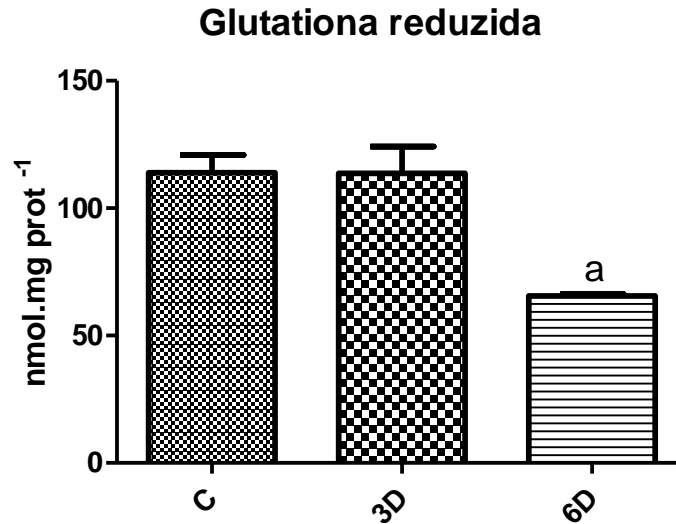


FIGURA 11 Concentração de glutathiona reduzida (nmol de tióis.mg prot⁻¹) em tecido retiniano para animais dos grupos controle (C) e animais expostos ao mercúrio e analisados 3 e 6 dias após, grupos 3D e 6D, respectivamente. Os dados estão apresentados como média \pm EPM de três experimentos. a $p < 0,05$ vs C e 3D.

A glutathiona reduzida, tripeptídeo composto por glutamato, cisteína e glicina, é importante antioxidante não enzimático presente em todas as células animais e normalmente atinge concentrações milimolares (PATRICK, 2002). É bem estabelecido na literatura que a exposição ao MeHg promova redução nas concentrações intracelulares de GSH, (SHANKER *et al.*, 2004) e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (SARAFIAN, 1999, SHANKER; ASCHNER, 2003). Nossos resultados estão de acordo com os dados da literatura (YEE; CHOI, 1996, SHANKER; ASCHNER, 2003, KAUR, 2006), uma vez que a intoxicação mercurial foi capaz de reduzir o conteúdo de GSH no grupo intoxicado 6D. GSH, principal tiol intracelular de baixo peso molecular age na defesa celular contra radicais livres, peróxidos e compostos xenobióticos. A redução das concentrações de GSH nas retinas dos animais após contaminação mercurial pode ser explicada pela habilidade do MeHg ligar-se ao GSH e, dessa maneira, diminuir sua concentração e disponibilidade celular (PATRICK, 2002, PATEL; REYNOLDS, 2013). Isto tem sido considerado importante mecanismo pelo qual compostos mercuriais induzem danos oxidativos (CLARKSON, 1997; SHANKER *et al.*, 2005). Ao mesmo tempo, a capacidade antioxidante de GSH que se

dá pelo grupamento tiol (-SH) reativo de sua cisteína tem sido mostrado fornecer certa proteção contra os efeitos deletérios de MeHg (CASTOLI *et al.*, 2001, MIURA; CLARKSON, 1993). O complexo formado (GSH-MeHg) previne que este metal venha a se ligar a outras proteínas ricas em grupos - SH e cause danos a enzimas e lesão tecidual (KROMIDAS *et al.*, 1990). Em outras palavras, GSH ao se ligar ao mercúrio age neutralizando a ação do mesmo.

O sistema antioxidante de GSH atua em ação conjunta com outras enzimas para realizar suas funções e manter o estado redox intracelular (DRINGEN, 2000). A glutationa peroxidase (GPx) catalisa a decomposição do H_2O_2 e peróxidos lipídicos à água e alcoóis lipídicos, respectivamente. Nesta reação, GSH atua como agente redutor doando seus elétrons para GPx e oxidando-se a glutationa dissulfeto (GSSH). A regeneração de GSH ocorre a partir de GSSH à custa de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida) pela ação da enzima glutationa redutase (GR) (VALKO *et al.*, 2007).

Estudos apontam que a adição de GSH a culturas celulares expostas a MeHg previne a redução das concentrações de glutationa peroxidase (GPx), importante enzima antioxidante necessária para proteção contra efeitos deletérios da peroxidação lipídica (PATRICK, 2002).

Neste estudo não foram avaliadas as atividades de GPx e GRs. O perfil de ambas as enzimas frente a intoxicação mercurial em nosso modelo experimental poderia ser de grande valia para melhor interpretação deste sistema antioxidante.

Para identificar se a contaminação por mercúrio pudesse alterar o perfil de enzimas antioxidantes, mensurou-se a atividade da enzima catalase ($nmol$ de H_2O_2 consumido. $min^{-1}.mg$ proteína $^{-1}$) no tecido retiniano (FIGURA 12). A atividade da catalase foi de 161,7 no grupo controle. A intoxicação mercurial foi capaz de reduzir significativamente a atividade desta enzima em ambos os grupos intoxicados 3D e 6D. Este parâmetro foi reduzido em 1,28 vezes no grupo 3D e 1,52 vezes no grupo 6D quando comparados ao grupo C.

Atividade da enzima catalase

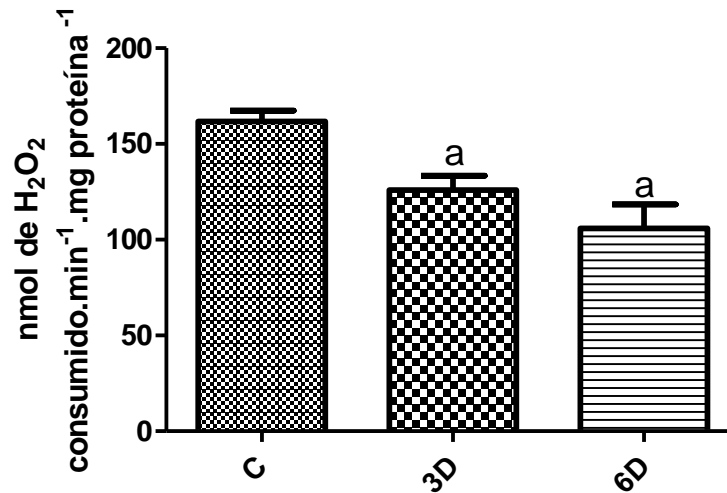


FIGURA 12 Atividade de catalase em tecido retiniano para animais dos grupos controle (C; n=18) e animais expostos ao mercúrio e analisados 3 e 6 dias após, grupos 3D (n=21) e 6D (n=21), respectivamente. Os dados estão apresentados como média \pm EPM de três experimentos. ^a $p < 0,05$ vs C.

A enzima catalase, um componente de defesa antioxidante, presente nos peroxissomos, tem como função a decomposição do H₂O₂ a oxigênio molecular e água, impedindo seu acúmulo celular e danos oxidativos (VALKO *et al.*, 2007). No entanto, estudos prévios têm relatado que a contaminação por compostos mercuriais alteram o perfil desta enzima (HUSSAIN *et al.*, 1999). No presente estudo, a atividade da catalase em retinas dos animais contaminados por metilmercúrio apresentou-se significativamente inibida quando comparada à dos animais controle. Este resultado está de acordo com Abdel-Hamid e colaboradores que também mostraram redução na atividade da catalase em amostras de sangue de trabalhadores expostos ao mercúrio em fábrica de lâmpadas fluorescentes (ABDEL-HAMID; FAHMY; SHARAF, 2001).

De igual modo, Pinheiro e colaboradores realizaram um estudo em diferentes regiões da Amazônia, no qual mulheres foram selecionadas para avaliar a concentração de mercúrio em amostras de seus cabelos e o perfil de defesas antioxidantes no sangue. Os resultados deste estudo além de apontar concentrações elevadas de mercúrio em amostras dos cabelos (>10 ppm) das mulheres expostas em áreas impactadas pela mineração do ouro, relataram também concentrações elevadas

de glutationa e atividade da catalase reduzida no sangue (PINHEIRO *et al.*, 2008).

Por outro lado, Hussain e colaboradores ao analisarem os efeitos do mercúrio inorgânico em camundongos expostos a 1mg/kg/dia de HgCl₂ por 14 dias, encontraram resultados diferentes dos estudos acima mencionados. Observaram aumento da atividade das enzimas catalase e GPx e aumento do conteúdo de GSH em fígados, rins e cérebros destes animais. A explicação sugerida para o sistema de defesa antioxidante ativado nestes tecidos seria um mecanismo compensatório do estresse oxidativo induzido por HgCl₂ (HUSSAIN *et al.*, 1999).

O desequilíbrio no estado redox provocado pela exposição ao mercúrio pode diminuir, de maneira considerável, a glutationa reduzida (GSH), principal tiol não-proteico em células mamárias. Como consequência da depleção nas concentrações de GSH, concentrações de espécies reativas de oxigênio e radicais livres podem elevar-se ainda mais. As espécies reativas resultantes desse processo podem atacar diferentes biomoléculas como proteínas, DNA e principalmente lipídios, processo denominado de peroxidação lipídica.

Neste estudo foi mensurada a produção de lipoperóxidos, como produtos do processo de peroxidação lipídica (mmoL/μg) (FIGURA 13). A concentração de lipoperóxidos no grupo controle foi de 1,69. A intoxicação mercurial no grupo 3D elevou significativamente este parâmetro para 4,83. No grupo 6D, a concentração de peróxidos lipídicos foi de 4,03 significativamente diferente quando comparada à do controle.

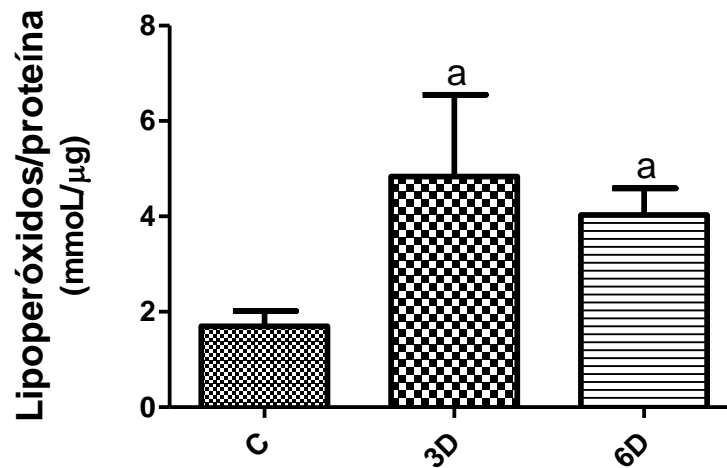


FIGURA 13 Concentração de lipoperóxidos (mmol/μg de proteína) em tecido retiniano para animais dos grupos controle (C) e animais expostos ao mercúrio e analisados 3 e 6 dias após, grupos 3D e 6D, respectivamente. Os dados estão apresentados como média ± EPM de três experimentos. ^a $p < 0,05$ vs C.

Nossos resultados da concentração de lipoperóxidos indicam que a peroxidação lipídica de retinas de ambos os animais dos grupos intoxicados por metilmercúrio (3D e 6D) tiveram aumento significativo em relação aos animais controle. De fato, peroxidação lipídica induzida por mercúrio parece ser crucial na toxicidade deste composto (SARAFIAN; VERITY, 1991). Um dos primeiros experimentos *in vivo* a demonstrar peroxidação lipídica induzido por metilmercúrio foi Yonaha e colaboradores. Neste estudo, ratos adultos receberam injeção, por via subcutânea, na dose de 10 mg/kg/dia p.c. de cloreto de metilmercúrio durante 7 dias. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foram mensuradas no fígado, rins e soro como índice de peroxidação lipídica, assim como os hidrocarbonetos (etano e pentano) exalados destes animais. Os resultados obtidos mostraram elevada peroxidação lipídica tanto nos tecidos como no soro. Estes pesquisadores também encontraram redução na atividade da glutathione peroxidase em fígado e rins. Foi sugerido que aumento significativo da formação de peróxidos lipídicos pode ser resultado de esgotamento de fatores de defesa que atuam contra a peroxidação lipídica (YONAHA; SAITO; SAGAI, 1983).

Em outro estudo conduzido por Nabi e colaboradores foi avaliado os efeitos do cloreto de metilmercúrio sobre a capacidade antioxidante, concentração proteica,

peroxidação lipídica e hidroperoxidação em regiões do cérebro, medula espinhal, pulmão, coração e pâncreas de ratos adultos. Estes animais foram intoxicados com cloreto de metilmercúrio na dose de 2 mg/kg/dia p.c., por gavagem, durante 28 dias. Os resultados revelaram aumento de peróxidos lipídicos e hidroperóxidos em todos os tecidos após a administração da droga. Ainda houve alteração na capacidade antioxidante dos animais tratados com redução nas atividades das enzimas SOD e CAT, além de reduções do conteúdo de GSH e de concentração proteica em todos os tecidos (NABI; ARA; RIZVI, 2011).

Aumento da peroxidação lipídica também foi observado em cultura de mitocôndrias, as quais foram isoladas de cérebros de camundongos adultos tratados com cloreto de metilmercúrio (40 mg/L) diluído em água de beber durante 21 dias. Franco e colaboradores investigaram a participação da GPx na toxicidade induzida pelo MeHg. Interessantemente este grupo de pesquisa encontrou concentração elevada de TBARS como consequência da atividade inibida da enzima GPx mediada pela toxicidade deste metal. Esta hipótese pôde ser confirmada quando se fez adição de GPx exógena a esta cultura e a peroxidação lipídica foi completamente bloqueada. Concomitantemente a estes dados, MeHg aumentou a produção de ROS nesta cultura que também foi bloqueada pela adição de GPx (FRANCO *et al.*, 2009).

Nossos resultados, tomados em conjunto, demonstraram pela primeira vez a lesão de retinas de ratos expostos ao cloreto de metilmercúrio na dose única de 2500 µg/kg/dia de peso corpóreo, caracterizada pela ativação de células de Müller. Sugerimos que a gliose reativa foi acompanhada provavelmente de aumento na produção de ROS. Embora, este parâmetro não foi mensurado neste estudo, podemos inferi-lo indiretamente quando avaliamos o estado redox do tecido estudado. De fato, a intoxicação mercurial promoveu alteração da capacidade antioxidante do tecido retiniano como observado pela redução da concentração de GSH e atividade da enzima catalase. A peroxidação lipídica também parece ser um dos mecanismos moleculares de lesão em retinas na intoxicação por MeHg.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram que a intoxicação mercurial na dose de 2500 µg/kg de p.c. é capaz de aumentar as expressões de proteínas como p ERK ½ e GFAP, caracterizando, dessa maneira, o estabelecimento de um modelo de gliose pela lesão tecidual na retina. Além disso, a suplementação com óleo de peixe teve efeito neuroprotetor inibindo o desenvolvimento do modelo proposto, pela redução da expressão proteica dos marcadores de gliose.

Além do desenvolvimento de um modelo de estudo da gliose, outras alterações foram encontradas pela intoxicação por mercúrio na retina, como aumento do estresse oxidativo pela elevada expressão da proteína Nrf2, redução da atividade de moléculas como a catalase e a glutadiona e aumento da concentração de lipoperóxidos, em diferentes tempos de exposição mercurial, mesmo não apresentando efeitos sobre mecanismos de apoptose e enzimas de cunho inflamatório, como a Caspase 3 e a COX2, respectivamente. O possível papel neuroprotetor do óleo de peixe não foi avaliado nestes parâmetros.

Sendo assim, um modelo para estudo da gliose retiniana foi estabelecido, onde o óleo de peixe atuou na inibição do processo de desenvolvimento da doença. Além disso, alterações na funcionalidade retiniana foram encontradas pela exposição mercurial. Novos trabalhos serão necessários para avaliar o completo efeito do óleo de peixe sobre estas e novas análises realizadas neste modelo.

7 REFERÊNCIAS

ABDEL-HAMID, H.A., FAHMY, F.C., SHARAF, I.A. Influence of free radicals on cardiovascular risk due to occupational exposure to mercury. **The Journal of the Egyptian Public Health Associatio**, v. 76, n. 1-2, p. 53-69, 2001.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AGUIRRE, G.D., ACLAND, G.M., MAUDE, M.B., ANDERSON, R.E. Diets enriched in docosahexaenoic acid fail to correct progressive rod-cone degeneration (prcd) phenotype. **Investigate Ophthalmology & Visual Science**, v. 38, p. 2387-2407, 1997

AKAGI, H.; MALM, O.; KINJO, Y.; HARADA, M.; BRANCHES, F.J.P.; PFEIFFER, W.C.; KATO, H. Methylmercury pollution in the Amazon, Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 175, p. 85-95, 1995.

AKIYAMA, H.; NAKAZAWA, T.; SHIMURA, M.; TOMITA, H.; TAMAI, M. Presence of mitogen-activated protein kinase in retinal Müller cells and its neuroprotective effect ischemia-reperfusion injury. **Neuroreport**, v. 13, p. 2103-2107, 2002.

ANDERSON, R.E. Lipids of ocular tissue: IV Comparison of phospholipids from retinas of six mammalian species. **Experimental Eye Research**, v. 10, n.2, p. 339-344, 1970.

ANDERSON, R.E., MAUDE, M.B., BOK, D. Low docosahexaenoic acid levels in rod outer segment membranes of mice with rds/peripherin and P216L peripherin mutations. **Investigate Ophthalmology & Visual Science**, v. 42, p. 1715-1720, 2001.

ASCHNER, M. Astrocyte swelling, phospholipase A2, glutathione and glutamate: Interactions in methylmercury-induced neurotoxicity. **Cellular and Molecular Biology**, v. 46, n.4, p. 843-854, 2000.

ASCHNER, M.; ALLEN, J.W.; KIMELBERG, H.K.; LOPACHIN, R.M.; STREIT, M.J. Glial cells in neurotoxicity development. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 39, p. 151-173, 1999.

ASCHNER, M.; EBERLE, N.B.; GODERIE, S.; KIMELBERG, H.K. Methylmercury uptake in rat primary astrocyte cultures: the role of the neutral amino acid transport system. **Brain Research**, v. 521, p. 221-228, 1990.

ASCHNER, M.; ONISHCHENKO, N.; CECCATELLI, S. Toxicology of alkylmercury compounds. **Metal Ions in Life Sciences**, v. 7, p. 403-434, 2010.

ASCHNER, M.; VITARELLA, D.; ALLEN, J.W.; CONKLIN D.R.; COWAN, K.S. Methylmercury induced inhibition of regulatory volume decrease in astrocytes: characterization of osmoregulator efflux and its reversal by amiloride. **Brain Research**,

v. 811, p. 133-142, 1998.

ATSDR – Agency for Toxic Substance and Disease Registry. **Toxicological Profile for Mercury**. Atlanta: Division of Toxicology / Department of Health and Human Services, 1999.

ATSDR – Agency for Toxic Substance and Disease Registry. **Toxicological Profile for Mercury**. Atlanta: Division of Toxicology / Department of Health and Human Services, 2011.

AZEVEDO, F.A. **Toxicologia do mercúrio**, 1ed. São Paulo: Rima, 2003.

BAYDAS, G.; TUZCU, M.; YASAR, A.; BAYDAS, B. Early changes in glial reactivity and lipid peroxidation in diabetic rat retina: effects of melatonin. **Acta Diabetologica**, v. 41, n. 3, p. 123-128, 2004.

BAZAN, N.G. Cell survival matters: docosahexaenoic acid signaling neuroprotection and photoreceptors. **Trends in Neurosciences**, v. 29, n. 5, p. 263-271, 2006.

BAZAN, N.G.; SCOTT, B.L.; REDDY, T.S.; PELIAS, M.Z. Decreased content of docosahexaenoate and arachidonate in plasma phospholipids in Usher's Syndrome. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 141, p. 600-604, 1986.

BERLIN, M.; ZALUPS, R.K.; FOWLER, B.A. "Mercury," in Handbook on the Toxicology of Metals, G.F. NORDBERG, G.F.; FOWLER, B.A.; NORDBERG, M.; FRIBERG, L.T. Eds., chapter 33, Elsevier, New York, NY, USA, 3rd edition, 2007.

BERNHOF, R. Mercury Toxicity and Treatment: A Review of the Literature. **Journal of Environmental and Public Health**, 2012.

BERTAZOLLI-FILHO, R.; LAICINE, E.M.; HADDAD, A.; RODRIGUES, M.L. Molecular and biochemical analysis of ceruloplasmin expression in rabbit and rat ciliary body. **Current Eye Research**, v. 31, n. 2, p. 155-161, 2006.

BERTAZOLLI-FILHO, R.; LAICINE, E.M.; HADDAD, A. Synthesis and secretion of transferrin by isolated ciliary epithelium of rabbit. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 305, n. 4, p. 820-825, 2003.

BISINOTI, M.C.; JARDIM, W.F. O comportamento do metilmercúrio (MetilHg) no Ambiente. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 593-600, 2004.

BRENNAN, J.T.; DIAU, G.Y. The influence of dietary docosahexaenoic acid and arachidonic on central nervous system polyunsaturated fatty acid composition. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 77, p. 247-250, 2007.

BRIDGES, C.C.; BATTLE, J.R.; ZALUPS, R.K. Transport of thiol-conjugates of inorganic mercury in human retinal pigment cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.

221, p. 251–260, 2007.

BRINGMANN, A.; PANNICKE, T.; GROSCHE, J.; FRANCKE, M.; WIEDEMANN, P.; SKATCHKOV, S.N.; OSBORNE, N.N.; REICHENBACH, A. Müller cells in the healthy and diseased retina. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 25, n. 4, p. 397-424, 2006.

BRINGMANN, A.; IANDIEV, I.; PANNICKE, T.; WURN, A.; HOLLBORN, M.; WIEDEMANN, P.; OSBORNE, N.N.; REICHENBACH, A. Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: Neuroprotective and detrimental effects. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 28, p. 423-451, 2009.

CALDER, P.C. Dietary fatty acids and the immune system. **Nutrition society**, v. 57, p. 487-508, 1998.

CALDER, P.C. N-3 Polyunsaturated fatty acids and immune cell function. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 37, p. 197-237, 1997.

CALDER, P.C. N-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.83, n. 6, p. 1505-1519, 2006.

CASTOLDI, A.F.; BARNI, S.; TURIN, I.; GANDINI, C.; MANZO, L. Early acute necrosis, delayed apoptosis and cytoskeleton breakdown in cultured cerebellar granule neurons exposed to methylmercury. **Journal of Neuroscience Research**, v. 15, n. 6, p. 775-787, 2000.

CASTOLDI, A.F.; COCCINI, T.; CECCATELLI, S.; MANZO, L. Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. **Brain Research Bulletin**, v. 55, n. 2, p. 197-203, 2001.

CECCATELLI, S.; DARÉ, E.; MOORS, M. Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, 2010.

CLARKSON, T.W. Mercury: Major Issues in Environmental Health. **Environmental Health Perspectives**, v. 100, pp. 31-38, 1992.

CLARKSON, T. W. The three modern faces of mercury. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 1, p. 11-23, 2002.

CLARKSON, T.W. The toxicology of mercury. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 34, p. 369-403, 1997.

CLARKSON, T.W.; MAGOS, L. The toxicology of Mercury and its chemical compounds. **Critical Reviews Intoxicology**, v. 36, n.8, p. 609-662, 2006.

CLARKSON, T.; VYAS, J.B.; BALLATORI, N. Review. Mechanisms of Mercury Disposition in the Body. **American Journal of Industrial Medicine**, v.50, p. 757–764,

2007.

COMPEAU, G.C.; BARTHA, R. Sulfate-reducing bacteria: Principal methylators of mercury in anoxic estuarine sedimentt. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 498-502, 1985.

CONNOR, W.E.; LOWENSLHN, R.; HATCHER, L. Increased docosahexaenoic acid levels in human newborn infants by administration of sardines and fish oil during pregnancy. **Lipids**, v. 31, p. 183-187, 1996.

COUNTER, S. A., BUCHANAN, L. H. Mercury exposure in children: a review. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 198, p. 209-230. 2004.

CRAWFORD, M.A. The role of essencial fatty acids in neural development: implications for perinatal nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p. 703-709, 1993.

CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYSASAKA, C.K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. 1ª ed. São Paulo: Manole, 2002.

DARÉ, E.; LI, W.; ZHIVOTOVSKY, B.; YUAN, X.; CECCATELLI, S. Methylmercury and H₂O₂ provoke lysosomal damage in human astrocytoma D384 cells followed by apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, n. 12, p. 1347-1356, 2001.

DAVE, V.; MULLANEY, K.J.; GODORIE, S.; KIMELBERG, H.K.; ASCHNER, M. Astrocytes as mediators of methylmercury neurotoxicity: effects on D-aspartate and serotonin uptake, **Developmental Neuroscience** v. 16, p. 222-231, 1994.

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

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 28, n. 1, p. 47-95, 2002.

EVANS, H.L.; GARMAN, R.H. Scotopic vision as an indicator of neurotoxicity. In: MERIGAN, W.H., WEISS, B. (Eds.), Neurotoxicity of the visual systems. Raven Press. New York, p. 135-147, 1980.

FADINI, P.S.; JARDIM, W.F. Is the Negro River Basin (Amazon) impacted by naturally occurring mercury? **Science of The Total Environment**, v. 275, n. 1-3, p. 71-82, 2001.

FARINA, M.; ASCHNER, M.; ROCHA, J.B.T. Special Issue: Environmental Chemicals and Neurotoxicity Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity, **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 256, n. 3p. 405-417, 2011.

FAVALORO, B.; ALLOCATI, N.; GRAZIANO, V.; DI LLIO, C.; DE LAURENZI, V. Role of apoptosis in disease. **Aging**, v.4, n.5, p.330-349, 2012

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

GARMAN, R.H.; WEISS, B.; EVANS, H.L. Alkylmercurial encephalopathy in the monkey: a histopathologic and autoradiographic study, **Acta Neuropathologica**, v. 32, p. 61-74, 1975.

GELLER, S.F.; LEWIS, G.P.; FISHER, S.K. FGFR1, signaling, and signaling, and AP-1 expression after retinal detachment: reactive Müller and RPE cells. **Investigate Ophthalmology & Visual Science**, v. 42, p. 1363-1369, 2001.

GERHARDINGER, C.; COSTA, M.B.; COULOMBE, MC.; TOTH, I.; HOEHN, T.; GROSU, P. Expression of acute-phase response proteins in retinal Müller cells in diabetes. **Investigate Ophthalmology & Visual Science**, v. 46, n. 1, p. 349-357, 2005.

GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; RALL, T.W.; MURAD, F. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11a ed. Rio de Janeiro: Grow-Hill, 2006.

GOBBA, F.; CAVALLERI, A. Review. Color vision impairment in workers exposed to neurotoxic chemicals. **Neurotoxicology**, v. 24, n. 4-5, p. 693-702, 2003.

GORDON, W.C.; BAZAN, N.G. Retina. In: Harding, J.J. (Ed.), *Biochemistry of the Eye*, 1st ed. **Chapman & Hall**, London, p. 144-275, 1997.

GUZZI, G.P.; LA PORTA, C.A. Review. Molecular mechanisms triggered by Mercury. **Toxicology**, v. 244, p. 1-12, 2008

HAIL J. R, N.; CARTER B. Z.; KONOPLEVA, M.; ANDREEFF, M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. **Apoptosis**, v. 11 p. 889-904, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C.; **Free radicals in Biology and Medicine**. 3 ed. London: Oxford University Press, 1999.

HANISCH, U.K. Microglia as a source and target of cytokines. **Glia**, v. 40, p. 140-155, 2002.

HAUGE; T.A.; CHRISTOFFERSEN, B.O. Effect of dietary fats on arachidonic acid and eicosapentaenoic acid biosynthesis and conversion of C22 fatty acids in isolated liver cells. **Biochemical Biophysical Acta**, v. 796, p. 205-217, 1984.

HARADA, M. Minamata Disease: Methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 25, n.1, p. 1-24, 1995.

HARADA, T.; HARADA, C.; KOHSAKA, S.; WADA, E.; YOSHIDA, K.; OHNO, S.;

MAMADA, H.; TANAKA, K.; PARADA, L.F.; WADA, K. Microglia-Müller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 21, p. 9228-9236, 2002.

HARDMAN, W. E. (n-3) Fatty Acids and Cancer Therapy. **Journal of Nutrition**, v.134, n.12, p. 3427-3430, 2004.

HORROCKS, L.A.; YEO, Y.K. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). **Pharmacological Research**, v. 40, n. 3, 1999.

HORVAT, M. Mercury analysis and speciation in environmental samples. In: Baeyens, W., Ebinghaus, R., Vasiliev, O. Kluwer A. Global and regional mercury cycles: sources, fluxes and mass balances. Netherlands: Publishers, p.1-31. 1996.

HUSSAIN, S.; ATKINSON, A.; THOMPSON, S.J.; KHAN, A.T. Accumulation of mercury and its effect on antioxidant enzymes in brain, liver, and kidneys of mice. **Journal of Environmental Science & Health Part B**, v. 34, n. 4, p. 645-660, 1999.

JARDIM, W.F. "Contaminação por mercúrio: fatos e fantasias", *Ciência Hoje*, v. 41, n. 7, p. 78-79, 1988.

KAUR, P.; ASCHNER, M.; SYVERSEN, T. Glutathione modulation influences methyl mercury induced neurotoxicity in primary cell cultures of neurons and astrocytes. **Neurotoxicology**, v.27, p.492-500, 2006.

KAUR, P.; HEGGLAND, I.; ASCHNER, M.; SYVERSEN, T. Docosahexaenoic acid may act as a neuroprotector for methylmercury-induced neurotoxicity in primary neural cell cultures. **Neurotoxicology**, v. 29, p. 978-987, 2008.

KIM, H.Y. Novel metabolism of docosahexaenoic acid in neural cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p.18661-5, 2007.

KIM, H.Y.; EDSALL, L.; GARCIA, M.; ZHANG, H. The release of polyunsaturated fatty acids and their lipoxygenation in the brain. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 447, p. 75-85, 1999.

KOBAYASHI, M; YAMAMOTO, M. Molecular mechanisms activating the Nrf2-keap1 pathway of antioxidant gene regulation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, p 385-394, 2005.

KOROGI, Y.; TAKAHASHI, M.; HIRAI, T.; IKUSHIMA, I.; KITAJIMA, M.; SUGAHARA, T.; SHIGEMATSU, Y.; OKAJIMA, T.; MUKUNO, K. Representation of the visual field in the striate cortex: Comparison of MR findings with visual field deficits in organic mercury poisoning (Minamata disease). **American Journal of Neuroradiology**, v. 18, n. 6, p. 1127-1130, 1997.

KROMIDAS, L.; TROMBETTA, L.D.; JAMALL, I.S. The protective effects of glutathione

against methylmercury cytotoxicity. **Toxicology Letters**, v. 51, p. 67-80, 1990.

KUMAR, S. Caspase function in programmed cell death. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, p. 32-43, 2007.

KUMAR, S. Review. Mechanisms mediating caspase activation in cell death. **Cell Death and Differentiation**, v. 6, p.1060-1066, 1999.

KUNIMOTO, M. Methylmercury induces apoptosis of rat cerebellar neurons in primary culture. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 204, n.1, p. 310-317, 1994.

LACERDA, L.D. Evolution of Mercury Contamination in Brazil. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 97, p. 247-255, 1997.

LACERDA, L.D.; MENESES, C.F.O. Mercúrio e a contaminação de reservatórios no Brasil. **Ciência Hoje**, v. 19, n. 110, p. 34-39, 1995.

LAEMMLI, U.K.; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, **Nature**, 227, p. 680–685, 1970.

LEBEL, J.; MERGLER, D.; BRANCHES, F.; LUCOTTE, M.; AMORIM, M.; LABIRRE, F.; DOLBEC, J. Neurotoxic effects of low-level methylmercury contamination in the Amazonian basin. **Environment Research**, v. 79, n. 1, p. 20-32, 1998.

LEE, J.E.; LIANG, K.J.; FARISS, R.N. WONG, W.T. Ex vivo dynamic imaging of retinal microglial using time-lapse confocal microscopy. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 49, n. 9, p. 4169-4176, 2008.

LI, F.; CHEN, H.; ANDERSON, R.E. Biosynthesis of docosahexaenoate-containing glycerolipid molecular species in the retina. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 16, p. 205-214, 2001.

LINDBERG, S.E. Emission and deposition of atmospheric mercury vapor. **Environmental Sciences Division**, p. 89-106. 1987

LITMAN, B.J.; NIU, S.L.; POLOZOVA, A.; MITCHELL, D.C. The role of docohexaenoic acid containing phospholipids in modulating G protein-coupled signaling pathways: visual transduction. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 16, p. 237-242, 2001

MAKRIDES, M.; NEUMANN, M.A.; BYARD, R.W.; SIMMER, K.; GIBSON, R.A. Fatty acid composition of brain, retina, and erythrocytes in breast-and formula-fed infants. **The American Journal of Clinical**, v. 60, p. 189-194, 1994.

MALM, O.; BRANCHES, F.J.P.; AKAGI, H.; CASTRO, M.B.; PFEIFFER, W.C.; HARADA, M.; BASTOS, W.R.; KATO, H. Mercury and methylmercury in fish and human hair from the Tapajos river basin, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 175,

n.2, p. 141-150, 1995.

MAZERIK, J.N.; HAGELE, T.; SHERWANI, S.; CIAPALA, V.; BUTLER, S.; KUPPUSAMY, M.L.; HUNTER, M.; KUPPUSAMY, P.; MARSH, C.B.; PARINANDI, N.L. Phospholipase A2 activation regulates cytotoxicity of methylmercury in vascular endothelial cells. **International Journal of Toxicology**, v. 26, n. 6, p. 553-569, 2007a.

MAZERIK, J. N.; MIKKILINENI, H.; KUPPUSAMY, V.A.; STEINHOOR, E.; PELTZ, A.; MARSH, C.B.; KUPPUSAMY, P.; PARINANDI, N.L. Mercury Activates Phospholipase A2 and Induces Formation of Arachidonic Acid Metabolites in Vascular Endothelial Cells. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v.17, p. 1–17, 2007b.

MELA, M.; CAMBIER, S.; MESMER-DUDONS, N.; LEGEAY, A.; GRÖTZNER, S.R.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A.; VENTURA, D.F.; MASSABUAU, J.C. Methylmercury localization in *Danio rerio* retina after trophic and subchronic exposure: A basis for neurotoxicology. . **Neurotoxicity**, v. 31, p. 448-453, 2010.

MELA, M.; GRÖTZNER, S.R.; LEGEAY, A.; MESMER-DUDONS, N.; MASSABUAU, J.C.; VENTURA, D.F.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A. Morphological evidence of neurotoxicity in retina after methylmercury exposure. **Neurotoxicity**, v. 33, p. 407-415, 2012.

MITCHELL, D.C.; NIU, S.L.; LITMAN, B.J. Optimization of receptor-G protein coupling by bilayer lipid composition I: Kinetics of rhodopsin-transducin binding. **The Journal Biological Chemistry**, v. 276, 42801-42806, 2001.

MITCHELL, D.C.; NIU, S.L.; LITMAN, B.J. Enhancement of G protein-acoupled signaling by DHA phospholipids. **Lipids**, v. 38, n.4, p. 437-443, 2003.

MIURA, K.; CLARKSON, T.W. Reduced methylmercury accumulation in a methylmercury-resistant rat pheochromocytoma PC12 cell line, **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 118, 39-45, 1993.

MOORE, S.A.; YODER, E.; MURPHY, S.; DUTTON, G.R.; SPECTOR, A.A. Astrocytes, not neurons, produce docosahexaenoic acid (22:6 omega-3) and arachidonic acid (20:4 omega-6). **Journal of Neurochemistry**, v. 56, n.2, p. 518-524, 1991.

MORAIS, S.; COSTA, F.G.; PEREIRA, M.L. Heavy Metals and Human Health. In Environmental Health, 1st ed. Oosthuizen, J: **InTech Open Sci**, p. 227-246, 2012.

MOREL, F. M. M.; KRAEPIEL, A. M. L.; AMYOT, M. The cycle and bioaccumulation of mercury. **Annual Reviews of Ecological and Systematics**, v. 29, p. 543-566, 1998.

MORENO, M.C.; CAMPENELLI, J.; SÁENZ, P.; SANEZ, D.A.; KELLER SARMIENTO, M.I.; ROSENSTEIN, R.E. Retinal oxidative stress induced by high intraocular pressure. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 6, p. 803-812, 2004.

MUNTHE, J.; MCELROY, W.J. Some aqueous reactions of potential importance in the

atmospheric chemistry of mercury. **Atmospheric Environment, Part A, General Topics**, v. 26, n. 4, p. 553-557, 1992.

NABI, S.; ARA, A.; RIZVI, S.J. Methylmercury Chloride Coaxed Oxidative Stress in Rats. **Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics**, v. 10, p. 52-60, 2011.

NAGASHIMA, K.; FUJII, Y.; TSUKAMOTO, T.; NUKUZUMA, S.; SATOH, M.; FUJITA, M.; FUJIOKA, Y.; AKAGI, H. Apoptotic process of cerebellar degeneration in experimental methylmercury intoxication of rats. **Acta neuropathologica**, v. 91, n.1, p. 72-77, 1996.

NASCIMENTO, J.L.M.; OLIVEIRA, K.R.M.; CRESPO-LOPEZ, M.E.; MACCHI, B.M.; MAUÉS, L.A.L.; PINHEIRO, M.C.N.; SILVEIRA, L.C.L.; HERCULANO, A.M. Review. Methylmercury neurotoxicity & antioxidant defenses. **Indian Journal of Medical Research**, v. 128, p. 373-382, 2008.

NINOMIYA, T.; OHMORI, H.; HASHIMOTO, K.; TSURUTA, K.; EKINO, S. Expansion of methylmercury poisoning outside of Minamata: An epidemiological study on chronic methylmercury poisoning outside of Minamata. **Environmental Research**, v. 70, n. 1, p. 47-50, 1995.

NISHIOKU, T.; TAKAI, N.; MIYAMOTO, K.; MURAO, K.; HARA, C.; YAMAMOTO, K.; NAKANISHI, H. Involvement of caspase 3-like protease in methylmercury-induced apoptosis of primary cultured rat cerebral microglia. **Brain Research**, v. 871, p. 160-164, 2000.

OBROSOVA, I.G.; FATHALLAH, L.; GREENE, D.A. Early changes in lipid peroxidation and anti-oxidative defense in diabetic rat retina: effect of DL-alpha-lipoic acid. **European Journal of Pharmacology**, v. 398, n.1, p. 139-146, 2000.

OSBURN, W.O.; KENSLER, T.W. Review. Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. **Mutation Research**, v. 659, n 1-2, p. 31-39, 2008

PAPALIAGKAS, V.; ANOGIANAKI, A.; ANOGIANAKIS, G., ILONIDIS, G. The proteins and the mechanisms of apoptosis: A mini-review of the fundamentals. **Hippokratia**, v.11, n.3, p. 108-113, 2007.

PARK, H.J.; YOUN, H.S. Mercury induces the expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. **Toxicology and Industrial Health**, v. 29, n. 2, p. 169-174, 2013.

PARK, J.D.; ZHENG, W. Human exposure and health effects of inorganic and elemental mercury. **Journal of Preventive Medicine and Public Health**, v. 45, n.6, p. 344-352, 2012.

PATEL, E.; REYNOLDS, M. Mini review. Methylmercury impairs motor function in early

development and induces oxidative stress in cerebellar granule cells. **Toxicology Letters**, v. 222, p. 265-272, 2013.

PATRICK, L. Mercury toxicity and antioxidants. Part 1. Role of glutathione and alpha-lipoic acid in the treatment of mercury toxicity. **Alternative Medicine Review**, v.7 n. 6, p. 456-471, 2002.

PFEIFFER, W. C.; LACERDA, L. D.; MALM, O.; SOUZA, C. M. M.; SILVEIRA, E. G.; BASTOS, W. R. Mercury concentrations in Inland Waters of Gold Mining Areas in Rondonia, Brazil. **The Science of the Total**, 1989.

PINHEIRO, M.C.N, NAKANISHI, J.; OIKAWA, T.; GUIMARÃES, G.A.; QUARESMA, M.; CARDOSO, B.S.; AMORAS, W.W.; HARADA, M.; MAGNO, C.; VIEIRA, J.L.F.; XAVIER, M.; BACELAR, M.D.R. Exposição humana ao metilmercúrio em comunidades ribeirinhas da Região do Tapajós, Pará, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 265-269, 2000.

PINHEIRO M.C.M.; CRESPO-LÓPEZ M.E.; VIEIRA, J.L.F. OIKAWA, T.; GUIMARÃES, G.A.; ARAÚJO C.C. Mercury pollution and childhood in Amazon riverside villages. **Environmental Internation**, v. 33, p. 56-61, 2007.

PINHEIRO, M.C.N.; MACCHI, B.M.; VIEIRA, J.L.F.; OIKAWA, T.; AMORAS, W.W.; GUIMARÃES, G.A.; COSTA, C.A.; CRESPO-LÓPEZ, M.E.; HERCULANO, A.M.; SILVEIRA, L.C.L.; NASCIMENTO, J.L.M. Mercury exposure and antioxidant defenses in women: A comparative study in the Amazon. **Environmental Research**, v. 107, p. 53-59, 2008.

PIRES, J. A.; MACHADO, E. P.; BITTAR, N. Riscos à Saúde e ao ambiente por Mercúrio. *Engenharia Sanitária*, Rio de Janeiro, v. 17, n. 4, p. 317-319, 1988.

PORTILLO, J.A.; VAN GROL, J.; ZHENG, L.; OKENKA, G.; GENTIL, K.; GARLAND, A.; CARLSON, E.C.; KERN, T.S.; SUBAUSTE, C.S. CD40 mediates retinal inflammation and neuro-vascular degeneration. **Journal Immunology**, v. 181, p. 8719-26, 2008.

RAMÍREZ CHAMOND, R.; CARRACEDO AÑÓN, J.; A.; MORENO AGUILAR, C.; GUERRA PASADAS, A. Review article. Apoptosis and disease. **Alergología e Inmunología Clínica**, v. 14, n. 6, p. 367-374, 1999.

RAVICHANDRAN, M. Review. Interactions between mercury and dissolved organic matter. **Chemosphere**, v. 55, n.3, p. 319-331, 2004.

REUBOLD, T. F.; ESCHENBURG, S. A molecular view on signal transduction by the apoptosome. **Cellular Signalling**, v.24, p.1420-1425, 2012.

ROSE, D.P.; CONNOLLY, J.M. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 83, p. 217-244, 1999.

ROSE, R.C.; RICHER, S.P.; BODE, A.M. Review. Ocular oxidants and antioxidant

protection. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 217, n. 4, p. 397-407, 1998.

ROULET, M; LUCOTTE, M; FARELLA, N; SERIQUE, G; COELHO, H; PASSOS, S.C.J.; SILVA, E DE JESUS DA SILVA; P. SCAVONE DE ANDRADE; MERGLER, D; GUIMARÃES, J-RD; AMORIM, M. Effects of Recent Human Colonization on the Presence of Mercury in Amazonian Ecosystems. **Water, Air and Soil Pollution**, p. 1-17, 1998.

SAKAMOTO, M.; NAKANO, A.; AKAGI, H. Declining Minamata male birth ratio associated with increased male fetal death due to heavy methylmercury pollution. **Environmental Research**, v. 87, n. 2, p. 92-98, 2001.

SANGIOVANNI, J.P.; CHEW, E.Y. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 24, p. 87-138, 2005.

SANTOS, E.C.O.; JESUS, I. M.; BRABO, E.S.; LOUREIRO, E.C.B.; MASCARENHAS, A.F.S.; WEIRICH, J.; CÂMARA, V.M.; CLEARY, D. Mercury exposures in riverside Amazon communities in Pará, Brazil. **Environmental Research Section**, v. 84, n. 2, p. 100-107, 2000.

SARAFIAN, T.; VERITY, M.A. Oxidative mechanisms underlying methylmercury neurotoxicity. *Int. J. Devl. Neuroscience*, v. 9, n.2, p. 147-153, 1991

SARAFIAN, T.A. Methylmercury-induced generation of free radicals: biological implications. **Metal Ions in Biological Systems**, v. 36, p. 415-444, 1999.

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

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, p.995-1014, 2005.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v.25, p.192-205, 1968.

SENNLAUB, F.; VALAMANESH, F.; VAZQUEZ-TELLO, A.; EL-ASRAR, A.M.; CHECCHIN D.; BRAULT S.; GOBEIL, F.; BEAUCHAMP, M.H.; MWAIKAMBO, B.; COURTOIS, Y.; GEBOES. K.; VARMA, D.R.; LACHAPPELLE, P.; ONG, H.; BEHAR-COHEN, F.; CHEMTOB, S. Cyclooxygenase-2 in human and experimental ischemic proliferative retinopathy. **Circulation**, v. 108, n.2, p. 198-204, 2003.

SCHROEDER, W.H.; MUNTHE, J. Atmospheric Mercury – An Overview. **Atmospheric**

Transport, Chemistry and Deposition of Mercury, v. 32, p. 809-822, 1998.

SCHULZ, J.B.; LINDENAU, J.; SEYFRIED, J.; DICHGANS, J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 4904-11, 2000.

SIU, T.L.; MORLEY, J.W.; CORONEO, M.T. Review. Toxicology of the retina: advances in understanding the defence mechanisms and pathogenesis of drug- and light-induced retinopathy. **Clinical & Experimental Ophthalmology**, v. 36, n. 2, p. 176-185, 2008.

SHANKER, G.; ASCHNER, M. Methylmercury-induced reactive oxygen species formation in neonatal cerebral astrocytic cultures is attenuated by antioxidants. **Brain Research. Molecular Brain Research**, v. 110, n.1, p. 85-91, 2003.

SHANKER, G. SYVERSEN, T.; ASCHNER, M. Astrocyte-Mediated Methylmercury Neurotoxicity. **Biological Trace Elemental Research**, v. 95, n.1, p. 1-10, 2003.

SHANKER, G.; ASCHNER, M. Methylmercury-induced reactive oxygen species formation in neonatal cerebral astrocytic cultures is attenuated by antioxidants. **Molecular Brain Research**, v. 110, p. 85-91, 2003.

SHANKER, G.; ASCHNER, J.L.; SYVERSEN, T.; ASCHNER, M. Free radical formation in cerebral cortical astrocytes in culture induced by methylmercury, **Molecular Brain Research**, v. 128, p. 48-57, 2004.

SHANKER, G.; SYVERSEN, T.; ASCHNER, J.L.; ASCHNER, M. Modulatory effect of glutathione status and antioxidants on methylmercury-induced free radical formation in primary cultures of cerebral astrocytes. **Molecular Brain Research**, v. 137, p. 11-22, 2005.

SHENKER, B.J.; GUO, T.L.; OU, I; SHAPIRO, I.M. Induction of apoptosis in human T-cells by methylmercury: temporal relationship between mitochondrial dysfunction and loss of reductive reserve, **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 157, p. 23-35, 1999.

SHENKER, B.J.; GUO, T.L.; OU, I; SHAPIRO, I.M. Low-Level Methylmercury Exposure Causes Human T-Cells to Undergo Apoptosis: Evidence of Mitochondrial Dysfunction. **Environmental Research, Section A**, v. 77, n. 2, p. 149-159, 1998.

SHENKER, B.J.; PANKOSKI, L.; ZEKAVAT, A.; SHAPIRO, I.M. Mercury induced apoptosis in human lymphocytes: caspase activation is linked to redox status. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 4, n.3, p. 379-389, 2002.

SYVERSEN, T.; KAUR, P. Invited review. The toxicology of mercury and its compounds. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.26, p. 215-226, 2012.

TANAN, C.L., VENTURA, D.F.; DE SOUZA, J.M.; GROTZNER, S,R.; MELA, M.;

GOUVEIRA, A.JR., OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A. Effects of mercury intoxication on the response of horizontal cells of the retina of thraira fish (*Hoplias malabaricus*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 7, p. 987-995, 2006.

TANITO, M.; AGBAGA, M.P.; ANDERSON, R.E. Upregulation of thioredoxin system via Nrf2-antioxidant responsive element pathway in adaptive-retinal neuroprotection in vivo and in vitro. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 42, n. 12, p.1838-1850, 2007.

TANITO, M.; NISHIYAMA, A.; TANAKA, T.; MASUTANI, H.; NAKAMURA, H, YODOI, J.; OHIRA, A. Change of Redox Status and Modulation by Thiol Replenishment in Retinal Photooxidative Damage. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 43, n. 7, p. 2392-2400, 2002.

TESSIER-LAVIGNE, M.; MOBBS, P.; ATTWELL, D. Lead and mercury toxicity and the rod light response. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 26, n.8, p. 1117-1123, 1985.

TEZEL, G.; CHAUHAN, B.C.; LEBLANC, R.P.; WAX, M.B. Immunohistochemical assessment of the glial mitogen-activated protein kinase activation in glaucoma. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, p. 3025-3033, 2003.

THE BRITISH NUTRITION FOUNDATION. **n-3 Fatty Acids and Health**. Briefing Paper, July, 1999.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TOYAMA, T.; SUMI, D.; SHINKAI, Y.; YASUTAKE, A.; TAGUCHI, K.; TONG, K.I.; YAMAMOTO, M.; KUMAGAI, Y. Cytoprotective role of Nrf2/Keap1 system in methylmercury toxicity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 363, n. 3, p. 645-650, 2007.

UNEP. United Nations Environmental Programme: Chemicals. **Global Mercury Assessment**. Geneva, Suíça, 2002.

UNEP. United Nations Environmental Programme: Sources, Emissions, Releases and Environmental Transport. UNEP Chemicals Branch, Geneva, Switzerland, 2013.

US EPA. United States Environmental Protection Agency: **Mercury Study Report to Congress**, Volume IV: Assessment of Exposure to Mercury in the United States. Washington, DC: Office of Air Quality Planning and Standards and Office of Research and Development. EPA-452/R-97-005, 1997.

US EPA. United States Environmental Protection Agency: **Water quality criterion for the protection of human health: methylmercury**. Washington, DC: EPA-0823/R-0-001, 2001.

USUKI, F.; FUJITA, E.; SASAGAWA, N. Methylmercury activates ASK1/JNK signaling pathways, leading to apoptosis due to both mitochondria- and endoplasmic reticulum (ER)-generated processes in myogenic cell lines. **Neurotoxicology**, v. 29, p. 22-30, 2008.

USUKI, F.; ISHIURA, S. Expanded CTG repeats in myotonin protein kinase increase susceptibility to oxidative stress. **Neuroreport**, v. 9, n. 10, p. 2291-2296, 1998.

VALKO, A.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Review. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VENTURA, D.F.; COSTA, M.T.V.; COSTA, M.F.; BEREZOVSKY, A.; SALOMÃO, S.R.; SIMÕES, A.L.; LAGO, M.; PEREIRA, L.H.M.C.; FARIA, M.A.M.; DE SOUZA, J.M.; SILVEIRA, L.C. Multifocal and full-field electroretinogram changes associated with color-vision loss in mercury vapor exposure. **Visual Neuroscience**, v. 21, p. 421-429, 2004.

VERITY, M.A.; SARAFIAN, T.; E. H. K. PACIFICI, E.H.K.; SEVANI, A. Phospholipase A2 stimulation by methylmercury in neuron culture. **Journal Neurochemistry**, v.62, p.705–714, 1994.

VITARELLA, D.; KIMELBERG, H.K.; ASCHNER, M. Inhibition of regulatory volume decrease in swollen rat primary astrocyte cultures by methylmercury is due to increased amiloride-sensitive Na⁺ uptake. **Brain Research**, v. 732, p. 169-178, 1996.

WAGNER, G.C.; REUHL, K.R.; MING, X.; HALLADAY, A.K. Behavioral and neurochemical sensitization to amphetamine following early postnatal administration of methylmercury (MeHg). **Neurotoxicology**, v. 28, n. 1, p. 59–66, 2007.

WANG L.; JIANG, H.; YIN, Z.; ASCHNER, M. CAI, J. Methylmercury Toxicity and Nrf2-dependent Detoxification in Astrocytes. **Toxicological Sciences**, v. 107, n. 1, p. 135-143, 2009.

WARFVINGE, K.; BRUNN, A. Mercury accumulation in the squirrel monkey eye after Mercury vapour exposure. **Toxicology**, v.107, n. 3, p. 189-200, 1996.

WELLS, J. Infant and follow-on formulas: the next decade. **British Nutrition Foundation. Bulletin**, v. 23, n. 1, p. 23-34, 1998.

WETZEL, M.G., LI, J., ALAVAREZ, R.A., ANDERSON, R.E., O'BRIEN, P.J. Metabolism of linolenic acid and docosahexaenoic acid in rat retinas and rod outer segments. **Experimental Eye Research**, v. 53, n.4, p. 437-446, 1991.

WHO. World Health Organization. Methylmercury. Geneva. Environment Health Criteria 101, 1990.

WHO. World Health Organization. Inorganic Mercury. Geneva. Environmental Health Criteria 11, 1991.

WHO. World Health Organization. Air Quality Guidelines 2ª edição. 2000.

WONG, R.S.Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 30, n.87, 2011.

WOODS, J.S.; DIEGUEZ-ACUÑA, F.J.; ELLIS, M.E.; KUSHLEIKA, J.; SIMMONDS, P.L. Attenuation of nuclear factor kappa B (NF-kappaB) promotes apoptosis of kidney epithelial cells: a potential mechanism of mercury-induced nephrotoxicity. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 5, p. 819-822, 2002.

YEE, S.; CHOI, B.H. Oxidative stress in neurotoxic effects of methylmercury poisoning. **Neurotoxicology**, v. 17, 1996.

YONAHA, M.; SAITO, M.; SAGAI, M. Stimulation of lipid peroxidation by methylmercury in rats. **Life Sciences**, v. 32, n. 13, p.1507-1514, 1983.

YUAN, Y.; ARCHISON, W.D. Disruption by methylmercury of membrane excitability and synaptic transmission of CA1 neurons in hippocampal slices of the rat. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 120, n.2, p. 203-215, 1993.

ZHENG, L.; GONG, B.; HATALA, D.A.; KERN, T.S. Retinal ischemia and reperfusion causes capillary degeneration: similarities to diabetes, **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 48, p. 361–367, 2007.

ANEXOS



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEA)



Nº 402

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

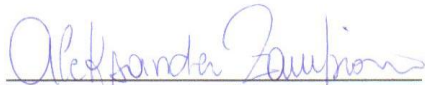
PROCESSO: 23075.096492/2009-07

APROVADO: 27/10/2009 – R.O. 09/2009

TÍTULO: Estudo dos efeitos neurotóxicos da intoxicação pelo mercúrio em estruturas oculares de rato e do papel neuroprotetor do ácido graxo docosaexaenóico

AUTORES: Luiz Claudio Fernades, Júlia Aikawa

DEPARTAMENTO: Fisiologia


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador do CEEA