



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

PEDRO PHILIPPE MOREIRA MATTA

EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA AO METILMERCÚRIO INDUZ DANOS TECIDUAIS,
BIOQUÍMICOS E PROTEÔMICOS EM CEREBELOS DE RATOS

BELÉM
2018

PEDRO PHILIPPE MOREIRA MATTA

EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA AO METILMERCÚRIO INDUZ DANOS TECIDUAIS,
BIOQUÍMICOS E PROTEÔMICOS EM CEREBELOS DE RATOS

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima

BELÉM
2018

PEDRO PHILIPPE MOREIRA MATTA

EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA AO METILMERCÚRIO INDUZ DANOS TECIDUAIS,
BIOQUÍMICOS E PROTEÔMICOS EM CEREBELOS DE RATOS

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Belém (PA), 04 de Julho de 2018

Banca Examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima (ICB/UFPA)

Prof. Dra. Luanna Melo Pereira Fernandes (ICS/UFPA)

Prof. Dra. Renata Duarte de Souza Rodrigues (ICA/UFPA)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M435e Matta, Pedro Philipe Moreira
Exposição subcrônica ao metilmercúrio induz danos teciduais, bioquímicos e proteômicos em cerebelos de ratos / Pedro Philipe Moreira Matta. — 2018
83 f. : il. color
- Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia celular (PPGNBC), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima
1. Compostos de metilmercúrio - Toxicidade. 2. Compostos de metilmercúrio - Efeitos adversos. 3. Estresse oxidativo - Efeitos da radiação. 4. Cerebelo - Efeitos da radiação. 5. Cerebelo - Lesões. I. Lima, Rafael Rodrigues, *orient.* II. Título

CDD 571.954663

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES E FONTES FINANCIADORAS

Universidade Federal do Pará - UFPA

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	7
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	8
RESUMO	12
ABSTRACT	13
2.1. OBJETIVO GERAL	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS	18
3.2. FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	18
3.3. EXPOSIÇÃO AO METILMERCÚRIO	20
3.4. ENSAIOS COMPORTAMENTAIS	20
3.4.1. <i>Teste da atividade locomotora espontânea (open field)</i>	20
3.4.2. <i>Teste do rotarod</i>	21
3.5. ANÁLISE BIOQUÍMICA	22
3.5.1. <i>Quantificação de proteínas</i>	22
3.5.2. <i>Análise da capacidade antioxidante contra radical peroxil</i>	23
3.5.3. <i>Concentração de nitrito (NO)</i>	23
3.5.4. <i>Peroxidação lipídica (LPO)</i>	23
3.6. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE MERCÚRIO NO CEREBELO	24
3.7. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PROTEÔMICO	24
3.7.1. <i>Quantificação de proteínas totais e extração de proteínas</i>	25
3.8. ANÁLISE TECIDUAL	27
3.9. ANÁLISE QUANTITATIVA	28
3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
4.1. QUANTIFICAÇÃO MERCURIAL	30
4.2. AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES MOTORAS	30
4.3. AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA	33
4.4. AVALIAÇÃO DO PERFIL PROTEÔMICO	35
4.4.1. <i>Proteínas exclusivas e ausentes no grupo MeHg</i>	35
4.4.2. <i>Proteínas super e subexpressas no grupo MeHg</i>	49
4.4.3. <i>Gráfico com a distribuição funcional das proteínas</i>	61
4.5. AVALIAÇÃO TECIDUAL	66
4.5.1. <i>Avaliação da densidade neuronal</i>	66
4.5.2. <i>Avaliação da resposta microglial e astrocitária</i>	68
4.5.3. <i>Avaliação da organização da bainha de mielina e comunicação sináptica</i>	69
DISCUSSÃO	72
CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
ANEXO I	85

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AF	Ácido fórmico
BSA	Bovine Serum Albumin
SOD	Superóxido dismutase
ERO's	Espécies Reativas de Oxigênio
ERN's	Espécies Reativas de Nitrogênio
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
HClO₄	Ácido perclórico
HE	Hematoxilina e Eosina
GSH	Glutathione Reduzida
Hg	Mercúrio
HNO₃	Ácido nítrico 1 + 1
MDA	Malonaldeído
MeHg	Metilmercúrio
O₂⁻	Radical superóxido
OH⁻	Radical Hidroxil
OMS	Organização Mundial da Saúde
-SH	Grupamentos sulfidrilas
SNC	Sistema nervoso central
Tris-HCl	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol + ácido clorídrico

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1.** Resumo metodológico sobre período de exposição, coleta de cerebelo e análises realizadas. Ratos *Wistar* foram divididos em Grupo Controle – GC (n=28) e Grupo Exposto - MeHg (n=28). Ambos grupos receberam, água e alimentação padrão. O grupo MeHg recebeu por gavagem intragástrica MeHg (0,04 mg/kg/dia). Após 60 dias de gavagem os animais foram eutanasiados e o cerebelo foi coletado. A metade do cerebelo de 10 animais de cada grupo foram utilizados para a Mensuração de Hg (2) e a outra metade para a análise da bioquímica oxidativa baseada no Estresse Oxidativo (3), através de ensaio da concentração de nitrito (Nitrito), ensaio de peroxidação lipídica (LPO) e Capacidade Antioxidante Contra Radicais Peroxil (ACAP); Análise do perfil proteômico foi feita utilizando 8 animais de cada grupo (4); Análise Imunohistoquímica (5), a qual foi realizada com os 10 animais restantes e a partir da avaliação de imunomarcagem dos anticorpos anti neuN , anti-GFAP, anti-IBA-1, anti-MBP e anti-Sinaptofisina (SINA). 23
- Figura 2.** Exposição do animal ao aparato que compõe o Campo Aberto para realização do teste de atividade locomotora espontânea. 25
- Figura 3.** Imagem do equipamento Rotarod. 26
- Figura 4.** Efeitos da exposição crônica ao MeHg (40 µg / kg / dia), durante 60 dias, nos níveis de mercúrio no cerebelo de ratos Wistar. Resultados expressos com média ± erro padrão. *p< 0,0001 comparado ao grupo controle (Teste t de student). 33
- Figura 5.** Efeitos da exposição crônica ao MeHg (40 µg / kg / dia), durante 60 dias, na exploração horizontal espontânea (A) e número de rearings (B) de ratos Wistar. Resultados expressos com média ± erro padrão. *p= 0,01 comparado ao grupo controle (Teste t de student). 33
- Figura 6.** Efeitos da exposição crônica ao MeHg (40 µg / kg / dia), durante 60 dias, no número de quedas durante a deambulação forçada de ratos Wistar nas rotações de 20, 25 e 28RPMs. Resultados expressos com média ± erro padrão. *p= 0,02 comparado ao grupo controle (Teste t de student). 34
- Figura 7** Efeitos da exposição crônica ao MeHg (40 µg / kg / dia), durante 60 dias mostrando diminuição da capacidade antioxidante contra radicais peroxil de ratos Wistar. Resultados expressos em porcentagens da diferença da área da unidade de fluorescência das curvas. *p= 0,02 comparado ao grupo controle (Teste t de student). 35
- Figura 8** Efeitos da exposição crônica ao MeHg (40 µg / kg / dia), durante 60 dias, aumentando nos níveis de nitrito de ratos Wistar. Resultados expressos em porcentagem de microM por micrograma de proteína com média ± erro padrão. *p= 0,0001 comparado ao grupo controle (Teste t de student). 36
- Figura 9** Efeitos da exposição crônica ao MeHg (40 µg / kg / dia), durante 60 dias, aumento nos níveis de MDA de ratos Wistar. Resultados expressos em porcentagem de nanoM por micrograma de proteína com média ± erro padrão. *p< 0,0001 comparado ao grupo controle (Teste t de Student). 36

- Figura 10** Distribuição funcional de proteínas identificadas com diferença de expressão no cerebelo de ratos adultos entre o grupo MeHg e o grupo controle. Categoria de proteínas baseado na ontologia genética de processos biológicos, função molecular e componentes celulares. Significancia (Kappa = 0,4) e distribuição de acordo com a porcentagem de genes associados. O número de acesso das 74
- Figura 11** Rede de interação criada no aplicativo ClusterMarker, mostrando interações nas proteínas identificadas no cerebelo de ratos adultos com diferente expressão do grupo MeHg e o grupo controle. A coloração dos nós indicam a diferença entre a expressão das proteínas identificadas pelo número de acesso. Vermelho e verde escuro indicam proteínas encontradas apenas no grupo controle e no MeHg respectivamente, o verde claro e a rosa indicam proteínas super e subexpressas respectivamente. Os nós cinzas representam proteínas que não foram identificadas em ambos os grupos, porém interagem com a rede. 76
- Figura 12** Rede de interação criada no aplicativo ClusterMarker, mostrando a interação nas proteínas identificadas no cerebelo de ratos adultos com diferente expressão do grupo MeHg e o grupo controle. A coloração dos nós indicam a diferença entre a expressão das proteínas identificadas pelo número de acesso. Vermelho e verde escuro indicam proteínas encontradas apenas no grupo controle e no MeHg respectivamente, o verde claro e a rosa indicam proteínas super e subexpressas respectivamente. Os nós cinzas representam proteínas que não foram identificadas em ambos os grupos, porém interagem com a rede. (VERDE CLARO: Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1 **P16086**; Synaptojanin-1 **Q62910**; Dynamin-1 **P21575**; VERDE ESCURO Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11 **P41499**; Adaptin ear-binding coat-associated protein 1 **P69682**; ROSA: Endophilin-A2 **O35964**; Endophilin-A1 **O35179**; Dynamin-2 **P39052**; Myc box-dependent-interacting protein 1 **O08839**; Amphiphysin **O08838**; CINZA: **Q62910-2**; Sorbin and SH3 domain-containing protein 2 **O35413**; Vesicular glutamate transporter 1 **Q62634**; MOB-like protein phocein **Q9QYW3**; Endophilin-A3 **O35180**; Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha **Q63787**; Growth factor receptor-bound protein 2 **P62994**; BDNF/NT-3 growth factors receptor **Q63604**; Tyrosine-protein kinase JAK2 **Q62689**; Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type substrate 1 **P97710**). 77

Figura 13 Rede de interação criada no aplicativo ClusterMarker, mostrando a interação nas 78

proteínas identificadas no cerebelo de ratos adultos com diferente expressão do grupo MeHg e o grupo controle. A coloração dos nós indicam a diferença entre a expressão das proteínas identificadas pelo número de acesso. Vermelho e verde escuro indicam proteínas encontradas apenas no grupo controle e no MeHg respectivamente, o verde claro e a rosa indicam proteínas super e subexpressas respectivamente. Os nós cinzas representam proteínas que não foram identificadas em ambos os grupos, porém interagem com a rede. (Vermelho: Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 **P85970**; Syntaxin-1A **P32851**; Rabphilin-3A **P47709**; VERDE CLARO: V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1 **P25286**; Alpha-soluble NSF attachment protein **P54921**; Synaptosomal-associated protein 25 **P60881**; Complexin-1 **P63041**; Syntaxin-binding protein 1 **P61765**; Tubulin beta-3 chain **Q4QRB4**; Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2 **P06686**; Excitatory amino acid transporter 2 **P31596**; Tubulin alpha-4A chain **Q5XIF6**; Synaptotagmin-1 **P21707**; Synaptotagmin-2 **P29101**; CINZA: Syntaxin-binding protein 5 **Q9WU70**; Potassium voltage-gated channel subfamily B member 1 **P15387**; Syntaxin-12 **G3V7P1**; Calpain-10 **Q9ES66**; Vesicle-associated membrane protein 2 **P63045**; Beta-soluble NSF attachment protein **P85969**; Vesicle-associated membrane protein 1 **Q63666**; PRKCA-binding protein **Q9EP80**; Amyloid-beta A4 precursor protein-binding family A member 2 **O35431**; Syntaxin-2 **P50279**; Synapsin-3

Figura 14 Efeitos da exposição crônica ao MeHg (40 µg / kg / dia), durante 60 dias, em 79

células de Purkinje no cerebelo de ratos Wistar. Fotomicrografia em A representa grupo controle e em B grupo exposto ao MeHg (n = 5 animais por grupo). Em C gráfico representando análise quantitativa de células de Purkinje em grupos controle e MeHg, setas apontando para células de Purkinje Resultados expressos com média ± erro padrão. *p<0,0001 comparado ao grupo controle (Teste t de student). Escala = 100 µm.

Figura 15 Efeitos da exposição crônica ao MeHg (40 µg / kg / dia), durante 60 dias, em 80
células positivas para NeuN em cerebelo de ratos Wistar. Fotomicrografia em A
representa grupo controle e em B grupo exposto ao MeHg (n = 5 animais por
grupo). Em C gráfico representando análise quantitativa de células NeuN+ em
grupos controle e MeHg. Resultados expressos com média ± erro padrão. *p=
0,0142 comparado ao grupo controle (Teste t de student). Escala = 100 µm.

Figura 16 Efeitos da exposição crônica ao MeHg (40 µg / kg / dia), durante 60 dias, em 81
células positivas para IBA1 em cerebelo de ratos Wistar. Fotomicrografia em A
representa grupo controle e em B grupo exposto ao MeHg (n = 5 animais por
grupo). Em C a quantidade de células positivas para IBA-1 na camada granular,
enquanto D apresenta imunexpressão de IBA1 na camada molecular, ambas
em grupo controle e MeHg, setas apontando para células IBA1+ Resultados
expressos com média ± erro padrão. *p > 0.05 comparado ao grupo controle

Figura 17 Efeitos da exposição crônica ao MeHg (40 µg / kg / dia), durante 60 dias, em 82
células positivas para GFAP em cerebelo de ratos Wistar. Fotomicrografia em A
representa grupo controle e em B grupo exposto ao MeHg (n = 5 animais por
grupo). Em C a fração de área marcada por GFAP em grupos controle e MeHg.
Resultados expressos com média ± erro padrão. *p= 0,0190 comparado ao
grupo controle (Teste de Mann-Whitney). Escala = 100 µm.

Figura 18 Efeitos da exposição crônica ao MeHg (40 µg / kg / dia), durante 60 dias, na 83
imunomarcagem de Proteína Básica de Mielina (MBP) em cerebelo de ratos
Wistar. Fotomicrografia em A representa grupo controle e em B grupo exposto
ao MeHg (n = 5 animais por grupo). Em C a fração de área marcada por MBP
em grupos controle e MeHg. Resultados expressos com média ± erro padrão.
*p= 0,0046 comparado ao grupo controle (Teste de Mann-Whitney). Escala =
100 µm.

Figura 19 Efeitos da exposição crônica ao MeHg (40 µg / kg / dia), durante 60 dias, em 84
vesículas positivas para Sinaptofisina em cerebelo de ratos Wistar.
Fotomicrografia em A representa grupo controle e em B grupo exposto ao MeHg
(n = 5 animais por grupo). Em C a fração de área marcada por Sinaptofisina em
grupos controle e MeHg. Resultados expressos com média ± erro padrão. *p=
0,0350 comparado ao grupo controle (Teste de Mann-Whitney). Escala = 100
µm.

RESUMO

O metilmercúrio (MeHg) representa a forma mais tóxica do mercúrio, que em intoxicações crônicas induz danos motores e cognitivos em ratos adultos. Dados na literatura sugerem um tropismo deste metal em relação ao cerebelo. No entanto, poucos estudos buscam elucidar os mecanismos associados aos danos induzidos por MeHg em baixa doses utilizando um modelo de exposição subcrônica. A partir disso, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as alterações motoras, teciduais, bioquímicas oxidativas e proteômicas induzidas pela exposição subcrônica ao MeHg. Para isso foram utilizados 56 ratos Wistar adultos, divididos em dois grupos: grupo controle e grupo exposto (0,04 mg/Kg/dia de MeHg), ambos administrados via gavagem intragástrica por 60 dias. Após o período de exposição, foram realizados os testes comportamentais de open field e rotarod. Posteriormente, coletou-se o cerebelo desses animais para análise bioquímica, proteômica, dosagem dos níveis de mercúrio e avaliação tecidual. Para análise estatística dos dados foi utilizado o teste t-Student, considerando um valor significativo de $p < 0,05$. O perfil proteômico foi analisado pelo software ProteinLynx Global SERVER™ (PLGS), e foram consideradas subexpressas proteínas com $p < 0,05$ e superexpressas proteínas com $p < 0,95$, o teste utilizado foi o teste exato de Fisher com correção por Bonferroni. Os resultados demonstraram um aumento nos níveis de mercúrio no cerebelo, e alterações nos testes motores dos animais expostos ao MeHg. No open field ocorreu uma diminuição da distância total percorrida e do número de rearing em comparação ao grupo controle com $p < 0,05$, já no rotaroad foi observado uma diminuição do tempo de latência da primeira queda e um aumento no número de quedas no grupo MeHg em comparação ao controle ($p < 0,05$). Na avaliação bioquímica ocorreu um aumento nos níveis de nitrito e de peroxidação lipídica e diminuição na capacidade antioxidante contra radicais peroxil (ACAP) ($p < 0,05$). O perfil proteômico desses animais também sofreu alteração, das 1220 proteínas identificadas no total 436 proteínas foram encontradas exclusivamente no grupo controle e 311 proteínas no grupo MeHg. Além disso, demonstrou uma subexpressão de 115 proteínas e uma superexpressão de 358 proteínas no grupo MeHg quando comparado com o grupo controle. Na avaliação tecidual encontrou-se uma diminuição das células de Purkinje, células NeuN+ e uma menor quantidade de células IBA1+. Nas análises por fração de área foi encontrada uma menor quantidade de células GFAP positivas, sinaptofisinas e MBP+. Assim, nossos resultados sugerem que a intoxicação por MeHg provocou danos celulares e proteômicos induzidos por estresse oxidativo que causou o déficit motor encontrados nos testes comportamentais.

Palavras-chaves: Cerebelo, Estresse Oxidativo, Metilmercúrio, Proteoma.

ABSTRACT

Methylmercury (MeHg) represents the most toxic form of mercury, which in chronic intoxications induces motor and cognitive impairment in adult rats. Studies suggest that this metal has a tropistic effect on the cerebellum, however few researches aim to elucidate the mechanisms associated with low-dose MeHg-induced damage in a subchronic exposure model. Thus, the objective of this study was to verify motor, tissue, oxidative and proteomic biochemical alterations induced by subchronic exposure to low doses of MeHg. Fifty six male Wistar rats, 90 days old, were divided into two groups: control group (distilled water) and exposed group (0.04 mg / kg / day of MeHg), both administered via intragastric gavage for 60 days. After the exposure period, the open field and rotarod behavioral tests were performed. Subsequently, the cerebellum from these animals were collected for biochemical analysis, proteomics, mercury tissue deposits, and immunohistochemistry evaluation. Statistical analysis was performed using the Student's t-test, considering a significant value of $p < 0.05$. The proteomic profile was analyzed by the ProteinLynx Global SERVER™ software (PLGS). Proteins with $p < 0.05$ were considered super-regulated proteins and those with $p < 0.95$ were considered as sub-regulated proteins. The test used was Fisher's exact test with Bonferroni correction. Our results demonstrated a decrease in the motor tests of the animals exposed to MeHg. Open field test showed a decrease in total distance covered and the number of rearing in comparison to the control group with $p < 0.05$. Rotarod test presented a decrease in the time for the first latency to fall and an increase in the number of falls in the MeHg group in comparison to the control with $p < 0.05$. The biochemical evaluation showed an increase in nitrite and lipid peroxidation levels and a reductions of Antioxidant Capacity Against Peroxyl radicals (ACAP) with $p < 0.05$. Considering the proteomic profile of these animals, among the 1220 proteins identified, 436 proteins were found exclusively in the control group and 311 proteins exclusively in the MeHg group. Also, 358 proteins were found overexpressed and 115 subexpressed proteins. All proteins interactions were depicted on 3 interactions networks to perform proteomic alterations analysis. In addition, the tissue evaluation showed a decrease in Purkinje cells and NeuN + cells and a smaller amount of IBA1+ cells. Area fraction analysis showed a smaller number of GFAP positive cells, synaptophysins and MBP +. Thus, our results suggest that MeHg intoxication provoked cellular and proteomic damage probably related to induced oxidative stress and also reflecting on motor deficit in behavioral tests.

Key words: Cerebellum, Oxidative Stress, Methylmercury, Proteomics.

INTRODUÇÃO

O mercúrio (Hg) é um metal de alta toxicidade, amplamente encontrado na natureza e considerado como uma grande preocupação à saúde pública (Dorea and Marques 2016);). Segundo a *Agency for Toxic Substances and Diseases Registry* (ATSDR) dos Estados Unidos, o Hg é considerado como uma das substâncias mais tóxicas à saúde humana (ATSDR, 2011).

Na natureza o Hg pode ser encontrado na forma inorgânica e orgânica. (WASSERMAN J. et al., 2001; BERNHOFT, 2012). Inorganicamente apresenta-se em três diferentes formas: mercúrio metálico ou elementar (Hg^0), íon mercurioso (Hg_2^{2+}) e íon mercúrico (Hg^{2+}), onde estes íons são capazes de estabelecer ligações a compostos como cloro (Cl), enxofre (S) e oxigênio (O), originando os sais de Hg, como o cloreto de mercúrio (HgCl_2). As formas orgânicas do Hg são o etilmercúrio ($\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$), metilmercúrio (MeHg) e dimetilmercúrio ($[\text{CH}_3]_2\text{Hg}$), sendo estas consideradas as formas mais perigosas e de maior frequência de exposição mercurial (MOREL et al., 1998; WHO, 2003; ZAMBRANO, 2004; CROWE et al., 2017).

Como fontes de liberação do metal a natureza, pode-se destacar o descarte inadequado na extração de matérias-primas como mais evidente, além de ser rejeito de mineração e aterros sanitários (WHO, 2008). No ambiente, é encontrado em sua grande maioria na cadeia alimentar aquática, principalmente em peixes predadores, onde sofre bioacumulação e pode atingir concentrações superiores a 1ppm, sendo esta a principal fonte de exposição humana ao mercúrio (CLARKSON et al., 2003; HINTELMANN, 2010).

A absorção do MeHg ocorre ainda no duodeno, quando as moléculas químicas já foram previamente separadas pela ação do ácido gástrico e estão ligadas às moléculas de L-cisteína e glutatona (GSH), formando os compostos metilmercúrio-cisteína (MeHg-Cys) e metilmercúrio-glutatona (MeHg-GSH), respectivamente (DO NASCIMENTO et al., 2008). Ao adentrar na corrente sanguínea, o metilmercúrio que está liga-se a grupos tióis, particularmente aos da L-cisteína, depositasse em todo o corpo principalmente no SNC (KERSHAW et al, 1980). O transportador de cisteína, exerce a função de distribuição deste metal aos tecidos periféricos, devido provavelmente a aderência ao grupo tiol da L-cisteína (FARINA e ASCHNER, 2017).

O MeHg possui a capacidade de se acumular nas mitocôndrias, ocasionando alterações bioquímicas, como a diminuição da atividade enzimática das enzimas mitocôndrias citocromo C oxidase (CCO), superóxido dismutase (CD) e

sucinatodesidrogenase (SD), contribuindo para a perda da homeostasia celular. Além disso, a intoxicação por MeHg pode ocasionar o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio após um colapso mitocondrial, como radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxil (OH^-), estando esse fenômeno intimamente relacionado com os danos celulares ocasionados pela intoxicação (FARINA et al., 2013; DO NASCIMENTO et al., 2008; ERCAL et al., 2001). Outro evento observado é a capacidade que o MeHg tem de se associar aos microtúbulos. Os microtúbulos são estruturas proteicas que possuem importância reconhecida na formação do citoesqueleto celular. Essas estruturas são compostas de proteínas tubulinas, que possuem em sua composição grupamentos $-SH$ (CRESPO-LOPEZ et al., 2009).

Um outro mecanismo de dano por exposição mercurial é a neurotoxicidade, o MeHg é capaz de aumentar a liberação de glutamato pelos neurônios pré-sinápticos e diminuir a recaptação do mesmo pelos astrócitos, com isso os níveis de glutamato na fenda sináptica aumentam ativando o receptor NMDA do neurônio pós-sináptico causando um influxo de cálcio e desencadeando mecanismos de morte celular por excitotoxicidade (FARINA, ROCHA e ASCHNER, 2011).

Após a absorção, MeHg pode atingir vários órgãos, no entanto o sistema nervoso central (SNC) representa um alvo preferencial para este metal (FARINA e ASCHNER, 2017), além disso parece ocorrer um tropismo seletivo do mercúrio pelo cerebelo que já foi demonstrado (KONG et al., 2013). Além disso, estudos em animais conseguiram demonstrar alterações bioquímicas no cerebelo causadas por exposição de curta duração ao metilmercúrio (MACEDO-JÚNIOR et al., 2017) e mostram que os efeitos neurotóxicos do MeHg envolvem significativamente o cerebelo e diversos mecanismos foram propostos para tal neurotoxicidade (CASTOLDI et al., 2001).

O cerebelo é um órgão que possui a capacidade de realizar ligações com diferentes regiões do SNC. Exerce papel fundamental na coordenação motora, na articulação da fala e no controle dos movimentos oculares, além de participar no controle do equilíbrio e das funções autonômicas. As lesões cerebelares causam alterações chamadas de síndromes cerebelares, que induzem sinais e sintomas motores como: desequilíbrio na marcha, descoordenação nos movimentos dos membros, alterações dos movimentos oculares e disartria (BUGALHO et al., 2006).

Na Amazônia brasileira garimpos ilegais que utilizam mercúrio para a extração de ouro ainda são uma realidade (IBAMA, 2018). Devido a esses fatos, faz-se

necessário estudar as consequências de uma exposição mercurial que mimetize o que ocorre com as populações ribeirinhas e tradicionais, que têm como sua principal fonte proteica os peixes oriundos dos rios da região que estão contaminados com o mercúrio (MARTÍN-DOIMEADIOS et al., 2014).

Estudos recentes demonstram danos no SNC ocorridos devido exposição mercurial em populações tradicionais (FREITAS et al., 2018; COSTA JUNIOR et al., 2017). Apesar de alguns trabalhos em animais já terem demonstrado uma maior deposição do metilmercúrio no cerebelo, poucos trabalhos mostram os efeitos desse depósito no parênquima cerebelar. Em consequência disso, faz-se necessária uma avaliação dos possíveis danos causados ao cerebelo após uma exposição prolongada e em baixas doses ao MeHg, uma vez que esta região do SNC apresentou maior tropismo mercurial em animais (KONG et al., 2013).

OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar as possíveis alterações desencadeadas no cerebelo de ratos adultos submetidos a um modelo de exposição a baixas doses de metilmercúrio.

2.2. Objetivos específicos

- a) Analisar os níveis de mercúrio no cerebelo;
- b) Avaliar o desempenho motor em animais expostos ao metilmercúrio;
- c) Investigar as alterações bioquímicas e possível estresse oxidativo desencadeados perante a exposição ao MeHg;
- d) Analisar as possíveis modulações do perfil proteômico do cerebelo de animais expostos ao MeHg;
- e) Avaliar o padrão neurodegenerativo (sobrevivência/densidade neuronal, astrocitária e microglial) desencadeados perante o modelo de exposição proposto;
- f) Avaliar se a exposição ao MeHg desencadeia ativação microglial e resposta astrocitária;
- g) Avaliar se a exposição ao MeHg promove desorganização da bainha de mielina;
- h) Avaliar se o padrão de comunicação sináptica foi alterado mediante a exposição mercurial;

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais experimentais

Neste estudo foram utilizados 56 ratos albinos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*, machos, com massa corpórea entre 180g a 250g e com 90 dias de vida fornecidos pelo Biotério de Criação da Universidade Federal do Pará para o Biotério do Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental ICB-UFGA. Os animais foram alojados em gaiolas-viveiros de plástico, com dimensões de 30cm X 20cm X 12cm, divididos em grupos de até 4 animais por caixa. Durante o período de alojamento, os animais receberam ração balanceada e água, permaneceram em uma temperatura de 25°C e foram submetidos à um ciclo escuro/claro de 12 horas (luzes ligadas às 7:00h)

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da UFGA (CEPAE- UFGA: 225-14) (anexo I).

3.2. Formação dos grupos experimentais

Os animais foram distribuídos dentro de 02 grupos distintos da seguinte forma:

- **Grupo Controle** (28 animais): Animais que receberam diariamente somente o veículo (óleo de milho) durante 60 dias;
- **Grupo MeHg** (28 animais): Animais foram expostos diariamente ao MeHg durante 60 dias;

Os grupos foram divididos de modo que 10 animais de cada grupo foram destinados para análise tecidual e outros 10 animais de cada grupo para análise dos parâmetros pró e antioxidante, assim como a mensuração dos níveis de mercúrio total formados no cerebelo. Os 16 animais restantes foram destinados para a caracterização do perfil proteômico (8 animais controle e 8 animais MeHg). Os procedimentos experimentais realizados estão descritos a seguir na Figura 1.

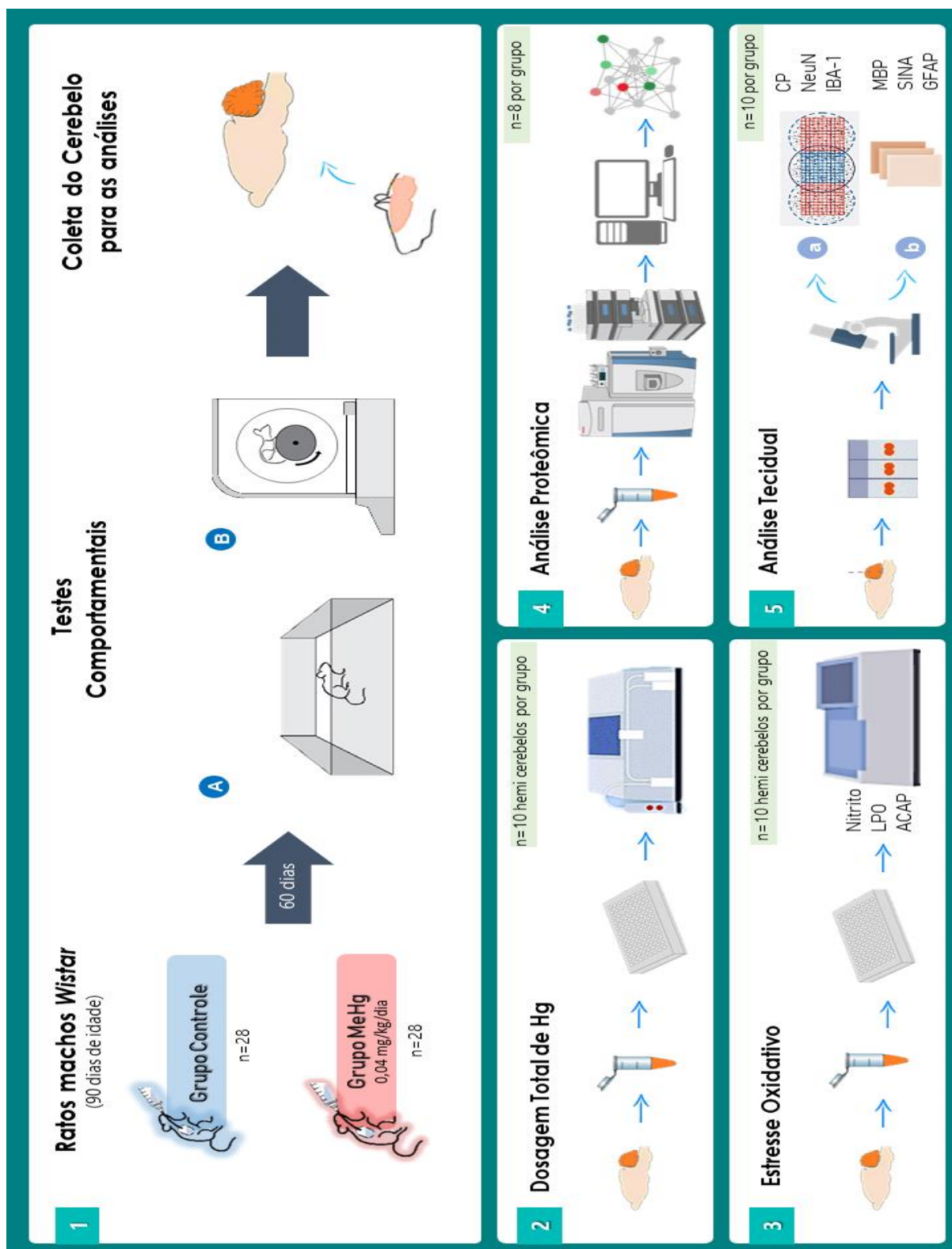


Figura 1 – Resumo metodológico sobre período de exposição, coleta de cerebelo e análises realizadas. Ratos Wistar foram divididos em Grupo Controle – GC (n=28) e Grupo Exposto - MeHg (n=28). Ambos grupos receberam, água e alimentação padrão. O grupo MeHg recebeu por gavagem intragástrica MeHg (0,04 mg/kg/dia). Após 60 dias de gavagem os animais foram eutanasiados e o cerebelo foi coletado. A metade do cerebelo de 10 animais de cada grupo foram utilizados para a Mensuração de Hg (2) e a outra metade para a análise da bioquímica oxidativa baseada no Estresse Oxidativo (3), através de ensaio da concentração de nitrito (Nitrito), ensaio de peroxidação lipídica (LPO) e Capacidade Antioxidante Contra Radicais Peroxil (ACAP); Análise do perfil proteômico foi feita

utilizando 8 animais de cada grupo (4); Análise Imunohistoquímica (5), a qual foi realizada com os 10 animais restantes e a partir da avaliação de imunomarcção dos anticorpos anti neuN , anti-GFAP, anti-IBA-1, anti-MBP e anti-Sinaptofisina (SINA).

3.3. Exposição ao metilmercúrio

A exposição dos animais foi iniciada quando os mesmos alcançaram 90 dias de vida, os animais pertencentes ao grupo tratado receberam MeHg através de gavagem intragástrica em uma dose diária de 0,04mg/kg durante 60 dias. As doses diárias foram ajustadas semanalmente a partir da mudança do peso corporal dos animais experimentais, tendo como veículo do MeHg o óleo de milho, os animais foram pesados semanalmente. Esta dose foi descrita no trabalho de Kong e colaboradores (KONG et al., 2013) como sendo capaz de promover aumento nos níveis de mercúrio no córtex cerebelar de ratos expostos ao metilmercúrio. Os animais do grupo controle passaram pelos mesmos processos de exposição via gavagem, porém sem MeHg, apenas com o veículo.

3.4. Ensaios comportamentais

Os ensaios comportamentais foram realizados após completados os 60 dias de exposição. Todos os testes foram executados em sala própria, com atenuação dos níveis de ruído e baixa intensidade de iluminação.

3.4.1. Teste da atividade locomotora espontânea (*open field*)

A avaliação de roedores em uma arena ou campo aberto é um procedimento muito utilizado com a finalidade de se observar a atividade locomotora de animais de pequeno porte, já tendo sido utilizado por nosso grupo (OLIVEIRA et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2014). Em um primeiro momento, sabe-se que ratos, assim como os seres humanos, poderão reagir ao ambiente considerado “novo” e apresentar uma resposta aversiva, característica de congelamento (do inglês “*freezing*”), que é um comportamento inerente ao animal, o qual muitas vezes é utilizado como uma forma de diminuir as detecções visuais e auditivas por parte dos predadores. No entanto, em um segundo momento, ele tende a explorar o ambiente onde se encontra. Este teste consiste de uma área central aversiva, que avalia tanto o nível de ansiedade, quanto parâmetros de deambulação do animal (PANDOLFO et al., 2007).

Para este teste foi utilizada uma arena em madeira (100x100x40cm), pintada com material impermeável, na qual o piso se encontra dividido em 25 quadrantes iguais de 20x20cm (Figura 02).

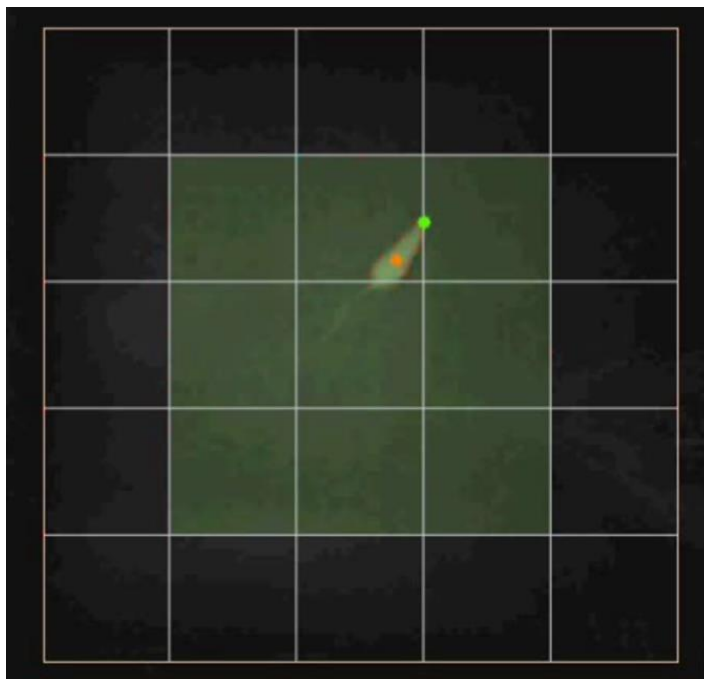


Figura 2 - Exposição do animal ao aparato que compõe o Campo Aberto para realização do teste de atividade locomotora espontânea.

Antes do início dos experimentos, os animais foram conduzidos à sala de teste por um período de uma hora para aclimação e habituação ao ambiente do teste. Após habituação, o teste da atividade locomotora foi iniciado. Os animais foram colocados individualmente no quadrante central do campo aberto e permitido o livre deslocamento dentro do aparato por 5 minutos, filmados através de uma câmera posicionada a cima da arena e monitorada em outra sala por experimentador que não tinha conhecimento do grupo de tratamento que estava sendo testado.

Os vídeos foram analisados e contabilizada a distância percorrida durante 5 minutos, este protocolo já vem sendo utilizado em nosso grupo de pesquisa (OLIVEIRA et al., 2014). Além disso, foi contado a taxa de “*rearing*” (levantamentos). O objetivo da utilização desse modelo no trabalho foi verificar se a exposição ao MeHg afetou as atividades exploratórias e locomotoras dos animais expostos.

3.4.2. Teste do rotarod

Este teste foi realizado no aparelho Rotarod (Insight, Brasil) para avaliação da força e coordenação motora dos animais (DUNHAM e MEYA, 1957; TEIXEIRA et al., 2014). Os animais foram treinados a manterem-se sobre o eixo giratório do equipamento durante 3 minutos a 8 rotações por minuto (8RPM). Após o treino, foram submetidos ao teste propriamente dito, onde os animais foram expostos ao aparelho em cinco etapas de 3 minutos a 16, 20, 25, 28 e 37 RPM, sendo respeitado o período de 60 segundos entre as exposições e contabilizando o tempo de permanência do animal (latência) sobre a barra de rolagem até a primeira queda nas cinco etapas e o número de quedas totais (TEIXEIRA et al., 2014) (Figura 03).



Figura 3 – Imagem do equipamento Rotarod.

3.5. Análise bioquímica

3.5.1. Quantificação de proteínas

Após a realização dos ensaios comportamentais, 10 animais de cada grupo foram eutanasiados por deslocamento cervical e seus cerebelos removidos. Em seguida, um hemisfério do cerebelo de cada animal do grupo controle e grupo exposto ao MeHg foi dissecado para posterior homogeneização em tampão Tris-HCl 20 mM (pH 7,4). A dosagem de proteína foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Bradford (1976). Este método foi realizado para normatização da quantificação de Nitrito e Peroxidação Lipídica.

As amostras previamente obtidas foram descongeladas em tubo cônico com volume de 3ml será adicionado 5µl de amostra e 250µl do reativo de Bradford (100 mg Azul Brilhante de Coomassie, 50ml de metanol 95%, 100ml de ácido fosfórico 85%) o qual reagiu com a amostra durante 5 minutos em triplicatas em uma microplaca transparente de 96 poços, foram feitas leituras no espectrofotômetro com comprimento de onda de 595nm. Os valores foram obtidos de acordo com uma curva-padrão pré-estabelecida com BSA (Albumina Sérica Bovina).

3.5.2. Análise da capacidade antioxidante contra radical peroxil

Uma alíquota do homogenato bruto foi retirada para mensurar a capacidade antioxidante total através do método de avaliação da capacidade antioxidante contra os radicais peroxil (AMADO et al, 2009). As amostras foram centrifugadas a 9700 RPM durante 20 min a 4°C. O sobrenadante das amostras foi exposto, em triplicatas em uma microplaca transparente de 96 poços, a um gerador de radicais peroxil, o 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (ABAP; 4 mM; Aldrich) e em outra triplicata recebeu somente água ultrapura. Após 30 minutos de reação entre a amostra e ABAP, foram levadas para mensuração da fluorescência gerada, com leituras realizadas a cada 5 minutos durante um período de 1 hora em leitor de microplaca opaca (Victor 2, Perkin Elmer), a temperatura de 35 °C. Os resultados foram expressos de acordo com a diferença da área da unidade defluorescência das curvas geradas da mesma amostra com e sem ABAP.

3.5.3. Concentração de nitrito (NO)

Para o ensaio de níveis de nitritos, uma alíquota do homogenato bruto foi centrifugada a 14000RPM por 10min a 4°C e o sobrenadante será utilizado para a análise descrita por Green et al. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente com reagente de Griess (Naftil-etileno-diamina 0,1% e Sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% - 1:1). A absorvância foi mensurada com o comprimento de onda igual a 550nm e comparada com a das soluções padrões de nitrito de sódio. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os valores expressos em microM/Microg de Proteína.

3.5.4. Peroxidação lipídica (LPO)

Este parâmetro foi mensurado pelo método colorimétrico (Gérard-Monnier, et. al.,1998). Onde uma alíquota do homogenato bruto foi centrifugada a 5600RPM por

10 minutos a 4°C e 100µL sobrenadante foi incubado com 325µL NMFI (solução de N-Metil-2-Fenilindol com acetonitrila 10,3 mM + Metanol - 1:3) e 75µL ácido metanosulfônico P.A., reagiu em banho maria por 40min em uma temperatura de 45° C. Após isso, as amostras foram plaqueadas em triplicata em microplaca transparente de 96 poços, foram feitas leituras no espectrofotômetro com comprimento de onda de 586nm. Os valores foram obtidos de acordo com uma curva-padrão pré-estabelecida com MDA (malonaldeído). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os valores expressos em nM/Microg de Proteína.

3.6. Avaliação dos níveis de mercúrio no cerebelo

Um hemisfério de cada cerebelo foi direcionado à análise dos níveis de mercúrio pelo método de Susuki e colaboradores (2004). Para tanto o tecido foi pesado e homogeneizado (0,5g máxima de peso em úmido), colocado em uma garrafa de digestão ao qual foi acrescido 1ml de água destilada, 2ml de ácido perclórico (HClO₄) em ácido nítrico 1 + 1 (HNO₃) e 5ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄), consecutivamente adicionados, e finalmente levados à placa de aquecimento (200 - 230°C) durante 30min. Para alcançar o volume final (50ml) foi acrescentado água destilada. O extrato do tecido foi preparado para 0 e 1,0ml de solução de metilmercúrio-cisteína (0,10µg de Hg/ml) em duas garrafas de digestão (uma a 0 e outra 0,10µg de Hg). Em uma foi colocado 1ml de água destilada (o branco) seguido por 2ml de HNO₃, HClO₄ (1 + 1) e 5ml de H₂SO₄ (constituindo o padrão para leitura), o mesmo foi feito com a solução da amostra para mensuração.

Os níveis de mercúrio nas amostras foram estimados por espectrometria de absorção atômica (CVAAS) (Semi-automatizado Mercúrio analisador, Modelo Hg-201, Sanso Seisakusho Co., Ltd., Tóquio, Japão).

Para a quantificação do mercúrio total presente foi utilizada a seguinte fórmula (SUSUKI et al., 2004): Concentração de mercúrio total na amostra (mg/g) = $0,10 \text{ mg} \times (\text{amostra} - \text{amostra em branco}) / (\text{amostra padrão} - \text{branca amostra}) \times \text{fator de diluição} \times 1/\text{peso amostra (g)} \times \text{relação de peso úmido / peso seco}$. Todas as análises foram realizadas em duplicata e os valores expressos em ng/g.

3.7. Caracterização do perfil proteômico

Para esta etapa foram utilizados os 16 ratos restantes (8 animais de cada grupo) que após a exposição ao metilmercúrio, foram profundamente anestesiados com uma solução de cloridrato de cetamina (90mg/Kg) e cloridrato de xilazina (9mg/Kg),

eutanasiados por deslocamento cervical para posterior dissecação das áreas do SNC. O cerebelo foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80 °C até a execução das etapas posteriores.

O processamento das amostras para análise do perfil proteômico foram executados da seguinte forma: as amostras foram pulverizadas por moinho criogênico, com posterior extração de proteínas solúveis com tampão de lise e recuperação das mesmas após centrifugação e precipitação pelo kit PlusOne 2D Cleanup (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), como recomendado pelo fabricante.

3.7.1. Quantificação de proteínas totais e extração de proteínas

Os pellets foram ressuspensos em tampão de reidratação e 25µL de proteínas da região de cada animal foi centrifugado para clarificação. Para cada amostra foi adicionado 10µL a 50mM de AMBIC contendo 2M de ureia. Cada amostra foi filtrada duas vezes em 3kDa AMICON (Millipore, St. Charles, MO, EUA) e a mensuração de proteínas totais foi feita pelo método descrito por Bradford (1976).

As proteínas totais foram extraídas com Tris-HCl 50mM (pH 8,8), cloreto de potássio 1,5mM, DTT 10mM e SDS 0,1% (m/v) em gelo por 10min. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 5min a 5000rpm a 4°C. O sobrenadante contendo as proteínas extraídas foi coletado e as mesmas foram precipitadas com acetona refrigerada na proporção 1:4 em gelo por 1 hora a -20°C seguido de centrifugação a 13000rpm por 10min a 4°C. O pellet foi solubilizado com bicarbonato de amônio (AMBIC) 50mM, seguido da quantificação de proteínas totais para a diluição da amostra na concentração de 1µg/µL. A amostra (50µL) foi transferida para um novo microtubo e 10µL de AMBIC 50mM foi adicionado à amostra seguido de 25µL da solução RapiGest SF a 0.2 % (Waters). A solução foi agitada em vórtex e incubada a 80°C em banho-maria por 15min. A seguir, foi adicionado 2,5µL de DTT 100mM à solução e incubada por 30min a 60°C. Após a amostra ter resfriado à temperatura ambiente, 2,5µL de iodoacetamida 300mM foi adicionada e incubada no escuro por 30min. A digestão proteica foi realizada após a adição de tripsina (50 µg/µL) em AMBIC 50mM a 37°C overnight. Após a digestão, 10µL de ácido trifluoroacético a 5%, agitado em vórtex e incubado a 37°C por 90min com o objetivo de hidrolisar o RapiGest. A amostra foi centrifugada a 14000rpm por 30min a 6°C e o sobrenadante foi transferido para um outro microtubo (Waters Total Recovery vial- Waters). À amostra foram adicionados 5µL do padrão de digestão MassPREP (álcool

desidrogenase (ADH) de levedura na concentração 1pmol/ μ L - Waters), seguido de 85 μ L de acetonitrila 3% com ácido fórmico 0,1%, sendo a concentração final da ADH de 25fmol/ μ L. A concentração proteica final da amostra foi em torno de 250ng/ μ L.

Para as análises dos peptídeos foi utilizado o espectrômetro de massas Xevo G2 (Waters Corporation) acoplado ao sistema nanoACQUITY (Waters Corporation). Todas as amostras foram analisadas em triplicata. Inicialmente foi realizada a cromatografia líquida em nanoescala (nanoLC) utilizando o sistema nanoACQUITY (Waters Corporation) equipado com uma pré-coluna Symmetry C18 5 μ m, 5mm 180- μ m e uma coluna analítica de fase reversa nanoEase BEH130 C18 1,7 μ m, 100 μ m, 100mm. As amostras foram misturadas a uma solução aquosa de ácido fórmico (AF) 0,1% e em seguida transferidas para pré-coluna a um fluxo de 15 μ L/min, durante 1 minuto. Foi utilizada como fase móvel A água com AF 0,1% e a fase móvel B foi composta de AF 0,1% em acetonitrila (ACN). Os peptídeos foram separados com gradiente de 3-40% de B durante 90 minutos a um fluxo de 600nL/min, seguido por uma lavagem de 10 minutos com 90% de B. A coluna foi então reequilibrada para as condições iniciais durante 20 minutos. A temperatura da coluna foi mantida a 35°C. Para o lockmass foi utilizado 100fmol de Human [Glu¹] - Fibrinopeptide (GFP) B (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO), que foi introduzido simultaneamente à amostra um fluxo constante de 150nL/min. Todos os espectros foram obtidos no modo íon positivo. Para as análises foram adotados os seguintes parâmetros: voltagem do capilar de 2.0 kV e voltagem do cone de 35 V. O modo de aquisição utilizado será o MS^E, o qual permite uma informação de massa exata tanto dos íons intactos quanto dos fragmentos que são obtidos. A aquisição dos dados foi feita com auxílio do software MassLynx® (Waters Corporation). Para a identificação das proteínas, os espectros conseguidos de MS/MS foram confrontados com bases de dados de proteínas de Homo sapiens usando o algoritmo MASCOT no softwareMassLynx® (Waters Corporation).

A quantificação livre de marcadores foi feita utilizando o software ProteinLynx Global Service (PLGS, v 2.2.5, Waters). Todas as proteínas identificadas com um score com confiança maior que 95% foram incluídas na análise quantitativa. Os peptídeos idênticos de cada triplicata por amostra foram agrupados com base na precisão de massa (< 10 ppm) e numa tolerância de tempo de retenção < 0,25 minutos, usando o software de agrupamento incluso no PLGS v. 2.3. Foi feita uma normalização usando a função de autonormalização do PLGS. Apenas proteínas

identificadas em 2 das 3 corridas foram selecionadas para análises subsequentes. Uma lista de proteínas diferencialmente expressas foi importada para o Cytoscape, a para se traçar as vias de integração.

3.8. Análise tecidual

Os animais restantes (10 controles e 10 expostos) foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (90mg/Kg) e cloridrato de xilazina (9mg/Kg), e perfundidos através do ventrículo esquerdo com solução salina a 0,9% heparinizada, seguida de paraformaldeído a 4%. Após a perfusão, os cerebelos foram removidos da caixa craniana e pós-fixados em bouin por 3 horas. Em seguida, lavadas em álcool 50% e desidratadas em uma bateria progressiva de álcool (70%,80%,90%,100%,100%) e clarificadas com xilol, após essas etapas foram incluídos em Paraplast (McCormick™) e seccionados em micrótomo a 5µm.

Algumas secções foram submetidas à coloração por hematoxilina e eosina (HE) para uma observação do panorama geral da condição tecidual de cada grupo e seleção das secções para imunohistoquímica, os anticorpos selecionados foram os seguintes:

- **Anti-NeuN** (1:100, Chemicon): Um marcador de neurônios maduros muito utilizado para se investigar a sobrevivência neuronal (SARNAT, NOCHLIN E BORN, 1998; LIMA et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2014);
- **Anti-GFAP** (1:2000, Dako): Um marcador de astrócitos que permite avaliar modificações na morfologia e número perante injúrias ao SNC (RESKE-NIELSEN, OSTER E REINTOFT, 1987; LIMA et al., 2007; FONTES-JÚNIOR et al., 2016);
- **Anti-Iba1** (1:1000, WAKO): Um anticorpo que reconhece uma proteína quelante de Ca++ presente no citoplasma microglial (ITO et al. 1998);
- **Anti-MBP** (1:100, Chemicon International): Anticorpo monoclonal que reconhece a proteína básica de mielina, um componente da mielina compacta (IRVING et al. 1997; GOMES-LEAL et al. 2005);
- **Anti-Sinaptofisina** (1:300, Millipore): A sinaptofisina é uma proteína implicada na ancoragem vesicular pré-sináptica, sendo utilizada como marcador do acoplamento a receptores pós-sinápticos (GOULD et al., 1987);

Essas imunomarcações foram quantificadas em ambos os grupos através das contagens de células positivas feita em um aumento de 40x com o auxílio de uma

gradícula com área de 0,0665mm² acoplada à ocular do microscópio de luz. foram consideradas 3 secções por animal (grupo exposto e controle) e 3 campos por secção. Após a contagem foram realizadas as fotomicrografias dos campos mais representativos de cada grupo para cada técnica.

3.9. Análise quantitativa

Para análise quantitativa da imunomarcação de MBP, Sinaptofisina e GFAP, micrografias adquiridas no microscópio Axioscope (Carl Zeiss, Alemanha) equipado com um CCD AxiocCam Câmera colorida HRC (Carl Zeiss) com a mesma ampliação ($\times 40$), foram segmentadas por "*deconvolution color plugin*" (Gabriel Landini, <http://www.dentistry.bham.ac.uk/landinig/software/software.html>) do software *Image J* (NIMH, NIH, Bethesda, MD, EUA, <https://imagej.nih.gov/ij/>). Após a segmentação da imagem, foram medidos os valores de fração de área (%) da coloração DAB nas secções (FERNANDES et al, 2015; FAGUNDES et al., 2016; LIMA et al., 2016). As micrografias foram adquiridas na região do segundo folheto do vêmis cerebelar de 5 secções por animal, sendo 3 micrografias por secção (5 animais por grupo). Os valores obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão.

As imunomarcações de NeuN e Iba1 e HE de neurônios de Purkinjee foram quantificadas utilizando gradícula de contagem em microscópio ótico com aumento de 40x. As contagens foram feitas na região do segundo folheto do vêmis cerebelar de 5 secções por animal, sendo 3 micrografias por secção (5 animais por grupo). Os valores obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão.

3.10. Análise estatística

Após a contabilização dos fatores avaliados em cada teste comportamental e nas subsequentes análises dos níveis de mercúrio, parâmetros de estresse oxidativo e análises imunohistoquímicas, estes foram inseridos no software GraphPad Prism 7.0 e a distribuição dos dados testada pelo método de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade. Em seguida foi utilizado o teste t-Student para análise dos dados do teste comportamental open field, quantificação de MeHg, de bioquímica oxidativa (LPO, Nitrito e ACAP), de contagem de células (Neu-N, Iba-1, células de Purkinje). Para a análise dos dados de fração de área, foi utilizado o teste de Mann-Whitney devido os dados serem representados por percentuais, considerado um valor significativo de $p < 0,05$. O perfil proteômico foi analisado pelo software ProteinLynx Global SERVER™ (PLGS), e foram

consideradas subreguladas proteínas com $p < 0,05$ e superreguladas proteínas com $p < 0,95$, o teste utilizado foi o teste exato de Fisher com correção por Bonferroni. Os resultados avindos do teste comportamental do rotarod, foram analisados pelo teste ANOVA dois fatores com pós-teste de Tukey. Tal teste foi escolhido para a comparação de duas variáveis, número de quedas e rotações por minuto.

Os dados com distribuição normal foram expressos no corpo do texto e através de gráficos utilizando a média acompanhada do erro padrão da média (média $\pm$ erro padrão da média). Os dados com distribuição anormal foram expressos utilizando a mediana acompanhada do desvio interquartilico.

RESULTADOS

4.1. Quantificação mercurial

O grupo MeHg apresentou um aumento nos níveis de Hg em relação ao grupo controle, como demonstrado na figura 4.

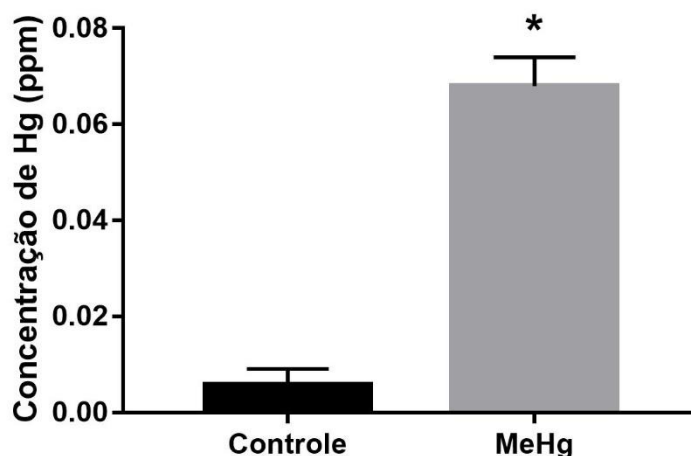


Figura 4 - Efeitos da exposição crônica ao MeHg (40 μg / kg / dia), durante 60 dias, nos níveis de mercúrio no cerebelo de ratos Wistar. Resultados expressos com média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle (Teste t de student).

4.2. Avaliação das atividades motoras

O grupo MeHg no teste open field apresentou uma diminuição da exploração espontânea em relação ao grupo controle, como demonstrado na figura 5A. Essa diminuição de exploração ocorreu tanto na exploração horizontal ($t=2.694$; $df=18$; $p=0,01$) quanto no número de rearings ($t=2.954$; $df=18$; $p<0,01$) demonstrado na figura 5B.

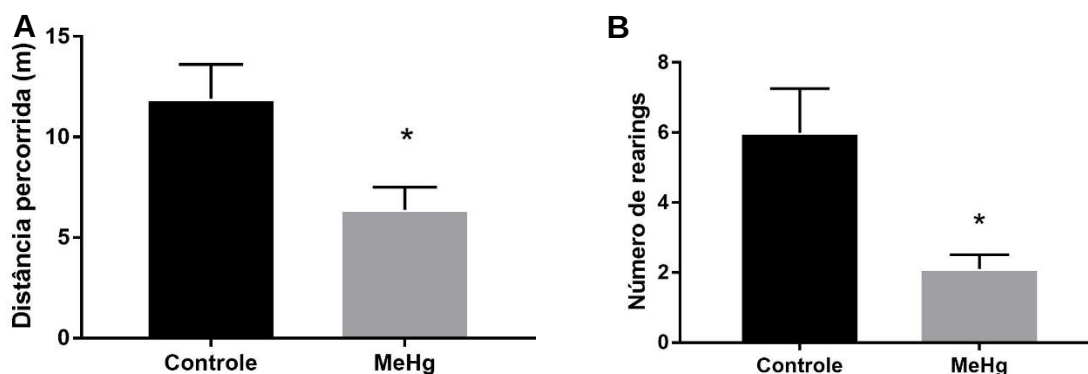


Figura 5 - Efeitos da exposição crônica ao MeHg (40 μg / kg / dia), durante 60 dias, na exploração horizontal espontânea (A) e número de rearings (B) de ratos Wistar. Resultados expressos com média $\pm$ erro padrão. * $p= 0,01$ comparado ao grupo controle (Teste t de student).

Essa diferença em relação ao controle também foi encontrada no teste de exploração forçada (Rotarod), onde o número de quedas dos animais MeHg foi maior quando comparado com os animais controle nas rotações de 20, 25 e 28 rpm ($t=2.429$; $df=19$; $p=0,02$).

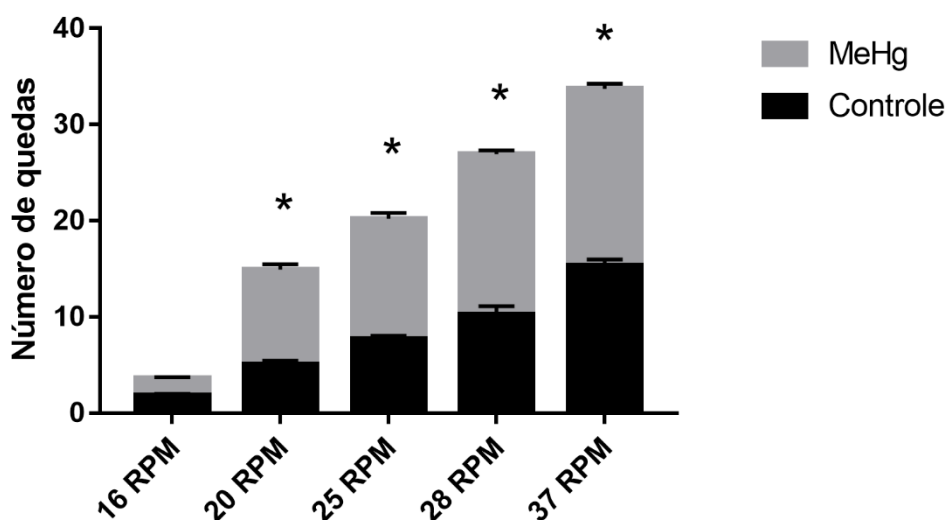


Figura 6 - Efeitos da exposição crônica ao MeHg ($40 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{dia}$), durante 60 dias, no número de quedas durante a deambulação forçada de ratos Wistar nas rotações de 20, 25, 28 e 37RPMs. Resultados expressos com média $\pm$ erro padrão. $*p < 0,0001$; $F(4,71) = 11,44$ comparado ao grupo controle (teste ANOVA dois fatores com pós-teste de Tukey).

4.3. Avaliação bioquímica

Na avaliação da bioquímica oxidativa ocorreu diminuição da capacidade antioxidante contra radicais peroxil no grupo MeHg em relação aos animais do grupo controle ($t=6.376$; $df=16$; $p<0,0001$), demonstrado na figura 7.

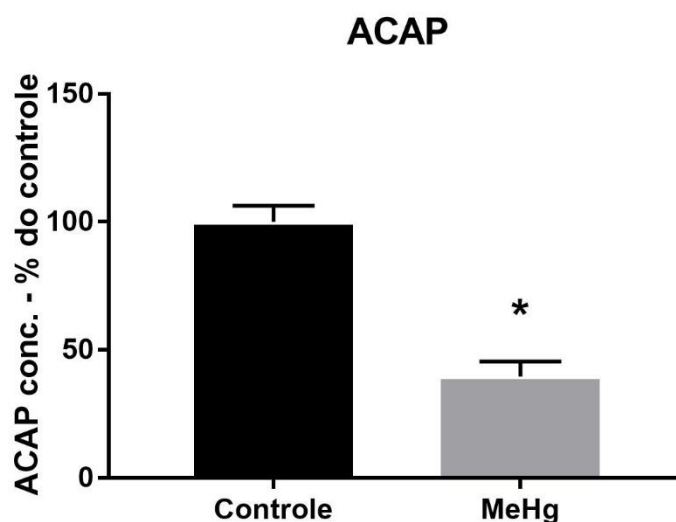


Figura 7 - Efeitos da exposição crônica ao MeHg (40 μg / kg / dia), durante 60 dias mostrando diminuição da capacidade antioxidante contra radicais peroxil de ratos Wistar. Resultados expressos em porcentagens da diferença da área da unidade de fluorescência das curvas geradas da mesma amostra com e sem ABAP com média $\pm$ erro padrão. * $p<0,0001$ comparado ao grupo controle (Teste t de student).

Ocorreu também um aumento nos níveis de nitrito no grupo MeHg em relação ao controle ($t=5.157$; $df=14$; $p=0,0001$), demonstrado na figura 8.

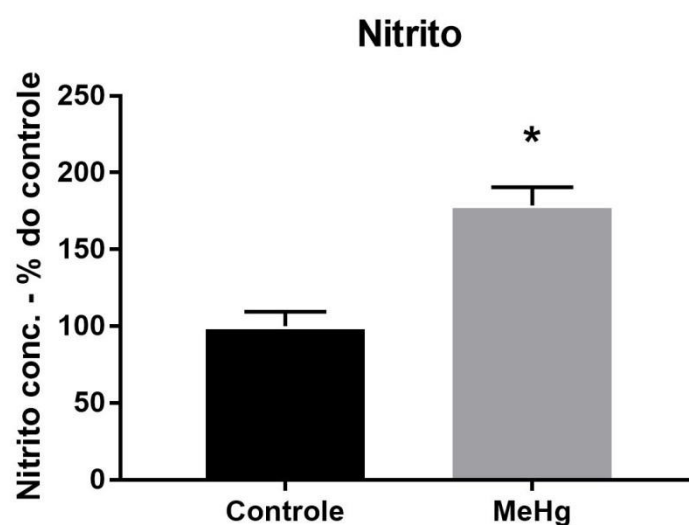


Figura 8 - Efeitos da exposição crônica ao MeHg (40 μ g / kg / dia), durante 60 dias, aumentando nos níveis de nitrito de ratos Wistar. Resultados expressos em porcentagem de microM por micrograma de proteína com média $\pm$ erro padrão. *p= 0,0001 comparado ao grupo controle (Teste t de student).

Foi encontrado um aumento nos níveis de peroxidação lipídica (LPO) em relação ao grupo controle (t=6.453; df=16; p<0,0001), apresentado na figura 9.

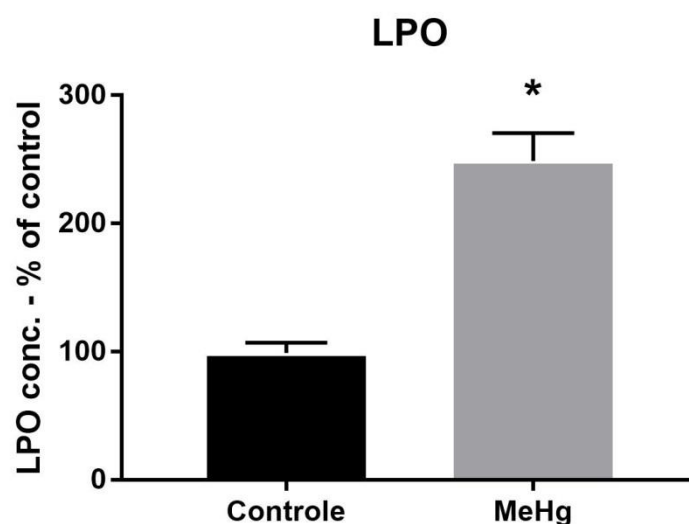


Figura 9 - Efeitos da exposição crônica ao MeHg (40 μ g / kg / dia), durante 60 dias, aumento nos níveis de MDA de ratos Wistar. Resultados expressos em porcentagem de nanoM por micrograma de proteína com média $\pm$ erro padrão. *p< 0,0001 comparado ao grupo controle (Teste t de Student).

4.4. Avaliação do perfil proteômico

4.4.1. Proteínas exclusivas e ausentes no grupo MeHg

Esse modelo de exposição revelou um total de 311 proteínas expressas apenas no grupo MeHg e 436 proteínas expressas apenas no grupo controle (tabela 1). Além disso, demonstrou uma subexpressão de 115 proteínas no grupo MeHg quando comparado ao grupo controle e apresentou uma superexpressão de 358 proteínas no grupo MeHg quando comparado com o grupo controle (tabela 2).

Tabela 1 - As proteínas identificadas estão organizadas em ordem alfabética. As proteínas identificadas unicamente no grupo MeHg (+) e ausentes no grupo MeHg (-), expressão proteica em comparação ao grupo controle. A identificação foi feita pela base de dados UniProt.

<i>“Número de Acesso”</i>	Descrição das proteínas	PLGS Score	MeHg
Q5XIB3	[Protein ADP-ribosylarginine] hydrolase-like protein 1	122,37	-
Q64536	[Pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)] kinase isozyme 2, mitochondrial	315,76	-
O88484	[Pyruvate dehydrogenase [acetyl-transferring]]-phosphatase 2, mitochondrial	70,18	-
M0R8T2	10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	57,13	-
D4AC45	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	134,1	+
Q5MYW7	2' '-5' oligoadenylate synthetase 1H	51,67	+
Q63569	26S proteasome regulatory subunit 6A	76,57	-
A0A0A0MXW1	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial	102,39	+
P62909	40S ribosomal protein S3	61,71	+
D3ZJT4	60S acidic ribosomal protein P0	62,81	-
P02401	60S acidic ribosomal protein P2	721,43	-
A7UAK3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-biphosphatase 3 splice variant	58,33	+
O35552	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3	58,33	+
Q6AYP7	7-methylguanosine phosphate-specific 5'-nucleotidase	90,38	-
D3ZZQ1	Abnormal spindle microtubule assembly	57,59	+
F7EL36	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A	191,56	-
A0A0G2JVI5	Actin filament-associated protein 1	59,87	+
Q99PD4	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1A	70,91	-
O88656	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	120,69	-
P85970	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	181,61	-
F1LSP2	Acyl-CoA dehydrogenase family, member 10	138,5	-
D3ZSE3	Acyl-CoA thioesterase 6	88,41	+
Q6SKG1	Acyl-coenzyme A synthetase ACSM3, mitochondrial	94,07	-
Q9QYL8	Acyl-protein thioesterase 2	188,35	-
M0R5P8	ADAM metallopeptidase domain 22	64,42	+
P69682	Adaptin ear-binding coat-associated protein 1	165,03	+
G3V649	Adenosine deaminase, RNA-specific, B1, isoform CRA_d	77,18	+

Q9WUS0	Adenylate kinase 4, mitochondrial	320	-
Q68FP8	Adenylate kinase 8	86,11	-
O88923	Adhesion G protein-coupled receptor L2	72,4	-
A0A1B0GWK8	Afadin- and alpha-actinin-binding protein	392,02	-
Q8CG45	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2	197,45	-
Q5QD51	A-kinase anchor protein 12	102,31	-
P0C6C0	A-kinase anchor protein SPHKAP	74,17	-
P50475	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	121,84	-
ADH1_YEAST	Alcohol dehydrogenase 1	235,89	-
A1L128	Alcohol dehydrogenase 4	76,78	-
P13601	Aldehyde dehydrogenase, cytosolic 1	66,39	+
Q66HG4	Aldose 1-epimerase	118,67	-
P07943	Aldose reductase	123,65	-
G3V6U3	ALG2, alpha-1,3/1,6-mannosyltransferase	92,03	+
G3V9J1	Alpha-1-inhibitor III	111,22	-
A0A0G2K013	Alpha-actinin-4	55,43	+
G3V9Z3	Amine oxidase	80,47	-
P21396	Amine oxidase [flavin-containing] A	80,47	-
F1LR26	Amino acid transporter	50,96	+
Q6AYS7	Aminoacylase-1^a	83,74	-
Q6PTT0	Aminoacylase-1B	101,04	-
Q6P6Q5	Amyloid-beta A4 protein	75,05	+
D3ZUB7	Anaphase promoting complex subunit 4, isoform CRA_a	97,41	-
D3ZDK4	Angiopoietin-related protein 7-like	77,83	-
Q5U312	Ankycorbin	54,88	+
D4A1J6	Ankyrin repeat and FYVE domain-containing 1	26,59	+
A0A0G2K2B9	Ankyrin-3	121,56	-
Q66HH8	Annexin	158,41	-
Q07936	Annexin A2	164,9	-
P14668	Annexin A5	158,41	-
Q32Q06	AP-1 complex subunit mu-1	179,2	-
D3ZHS8	APC membrane recruitment protein 3	80,96	+
F1LQ70	Arachidonate 12-lipoxygenase, 12S-type	92,71	+
D4ABD3	ArfGAP with coiled-coil, ankyrin repeat and PH domains 1	59,38	-
B0BN83	Armadillo repeat-containing protein 1	145,71	-
A0A0G2K2J1	Arp2/3 complex 34 kDa subunit	163,11	-
P50430	Arylsulfatase B	101,07	+
Q32KJ9	Arylsulfatase G	82,54	-
Q5XIH1	Asporin	55,7	-
A0A096MK06	Astrotactin 2	54,09	-
B3DMA1	Ataxin 2-like	42,6	+
P29419	ATP synthase subunit e, mitochondrial	394,85	-
D3ZAF6	ATP synthase subunit f, mitochondrial	682,75	+
Q7TP35	ATPase family AAA domain-containing protein 1	99,65	-
O70595	ATP-binding cassette sub-family B member 6, mitochondrial	103,6	-

Q9QY44	ATP-binding cassette sub-family D member 2	95,84	+
M0R7Y5	ATP-binding cassette, subfamily A (ABC1), member 14	86,26	+
A0A0G2JTZ9	ATP-binding cassette, subfamily G (WHITE), member 3-like 1	58,95	+
Q4KM08	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 3-like 1	58,95	+
D4A896	ATP-binding cassette, subfamily G (WHITE), member 3-like 3	63,12	+
Q5U216	ATP-dependent RNA helicase DDX39A	262,86	-
A0A0G2K5B6	Autophagy and beclin 1 regulator 1	179,8	-
D3ZT64	Autophagy-related 2^a	46,25	+
Q9R1T1	Barrier-to-autointegration factor	337,11	-
F1LUF8	Basonuclin 1	59,85	+
G3V977	B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1	175,06	+
Q925D2	BCL2-interacting killer	206,68	+
Q701R3	Beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 2	58,12	+
Q641X3	Beta-hexosaminidase subunit alpha	90,41	-
P07882	Bile salt-activated lipase	76,89	-
D3ZH27	Bis(5'-nucleosyl)-tetrphosphatase [asymmetrical]-like	131,93	+
D4AD20	BPI fold-containing family C	86,29	-
A0A0G2K0E5	Brain-enriched guanylate kinase-associated protein	73,71	+
A0A0G2K475	BRCA1-interacting protein C-terminal helicase 1	45,42	-
A0A0G2K7Z8	Cadherin 26	51,87	-
D3ZW89	Calcium binding protein 5 (Predicted), isoform CRA_b	376,99	-
F1LWT1	Calcium-dependent secretion activator 2	78,28	-
Q5BK10	Calpain-13	58,02	-
P09456	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	99,55	-
F7FL00	Carbonic anhydrase 9	78,8	-
G3V7G2	Carboxylic ester hydrolase	76,89	-
M0R557	Cardiomyopathy-associated 5	63,04	+
Q9QX80	CArg-binding factor A	110,78	-
Q63704	Carnitine O-palmitoyltransferase 1, muscle isoform	65,53	-
P19139	Casein kinase II subunit alpha	125,66	-
P24268	Cathepsin D	273,98	+
Q1M168	Caytaxin	579,47	-
Q5M7A7	CB1 cannabinoid receptor-interacting protein 1	1299,88	-
O35112	CD166 antigen	102,17	-
F1M567	CDC14 cell division cycle 14 homolog B (S. cerevisiae) (Predicted), isoform CRA_a	69,65	-
B1WC33	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 4 (Predicted), isoform CRA_a	85,86	-
F1LYI0	CECR2, histone acetyl-lysine reader	59,06	+
A0A0G2K7S1	Cell division cycle 14B	65,42	-
P23505	Cell surface glycoprotein gp42	177,71	+
F1LPD3	Centrosomal protein 350	84,73	+
D4AC23	Chaperonin-containing TCP1 subunit 7	85,65	-
B0BMY5	Chchd5 protein	142,3	-

Q6IRF7	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	86,03	-
Q01134	Choline kinase alpha	87,06	-
Q5RJK5	Chromobox 3	772,99	+
B5DEG7	Chromosome alignment maintaining phosphoprotein 1	120,03	+
G3V739	Cilia and flagella-associated protein 45	70,95	-
F1M6Q2	Ciliary rootlet coiled-coil, rootletin	70,17	+
P08082	Clathrin light chain B	317,07	-
D4A0H5	Cleavage and polyadenylation specific factor 1, 160kDa (Predicted), isoform CRA_a	42,31	+
B5DEL2	Cleavage and polyadenylation-specific factor 1	42,31	+
Q99M76	Cohesin subunit SA-3	84,96	-
A0A0G2K991	Coiled-coil alpha-helical rod protein 1	77,5	+
D3ZBB5	Coiled-coil domain-containing 14	59,25	-
D3ZRD2	Coiled-coil domain-containing 15	64,3	+
P18395	Cold shock domain-containing protein E1	73,93	+
F1M6H4	Collagen, type VI, alpha 4	67	-
Q3MIE7	COMM domain containing 9, isoform CRA_a	240,28	-
A0A1B0GWQ4	Complement C5	257,76	+
Q9Z1T4	Connector enhancer of kinase suppressor of ras 2	53,8	-
D3ZKK3	Consortin, connexin sorting protein	86,05	-
D3ZWR4	Copine VII (Predicted), isoform CRA_b	117,8	-
H1UBN0	Copine-7	127,7	-
Q5BJS7	Copine-9	59,76	-
A0A140TAB4	Core histone macro-H2A	79,61	+
Q02874	Core histone macro-H2A.1	79,61	+
P00564	Creatine kinase M-type	54,98	+
Q9Z2F5	C-terminal-binding protein 1	192,3	-
D3ZG42	CUB domain-containing protein 2	125,5	-
P97536	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	46,11	+
Q3MHT2	Cysteine desulfurase, mitochondrial	74,03	-
P10715	Cytochrome c, testis-specific	184,89	-
Q63270	Cytoplasmic aconitate hydratase	80,45	+
Q9QXU8	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1	88,51	-
Q68FS4	Cytosol aminopeptidase	137,35	+
A0A0G2JUK6	D-amino-acid oxidase	199,97	-
D4A1V8	DAZ-interacting zinc finger protein 3	53,33	-
D4A7Q5	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 28 (Predicted)	63,75	+
Q8CF97	Deubiquitinating protein VCIP135	67,32	+
P36365	Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 1	78,91	-
Q01460	Di-N-acetylchitobiase	77,67	-
O55096	Dipeptidyl peptidase 3	81,09	-
M0R781	Dipeptidyl peptidase 9	62,41	+
G3V616	Divalent cation tolerant protein CUTA, isoform CRA_b	205,04	-
A0A0G2JT00	Divalent cation tolerant protein CUTA, isoform CRA_c	205,04	-
G3V681	DNA helicase	94	-
G3V8M1	DNA polymerase	59,15	-

O54747	DNA polymerase delta catalytic subunit	65,03	-
B1WBY5	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 11	126,16	-
B0BNA8	Docking protein 4	79,02	+
D4A098	Doublesex and mab-3 related transcription factor 2 (Predicted)	84,93	-
P55266	Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase	48,37	+
P51400	Double-stranded RNA-specific editase 1	77,18	+
Q569A7	DPH5 homolog (S. cerevisiae)	141,55	+
D4A3W6	Dual specificity phosphatase 16 (Predicted)	76,64	-
A0A0G2K4H4	Dynein assembly factor 3, axonemal	45,58	-
D3ZEK8	Dystrophin	78,54	-
A0A0G2K6R8	EH domain-binding protein 1-like 1	38,5	+
A0A1B0GWQ5	ELAV-like protein	104,08	+
B5DF91	ELAV-like protein 1	79,38	+
Q8CH84	ELAV-like protein 2	104,08	+
O09032	ELAV-like protein 4	104,08	+
A0A0G2JYT1	ELKS/Rab6-interacting/CAST family member 1	57,7	-
Q68FR6	Elongation factor 1-gamma	122,82	-
M0R4P2	Elongation factor Ts, mitochondrial	126,88	-
Q499U2	Engulfment and cell motility protein 3	157,78	+
A0A140TAE6	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase, mitochondrial	93,76	-
P54759	Ephrin type-A receptor 7	47,7	+
F1M471	EPM2A-interacting protein 1	69,17	+
A0A0G2K140	ERC protein 2	69,14	-
B5DEH2	Erlin-2	126,32	-
A0A0G2K774	Ermin	128,86	-
B0BNJ4	ETHE1, persulfide dioxygenase	98,07	-
B5DEN5	Eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	228,68	-
A0A0G2KAW7	Eukaryotic translation initiation factor 4H	156,35	+
Q04931	FACT complex subunit SSRP1	65,89	+
B2GUZ9	Fam49b protein	69	+
A0A0G2QC58	Family with sequence similarity 117, member A	91,8	+
Q5XII4	Family with sequence similarity 207, member A	106,14	-
M0R501	Family with sequence similarity 83, member C	70,95	-
P85845	Fascin	73,06	-
F1LME1	Fc receptor-like 6	177,71	+
F1M5T1	Ferritin	149,7	-
P02793	Ferritin light chain 1	149,7	-
D3ZHA0	Filamin-C	43,27	+
G3V633	FMS-like tyrosine kinase 1, isoform CRA_a	79,48	+
A0A0G2JW59	Fms-related tyrosine kinase 3	79,48	+
D3ZY28	Forkhead box K2	84,28	+
O55145	Fractalkine	86,03	-
B2RYW9	Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 2	211,44	-
Q5PQK2	FUS RNA-binding protein	301,11	-
A0A0G2K2S8	FYVE, RhoGEF and PH domain-containing protein 4	53,44	+

D3ZYS7	G3BP stress granule assembly factor 1	72,58	-
P38552	Galectin-4	98,35	-
O09028	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit pi	88,93	+
D3ZVR0	Gamma-tubulin complex component	51,88	+
B4F774	Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1-like 1	77,47	-
P04634	Gastric triacylglycerol lipase	97,14	-
M0RBT0	Germ cell associated 2 (haspin)	53,63	+
Q5I287	Germ cell-less homolog 1 (Drosophila), isoform CRA_a	126,91	+
A0A0G2K533	Germ cell-less, spermatogenesis-associated 1	123,41	+
B5DEZ6	Glucosamine-6-phosphate isomerase	144,76	-
D3ZR63	Glucose-fructose oxidoreductase domain-containing 1	53,85	+
Q63226	Glutamate receptor ionotropic, delta-2	57,99	+
M0RAI4	Glutamyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	68,32	-
G3V8H3	Glutathione S-transferase	42,89	+
A0A096MJ04	Glutathione S-transferase omega 1, isoform CRA_a	115,2	-
Q6AXR6	Glutathione S-transferase omega 1, isoform CRA_b	302,49	-
Q9Z339	Glutathione S-transferase omega-1	302,49	-
A0A0G2JTY5	Glutathione S-transferase omega-2	187,29	-
P30713	Glutathione S-transferase theta-2	232,82	+
A0A0G2JZV9	Glutathione S-transferase theta-2-like	160,03	+
P46413	Glutathione synthetase	93,43	+
A0A0G2K0Z7	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	91,86	+
Q5I0P2	Glycine cleavage system H protein, mitochondrial	357,55	+
Q5I0G4	Glycine--tRNA ligase	69,98	-
P35053	Glypican-1	64,4	-
Q4V7C6	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing]	180,2	-
G3V6A8	Golgi autoantigen, golgin subfamily b, macrogolgin 1, isoform CRA_c	49,76	+
A0A0G2JWG6	Golgin B1	47,2	+
D3ZZL9	GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2	47,63	-
D4AB19	Growth arrest-specific 2-like 3	103,42	-
Q6TXE7	Growth hormone-regulated TBC protein 1	125,25	-
Q6QI86	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 2	91,79	+
D3ZC55	Heat shock 70kDa protein 12A (Predicted), isoform CRA_a	271,51	+
D3ZVM5	Heat shock protein family A (Hsp70) member 12B	54,58	-
D3ZPP6	HECT and RLD domain-containing E3 ubiquitin protein ligase 3	117,56	-
Q925G1	Hepatoma-derived growth factor-related protein 2	52,49	-
Q923W4	Hepatoma-derived growth factor-related protein 3	130,49	-
Q9QX81	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	110,78	-
D4ABT8	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 2	114,47	+
A0A0G2JST6	Hexokinase 3, isoform CRA_a	61,06	+
P27926	Hexokinase-3	72,09	+
P62749	Hippocalcin-like protein 1	332,15	-
Q5XI06	Histone acetyltransferase KAT8	72,72	+

P06349	Histone H1t	100,51	-
Q9Z214	Homer protein homolog 1	95,2	-
O88801	Homer protein homolog 2	95,2	-
P50503	Hsc70-interacting protein	150,73	-
Q63692	Hsp90 co-chaperone Cdc37	80,59	-
A0A0G2JV35	Hyaluronoglucosaminidase 3, isoform CRA_d	111,09	-
F1M147	HYLS1, centriolar and ciliogenesis-associated	106,46	+
Q6P136	Hyou1 protein	105,09	-
D4A8N6	Hypothetical protein LOC690422	61,53	-
Q63617	Hypoxia up-regulated protein 1	107,84	-
P20759	Ig gamma-1 chain C region	150,38	-
F7EL93	Immunoglobulin superfamily, DCC subclass, member 4	136	-
F1M5M3	Inactive serine/threonine-protein kinase TEX14	87,74	-
Q9QYE7	Integrin alpha-D	62,96	-
D3ZN51	Integrin subunit alpha 9	61,71	+
F1M8G4	Integrin subunit alpha D	59,36	-
M0R9Z5	Interferon regulatory factor 2-binding protein 2	106,96	-
G3V760	Intestinal cell kinase, isoform CRA_a	83,17	+
D4A1F4	Intracisternal A particle-promoted polypeptide	59,72	+
A0A096MK45	Intraflagellar transport protein 172 homolog	73,77	+
A0A0G2JUF6	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	140,9	-
P56574	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	171,15	-
D4A1C2	Junction adhesion molecule-like	77,59	+
Q5PQU0	Kdr protein	86,81	+
M0R439	Kelch domain-containing 7A	83,2	-
Q6IFZ5	Keratin 76	204,29	-
A0A0G2JUR6	Keratin 78	124,72	-
A0A0G2JW69	Keratin 79	124,72	-
A0A0G2JU05	Keratin 83	124,72	-
A0A0G2K0I4	Keratin 84	124,72	-
A7M777	Keratin 85	124,72	-
G3V712	Keratin complex 2, basic, gene 7, isoform CRA_a	124,72	-
Q6IFU7	Keratin, type I cytoskeletal 42	116,99	+
A0A0G2JST3	Keratin, type II cytoskeletal 1	40,62	-
A0A0G2JWX4	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	65,91	-
A0A0G2K6P7	Keratin, type II cytoskeletal 4	190,63	-
A0A0G2K1K9	Keratin, type II cytoskeletal 5	140,2	+
Q4FZU2	Keratin, type II cytoskeletal 6A	124,72	-
Q6IG12	Keratin, type II cytoskeletal 7	124,72	-
A0A0G2K7N1	Keratin, type II cytoskeletal 72	63,57	+
A0A0G2JXH6	Keratin, type II cytoskeletal 73	65,91	-
Q6IG05	Keratin, type II cytoskeletal 75	190,63	-
Q10758	Keratin, type II cytoskeletal 8	124,72	-
Q91V33	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1	74,14	+
F1M4A4	Kinesin family member 1A	88,58	+

D4ADC4	Kinesin family member 26B	51,62	+
D4A8G1	Kinesin-like protein	72,56	+
Q64602	Kynurenine/alpha-aminoadipate aminotransferase, mitochondrial	67,26	-
Q6P7Q4	Lactoylglutathione lyase	330,78	-
Q811X6	Lambda-crystallin homolog	96,3	+
G3V8L3	Lamin A, isoform CRA_b	75,64	-
B1WC94	Lamin tail domain-containing 2	96	+
F1MAA7	Laminin subunit gamma 1	43,4	+
D3ZXT1	Leucine rich repeat containing 4C (Predicted), isoform CRA_a	42,32	+
F7ESR8	Leucine-rich repeat LGI family, member 2	106,95	-
D4A456	Leucine-rich repeats and calponin homology domain-containing 2	59,07	+
Q499P2	Leukotriene A(4) hydrolase	60,71	+
P30349	Leukotriene A-4 hydrolase	60,71	+
A0A140TAC7	L-gulonolactone oxidase	46,89	+
Q6AYX2	L-lactate dehydrogenase	146,25	-
H9N9H4	L-lactate dehydrogenase C chain	146,25	-
Q6P6U3	Lmna protein	74,15	-
Q66H93	LOC100125386 protein	687,95	-
P15650	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	91,43	-
A0A0G2JTH9	LRRGT00097	71,62	+
Q6QI69	LRRGT00139	86,62	-
Q6QI11	LRRGT00197	72,61	-
D3ZN15	L-threonine dehydrogenase	165,93	-
Q0VGK4	Lysophospholipase D GDPD1	149,39	-
Q63341	Macrophage metalloelastase	80,87	-
F1M3X5	Maestro heat-like repeat family member 6	108,56	+
A0A140TAE0	Major vault protein	54,25	-
A0A0G2K4C6	Malic enzyme	198,85	-
D3ZT16	MAP6 domain-containing 1	211,7	+
A0A0G2JTL4	Mast/stem cell growth factor receptor	79,48	+
A0A0G2JYF9	Matrilin 3	52,84	-
D3ZZ42	Matrix metalloproteinase 21	65,37	+
R9PXT7	Matrix metalloproteinase	80,87	-
A0A0G2JW88	Microtubule-associated protein	88,61	-
Q7TQ75	Microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta	160,68	-
D3ZAP3	Microtubule-associated protein 10	57,13	+
Q5M7W5	Microtubule-associated protein 4	80,63	-
Q5XIT1	Microtubule-associated protein RP/EB family member 3	495,21	-
Q62625	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B	438,24	-
A0A096MJG9	Midasin AAA ATPase 1	79,3	-
P22199	Mineralocorticoid receptor	89,36	-
Q4KM98	Mitochondrial fission factor	156,49	-
A0A0G2K2M2	Mitochondrial fission factor-like	156,49	-

A0A0G2K5L2	Mitochondrial glutamate carrier 1-like	226,32	-
Q5XIN6	Mitochondrial proton/calcium exchanger protein	92,07	+
G3V6Z9	Mitochondrial transcription termination factor 1	54,3	+
A0A0G2KAB2	Mitogen-activated protein kinase	77,78	+
Q9Z2A6	Mitogen-activated protein kinase 15	77,78	+
A0A0G2JUN9	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase	89,11	-
D3ZG83	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase	56,04	+
D4A552	MORC family CW-type zinc finger 3	70,99	+
D3Z9C8	M-phase phosphoprotein 9	36,17	+
O55164	Multiple PDZ domain protein	34,92	+
B2GV99	Myl6 protein	331,08	-
D4A228	Myomesin 3	58,51	+
A0A0G2JWE1	Myosin light polypeptide 6	331,08	-
Q64122	Myosin regulatory light polypeptide 9	80,52	-
G3V6P7	Myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle	62,39	-
Q62812	Myosin-9	68,63	-
Q769K2	N-acyl-phosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D	103,77	-
F7EXV6	NAD kinase	108,78	-
D4A7L4	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) 1 beta subcomplex, 11 (Predicted)	322,37	-
Q80W89	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 11	539,57	+
B2RYS8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial	402,47	+
F1LPG5	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B4	249,1	-
F1LSM5	Nck-associated protein 1	89,75	+
D4ABE3	N-deacetylase and N-sulfotransferase 3	59,75	-
A0A0G2JWS2	Nebulette	89,5	+
P28841	Neuroendocrine convertase 2	57,81	-
P12389	Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-2	179,19	-
P12392	Neuronal acetylcholine receptor subunit beta-4	118,45	-
A0A0G2JW27	Neuronal cell adhesion molecule	62,01	-
Q6PW39	Neuronal cell adhesion molecule long isoform Nc1	62,01	-
Q62718	Neurotrimin	98,16	-
G3V6L2	NIMA-related kinase 2	116,9	-
D4A1J7	Ninein	47,37	-
A0A0G2K350	NSF attachment protein gamma	169,52	-
F1M575	Nuclear GTPase, germinal center-associated	82,15	-
Q63525	Nuclear migration protein nudC	50,54	-
A0A0G2K0V8	Nuclear migration protein nudC-like	50,54	-
F7FF45	Nuclear mitotic apparatus protein 1	48,86	+
G3V662	Nuclear pore complex protein Nup153	79,12	+
A0A0G2JU66	Nuclear protein localization protein 4 homolog	48,36	+
Q6AYD9	Nucleoside diphosphate-linked moiety X motif 19	116,1	-
D3ZYH3	Nudix (nucleoside diphosphate-linked moiety X)-type motif 10	119,98	-
D4A4R3	NUT family member 2F	68,33	+

Q8R5M4	Optineurin	47,64	+
Q4R180	Origin recognition complex subunit 3	114,87	-
Q4V8B0	Oxidation resistance protein 1	144,77	-
Q32PZ0	PAK1-interacting protein 1	52,12	-
D3ZMK9	PEAK1-related kinase-activating pseudokinase 1	65,53	+
Q9JLN4	Peptidoglycan recognition protein 1	90,5	+
G3V7R2	Peptidoglycan-recognition protein	90,5	+
D3ZSF3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	367,71	-
Q9QVC8	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4	85,45	-
F6QBA3	Perilipin	84,95	+
F1M7P4	Peripherin	62,95	-
G3V839	Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide	47,79	+
Q9Z1L0	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta isoform	47,79	+
P53812	Phosphatidylinositol transfer protein beta isoform	109,07	-
D3ZQH6	Phospholipase A2	49,91	-
F1LMQ4	Phospholipase A2, group IVC	58,86	+
G3V719	Phospholipid scramblase	144,02	-
A0A0G2K931	Phosphoserine aminotransferase	128,81	+
A0A0G2KAC0	Phosphoserine aminotransferase 1	128,81	+
Q6AYN4	Phytanoyl-CoA hydroxylase-interacting protein-like	163,58	+
F1M419	Pim-2 proto-oncogene, serine/threonine kinase	173,96	-
M0RDK4	PITPNM family member 3	87,17	-
P11505	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	62,66	+
P20786	Platelet-derived growth factor receptor alpha	54,68	+
Q05030	Platelet-derived growth factor receptor beta	66,75	+
D3ZUW0	Pleckstrin and Sec7 domain-containing 3	46,91	-
B1WBU8	Pleckstrin homology domain-containing family D member 1	88,59	-
D4A959	Pleckstrin homology domain-containing M3	59,16	+
A0A0G2K3I8	Pogo transposable element with KRAB domain (Predicted), isoform CRA_a	86,24	-
D3ZV46	Pogo transposable element-derived with KRAB domain	84,35	-
Q6AY48	Poly(rC)-binding protein 3	56,59	+
G3V9N0	Polyadenylate-binding protein	61,38	-
Q66H20	Polypyrimidine tract-binding protein 2	77,19	-
D3ZGN4	Potassium channel tetramerization domain-containing 20	86,97	+
O88758	Potassium voltage-gated channel subfamily S member 1	80,09	+
G3V6U5	POU domain protein	85,78	-
P20267	POU domain, class 3, transcription factor 1	85,78	-
P56222	POU domain, class 3, transcription factor 2	85,78	-
Q63262	POU domain, class 3, transcription factor 3	85,78	-
P62516	POU domain, class 3, transcription factor 4	85,78	-
D3ZP38	Predicted gene 1758	404,38	-
P48679	Prelamin-A/C	75,64	-
A1A5S1	Pre-mRNA-processing factor 6	59,11	-
A0A0G2K1S0	Pre-mRNA-splicing factor SLU7	121,86	-

D3ZDU5	Profilin	317,61	-
Q9EPC6	Profilin-2	317,61	-
D3ZFB6	Proline-rich transmembrane protein 2	151,39	+
P83868	Prostaglandin E synthase 3	215,45	-
Q5BK81	Prostaglandin reductase 2	72,34	-
P18420	Proteasome subunit alpha type-1	211,66	-
Q6MGD0	Protein CutA	205,04	-
A0A0G2JSZ5	Protein disulfide-isomerase A6	150,49	-
G3V9L2	Protein kinase LYK5, isoform CRA_c	85,05	+
F1LQV9	Protein lin-7 homolog A	135,87	-
Q79210	Protein lin-7 homolog C	154,46	-
Q6JE36	Protein NDRG1	205,22	-
P35467	Protein S100-A1	282,57	-
P23606	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K	87,49	+
P70600	Protein-tyrosine kinase 2-beta	31,08	+
A0A0G2K0U8	Pseudouridylate synthase 10	88,37	-
D3ZVK6	Putative ERV-F(c)1 provirus ancestral Env polyprotein	108,75	+
F7EPH4	Pyrophosphatase (inorganic) 1	250,79	-
Q6AYT0	Quinone oxidoreductase	92,76	+
F1LPB9	Rabphilin-3^a	73,69	-
D4A823	RAD52 motif 1 (Predicted), isoform CRA_c	107,73	-
Q62796	RalA-binding protein 1	136,3	-
D4A2G9	RAN-binding protein 1	58,36	+
D4A634	RAN-binding protein 6	59,82	+
F1M8L9	Rap guanine nucleotide exchange factor 1	108,91	-
F1M386	Rap guanine nucleotide exchange factor 2	29,03	+
A0A0G2K1D2	RAP1, GTP-GDP dissociation stimulator 1 (Predicted), isoform CRA_a	72,42	+
F1M7Y3	RAP1, GTP-GDP dissociation stimulator 1 (Predicted), isoform CRA_b	72,42	+
B1WC85	RCG23253, isoform CRA_a	95,75	-
D3ZTA4	RCG26849, isoform CRA_a	105,51	-
M0R3Z8	RCG28930, isoform CRA_b	138,08	-
G3V6B7	RCG35022, isoform CRA_b	60,14	+
D4ADT0	RCG37011	181,4	+
A0A0G2JSL7	RCG39005	70,18	-
G3V911	RCG41265	68,79	+
M0R9Q1	RCG48334, isoform CRA_e	84,26	-
Q6AYR1	RCG52996, isoform CRA_a	117,82	-
A0A0G2K6B2	RCG60109	69,13	-
A0A0U1RRV7	RCG61099, isoform CRA_b	506,96	+
Q0ZFS8	RCG61099, isoform CRA_c	506,96	+
D3ZVG0	RCG64393	187,71	-
G3V783	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2	54,32	-
Q62656	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta	32,66	+
G3V6G4	Recoverin	139,75	-
O08774	Regulator of G-protein signaling 12	53,1	+

A0A0G2K326	Regulator of G-protein signaling 12, isoform CRA_b	47,46	+
G3V9H1	Regulator of G-protein signaling 12, isoform CRA_c	52,44	+
P49803	Regulator of G-protein signaling 7	47,68	+
D3Z956	Retinaldehyde binding protein 1 (Predicted), isoform CRA_a	45,45	+
B2RYG3	RGD1565149 protein	93,76	-
D4A6C5	Rho GTPase-activating protein 1	56,58	-
D3ZDI5	Rho GTPase-activating protein 12	54,79	+
Q5XXR3	Rho guanine nucleotide exchange factor 6	75,76	-
Q6MFZ6	Ribonuclease P 21 subunit (Human), isoform CRA_c	121,55	+
Q5BJP4	RNA binding motif protein 39	87,68	-
Q68FQ7	RNA polymerase II-associated protein 3	70,76	-
M0R3R6	RNA-binding motif protein 14	84,26	-
A0A0G2JZA1	Roundabout guidance receptor 2	158,14	+
A0A0G2JW21	Roundabout homolog 1	155,5	+
D3ZW66	RUN and TBC1 domain containing 1 (Predicted)	48,38	+
Q6AY30	Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase	85,57	+
B5DFD3	Schip1 protein	111,56	-
F1M6Q1	Schwannomin-interacting protein 1	65,42	-
F1M7L6	Secretogranin III, isoform CRA_a	110,34	-
P47868	Secretogranin-3	110,34	-
A0A0U1RRQ5	Septin 6	88,51	-
Q5EB96	Septin-1	58,13	+
Q6TXG7	Serine hydroxymethyltransferase	54,57	+
D4A2H2	Serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 1	188,36	-
Q62726	Serine/threonine-protein kinase ICK	102,51	+
Q9R011	Serine/threonine-protein kinase PLK3	82,99	+
D3ZHP7	Serine/threonine-protein kinase ULK3	76,42	-
P36876	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B alpha isoform	96,35	-
F1MAA9	Serpin family B member 3	64,62	-
D4AEC7	SET and MYND domain containing 4 (Predicted)	58,45	-
M0RB44	Shroom family member 1	65,74	-
D3ZY56	Similar to divalent cation tolerant protein CUTA	125,16	+
F1M7K9	Similar to elongation protein 4 homolog	79,15	-
D4A227	Similar to GS2 gene	90,16	+
D3ZV82	Similar to guanylate-binding protein family, member 6	238,06	+
A0A0U1RS33	Small G protein-signaling modulator 2	48,38	+
F1LYZ6	Small nuclear RNA-activating complex, polypeptide 4	57,96	-
D3ZJ86	Sodium/hydrogen exchanger	95,66	+
F1LNP4	Solute carrier family 12 member 5	70,24	+
Q66HR0	Solute carrier family 12 member 9	55,58	+
Q4PJT6	Spermatogenesis-associated protein 24	97,24	-
A0A0G2K4X8	S-phase kinase-associated protein 1	802,26	-
A0A0G2KAH6	SRSF protein kinase 3	119,66	+
Q7TNZ6	STE20-related kinase adapter protein alpha	85,05	+
D4A769	Sterile alpha motif domain-containing 4B	47,58	+

D4AAG8	Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing 1	61,16	+
F1MAD9	Structural maintenance of chromosomes protein	62,08	-
P97690	Structural maintenance of chromosomes protein 3	44,82	+
P21913	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	128,2	+
Q68FU8	SURP and G-patch domain-containing protein 1	54,11	+
Q02563	Synaptic vesicle glycoprotein 2A	45,74	+
P97610	Synaptotagmin-12	175,41	+
P32851	Syntaxin-1^a	96,17	-
D3ZU84	Syntaxin-binding protein 5-like	63,28	-
D4A6C9	Target of myb1-like 2 (Chicken) (Predicted), isoform CRA_a	598,87	-
A0A0G2K9L2	Target of myb1-like 2 membrane-trafficking protein	598,87	-
Q66HA4	Tax1-binding protein 1 homolog	47,71	-
Q5CD77	TBC1 domain family member 14	116,19	-
Q4V8G8	Tektin-3	75,96	-
Q9Z220	Testis-specific gene 10 protein	61,85	+
Q6AY87	THO complex subunit 6 homolog	83,45	+
Q5XHYS	Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic	43,71	+
Q5X117	Threonyl-tRNA synthetase-like 2	43,47	+
D3ZPC3	TLC domain-containing 2	223,37	+
Q9EPI8	Transcription termination factor 1, mitochondrial	54,3	+
P26342	Transforming growth factor beta receptor type 3	70,88	-
Q925B3	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 7	58,74	+
Q6AY76	Transmembrane protein 248	114,24	-
A0A0G2K1P8	TRIO and F-actin-binding protein	70,93	-
D4A7S9	Tripartite motif protein 45 (Predicted), isoform CRA_b	121,08	-
A0A0G2JXN2	Tripartite motif-containing protein 46	80,28	-
Q64560	Tripeptidyl-peptidase 2	79,02	-
Q4R1A4	TRK-fused gene protein	97,43	-
A0A0G2KA47	tRNA-dihydrouridine(16/17) synthase [NAD(P)(+)]-like	66,01	+
Q6IE07	Trypsin X5	116,18	-
Q6P7B0	Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic	126,39	+
Q5U2Y6	Tuftelin-interacting protein 11	46,04	+
Q6PCT3	Tumor protein D54	122,48	-
Q5RJR2	Twinfilin-1	99,18	+
Q9QWG5	Type II inositol 3,4-bisphosphate 4-phosphatase	83,45	+
A7M776	Type II keratin 23	124,72	-
A0A0G2JVA8	Type II keratin Kb15	190,63	-
D4A7W7	Tyrosine-protein kinase	82,03	-
P32577	Tyrosine-protein kinase CSK	70,18	+
P41499	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11	47,7	+
F2Z3T9	U2 snRNP auxiliary factor large subunit	384,75	-
D4AA63	Ubiquilin 2	145,55	-
Q4VSI4	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	48,53	+

A0A0G2K8A5	Ubiquitin-activating enzyme, Chr Y	45,14	+
D3ZFY8	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1-like	869,03	-
A0A0G2JU07	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	878,31	-
A0A0G2JZU8	Ubiquitin-specific peptidase 9, Y-linked	69,53	+
A0A0G2JSJ2	UMP-CMP kinase	242,87	-
P53767	Vascular endothelial growth factor receptor 1	79,48	+
O08775	Vascular endothelial growth factor receptor 2	61,92	+
Q91ZT1	Vascular endothelial growth factor receptor 3	62,63	+
M0R3N4	Vesicle amine transport 1-like	554,76	-
P62762	Visinin-like protein 1	386,45	-
Q8VHW7	Voltage-dependent calcium channel gamma-6 subunit	90,03	-
D4ACM5	WD repeat domain 31	89,26	+
D3ZMM2	WD repeat domain 90	46,75	-
Q9ERH3	WD repeat-containing protein 7	59,5	-
G3V817	X-ray repair cross-complementing protein 5	69,21	+
Q9JKY2	Zic family member 1	93,97	+
F1LTU5	Zinc finger CCCH type containing 6 (Predicted)	61,97	+
G3V9G6	Zinc finger protein 111	65,28	+
F7FQD8	Zinc finger protein 133	51,48	-
G3V893	Zinc finger protein 335	66,05	+
M0RAT5	Zinc finger protein 560	101,46	-

4.4.2. Proteínas super e subexpressas no grupo MeHg

Tabela 2 - As proteínas identificadas estão organizadas em ordem alfabética. A diferença da expressão é identificada por valores positivos nas proteínas superexpressas e valores negativos em proteínas subexpressas (-), expressa proteica em comparação ao grupo controle. A identificação foi feita pela base de dados UniProt.

“ Número de Acesso”	Descrição das proteínas	PLGS Score	MeHg
P26772	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	2966,42	-0,951229424
P35213	14-3-3 protein beta/alpha	4944,62	-0,951229424
P62260	14-3-3 protein épsilon	6626,1	-0,970445534
P68511	14-3-3 protein eta	5120,96	-0,951229424
P61983	14-3-3 protein gamma	6503,99	-0,980198674
P63102	14-3-3 protein zeta/delta	10181,67	-0,980198674
P13233	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase	6549,27	1,993715528
Q5XI78	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	461,85	1,233678052
P50554	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial	1432,27	1,197217372
P63039	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	1274,72	-0,970445534
P19944	60S acidic ribosomal protein P1	1399,13	1,083287066
D3ZD79	Absent in melanoma 1	65,68	2,095935534
Q9ER34	Aconitate hydratase, mitochondrial	3871,57	1,127496849
P68035	Actin, alpha cardiac muscle 1	11818,65	1,127496849
P68136	Actin, alpha skeletal muscle	11864,46	1,127496849
P62738	Actin, aortic smooth muscle	10807,14	1,127496849
D3ZRN3	Actin, beta-like 2	4924,71	1,11627807
P60711	Actin, cytoplasmic 1	27340,94	1,138828378
P63259	Actin, cytoplasmic 2	27340,94	1,138828378
P63269	Actin, gamma-enteric smooth muscle	10743,07	1,138828378
Q4V7C7	Actin-related protein 3	686,16	1,16183425
P11030	Acyl-CoA-binding protein	740,91	1,094174288
A0A0G2JSM7	Adducin 1 (Alpha), isoform CRA_b	305,73	1,051271097
P39069	Adenylate kinase isoenzyme 1	2086,27	-0,835270205
Q05962	ADP/ATP translocase 1	1755,83	2,033991215
Q09073	ADP/ATP translocase 2	1564,83	2,033991215
P84082	ADP-ribosylation factor 2	658,27	-0,93239382
P11884	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	241,66	-0,878095435
Q63910	Alpha globin	1402,56	-0,548811623
G3V6Y6	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	535,47	1,221402762
Q63028	Alpha-adducin	305,73	1,051271097
P23565	Alpha-internexin	2847,99	1,061836545
P54921	Alpha-soluble NSF attachment protein	482,27	1,10517092
P37377	Alpha-synuclein	903,4	-0,895834136
G3V846	Amino acid transporter	274,62	1,138828378
F1M9V7	Aminopeptidase	67,27	1,296930074
A0A0G2K3U1	AMP deaminase	77,7	1,173510867
Q02356	AMP deaminase 2	77,7	1,16183425
O08838	Amphiphysin	250,58	-0,826959136

A0A0G2K5Z4	Amphiphysin-like	250,58	-0,826959136
A0A0H2UHB7	Anion exchange protein	117,88	1,221402762
D3Z9Z0	Ankyrin 1	107,69	1,16183425
F1LM42	Ankyrin 2	108,67	1,197217372
Q6IMZ3	Annexin	124,58	1,209249595
P48037	Annexin A6	124,58	1,233678052
G3V9N8	AP complex subunit beta	130,78	1,10517092
P52303	AP-1 complex subunit beta-1	139,11	1,11627807
D3ZUY8	AP-2 complex subunit alpha	94,77	1,083287066
P62944	AP-2 complex subunit beta	285,77	1,127496849
B2RYJ7	ARP1 actin-related protein 1 homolog B	67,56	1,221402762
P13221	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	5532	1,083287066
P00507	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	6479,65	1,1502738
Q5U318	Astrocytic phosphoprotein PEA-15	375,78	-0,869358235
P19511	ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial	193,55	1,803988368
G3V6D3	ATP synthase subunit beta	18119,85	-0,980198674
P10719	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	18119,85	-0,980198674
P31399	ATP synthase subunit d, mitochondrial	3831,18	1,094174288
P35434	ATP synthase subunit delta, mitochondrial	360,01	-0,904837417
Q6PDU7	ATP synthase subunit g, mitochondrial	1005,94	1,233678052
Q6PCU0	ATP synthase subunit gamma	489,83	-0,860707971
P35435	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	489,83	-0,852143792
G3V7Y3	ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit	360,01	-0,904837417
D4A133	ATPase H⁺-transporting V1 subunit A	2523,99	1,02020134
D3ZZS8	ATPase H⁺-transporting V1 subunit B1	332,61	1,040810773
A0A0G2K9J2	ATPase H⁺-transporting V1 subunit H	168,72	-0,818730751
A0A0G2KBC7	ATP-dependent 6-phosphofructokinase	722,53	1,1502738
P47858	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type	551,83	1,127496849
P47860	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type	266,65	1,197217372
D4ACZ4	Band 4.1-like protein 1	84,92	1,568312167
Q63754	Beta-synuclein	6337,13	-0,970445534
O35567	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	83,83	1,462284582
Q5HZA7	Bin1 protein	1103,29	-0,951229424
P55068	Brevican core protein	313,71	1,209249595
P07171	Calbindin	5179,34	1,051271097
G3V9G3	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, beta, isoform CRA_a	1207,97	1,390968147
F1LUE2	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, beta, isoform CRA_c	1207,97	1,390968147
P11275	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha	521,49	1,390968147
P08413	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit beta	1207,97	1,390968147
P15791	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta	571,53	1,296930074

P11730	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit gamma	606,38	1,258600015
A0A0G2K9Q6	Calcium-transporting ATPase	85,9	1,404947596
P63055	Calmodulin regulator protein PCP4	1492,53	1,127496849
D4ABV5	Calmodulin-2	5453,02	1,051271097
Q5U206	Calmodulin-like protein 3	1389,79	1,349858824
P18418	Calreticulin	759,09	-0,913931182
B0BNN3	Carbonic anhydrase 1	440,68	-0,810584251
A0A0G2K7B9	Carbonic anhydrase 8	1490,29	1,377127754
Q5PPN4	Carbonic anhydrase-related protein	1751,81	1,41906754
B0K020	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 1	984,45	1,138828378
Q1WIM3	Cell adhesion molecule 3	506,28	1,476980773
D4ACB8	Chaperonin subunit 8 (Theta) (Predicted), isoform CRA_a	208,16	1,11627807
G3V936	Citrate synthase	3569,96	1,462284582
Q8VHF5	Citrate synthase, mitochondrial	2516,38	1,462284582
Q05140	Clathrin coat assembly protein AP180	129,23	1,083287066
F1M779	Clathrin heavy chain	1094,54	1,69893226
P11442	Clathrin heavy chain 1	1097,6	1,682027618
A0A0G2JYW3	Clathrin light chain	360,11	-0,810584251
P08081	Clathrin light chain A	360,11	-0,802518799
M0RC65	Cofilin 2	2562,94	1,051271097
P45592	Cofilin-1	6763,12	1,10517092
P63041	Complexin-1	425,37	1,1502738
P84087	Complexin-2	2304,99	1,083287066
Q63198	Contactin-1	130,65	1,665291179
A0A0G2JVQ1	Creatine kinase S-type, mitochondrial	74,9	-0,826959136
P25809	Creatine kinase U-type, mitochondrial	1483,88	1,16183425
P47875	Cysteine and glycine-rich protein 1	109,78	-0,794533599
Q68FY0	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	977,02	1,173510867
P20788	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	1645,45	1,083287066
D3ZD09	Cytochrome c oxidase subunit	2962,23	1,094174288
P00406	Cytochrome c oxidase subunit 2	319,32	1,404947596
P10888	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	791,94	1,973877746
P11240	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	3967,07	1,10517092
P10818	Cytochrome c oxidase subunit 6A1, mitochondrial	2260,59	1,11627807
D3ZSB0	Cytochrome c oxidase subunit 6B1	2668,43	1,051271097
P35171	Cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial	496,15	1,584073998
P62898	Cytochrome c, somatic	865,26	1,296930074
D3ZFAQ	Cytochrome c-1	1044,59	1,803988368
Q6Q0N1	Cytosolic non-specific dipeptidase	266,19	-0,697676316
A0A096MJW9	DEAD-box helicase 17	64,46	1,296930074
P48675	Desmin	219,1	1,221402762
Q6P725	Desmin	219,1	-0,039955057
Q6P6R2	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	1017,76	1,10517092

P08461	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	1005,88	1,02020134
P11348	Dihydropteridine reductase	1097,47	1,051271097
P47942	Dihydropyrimidinase-related protein 2	13176,8	1,040810773
Q62951	Dihydropyrimidinase-related protein 4	934,62	1,040810773
Q9JHU0	Dihydropyrimidinase-related protein 5	184,78	-0,860707971
A0A0G2K8Y5	Dihydropyrimidinase-related protein 5-like	182,52	-0,843664815
Q62936	Disks large homolog 3	361,31	-0,677056884
A0A0G2JY26	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C6	71,7	1,433329435
P21575	Dynamin-1	2040,38	1,030454533
P39052	Dynamin-2	434,7	-0,970445534
P63170	Dynein light chain 1, cytoplasmic	377,02	-0,65050909
A0A0G2JU43	Dynein light chain 1-like	377,02	1,094174288
Q78P75	Dynein light chain 2, cytoplasmic	776,91	1,083287066
Q641Z6	EH domain-containing protein 1	81,73	1,209249595
Q9JI66	Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 1	117,88	1,233678052
P13803	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	287,32	-0,778800783
M0R757	Elongation factor 1-alpha	4142,24	1,030454533
P62630	Elongation factor 1-alpha 1	4142,24	1,030454533
P05197	Elongation factor 2	171,72	1,309964465
Q9QYU2	Elongation factor Ts, mitochondrial	150,03	1,69893226
O35179	Endophilin-A1	1194,53	-0,96078944
O35964	Endophilin-A2	194,5	-0,93239382
O88752	Epsilon 1 globin	1635,83	-0,733446954
D3ZM69	Erythrocyte membrane protein band 4.1-like 2	73,81	1,138828378
Q9JMB3	Erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3	205,12	1,072508182
Q6XDA1	Erythroid spectrin alpha	46,85	2,410899695
P24942	Excitatory amino acid transporter 1	274,62	1,138828378
P31596	Excitatory amino acid transporter 2	159,75	1,336427477
O35921	Excitatory amino acid transporter 4	114,54	1,377127754
A0A0G2JYB1	F-actin-capping protein subunit beta	539,78	1,258600015
P12785	Fatty acid synthase	97,26	1,209249595
P02680	Fibrinogen gamma chain	118,49	-0,486752242
A0A0G2K3Q6	Fructose-bisphosphate aldolase	11655,69	1,138828378
P05065	Fructose-bisphosphate aldolase A	5704,35	1,11627807
P09117	Fructose-bisphosphate aldolase C	11807,5	1,127496849
Q5M964	Fumarate hydratase 1	541,43	1,072508182
P14408	Fumarate hydratase, mitochondrial	541,43	1,083287066
D3ZSS5	G protein subunit alpha transducin 1	254,16	2,203396474
D4AA42	G protein subunit alpha transducin 2	254,16	2,203396474
P47819	Glial fibrillary acidic protein	7331,02	-0,913931182
Q62669	Globin a1	3701,6	-0,657046828
A0A0G2JSW3	Globin a4	17795,89	-0,733446954
A0A0G2JSV6	Globin c2	47473,69	-0,657046828
G3V8R3	Globin e1	1227,81	-0,527292432

Q6P6V0	Glucose-6-phosphate isomerase	855	1,896480852
Q05683	Glutamate decarboxylase 2	129,39	1,616074385
P10860	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	1390,55	1,040810773
P13264	Glutaminase kidney isoform, mitochondrial	222,03	1,1502738
P09606	Glutamine synthetase	4448,81	1,127496849
Q99MZ4	Glutathione hydrolase 7	98,13	-0,748263574
P04906	Glutathione S-transferase P	1850,04	1,185304853
P04797	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	23558,41	1,061836545
Q9ESV6	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific	1881,14	1,072508182
P35571	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	93,91	1,246076729
P53534	Glycogen phosphorylase, brain form	535,47	1,221402762
P09811	Glycogen phosphorylase, liver form	157,98	1,072508182
PYGM_RABIT	Glycogen phosphorylase, muscle form	163,15	1,1502738
Q66H11	GTP-binding nuclear protein Ran	714,3	-0,869358235
Q8K586	GTP-binding nuclear protein Ran, testis-specific isoform	714,3	-0,860707971
Q5EEY3	GTP-binding protein G-alpha-i2 splice variant b	254,16	2,247907992
Q63942	GTP-binding protein Rab-3D	1030,36	1,127496849
D4AE68	Guanine nucleotide binding protein, alpha q polypeptide, isoform CRA_a	123,73	1,404947596
P10824	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1	254,16	2,181472203
P04897	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	254,16	2,117000017
P54311	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	3115,65	1,127496849
P54313	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2	1912,57	1,127496849
P52287	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-3	718,79	1,11627807
P08753	Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha	254,16	2,1382762
P59215	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha	1307,52	2,013752683
P38406	Guanine nucleotide-binding protein G(olf) subunit alpha	254,16	2,225540955
P82471	Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha	123,73	1,377127754
P63095	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short	267,44	2,247907992
Q63803	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas	267,44	2,293318702
P29348	Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-3	254,16	2,225540955
Q63210	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-12	290,1	2,095935534
Q6Q7Y5	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13	260,44	2,225540955
O35353	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4	2021,3	1,16183425
MORBJ0	Guanine nucleotide-binding protein subunit gamma	319,44	2,075080647
F1LRV4	Heat shock 70 kDa protein 4	279,24	1,051271097

B4F772	Heat shock 70kDa protein 4-like (Predicted), isoform CRA_b	229,34	1,083287066
M0R8M9	Heat shock cognate 71 kDa protein	7027,26	-0,980198674
Q66HA8	Heat shock protein 105 kDa	76,49	1,11627807
Q5XHZ0	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	1871,19	1,083287066
P82995	Heat shock protein HSP 90-alpha	3376,98	1,02020134
P14659	Heat shock-related 70 kDa protein 2	2012,64	1,02020134
P01946	Hemoglobin subunit alpha-1/2	47484,75	-0,690734327
P02091	Hemoglobin subunit beta-1	17958,63	-0,733446954
P11517	Hemoglobin subunit beta-2	11774,17	-0,65050909
A0A0G2JTW9	Hemoglobin, beta adult major chain	3864,35	-0,65050909
Q6URK4	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	1085,33	-0,923116348
D4A6A2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	885,75	-0,895834136
Q9JJ54	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	479,3	-0,96078944
Q499R8	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	114,7	-0,63128364
Q5D059	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	2471,19	-0,970445534
P61980	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	2471,19	-0,970445534
Q6IMY8	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	454,46	1,040810773
A7VJC2	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	2658,55	-0,93239382
P05708	Hexokinase-1	757,09	1,336427477
P62959	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	2215,85	-0,923116348
G3V9C0	Histone H2A	24276,28	1,072508182
M0R6X5	Histone H2A	299,21	-0,941764535
P02262	Histone H2A type 1	24276,28	1,072508182
P0C169	Histone H2A type 1-C	24276,28	1,072508182
P0C170	Histone H2A type 1-E	24276,28	1,072508182
Q64598	Histone H2A type 1-F	24276,28	1,072508182
P0CC09	Histone H2A type 2-A	24276,28	1,072508182
Q4FZT6	Histone H2A type 3	24276,28	1,072508182
Q00728	Histone H2A type 4	24276,28	1,072508182
A9UMV8	Histone H2A.J	24276,28	1,072508182
D3ZWM5	Histone H2B	9088,86	1,16183425
Q00715	Histone H2B type 1	9088,86	1,16183425
Q00729	Histone H2B type 1-A	1449,87	1,173510867
D3ZJ08	Histone H3	379,61	1,127496849
Q6LED0	Histone H3.1	379,61	1,127496849
P84245	Histone H3.3	1855,25	1,221402762
P62804	Histone H4	13476,51	1,390968147
D4A7Q7	Hormonally upregulated Neu-associated kinase	87,55	-0,670320042
P20760	Ig gamma-2A chain C region	1035,24	-0,923116348
P20761	Ig gamma-2B chain C region	113,18	-0,440431658
P29994	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1	198,32	1,185304853
P29995	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2	76,22	1,377127754
Q99NA5	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial	1460,86	1,051271097
F1LNF7	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial	1460,86	1,051271097

A7M778	Keratin 86	124,72	-0,697676316
D3ZX13	Kinesin family member 20B	76,72	1,537257535
P70615	Lamin-B1	150,43	-0,786627865
Q99MZ8	LIM and SH3 domain protein 1	255,88	1,377127754
P04642	L-lactate dehydrogenase A chain	2180,81	1,173510867
P42123	L-lactate dehydrogenase B chain	9037,47	1,127496849
A0A0A6YYM0	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 6	77,71	1,537257535
P30904	Macrophage migration inhibitory factor	4629,79	1,094174288
O88989	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	6766,34	1,11627807
P04636	Malate dehydrogenase, mitochondrial	15278,14	1,10517092
B2GUZ3	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+-dependent) 1-like	316,51	1,309964465
F1LU71	Methylglutaconyl-CoA hydratase, mitochondrial	88,7	1,16183425
Q02253	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	61,78	1,349858824
Q3KR86	MICOS complex subunit Mic60	857,65	1,072508182
D4A1Q2	Microtubule-associated protein	544,37	-0,904837417
G3V7U2	Microtubule-associated protein 1 A, isoform CRA_c	167,64	-0,913931182
P34926	Microtubule-associated protein 1A	188,99	-0,923116348
P15205	Microtubule-associated protein 1B	103,23	-0,895834136
P15146	Microtubule-associated protein 2	387,28	-0,763379486
Q63560	Microtubule-associated protein 6	211,51	-0,818730751
P19332	Microtubule-associated protein tau	544,37	-0,904837417
A0A0G2K7P7	Mitochondrial carrier 2	270	1,233678052
P63086	Mitogen-activated protein kinase 1	103,77	1,209249595
P21708	Mitogen-activated protein kinase 3	165	1,185304853
O08839	Myc box-dependent-interacting protein 1	1103,29	-0,941764535
P02688	Myelin basic protein	15864,71	1,10517092
P60203	Myelin proteolipid protein	3177,37	4,48168907
P07722	Myelin-associated glycoprotein	157,55	-0,726149042
Q63345	Myelin-oligodendrocyte glycoprotein	445,82	-0,835270205
G3V9Y1	Myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle, isoform CRA_b	84,5	1,665291179
P12847	Myosin-3	51,92	3,034358438
F1LMW7	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	186,8	-0,878095435
A0A0G2JWM2	NAD-dependent protein deacetylase	402,36	1,138828378
Q5RJQ4	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2	402,36	1,1502738
D3ZG43	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) Fe-S protein 3 (Predicted), isoform CRA_c	219,69	-0,818730751
Q5RJN0	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) Fe-S protein 7	896,05	1,616074385
Q561S0	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial	795,06	1,138828378
Q5BK63	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial	229,1	1,221402762
Q5XIH3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial	1123,76	1,185304853
P19234	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	1218,32	-0,941764535

Q641Y2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	73,27	1,476980773
Q66HF1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	512,23	1,11627807
B2RZD6	NDUFA4, mitochondrial complex-associated	2921,89	1,491824707
F1LQ81	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein, isoform CRA_b	924,67	1,246076729
P13596	Neural cell adhesion molecule 1	248,83	1,16183425
O35095	Neurochondrin	224,82	1,185304853
A0A0G2JWA1	Neuroendocrine secretory protein 55	254,16	2,247907992
P97685	Neurofascin	142,87	1,233678052
P16884	Neurofilament heavy polypeptide	637,93	1,138828378
P19527	Neurofilament light polypeptide	4078,26	1,061836545
A0A0G2K329	Neuronal cell adhesion molecule	62,01	1,209249595
P97686	Neuronal cell adhesion molecule	62,01	-0,763379486
P97546	Neuroplastin	100,13	1,934792385
Q5BJZ3	Nicotinamide nucleotide transhydrogenase	78,59	-0,802518799
A0A0G2JSV0	N-myc downstream regulated gene 2, isoform CRA_a	1790,35	1,040810773
A0A0G2JSU4	N-myc downstream regulated gene 2, isoform CRA_b	1916,64	1,040810773
P13084	Nucleophosmin	162,22	-0,860707971
Q05982	Nucleoside diphosphate kinase A	1511,66	-0,951229424
P19804	Nucleoside diphosphate kinase B	3357,93	-0,923116348
D3ZQD3	Oxoglutarate dehydrogenase-like	66,12	1,50681778
Q5BKC3	Park7 protein	6544,92	1,051271097
P02625	Parvalbumin alpha	9318,62	-0,904837417
Q4V8F6	Pcbp2 protein	94,96	-0,527292432
A0A0G2K1P0	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	5751,45	1,072508182
P10111	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	5939,77	1,072508182
G3V710	Peroxiredoxin 3	1026,35	-0,869358235
A0A0G2JSS8	Peroxiredoxin 5, isoform CRA_c	4015,73	1,02020134
Q63716	Peroxiredoxin-1	1231,74	1,173510867
Q9Z0V5	Peroxiredoxin-4	256,28	1,221402762
P16036	Phosphate carrier protein, mitochondrial	641,74	1,336427477
P31044	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	15007,68	1,051271097
M0R6Y8	Phosphoglycerate kinase	2869,42	-0,941764535
P25113	Phosphoglycerate mutase 1	9132,31	1,083287066
Q568Z9	Phytanoyl-CoA hydroxylase-interacting protein	564,2	1,349858824
P11506	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 2	114,32	1,491824707
Q64568	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 3	93,4	1,390968147
D4A404	Pleckstrin and Sec7 domain-containing 3	51,61	-0,58274824
Q6AYU5	Poly(rC)-binding protein 2	94,96	-0,548811623
P0CG51	Polyubiquitin-B	9598,47	1,1502738
Q63429	Polyubiquitin-C	9598,47	1,1502738
P09626	Potassium-transporting ATPase alpha chain 1	88,88	1,246076729
P54708	Potassium-transporting ATPase alpha chain 2	237,88	1,258600015
P62963	Profilin-1	937,26	1,16183425

Q5XIH7	Prohibitin-2	361,5	-0,810584251
Q6PDW4	Proteasome subunit beta type	127,85	-0,453844786
P18421	Proteasome subunit beta type-1	127,85	-0,516851321
G3V984	Protein bassoon	60,97	-0,869358235
A0A0H2UHM5	Protein disulfide-isomerase	381,56	-0,895834136
P11598	Protein disulfide-isomerase A3	381,56	-0,923116348
F1LS36	Protein kinase C	96,36	1,377127754
P05696	Protein kinase C alpha type	63,75	1,233678052
Q9Z0W5	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 1	262,32	-0,818730751
P63319	Protein kinase C gamma type	193,63	1,284025417
Q8VBU2	Protein NDRG2	1790,35	1,051271097
Q5XI34	Protein phosphatase 2 (Formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), alpha isoform, isoform CRA_a	607,56	1,11627807
P04631	Protein S100-B	17011,17	1,127496849
O88767	Protein/nucleic acid deglycase DJ-1	6592,2	1,051271097
A0A140TAB9	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	2289,29	-0,835270205
P22062	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	2289,29	-0,818730751
D3ZXP8	Purkinje cell protein 2	2775,2	1,10517092
P52873	Pyruvate carboxylase, mitochondrial	91,94	1,083287066
D4A5G8	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	899,95	1,072508182
P26284	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	902,19	1,072508182
P49432	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	2178,18	1,061836545
A0A0G2JVG3	Pyruvate kinase	8880,94	1,094174288
P12928	Pyruvate kinase PKLR	939,4	1,083287066
P11980	Pyruvate kinase PKM	10257,25	1,094174288
P50398	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	5739,67	1,138828378
P50399	Rab GDP dissociation inhibitor beta	3485,47	1,1502738
Q5RKJ9	RAB10, member RAS oncogene family	1030,36	1,11627807
B0BMW0	RAB14, member RAS oncogene family	1096,06	1,197217372
A0A0G2K235	RAB1A, member RAS oncogene family	1030,36	1,11627807
G3V6H0	RAB1B, member RAS oncogene family-like	1030,36	1,10517092
A0A0G2JTT4	RAB30, member RAS oncogene family	1030,36	2,1382762
F1LW77	RAB33B, member RAS oncogene family	922,73	2,1382762
D4A0G7	RAB37, member RAS oncogene family	1030,36	2,117000017
D3ZZP2	RAB39, member RAS oncogene family (Predicted)	955,7	2,1382762
A0A0G2K201	RAB42, member RAS oncogene family	955,7	2,159766213
A0A0G2JT78	RAB6B, member RAS oncogene family	1013,75	2,159766213
P35281	Ras-related protein Rab-10	1030,36	1,11627807
P35284	Ras-related protein Rab-12	1030,36	2,1382762
P61107	Ras-related protein Rab-14	1096,06	2,054433269
P35289	Ras-related protein Rab-15	957,32	1,11627807
Q6NYB7	Ras-related protein Rab-1A	1030,36	1,11627807
P10536	Ras-related protein Rab-1B	1030,36	2,159766213

P51156	Ras-related protein Rab-26	1030,36	2,1382762
Q5U316	Ras-related protein Rab-35	1087,7	1,11627807
P63012	Ras-related protein Rab-3A	1233,41	1,138828378
Q63941	Ras-related protein Rab-3B	1030,36	1,127496849
P62824	Ras-related protein Rab-3C	1030,36	1,11627807
Q53B90	Ras-related protein Rab-43	1030,36	1,127496849
P05714	Ras-related protein Rab-4A	1030,36	2,159766213
P51146	Ras-related protein Rab-4B	1030,36	2,159766213
Q9WVB1	Ras-related protein Rab-6A	955,7	2,1382762
P35280	Ras-related protein Rab-8A	1030,36	1,094174288
P70550	Ras-related protein Rab-8B	1030,36	1,094174288
A0A0H2UHP9	RCG39700, isoform CRA_d	955,7	2,1382762
M0R608	Reticulon	98,46	1,309964465
Q64548	Reticulon-1	203,9	1,309964465
A0JN02	Sept4 protein	317,04	1,197217372
A0A096MIX9	Septin 4	317,04	1,309964465
G3V9Z6	Septin 8 (Predicted)	485,54	1,094174288
B0BNF1	Septin-8	485,54	1,094174288
A0A0G2K7T5	Serine/threonine-protein phosphatase	173,04	1,258600015
P63331	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform	136,88	1,258600015
P62716	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform	136,88	1,258600015
P63329	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform	849,58	1,336427477
P20651	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit beta isoform	173,04	1,246076729
A0A0G2JSH5	Serum albumin	2946,59	1,010050167
B0BNE5	S-formylglutathione hydrolase	200,03	-0,458406024
G3V804	Sideroflexin	121,5	1,858928051
Q9JHY2	Sideroflexin-3	133,08	1,915540783
Q5EBB0	Similar to 14-3-3 protein sigma	3703,13	-0,980198674
A0A0G2K9I5	Similar to H3 histone, family 3B	379,61	1,11627807
A0A0G2K4Q5	Similar to hypothetical protein MGC37914	65,27	3,669296493
D3Z8P5	Similar to pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase	222,3	1,173510867
G3V8S4	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha	234,6	1,258600015
P06685	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	327,76	1,296930074
P06686	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2	381,73	4,349235265
P06687	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3	430,83	4,305959693
Q64541	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-4	218,91	4,392945765
Q5M9H4	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta	306,02	1,138828378
P07340	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	2808,71	2,664456293

P13638	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-2	316,56	1,127496849
F1LX07	Solute carrier family 25 member 12	551,56	1,390968147
D3ZB81	Solute carrier family 25 member 31	240,1	2,585709628
P16086	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	906,01	1,072508182
A0A0G2K8W9	Spectrin beta chain	345,21	1,786038401
Q9QWN8	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 2	98,51	1,336427477
Q63413	Spliceosome RNA helicase Ddx39b	448,38	1,323129814
P48721	Stress-70 protein, mitochondrial	369,46	-0,895834136
Q920L2	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	392,37	1,185304853
F1LM47	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	331,08	1,083287066
P07632	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	2891,33	1,11627807
G3V733	Synapsin II, isoform CRA_a	1908,81	1,061836545
P09951	Synapsin-1	2154,53	-0,904837417
Q63537	Synapsin-2	1908,81	1,061836545
Q62910	Synaptojanin-1	76,4	1,768267039
P07825	Synaptophysin	325,69	2,944679677
D4A5W9	Synaptosomal-associated protein	296,77	1,377127754
P60881	Synaptosomal-associated protein 25	305,14	1,309964465
G3V6M3	Synaptotagmin II	402,44	1,209249595
P21707	Synaptotagmin-1	231,31	1,11627807
P29101	Synaptotagmin-2	439,09	1,221402762
P47861	Synaptotagmin-5	65,57	1,648721271
P61265	Syntaxin-1B	456,34	1,271249144
P61765	Syntaxin-binding protein 1	8799,71	1,377127754
D3ZN60	Tau tubulin kinase 1 (Predicted)	91,12	-0,826959136
A0A0G2JYZ1	Tau tubulin kinase 2	90	-0,826959136
Q5XIM9	T-complex protein 1 subunit beta	143,54	1,221402762
Q7TPB1	T-complex protein 1 subunit delta	434,17	-0,923116348
R4GNK3	Thioredoxin	453,48	-0,852143792
Q9Z0V6	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	1026,35	-0,878095435
Q68A21	Transcriptional activator protein Pur-beta	284,5	-0,726149042
P50137	Transketolase	819,11	1,1502738
P48500	Triosephosphate isomerase	11764,19	1,11627807
A0A0H2UHM7	Tubulin alpha chain	13257,26	1,127496849
P68370	Tubulin alpha-1A chain	17343,54	1,127496849
Q6P9V9	Tubulin alpha-1B chain	19018,51	1,127496849
Q6AYZ1	Tubulin alpha-1C chain	13257,26	1,11627807
Q68FR8	Tubulin alpha-3 chain	13238,7	1,138828378
Q5XIF6	Tubulin alpha-4A chain	17103,29	1,11627807
Q6AY56	Tubulin alpha-8 chain	7863,83	1,11627807
G3V7C6	Tubulin beta chain	32185,94	1,1502738
P85108	Tubulin beta-2A chain	27779,3	1,11627807
Q3KRE8	Tubulin beta-2B chain	26903,36	1,11627807

Q4QRB4	Tubulin beta-3 chain	20141,59	1,138828378
Q6P9T8	Tubulin beta-4B chain	31031,09	1,1502738
P69897	Tubulin beta-5 chain	28350,87	1,1502738
Q00981	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	1592,74	-0,895834136
B2RYG6	Ubiquitin thioesterase OTUB1	208,23	1,246076729
P62982	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	9598,47	1,1502738
P62986	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	9598,47	1,1502738
Q5U300	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	313,45	1,127496849
D3ZVQ0	Ubiquitinyl hydrolase 1	234,48	1,127496849
Q9Z270	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A	199,06	1,840431425
Q9QUL6	Vesicle-fusing ATPase	928,93	1,246076729
P31000	Vimentin	1278,45	-0,818730751
Q9Z2L0	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	4505,35	1,061836545
P81155	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	2072,38	1,16183425
Q9R1Z0	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	1638,11	1,209249595
P25286	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1	78,37	1,349858824
Q5M7T6	V-type proton ATPase subunit	693,56	1,233678052
Q2I6B5	V-type proton ATPase subunit a	78,37	1,363425117
P62815	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	888,53	1,030454533
Q5RKI0	WD repeat-containing protein 1	206,19	1,138828378

4.4.3. Gráfico com a distribuição funcional das proteínas

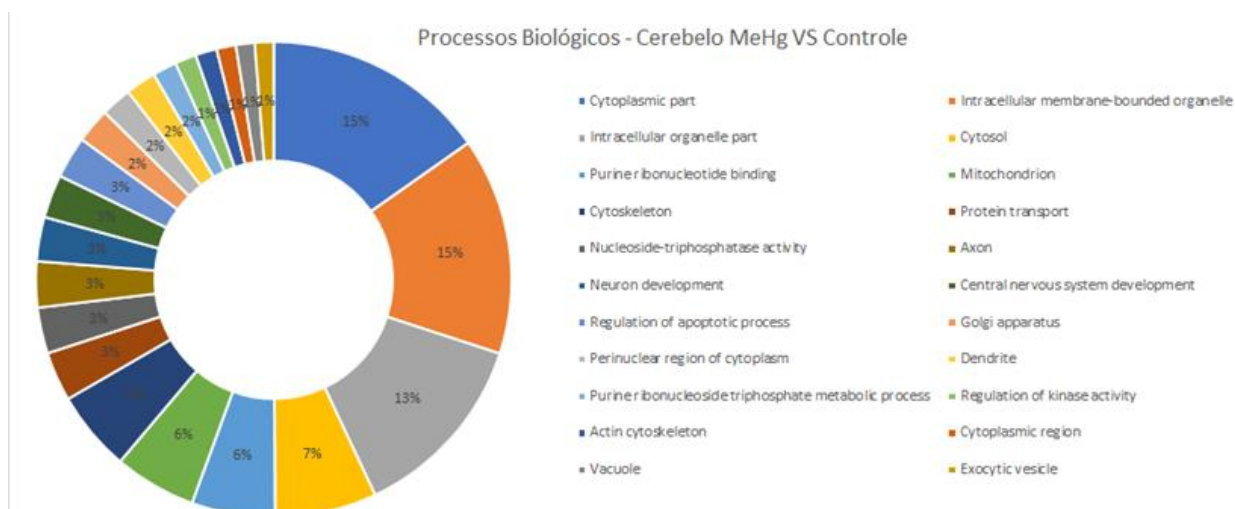


Figura 10 - Distribuição funcional de proteínas identificadas com diferença de expressão no cerebelo de ratos adultos entre o grupo MeHg e o grupo controle. Categoria de proteínas baseado na ontologia genética de processos biológicos, função molecular e componentes celulares. Significancia (Kappa = 0,4) e distribuição de acordo com a porcentagem de genes associados. O número de acesso das proteínas provém do UNIPROT. A ontologia dos genes foi avaliada de acordo com o aplicativo ClueGo® pertencente ao software Cytoscape® 3.4.

4.4.4. Redes de interações proteicas

Uma das redes de interação do cerebelo (figura 11) apresentou como proteína central uma quinase (*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha*; **P11275**), que está ligada a sinapses excitatórias essa proteína estava superexpressa no grupo MeHg, essa proteína interage com proteínas de receptores de NMDA (*Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2B*, **Q00960**; *Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2A*, **Q00959**), além disso proteínas de receptores glutamatérgicos em células de Purkinje foram encontradas unicamente no grupo MeHg (*Glutamate receptor ionotropic, delta-2*, **Q63226**), uma subexpressão de proteína fibrilar glial tbm foi encontrada (*Glial fibrillary acidic protein*, **P47819**)

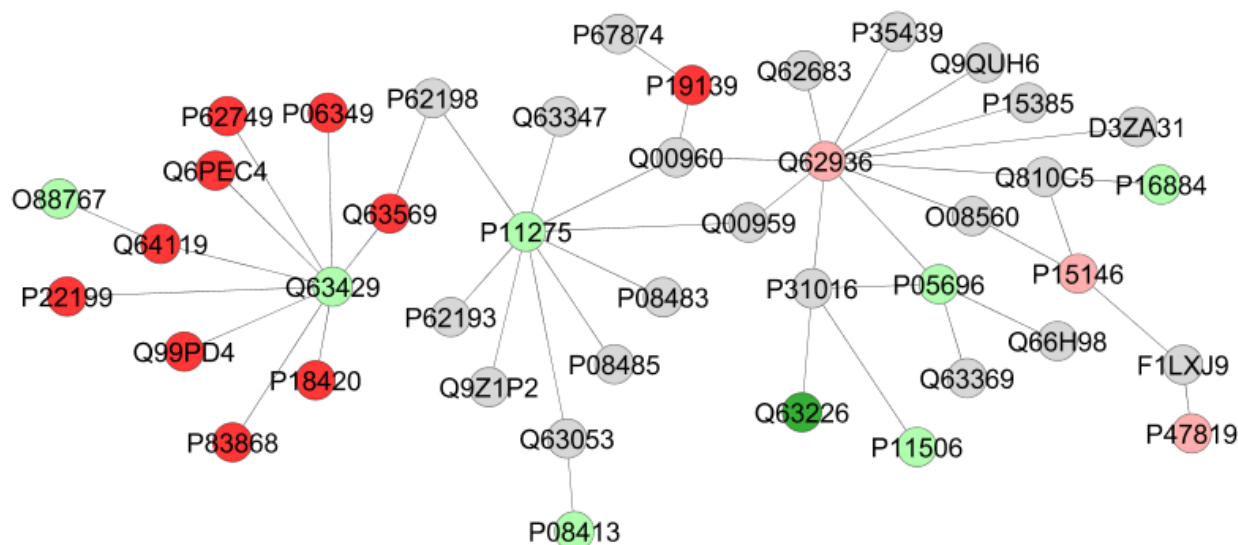


Figura 11 – Rede de interação criada no aplicativo ClusterMarker, mostrando interações nas proteínas identificadas no cerebelo de ratos adultos com diferente expressão do grupo MeHg e o grupo controle. A coloração dos nós indicam a diferença entre a expressão das proteínas identificadas pelo número de acesso. Vermelho e verde escuro indicam proteínas encontradas apenas no grupo controle e no MeHg respectivamente, o verde claro e a rosa indicam proteínas super e subexpressas respectivamente. Os nós cinzas representam proteínas que não foram identificadas em ambos os grupos porém interagem com a rede. (VERMELHO: *Hippocalcin-like protein 1* **P62749**; *Histone H1t* **P06349**; *S-phase kinase-associated protein 1* **Q6PEC4**; *26S proteasome regulatory subunit 6A* **Q63569**; *Myosin light polypeptide 6* **Q64119**; *Mineralocorticoid receptor* **P22199**; *Actin-related protein 2/3 complex subunit 1A* **Q99PD4**; *Proteasome subunit alpha type-1* **P18420**; *Prostaglandin E synthase 3* **P83868**; *Casein kinase II subunit alpha* **P19139**; VERDE: *Glutamate receptor ionotropic, delta-2* **Q63226**; VERDE CLARO: *Protein/nucleic acid deglycase DJ-1* **O88767**; *Polyubiquitin-C* **Q63429**; *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha* **P11275**; *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit beta* **P08413**; *Plasma membrane calcium-transporting ATPase 2* **P11506**; *Protein kinase C alpha type* **P05696**; *Neurofilament heavy polypeptide* **P16884**; ROSA: *Disks large homolog 3* **Q62936**; *Microtubule-associated protein 2* **P15146**; *Glial fibrillary acidic protein* **P47819**; CINZA: *26S proteasome regulatory subunit 8* **P62198**; *26S proteasome regulatory subunit 7* **Q63347**; *26S proteasome regulatory subunit 4* **P62193**; *Alpha-actinin-1* **Q9Z1P2**; *Activity-regulated cytoskeleton-associated protein* **Q63053**; *Muscarinic acetylcholine receptor M4* **P08485**; *Muscarinic acetylcholine receptor M3* **P08483**; *Casein kinase II subunit beta* **P67874**; *Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2B* **Q00960**; *Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2A* **Q00959**; *Disks large homolog 4* **P31016**; *Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit* **Q63369**; *Caveolae-associated protein 2* **Q66H98**; *Protein tyrosine phosphatase, receptor type, T* **F1LXJ9**; *Diacylglycerol kinase zeta* **O08560**; *Diacylglycerol kinase* **Q810C5**; *Myotubularin related protein 2 (Predicted), isoform CRA_b* **D3ZA31**; *Potassium voltage-gated channel subfamily A member 4* **P15385**; *Ras/Rap GTPase-activating protein SynGAP* **Q9QUH6**; *Glutamate receptor ionotropic, NMDA 1* **P35439**; *NMDAR1 glutamate receptor subunit* **Q62683**).

A segunda rede (figura 12) apresenta como proteína central uma proteína de microtúbulo relacionada com o transporte vesicular (*Dynamin-1*, **P21575**), apresentando interação com proteína reguladora de sinapses excitatórias (*Amphiphysin*, **O08838**) e outra proteína de microtúbulo (*Dynamin-2*, **P39052**).

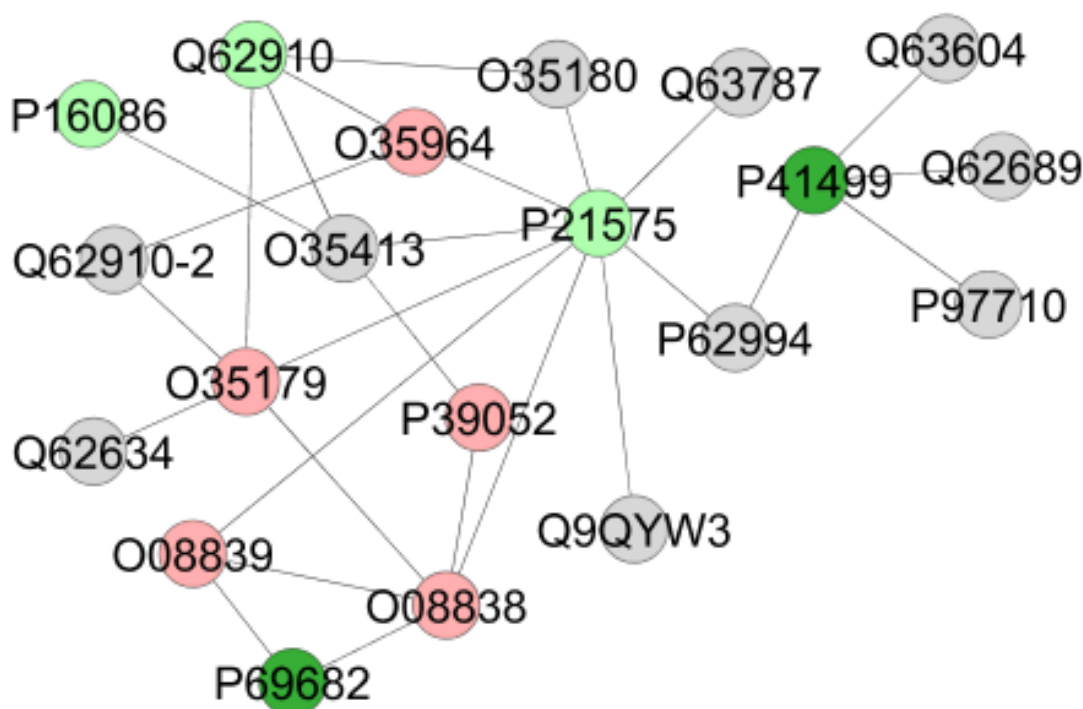


Figura 12 - Rede de interação criada no aplicativo ClusterMarker, mostrando a interação nas proteínas identificadas no cerebelo de ratos adultos com diferente expressão do grupo MeHg e o grupo controle. A coloração dos nós indicam a diferença entre a expressão das proteínas identificadas pelo número de acesso. Vermelho e verde escuro indicam proteínas encontradas apenas no grupo controle e no MeHg respectivamente, o verde claro e a rosa indicam proteínas super e subexpressas respectivamente. Os nós cinzas representam proteínas que não foram identificadas em ambos os grupos porém interagem com a rede. (**VERDE CLARO:** Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1 **P16086**; Synaptotagmin-1 **Q62910**; *Dynamin-1* **P21575**; **VERDE ESCURO** Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11 **P41499**; Adaptin ear-binding coat-associated protein 1 **P69682**; **ROSA:** Endophilin-A2 **O35964**; Endophilin-A1 **O35179**; *Dynamin-2* **P39052**; Myc box-dependent-interacting protein 1 **O08839**; Amphiphysin **O08838**; **CINZA:** **Q62910-2**; Sorbin and SH3 domain-containing protein 2 **O35413**; Vesicular glutamate transporter 1 **Q62634**; MOB-like protein phocein **Q9QYW3**; Endophilin-A3 **O35180**; Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha **Q63787**; Growth factor receptor-bound protein 2 **P62994**; BDNF/NT-3 growth factors receptor **Q63604**; Tyrosine-protein kinase JAK2 **Q62689**; Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type substrate 1 **P97710**).

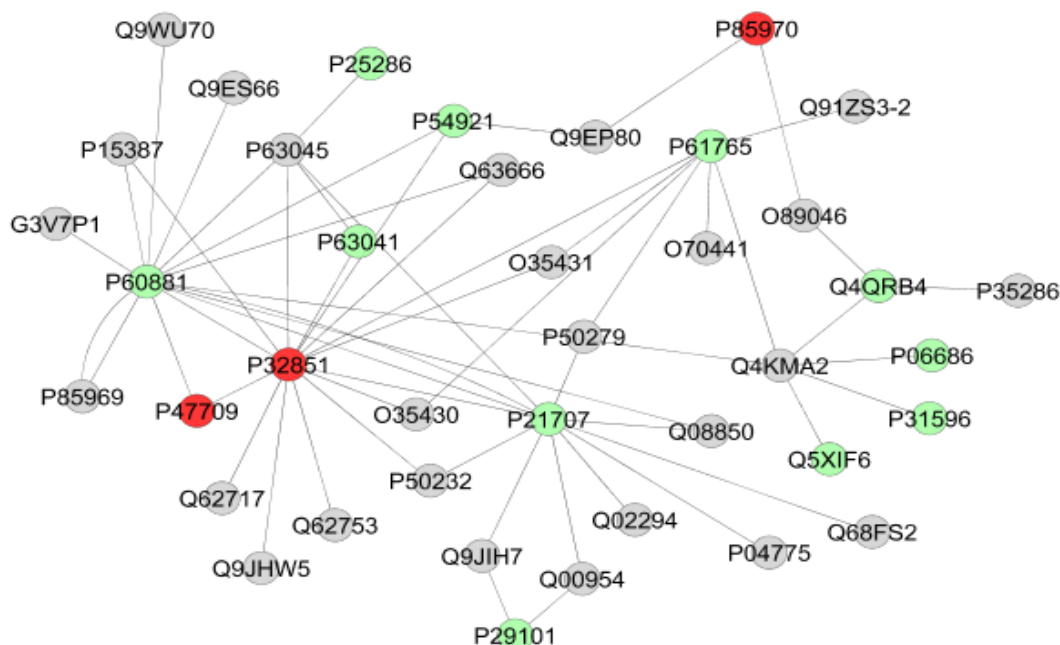


Figura 13 - Rede de interação criada no aplicativo ClusterMarker, mostrando a interação nas proteínas identificadas no cerebelo de ratos adultos com diferente expressão do grupo MeHg e o grupo controle. A coloração dos nós indicam a diferença entre a expressão das proteínas identificadas pelo número de acesso. Vermelho e verde escuro indicam proteínas encontradas apenas no grupo controle e no MeHg respectivamente, o verde claro e a rosa indicam proteínas super e subexpressas respectivamente. Os nós cinzas representam proteínas que não foram identificadas em ambos os grupos, porém interagem com a rede. (Vermelho: *Actin-related protein 2/3 complex subunit 2* **P85970**; *Syntaxin-1A* **P32851**; *Rabphilin-3A* **P47709**; VERDE CLARO: *V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1* **P25286**; *Alpha-soluble NSF attachment protein* **P54921**; *Synaptosomal-associated protein 25* **P60881**; *Complexin-1* **P63041**; *Syntaxin-binding protein 1* **P61765**; *Tubulin beta-3 chain* **Q4QRB4**; *Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2* **P06686**; *Excitatory amino acid transporter 2* **P31596**; *Tubulin alpha-4A chain* **Q5XIF6**; *Synaptotagmin-1* **P21707**; *Synaptotagmin-2* **P29101**; CINZA *Syntaxin-binding protein 5* **Q9WU70**; *Potassium voltage-gated channel subfamily B member 1* **P15387**; *Syntaxin-12* **G3V7P1**; *Calpain-10* **Q9ES66**; *Vesicle-associated membrane protein 2* **P63045**; *Beta-soluble NSF attachment protein* **P85969**; *Vesicle-associated membrane protein 1* **Q63666**; *PRKCA-binding protein* **Q9EP80**; *Amyloid-beta A4 precursor protein-binding family A member 2* **O35431**; *Syntaxin-2* **P50279**; *Synapsin-3* **O70441**; *Coronin-1B* **O89046**; *45 kDa calcium-binding protein* **Q91ZS3-2**; *Ras-related protein Rab-13* **P35286**; *UV excision repair protein RAD23 homolog B* **Q4KMA2**; *Syntaxin-4* **Q08850**; *COP9 signalosome complex subunit 4* **Q68FS2**; *Sodium channel protein type 2 subunit alpha* **P04775**; *Voltage-dependent N-type calcium channel subunit alpha-1B* **Q02294**; *Sodium channel subunit beta-1* **Q00954**; *Serine/threonine-protein kinase WNK1* **Q9JIH7**; *Amyloid-beta A4 precursor protein-binding family A member 1* **O35430**; *Synaptotagmin-4* **P50232**; *Syntaxin-binding protein 2* **Q62753**; *Vesicle-associated membrane protein 7* **Q9JHW5**; *Calcium-dependent secretion activator 1* **Q62717**).

4.5. Avaliação tecidual

4.5.1. Avaliação da densidade neuronal

A análise comparativa entre os grupos estudados indicou uma redução na população de neurônios de Purkinje na coloração em HE dos animais expostos ao MeHg ($5,833 \pm 0,3157$, $p < 0,0001$) em relação ao grupo controle ($9,267 \pm 0,5561$).

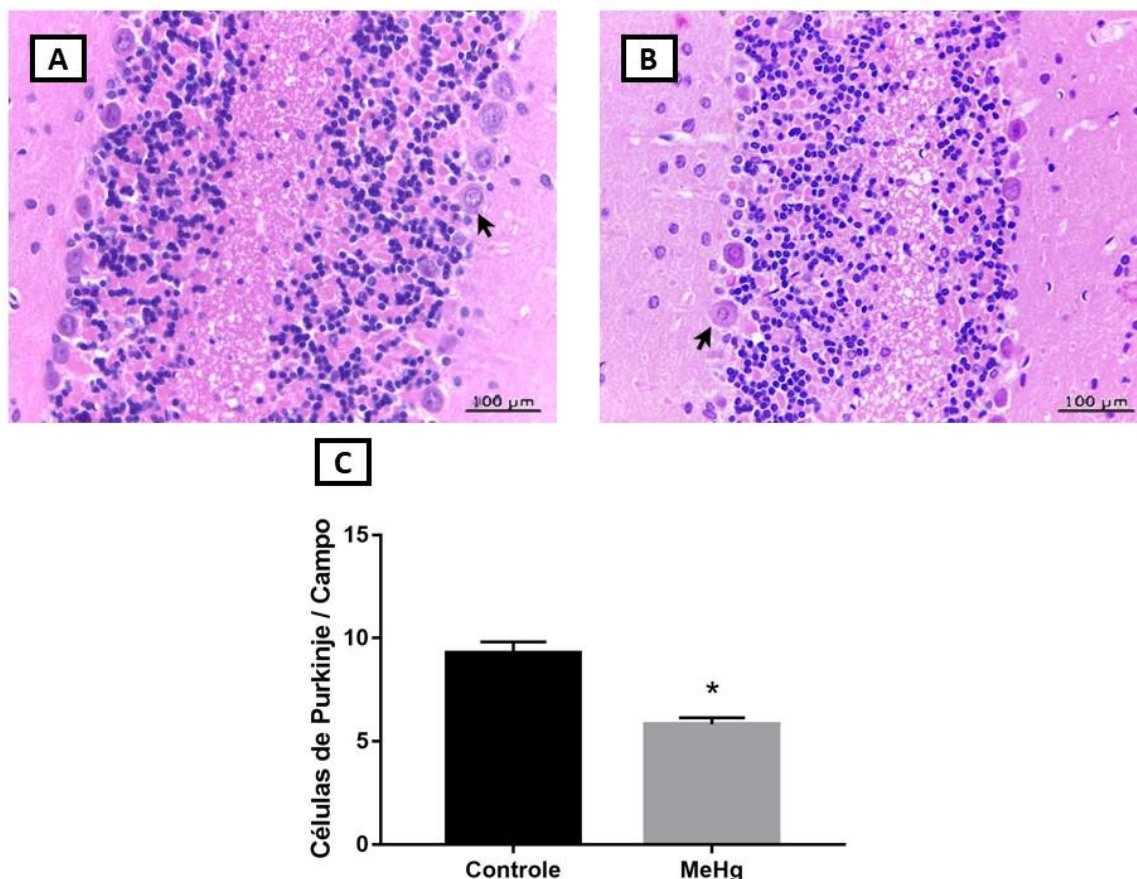


Figura 14 - Efeitos da exposição crônica ao MeHg (40 µg / kg / dia), durante 60 dias, em células de Purkinje no cerebelo de ratos Wistar. Fotomicrografia em A representa grupo controle e em B grupo exposto ao MeHg (n = 5 animais por grupo). Em C gráfico representando análise quantitativa de células de Purkinje em grupos controle e MeHg, setas apontando para células de Purkinje. Resultados expressos com média $\pm$ erro padrão. * $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle (Teste t de student). Escala = 100 µm.

A análise comparativa entre os grupos estudados indicou uma redução na população de células NeuN positivas dos animais expostos ao MeHg ($47,26 \pm 2,096$) em relação ao grupo controle ($56,93 \pm 2,992$, $p= 0,0142$).

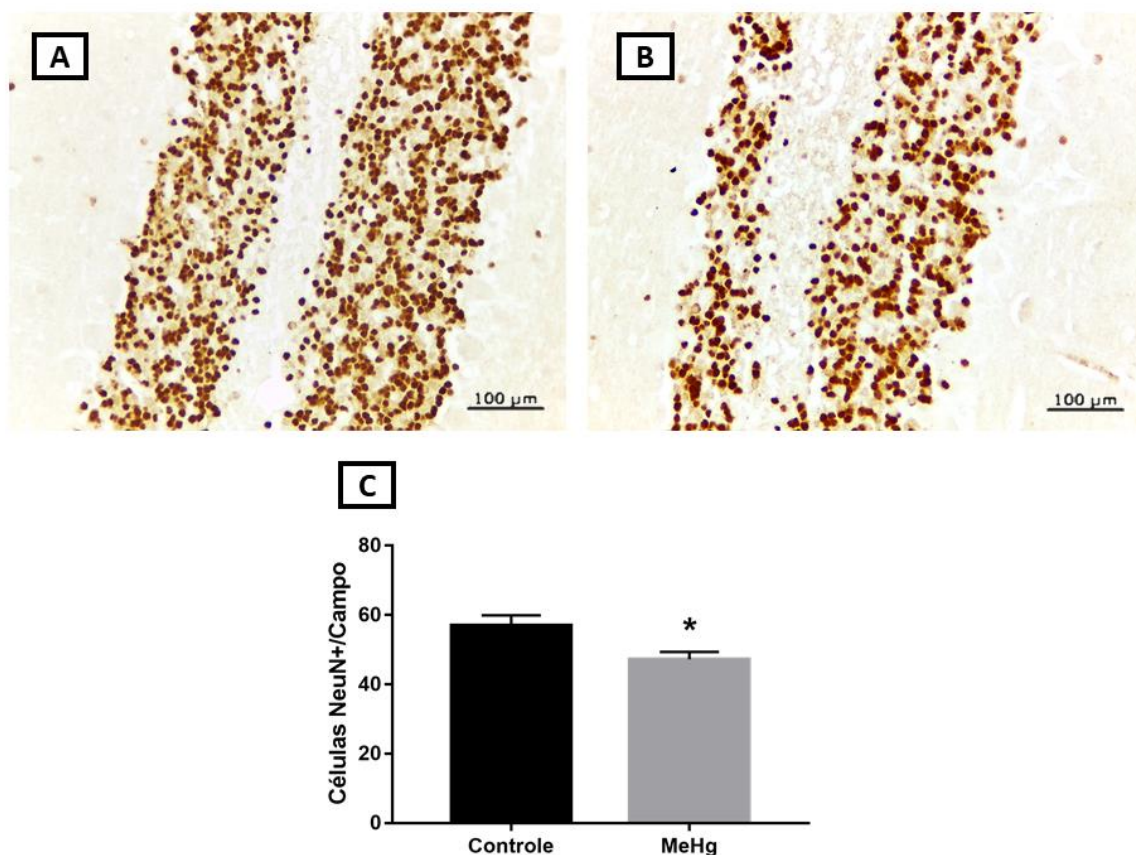


Figura 15 - Efeitos da exposição crônica ao MeHg (40 µg / kg / dia), durante 60 dias, em células positivas para NeuN em cerebelo de ratos Wistar. Fotomicrografia em A representa grupo controle e em B grupo exposto ao MeHg (n = 5 animais por grupo). Em C gráfico representando análise quantitativa de células NeuN+ em grupos controle e MeHg. Resultados expressos com média ± erro padrão. * $p= 0,0142$ comparado ao grupo controle (Teste t de student). Escala = 100 µm.

4.5.2. Avaliação da resposta microglial e astrocitária

A exposição MeHg induziu aumento na população de micróglia no grupo exposto ($0,7925 \pm 0,09023$, $p < 0,0001$) ao metal pesado, quando comparado ao grupo controle ($0,2577 \pm 0,05356$), como analisado a partir da contagem de células IBA1+ em camada granular. Em adição, observamos apresentou aumento dessa população celular na camada molecular ($3,213 \pm 0,5081$, $p = 0,0021$) quando comparada com o grupo controle ($1,437 \pm 0,1574$).

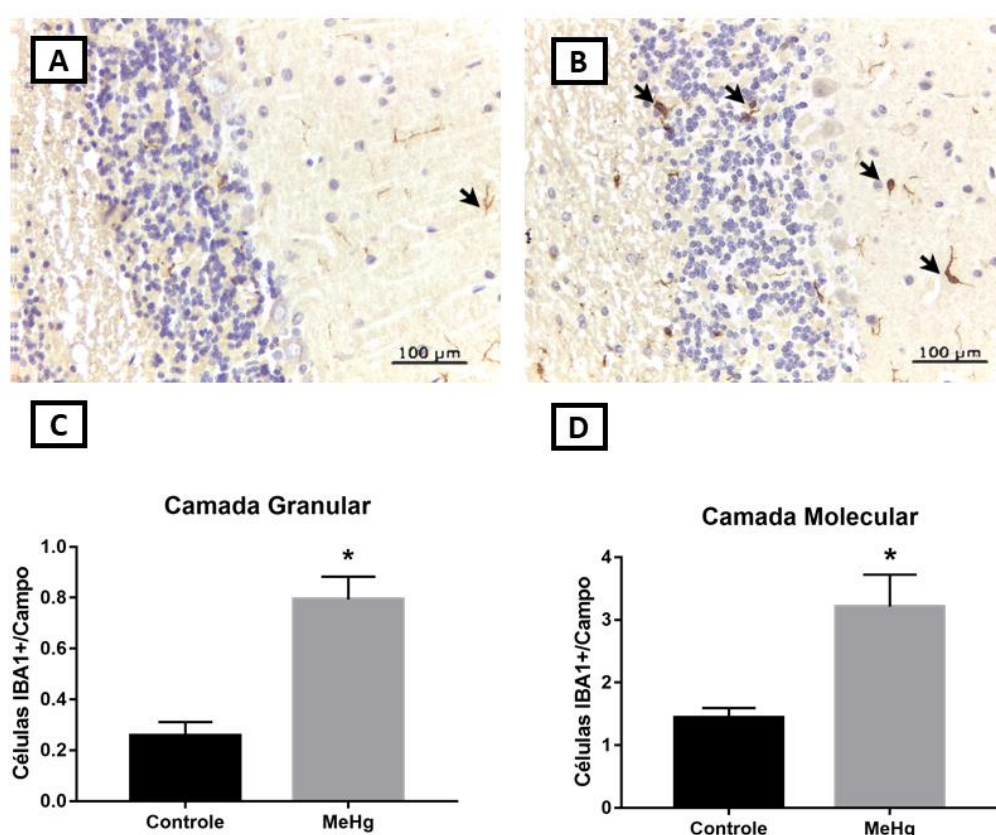


Figura 16 - Efeitos da exposição crônica ao MeHg (40 µg / kg / dia), durante 60 dias, em células positivas para IBA1 em cerebello de ratos Wistar. Fotomicrografia em A representa grupo controle e em B grupo exposto ao MeHg (n = 5 animais por grupo). Em C a quantidade de células positivas para IBA-1 na camada granular, enquanto D apresenta imunoexpressão de IBA1 na camada molecular, ambas em grupo controle e MeHg, setas apontando para células IBA1+ Resultados expressos com média ± erro padrão. *p > 0,05 comparado ao grupo controle (Teste t de student). Escala = 100 µm. Setas representando as imunomarcações.

Após a exposição crônica MeHg, observou-se redução na fração de área ocupada por células GFAP positivas no cerebello dos animais expostos ($15,25 \pm 1,404$, $p = 0,0190$) em relação aos animais não expostos ($22,35 \pm 1,836$).

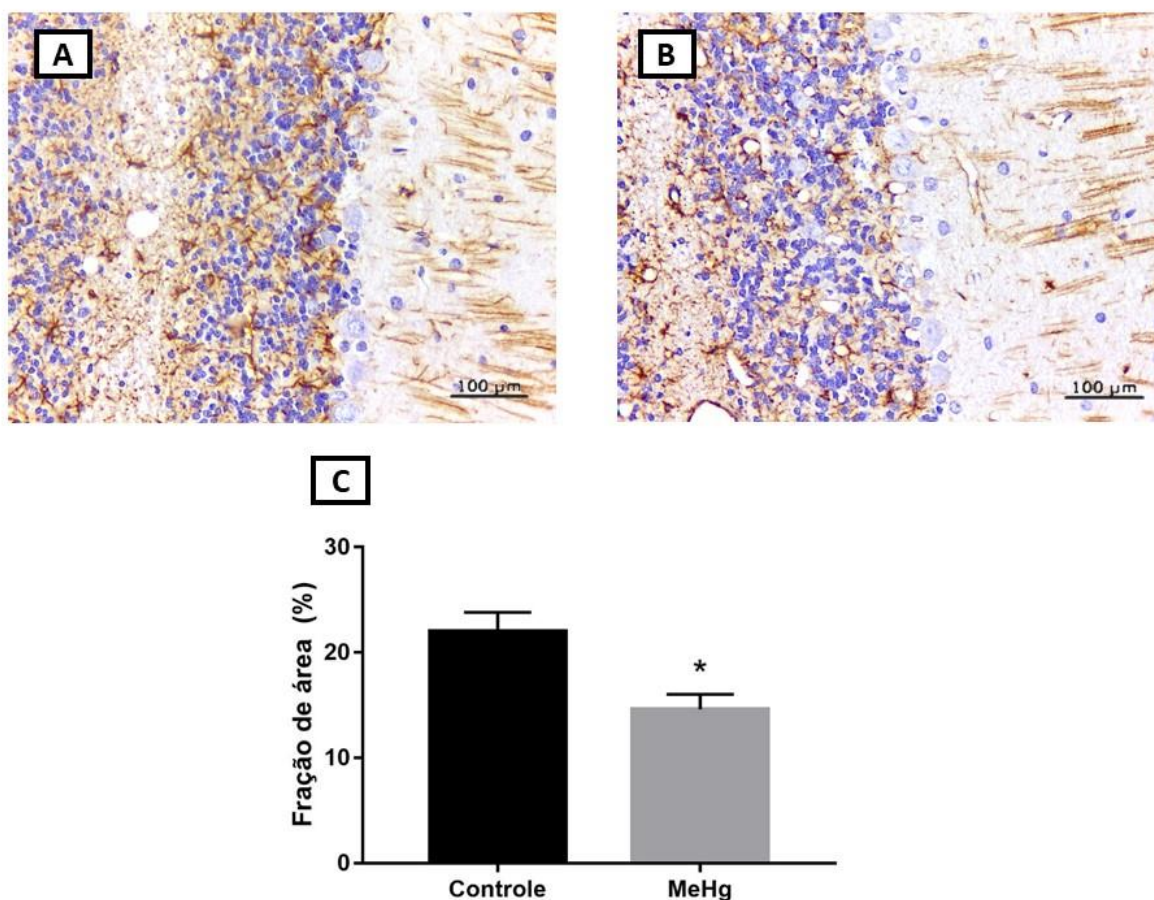


Figura 17 - Efeitos da exposição crônica ao MeHg (40 μg / kg / dia), durante 60 dias, em células positivas para GFAP em cerebelo de ratos Wistar. Fotomicrografia em A representa grupo controle e em B grupo exposto ao MeHg (n = 5 animais por grupo). Em C a fração de área marcada por GFAP em grupos controle e MeHg. Resultados expressos com média $\pm$ erro padrão. *p= 0,0190 comparado ao grupo controle (Teste de Mann-Whitney). Escala = 100 μm .

4.5.3 Avaliação da organização da bainha de mielina e comunicação sináptica

Ao avaliar a expressão de proteínas e vesículas sinápticas no cerebelo de ratos, observou-se que o MeHg foi capaz de diminuir a expressão de MBP nos animais expostos ($15,5 \pm 2,344$, $p=0,0350$). Entretanto que houve aumento da expressão de sinaptofisina ($23,97 \pm 2,033$ $p=0,0046$) no grupo exposto.

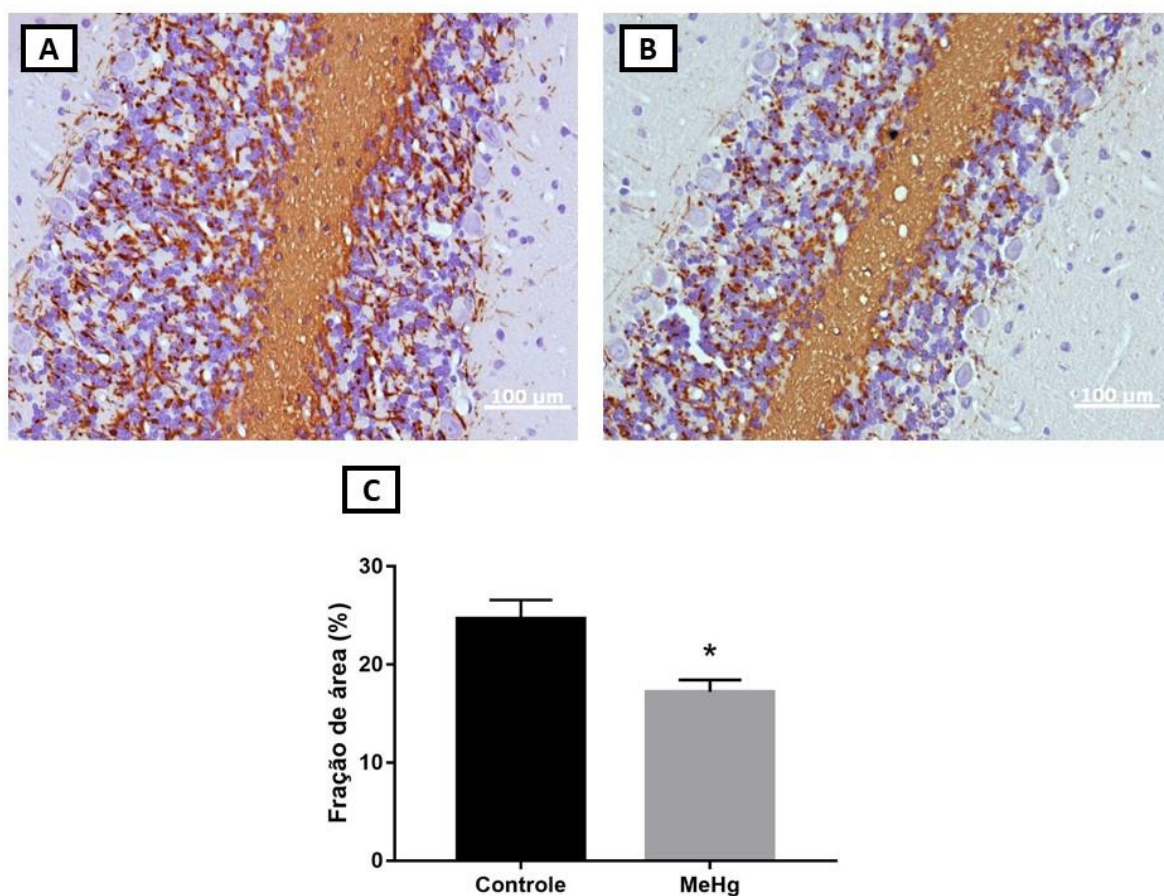


Figura 18 - Efeitos da exposição crônica ao MeHg (40 µg / kg / dia), durante 60 dias, na imunomarcção de Proteína Básica de Mielina (MBP) em cerebelo de ratos Wistar. Fotomicrografia em A representa grupo controle e em B grupo exposto ao MeHg (n = 5 animais por grupo). Em C a fração de área marcada por MBP em grupos controle e MeHg. Resultados expressos com média $\pm$ erro padrão. *p= 0.0046 comparado ao grupo controle (Teste de Mann-Whitney). Escala = 100 µm.

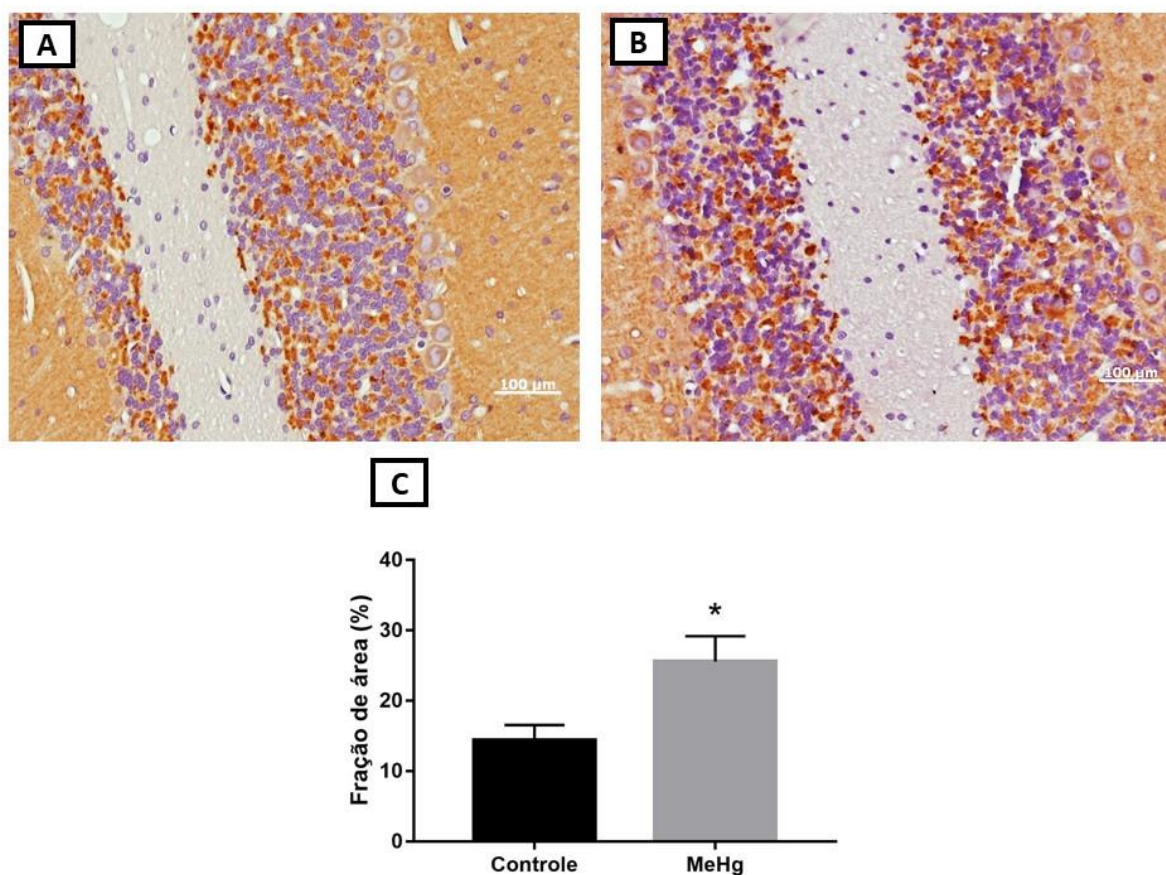


Figura 19 - Efeitos da exposição crônica ao MeHg ($40 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{dia}$), durante 60 dias, em vesículas positivas para Sinaptofisina em cerebelo de ratos Wistar. Fotomicrografia em A representa grupo controle e em B grupo exposto ao MeHg ($n = 5$ animais por grupo). Em C a fração de área marcada por Sinaptofisina em grupos controle e MeHg. Resultados expressos com média $\pm$ erro padrão. * $p = 0,0350$ comparado ao grupo controle (Teste de Mann-Whitney). Escala = $100 \mu\text{m}$.

DISCUSSÃO

Os resultados dessa investigação mostram que o MeHg pode depositar-se no cerebelo e causar danos ao perfil bioquímico, proteômico, tecidual e comportamental de ratos adultos, em um período de exposição subcrônica. A partir do modelo proposto, constatamos um depósito de Hg na estrutura cerebelar, bem como um possível dano na membrana celular por níveis elevados de LPO; geração de ERN's devido ao estresse oxidativo; e baixa capacidade antioxidante contra radicais peroxil. Além disso, evidenciamos que esse desequilíbrio na bioquímica oxidativa e, consequente, modulação do perfil proteômico, principalmente de proteínas sinápticas, podem desencadear alterações teciduais e comportamentais.

O presente estudo utilizou um modelo de exposição ao MeHg de longo prazo e de baixa dose diferindo de modelos já estabelecidos na literatura que demonstraram que exposições de curto prazo, porém com doses maiores as quais são capazes de promover danos em SNC de animais experimentais (LIU et al., 2014; BELLUM et al., 2013; LEE et al., 2012). A quantidade de mercúrio a qual os animais deste trabalho foram expostos, pode ser, se revertida para o consumo humano, próxima à ingerida pelas comunidades ribeirinhas da região amazônica, sendo que tal volume exposição pode representar riscos severos à saúde desta população (MARTÍN-DOIMEADIOS et al., 2014; KHOURY et al., 2015).

Estudos têm apontado que a exposição ao MeHg causa danos em diversos em diversas áreas do SNC, que perpassam pelo sistema nervo periférico (CAO et al., 2013) e terminam no SNC, conforme visto neste trabalho. Estudos mostraram que o mercúrio é capaz de promover danos em áreas de memória, por exemplo o hipocampo (LI et al., 2005), de planejamento motor como o córtex pre-frontal (GUIDA et al., 2016) e execução do movimento, o córtex motor (TEIXEIRA et al., 2018). Neste trabalho decidimos avaliar o cerebelo por representar uma das principais regiões do desempenho motor (VALENZUELA et al., 2015; VALENZUELA et al., 2010)

Modelos experimentais com doses baixas e tendo o cerebelo como principal elemento a ser estudado são escassos e, para além disso, este órgão pode representar um importante alvo de compostos, nos quais contém produtos tóxicos (Fonnum, 2000). O que nos impulsionou a investigar essa área foi sua relevância funcional, por esta receber impulsos de várias regiões cerebrais envolvidas na atividade motora, como o córtex motor e a medula espinhal, sendo a responsável pela

coordenação e correção dos movimentos executados (KOZIOL et al., 2014; HIBI e SHIMIZU, 2012). Em consequência da importância de suas funções, o cerebelo torna-se uma área de interesse a ser analisada para a investigação de danos motores.

O MeHg é um neurotóxico estudado extensivamente em humanos e animais (KREY, KWAN e CHAN, 2014; HONG, KIM e LEE, 2012; MAILLOUX, YUMVIHOZE e CHAN, 2015). Os seres humanos podem ser expostos ao MeHg principalmente por meio da ingestão de alimentos de origem aquática, por exemplo: peixes e mariscos contaminados (MARTÍN-DOIMEADIOS et al., 2014; SANTOS et al., 2000). Após a absorção pelo trato digestivo, o MeHg pode ultrapassar a barreira hematoencefálica e, devido sua longa meia-vida no corpo humano, pode se depositar nos tecidos do SNC e os danos tendem a ocorrer com maior intensidade no cerebelo (FUJIMURA et al., 2016; SYVERSEN e KAUR, 2012; FONNUM e LOCK, 2000). Esse evento pode ser encontrado em nosso estudo onde comprovamos a deposição de Hg no tecido cerebelar (Figura 4) quando comparado ao grupo controle, configurando a premissa de que a exposição subcrônica ao MeHG desencadeia danos variados ao cerebelo, tendo como consequência prejuízo em suas funções.

Baseado nisso, como consequência desse depósito, na avaliação da capacidade motora dos animais, realizadas por meio dos testes *Open Field* e *Rotaroad*, foi observada uma menor exploração dos animais expostos, tanto na distância percorrida como uma diminuição no número de rearings. Estes resultados estão de acordo com os encontrados em outro estudo que demonstrou que o MeHG está associado a déficits motores e animais machos e fêmeas (BELLUM et al., 2012).

No Rotarod também foi encontrado déficit motor, no qual os animais expostos ao MeHg apresentaram um maior número de quedas em comparação ao grupo controle, principalmente em velocidades mais altas no aparelho, indicando alterações na coordenação motora fina e equilíbrio. Nossos dados são confirmados na literatura, pois alguns estudos já demonstram déficit nas avaliações de funções motoras em intoxicações mercuriais, as quais estão associadas a efeitos neurotóxicos à nível celular (TEIXEIRA et al., 2014; BIAMONTE et al., 2014; FRANCO et al., 2006).

Como consequência desses efeitos, a homeostase é prejudicada, promovendo alterações bioquímicas celulares. (FRANCO et al., 2006; CARVALHO et al, 2008). A nível celular, o estresse oxidativo é um dos mecanismos de toxicidade do MeHg. Esse processo caracteriza-se pelo desequilíbrio oxi-redutivo, com aumento das ERO's, gerando desequilíbrio do sistema antioxidante enzimático, podendo causar danos às

proteínas, lipídios, podendo chegar ao DNA. (FARINA et al., 2010), conforme visto nesta investigação, pois este modelo de exposição foi capaz de alterar a expressão de proteínas envolvidas em várias funções biológicas, que possivelmente está envolvido com o estresse oxidativo causado pela exposição ao mercúrio, pois sabe-se que o tal estresse pode promover alteração do proteoma (REICHMANN et al., 2018). O mecanismo de dano ao cerebelo ainda não é completamente elucidado, contudo Syversen e Kaur (2012) sugerem que o maior dano aos neurônios da camada granular no cerebelo está ligado ao tamanho diminuto dessas células e, por conta disso, possuem menos citoplasma, sendo assim uma pequena dose de MeHg já é capaz de provocar alterações nestas células e, conseqüentemente no órgão, desencadeadas principalmente por estresse oxidativo. Nossos dados ratificam essa teoria, pois em nossas análises da bioquímica oxidativa do cerebelo foi encontrado um aumento da peroxidação lipídica e dos níveis de nitrito, marcadores de estresse oxidativo já utilizados nos estudos do nosso grupo (TEIXEIRA et al., 2014; ARAGÃO et al., 2018). As alterações oxidativas, como aumento da peroxidação lipídica, dos níveis de ERO's e ERN's; e diminuição da capacidade antioxidante, são achados frequentes durante a intoxicação do MeHg, ratificando que a intoxicação a este metal induz o estresse oxidativo (FUJIMURA e USUKI, 2018).

Neste estudo, também foi demonstrado os efeitos oxidativos induzidos pelo MeHg na concentração 0,04 mg/Kg/dia. A exposição foi capaz de aumentar os níveis de MDA, pois já foi demonstrado que o MeHg possui forte relação com os grupos sulfidrilas de diversas proteínas, sendo tal grupo presente nas reações de oxirredução que levam à danos na membrana (USUKI e FUJIMURA, 2016; FRANCO et al., 2006). Os elevados níveis de nitritos apresentados corroboram outros trabalhos que demonstraram que altas concentrações de metabólitos do óxido nítrico, causam danos à proteínas, aumentam indicadores de ansiedade e depressão em comportamento animal e inibem a cadeia de transporte mitocondrial, levando a insuficiência energética da célula (CHEN, 2015; KUMAR, 2017).

O estresse oxidativo é possivelmente um dos principais eventos geradores de danos às células provocado pela exposição ao MeHg (CRESPO-LÓPEZ et al., 2009), assim como a excitotoxicidade (DENG et al., 2014). Em nossa análise do perfil proteômico foi encontrada um aumento na expressão de proteínas ligadas com essa via de dano, assim como foi encontrada alterações em proteínas ligadas com a

comunicação sináptica, *Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1*, *Dynamin-1* que estão envolvidas na liberação de vesículas sinápticas.

A exposição ao MeHg resultou em uma subexpressão 115 proteínas e uma superexpressão de 358 proteínas no cerebelo. Entre todas as funções de transporte iônico, a transmissão sináptica foi a função mais afetada, dado que é similar à observação no cerebelo de ratos expostos a MeHg (RADONJIC *et al.*, 2013).

A sinapse mais alterada pela exposição ao MeHg foram as sinapses excitatórias, proteínas como a *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha* que está ligada a sinapses excitatórias teve sua expressão aumentada no grupo MeHg. Além disso, proteínas de receptores glutamatérgicos em células de Purkinje foram encontradas unicamente no grupo MeHg (*Glutamate receptor ionotropic, delta-2*), reforçando a excitotoxicidade como um dos mecanismos de morte celular, principalmente em neurônios de Purkinje. Foi achado uma subexpressão da proteína *Glial fibrillary acidic* (GFAP) protein, o que também foi demonstrada em nossas imunomarcações, nas quais uma diminuição na fração de área para GFAP foi mostrada, sugerindo uma diminuição da atividade astrocitária no tecido cerebelar.

Algumas proteínas associadas com a transmissão sináptica como: *Plasma membrane calcium-transporting ATPase 2*, *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha* e *Synaptophysin*, já foram anteriormente relacionadas com a toxicidade do mercúrio (FUJIMURA *et al.*, 2012;

HUYCK *et al.*, 2014; REDDY *et al.*, 1988; YOSHIDA *et al.*, 2011). A identificação de termos de componentes celulares enriquecidos de sinapse excitatória e membrana sináptica também sugeriu que o MeHg impacta a neurotransmissão por proteínas disruptivas na sinapse excitatória e na membrana sináptica. Esses resultados são consistentes com os estudos anteriores de que o desequilíbrio do aminoácido excitatório glutamato nos neurônios foi um dos mecanismos mais importantes na exposição ao MeHg (FARINA *et al.*, 2011; YIN *et al.*, 2009).

A neurotoxicidade do MeHg sobre as células neuronais pode ser comprovada em nossos resultados imunohistoquímicos que revelaram uma diminuição da população de neurônios de Purkinje na camada granular nos animais expostos ao MeHg e diminuição da atividade astrocitária. Alguns estudos relatam uma redução significativa no número de neurônios após exposição ao MeHg (CARVALHO *et al.*, 2008; FALLUEL-MOREL *et al.*, 2007), possivelmente em consequência de processos de morte celular (WATANABE *et al.*, 2013; CECCATELLI *et al.*, 2010; SOKOLOWSKI

et al., 2013), desencadeadas por diferentes vias celulares que envolvem a toxicidade direta do metal e o estresse oxidativo (FARINA et al., 2010).

A capacidade de ligação do Hg aos grupos -SH presentes em várias proteínas celulares confere alto poder tóxico ao MeHg por promover alteração funcional de proteínas essenciais para a homeostase das células neuronais (FARINA, ASCHNER E ROCHA, 2011; GLASER et al., 2010).

Além desse dado, nosso estudo constatou um aumento na população microglial por meio da presença de células IBA1 positivas na camada granular e molecular do cerebelo, diminuição de vesículas sinápticas e uma menor marcação de proteína básica de mielina (MBP) sugerindo problemas na comunicação sináptica desses animais.

CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que a exposição crônica ao MeHg em baixas doses é capaz de gerar alterações significativas no cerebelo prejudicando a função motora dos animais por meio de danos teciduais desencadeados por alterações no perfil proteico e estresse oxidativo.

Esses danos ocorreram devido a uma perda do balanço oxidativo desencadeada pelo MeHg além de danos desencadeados por excitotoxicidade

ade, esses danos são corroborados pelas alterações no perfil proteômico desses animais onde proteínas relacionadas com esses parâmetros de danos foram encontradas. Nossos dados comprovam que o MeHg consegue gerar danos, mesmo em baixas doses, no cerebelo de ratos adultos evidenciando que a barreira hematoencefálica não é capaz de gerar proteção suficiente contra o aumento dos níveis do MeHg no tecido cerebelar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMADO, L. L., ET AL. (2009). "A METHOD TO MEASURE TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY AGAINST PEROXYL RADICALS IN AQUATIC ORGANISMS: APPLICATION TO EVALUATE MICROCYSTINS TOXICITY." **SCI TOTAL ENVIRON** 407(6): 2115-2123.

ANDRISIC, L., ET AL. (2018). "SHORT OVERVIEW ON METABOLOMICS APPROACH TO STUDY PATHOPHYSIOLOGY OF OXIDATIVE STRESS IN CANCER." **REDOX BIOL** 14: 47-58.

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

BAKIR, F., ET AL. (1973). "METHYLMERCURY POISONING IN IRAQ." **SCIENCE** 181(4096): 230-241.

BELLUM, S., ET AL. (2013). "THE EFFECT OF METHYLMERCURY EXPOSURE ON BEHAVIOR AND CEREBELLAR GRANULE CELL PHYSIOLOGY IN AGED MICE." **J APPL TOXICOL** 33(9): 959-969.

BERNHOF, R. A. (2012). "MERCURY TOXICITY AND TREATMENT: A REVIEW OF THE LITERATURE." **J ENVIRON PUBLIC HEALTH** 2012: 460508.

BIAMONTE, F., ET AL. (2014). "ASSOCIATIONS AMONG EXPOSURE TO METHYLMERCURY, REDUCED REELIN EXPRESSION, AND GENDER IN THE CEREBELLUM OF DEVELOPING MICE." **NEUROTOXICOLOGY** 45: 67-80.

BJORKLUND, G., ET AL. (2017). "THE TOXICOLOGY OF MERCURY: CURRENT RESEARCH AND EMERGING TRENDS." **ENVIRON RES** 159: 545-554.

BOOTH, S. AND D. ZELLER (2005). "MERCURY, FOOD WEBS, AND MARINE MAMMALS: IMPLICATIONS OF DIET AND CLIMATE CHANGE FOR HUMAN HEALTH." **ENVIRON HEALTH PERSPECT** 113(5): 521-526.

BRADFORD, M. M. (1976). "A RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR THE QUANTITATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING THE PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING." **ANAL BIOCHEM** 72: 248-254.

BUGALHO, P., ET AL. (2006). "[ROLE OF THE CEREBELLUM IN COGNITIVE AND BEHAVIOURAL CONTROL: SCIENTIFIC BASIS AND INVESTIGATION MODELS]." **ACTA MED PORT** 19(3): 257-267.

CARVALHO, C. M., ET AL. (2008). "INHIBITION OF THE HUMAN THIOREDOXIN SYSTEM. A MOLECULAR MECHANISM OF MERCURY TOXICITY." **J BIOL CHEM** 283(18): 11913-11923.

CASTOLDI, A. F., ET AL. (2001). "NEUROTOXICITY AND MOLECULAR EFFECTS OF METHYLMERCURY." **BRAIN RES BULL** 55(2): 197-203.

CECCATELLI, S., ET AL. (2010). "METHYLMERCURY-INDUCED NEUROTOXICITY AND APOPTOSIS." **CHEM BIOL INTERACT** 188(2): 301-308.

CHEN, H. J., ET AL. (2015). "RESPONSE OF THE NITRERGIC SYSTEM TO ACTIVATION OF THE NEUROENDOCRINE STRESS AXIS." **FRONT NEUROSCI** 9: 3.

CLARKSON, T. W., ET AL. (2003). "THE TOXICOLOGY OF MERCURY--CURRENT EXPOSURES AND CLINICAL MANIFESTATIONS." **N ENGL J MED** 349(18): 1731-1737.

COSTA JUNIOR, J. M. F., ET AL. (2017). "MANIFESTAÇÕES EMOCIONAIS E MOTORAS DE RIBEIRINHOS EXPOSTOS AO MERCÚRIO NA AMAZÔNIA." **REVISTA BRASILEIRA DE EPIDEMIOLOGIA** 20: 212-224.

CRESPO-LOPEZ, M. E., ET AL. (2009). "MERCURY AND HUMAN GENOTOXICITY: CRITICAL CONSIDERATIONS AND POSSIBLE MOLECULAR MECHANISMS." **PHARMACOL RES** 60(4): 212-220.

CROWE, W., ET AL. (2017). "MERCURY AS AN ENVIRONMENTAL STIMULUS IN THE DEVELOPMENT OF AUTOIMMUNITY - A SYSTEMATIC REVIEW." **AUTOIMMUN REV** 16(1): 72-80.

DE OLIVEIRA SANTOS, E. C., ET AL. (2000). "MERCURY EXPOSURES IN RIVERSIDE AMAZON COMMUNITIES IN PARÁ, BRAZIL." **ENVIRON RES** 84(2): 100-107.

DENG, Y., ET AL. (2014). "EXPLORING CROSS-TALK BETWEEN OXIDATIVE DAMAGE AND EXCITOTOXICITY AND THE EFFECTS OF RILUZOLE IN THE RAT CORTEX AFTER EXPOSURE TO METHYLMERCURY." **NEUROTOX RES** 26(1): 40-51.

DOREA, J. G. AND R. C. MARQUES (2016). "MERCURY LEVELS AND HUMAN HEALTH IN THE AMAZON BASIN." **ANN HUM BIOL** 43(4): 349-359.

DOS SANTOS FREITAS, J., ET AL. (2018). "CROSS-SECTIONAL STUDY TO ASSESS THE ASSOCIATION OF COLOR VISION WITH MERCURY HAIR CONCENTRATION IN CHILDREN FROM BRAZILIAN AMAZONIAN RIVERINE COMMUNITIES." **NEUROTOXICOLOGY** 65: 60-67.

DUNHAM, N. W. AND T. S. MIYA (1957). "A NOTE ON A SIMPLE APPARATUS FOR DETECTING NEUROLOGICAL DEFICIT IN RATS AND MICE." **J AM PHARM ASSOC AM PHARM ASSOC** 46(3): 208-209.

FALLUEL-MOREL, A., ET AL. (2007). "DEVELOPMENTAL MERCURY EXPOSURE ELICITS ACUTE HIPPOCAMPAL CELL DEATH, REDUCTIONS IN

NEUROGENESIS, AND SEVERE LEARNING DEFICITS DURING PUBERTY." **J NEUROCHEM** 103(5): 1968-1981.

FARINA, M. AND M. ASCHNER (2017). "METHYLMERCURY-INDUCED NEUROTOXICITY: FOCUS ON PRO-OXIDATIVE EVENTS AND RELATED CONSEQUENCES." **ADV NEUROBIOL** 18: 267-286.

FARINA, M., ET AL. (2011). "OXIDATIVE STRESS IN MEHG-INDUCED NEUROTOXICITY." **TOXICOL APPL PHARMACOL** 256(3): 405-417.

FARINA, M., ET AL. (2011). "MECHANISMS OF METHYLMERCURY-INDUCED NEUROTOXICITY: EVIDENCE FROM EXPERIMENTAL STUDIES." **LIFE SCI** 89(15-16): 555-563.

FONNUM, F. AND E. A. LOCK (2000). "CEREBELLUM AS A TARGET FOR TOXIC SUBSTANCES." **TOXICOL LETT** 112-113: 9-16.

FONTES-JUNIOR, E. A., ET AL. (2016). "CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION AND CORTICAL ISCHEMIA: STUDY OF THEIR COMORBIDITY AND THE PROTECTIVE EFFECTS OF MINOCYCLINE." **OXID MED CELL LONGEV** 2016: 1341453.

FRANCO, J. L., ET AL. (2006). "CEREBELLAR THIOL STATUS AND MOTOR DEFICIT AFTER LACTATIONAL EXPOSURE TO METHYLMERCURY." **ENVIRON RES** 102(1): 22-28.

FUJIMURA, M. AND F. USUKI (2018). "METHYLMERCURY INDUCES OXIDATIVE STRESS AND SUBSEQUENT NEURAL HYPERACTIVITY LEADING TO CELL DEATH THROUGH THE P38 MAPK-CREB PATHWAY IN DIFFERENTIATED SH-SY5Y CELLS." **NEUROTOXICOLOGY** 67: 226-233.

FUJIMURA, M., ET AL. (2016). "PRENATAL LOW-DOSE METHYLMERCURY EXPOSURE IMPAIRS NEURITE OUTGROWTH AND SYNAPTIC PROTEIN EXPRESSION AND SUPPRESSES TRKA PATHWAY ACTIVITY AND EEF1A1 EXPRESSION IN THE RAT CEREBELLUM." **TOXICOL APPL PHARMACOL** 298: 1-8.

GERARD-MONNIER, D., ET AL. (1998). "REACTIONS OF 1-METHYL-2-PHENYLINDOLE WITH MALONDIALDEHYDE AND 4-HYDROXYALKENALS. ANALYTICAL APPLICATIONS TO A COLORIMETRIC ASSAY OF LIPID PEROXIDATION." **CHEM RES TOXICOL** 11(10): 1176-1183.

GIOVANELLA, P., ET AL. (2011). "ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS RESISTENTES E CAPAZES DE VOLATILIZAR MERCÚRIO." **QUÍMICA NOVA** 34: 232-236.

GLASER, V., ET AL. (2010). "OXIDATIVE STRESS-MEDIATED INHIBITION OF BRAIN CREATINE KINASE ACTIVITY BY METHYLMERCURY." **NEUROTOXICOLOGY** 31(5): 454-460.

GOMES-LEAL, W., ET AL. (2005). "SYSTEMATIC ANALYSIS OF AXONAL DAMAGE AND INFLAMMATORY RESPONSE IN DIFFERENT WHITE MATTER TRACTS OF ACUTELY INJURED RAT SPINAL CORD." **BRAIN RES** 1066(1-2): 57-70.

GOULD, V. E., ET AL. (1987). "SYNAPTOPHYSIN EXPRESSION IN NEUROENDOCRINE NEOPLASMS AS DETERMINED BY IMMUNOCYTOCHEMISTRY." **AM J PATHOL** 126(2): 243-257.

GRUENWEDEL, D. W. AND D. S. LU (1970). "CHANGES IN THE SEDIMENTATION CHARACTERISTICS OF DNA DUE TO METHYLMERCURATION." **BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN** 40(3): 542-548.

HARADA, M. (2009). "[GLOBAL LESSONS OF MINAMATA DISEASE--A MAN'S WORTH]." **NIHON HANSENBYO GAKKAI ZASSHI** 78(1): 55-60.

HECKER, L. (2018). "MECHANISMS AND CONSEQUENCES OF OXIDATIVE STRESS IN LUNG DISEASE: THERAPEUTIC IMPLICATIONS FOR AN AGING POPULACE." **AM J PHYSIOL LUNG CELL MOL PHYSIOL** 314(4): L642-L653.

HERMAN, S. P., ET AL. (1973). "AN ULTRASTRUCTURAL STUDY OF METHYLMERCURY-INDUCED PRIMARY SENSORY NEUROPATHY IN THE RAT." **LAB INVEST** 28(1): 104-118.

HIBI, M. AND T. SHIMIZU (2012). "DEVELOPMENT OF THE CEREBELLUM AND CEREBELLAR NEURAL CIRCUITS." **DEV NEUROBIOL** 72(3): 282-301.

HINTELMANN, H. (2010). "ORGANOMERCURIALS. THEIR FORMATION AND PATHWAYS IN THE ENVIRONMENT." **MET IONS LIFE SCI** 7: 365-401.

HONG, Y. S., ET AL. (2012). "METHYLMERCURY EXPOSURE AND HEALTH EFFECTS." **J PREV MED PUBLIC HEALTH** 45(6): 353-363.

IRVING, E. A., ET AL. (1997). "RAPID ALTERATION OF TAU IN OLIGODENDROCYTES AFTER FOCAL ISCHEMIC INJURY IN THE RAT: INVOLVEMENT OF FREE RADICALS." **J CEREB BLOOD FLOW METAB** 17(6): 612-622.

ITO, D., ET AL. (1998). "MICROGLIA-SPECIFIC LOCALISATION OF A NOVEL CALCIUM BINDING PROTEIN, IBA1." **BRAIN RES MOL BRAIN RES** 57(1): 1-9.

KARL, T., ET AL. (2003). "BEHAVIORAL PHENOTYPING OF MICE IN PHARMACOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL RESEARCH." **EXP TOXICOL PATHOL** 55(1): 69-83.

KERSHAW, T. G., ET AL. (1980). "THE RELATIONSHIP BETWEEN BLOOD LEVELS AND DOSE OF METHYLMERCURY IN MAN." **ARCH ENVIRON HEALTH** 35(1): 28-36.

KHOURY, E. D., ET AL. (2015). "SOMATOSENSORY PSYCHOPHYSICAL LOSSES IN INHABITANTS OF RIVERSIDE COMMUNITIES OF THE TAPAJOS RIVER BASIN,

AMAZON, BRAZIL: EXPOSURE TO METHYLMERCURY IS POSSIBLY INVOLVED." **PLOS ONE** 10(12): E0144625.

KONG, H. K., ET AL. (2013). "CHRONIC EXPOSURE OF ADULT RATS TO LOW DOSES OF METHYLMERCURY INDUCED A STATE OF METABOLIC DEFICIT IN THE SOMATOSENSORY CORTEX." **J PROTEOME RES** 12(11): 5233-5245.

KOZIOL, L. F., ET AL. (2014). "CONSENSUS PAPER: THE CEREBELLUM'S ROLE IN MOVEMENT AND COGNITION." **CEREBELLUM** 13(1): 151-177.

KREY, A., ET AL. (2014). "IN VIVO AND IN VITRO CHANGES IN NEUROCHEMICAL PARAMETERS RELATED TO MERCURY CONCENTRATIONS FROM SPECIFIC BRAIN REGIONS OF POLAR BEARS (URSUS MARITIMUS)." **ENVIRON TOXICOL CHEM** 33(11): 2463-2471.

KRIZKOVA, S., ET AL. (2016). "MICROARRAY ANALYSIS OF METALLOTHIONEINS IN HUMAN DISEASES--A REVIEW." **J PHARM BIOMED ANAL** 117: 464-473.

KUMAR, A. AND P. CHANANA (2017). "ROLE OF NITRIC OXIDE IN STRESS-INDUCED ANXIETY: FROM PATHOPHYSIOLOGY TO THERAPEUTIC TARGET." **VITAM HORM** 103: 147-167.

LEE, J. Y., ET AL. (2012). "METHYLMERCURY INDUCES A BRAIN-SPECIFIC INCREASE IN CHEMOKINE CCL4 EXPRESSION IN MICE." **J TOXICOL SCI** 37(6): 1279-1282.

LIMA, R. R., ET AL. (2008). "DIFFUSE AXONAL DAMAGE, MYELIN IMPAIRMENT, ASTROCYTOSIS AND INFLAMMATORY RESPONSE FOLLOWING MICROINJECTIONS OF NMDA INTO THE RAT STRIATUM." **INFLAMMATION** 31(1): 24-35.

LIU, W., ET AL. (2013). "PROTECTIVE EFFECTS OF MEMANTINE AGAINST METHYLMERCURY-INDUCED GLUTAMATE DYSHOMEOSTASIS AND OXIDATIVE STRESS IN RAT CEREBRAL CORTEX." **NEUROTOX RES** 24(3): 320-337.

LIU, W., ET AL. (2014). "EXCITOTOXICITY AND OXIDATIVE DAMAGES INDUCED BY METHYLMERCURY IN RAT CEREBRAL CORTEX AND THE PROTECTIVE EFFECTS OF TEA POLYPHENOLS." **ENVIRON TOXICOL** 29(3): 269-283.

MACEDO-JUNIOR, S. J., ET AL. (2017). "METHYLMERCURY EXPOSURE FOR 14 DAYS (SHORT-TERM) PRODUCES BEHAVIORAL AND BIOCHEMICAL CHANGES IN MOUSE CEREBELLUM, LIVER, AND SERUM." **J TOXICOL ENVIRON HEALTH A** 80(19-21): 1145-1155.

MAILLOUX, R. J., ET AL. (2015). "SUPEROXIDE ANION RADICAL (O₂⁻) DEGRADES METHYLMERCURY TO INORGANIC MERCURY IN HUMAN ASTROCYTOMA CELL LINE (CCF-STTG1)." **CHEM BIOL INTERACT** 239: 46-55.

MOREL, F. M. M., ET AL. (1998). "THE CHEMICAL CYCLE AND BIOACCUMULATION OF MERCURY." **ANNUAL REVIEW OF ECOLOGY AND SYSTEMATICS** 29(1): 543-566.

NORDBERG, G. F., ET AL. (2014). HANDBOOK ON THE TOXICOLOGY OF METALS, **ELSEVIER SCIENCE**.

OLIVEIRA, G. B., ET AL. (2014). "MINOCYCLINE MITIGATES MOTOR IMPAIRMENTS AND CORTICAL NEURONAL LOSS INDUCED BY FOCAL ISCHEMIA IN RATS CHRONICALLY EXPOSED TO ETHANOL DURING ADOLESCENCE." **BRAIN RES** 1561: 23-34.

OLIVIERI, G., ET AL. (2000). "MERCURY INDUCES CELL CYTOTOXICITY AND OXIDATIVE STRESS AND INCREASES BETA-AMYLOID SECRETION AND TAU PHOSPHORYLATION IN SHSY5Y NEUROBLASTOMA CELLS." **J NEUROCHEM** 74(1): 231-236.

PANDOLFO, P., ET AL. (2007). "INCREASED SENSITIVITY OF ADOLESCENT SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS, AN ANIMAL MODEL OF ATTENTION DEFICIT HYPERACTIVITY DISORDER, TO THE LOCOMOTOR STIMULATION INDUCED BY THE CANNABINOID RECEPTOR AGONIST WIN 55,212-2." **EUR J PHARMACOL** 563(1-3): 141-148.

PATRICK, L. (2002). "MERCURY TOXICITY AND ANTIOXIDANTS: PART 1: ROLE OF GLUTATHIONE AND ALPHA-LIPOIC ACID IN THE TREATMENT OF MERCURY TOXICITY." **ALTERN MED REV** 7(6): 456-471.

REICHMANN, D., ET AL. (2018). "MAINTAINING A HEALTHY PROTEOME DURING OXIDATIVE STRESS." **MOL CELL** 69(2): 203-213.

RESKE-NIELSEN, E., ET AL. (1987). "ASTROCYTES IN THE PRENATAL CENTRAL NERVOUS SYSTEM. FROM 5TH TO 28TH WEEK OF GESTATION. AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY ON PARAFFIN-EMBEDDED MATERIAL." **ACTA PATHOL MICROBIOL IMMUNOL SCAND A** 95(6): 339-346.

RODRIGUEZ MARTIN-DOIMEADIOS, R. C., ET AL. (2014). "COMPARATIVE STUDY OF MERCURY SPECIATION IN COMMERCIAL FISHES OF THE BRAZILIAN AMAZON." **ENVIRON SCI POLLUT RES INT** 21(12): 7466-7479.

SARNAT, H. B., ET AL. (1998). "NEURONAL NUCLEAR ANTIGEN (NEUN): A MARKER OF NEURONAL MATURATION IN EARLY HUMAN FETAL NERVOUS SYSTEM." **BRAIN DEV** 20(2): 88-94.

SARNAT, H. B., ET AL. (1998). "NEURONAL NUCLEAR ANTIGEN (NEUN): A MARKER OF NEURONAL MATURATION IN THE EARLY HUMAN FETAL NERVOUS SYSTEM¹." **BRAIN AND DEVELOPMENT** 20(2): 88-94.

SKERFVING, S. B. AND J. F. COPPLESTONE (1976). "POISONING CAUSED BY THE CONSUMPTION OF ORGANOMERCURY-DRESSED SEED IN IRAQ." **BULL WORLD HEALTH ORGAN** 54(1): 101-112.

SOKOLOWSKI, K., ET AL. (2013). "NEURAL STEM CELL APOPTOSIS AFTER LOW-METHYLMERCURY EXPOSURES IN POSTNATAL HIPPOCAMPUS PRODUCE PERSISTENT CELL LOSS AND ADOLESCENT MEMORY DEFICITS." **DEV NEUROBIOL** 73(12): 936-949.

SUDA, I. AND H. TAKAHASHI (1992). "DEGRADATION OF METHYL AND ETHYL MERCURY INTO INORGANIC MERCURY BY OTHER REACTIVE OXYGEN SPECIES BESIDES HYDROXYL RADICAL." **ARCH TOXICOL** 66(1): 34-39.

TEIXEIRA, F. B., ET AL. (2018). "EXPOSURE TO INORGANIC MERCURY CAUSES OXIDATIVE STRESS, CELL DEATH, AND FUNCTIONAL DEFICITS IN THE MOTOR CORTEX." **FRONT MOL NEUROSCI** 11: 125.

TEIXEIRA, F. B., ET AL. (2014). "EVALUATION OF THE EFFECTS OF CHRONIC INTOXICATION WITH INORGANIC MERCURY ON MEMORY AND MOTOR CONTROL IN RATS." **INT J ENVIRON RES PUBLIC HEALTH** 11(9): 9171-9185.

USUKI, F. AND M. FUJIMURA (2016). "DECREASED PLASMA THIOL ANTIOXIDANT BARRIER AND SELENOPROTEINS AS POTENTIAL BIOMARKERS FOR ONGOING METHYLMERCURY INTOXICATION AND AN INDIVIDUAL PROTECTIVE CAPACITY." **ARCH TOXICOL** 90(4): 917-926.

VALENZUELA, C. F. AND K. JOTTY (2015). "MINI-REVIEW: EFFECTS OF ETHANOL ON GABAA RECEPTOR-MEDIATED NEUROTRANSMISSION IN THE CEREBELLAR CORTEX--RECENT ADVANCES." **CEREBELLUM** 14(4): 438-446.

VALENZUELA, C. F., ET AL. (2010). "A REVIEW OF SYNAPTIC PLASTICITY AT PURKINJE NEURONS WITH A FOCUS ON ETHANOL-INDUCED CEREBELLAR DYSFUNCTION." **INT REV NEUROBIOL** 91: 339-372.

WASSERMAN, J. C., ET AL. (2002). "MERCURY SPECIATION IN SEDIMENTS OF A TROPICAL COASTAL ENVIRONMENT." **ENVIRON TECHNOL** 23(8): 899-910.

WATANABE, J., ET AL. (2013). "LOW DOSE OF METHYLMERCURY (MEHG) EXPOSURE INDUCES CASPASE MEDIATED-APOPTOSIS IN CULTURED NEURAL PROGENITOR CELLS." **J TOXICOL SCI** 38(6): 931-935.

YNALVEZ, R., ET AL. (2016). "MINI-REVIEW: TOXICITY OF MERCURY AS A CONSEQUENCE OF ENZYME ALTERATION." **BIOMETALS** 29(5): 781-788.

ZAMBRANO, B. (2004). "CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE EL MERCURIO, EL TIMEROSAL, Y SU USO EN VACUNAS PEDIÁTRICAS." **REVISTA MÉDICA DEL URUGUAY** 20: 4-11.

ANEXO I

PARECER 225-14

Projeto: CARACTERIZAÇÃO DA INJURIA NO CORTEX MOTOR DE RATOS APÓS ACIDENTE VASCULAR ISQUEMICO, EM UM MODELO DE INTOXICAÇÃO CRONICA COM METILMERCURIO

Coordenador: Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima

Area Tematica: Neurociências

Vigencia 01/2013 a 12/2015

Nono CEPAE-UFPA: 225-14

O projeto a cima identificado foi avaliado pelo Comite de Etica Em Pesquisa Com Animais de Experimentao da Universidade Federal do Para (CEPAE). O tema eleito para a investigao e de alto teor científico justificando a utilizaao do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulao de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, atraves de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria No 1032/2014 do Reiter da Universidade Federal do Para, resolve APROVAR a utilizaçã o de a n i m a i s de experimentação (N= 80, rates Wistar) nas atividades do projeto em quest:l:o, no periodo de vigencia estabelecido.

As atividades experimentais fora do periodo de vigencia devem receber nova autorizaao deste comite.

Belém, 01 de janeiro de 2013


Prof. Dr. Wallace Gomes Leal
Presidente do CEPAE-UFPA