



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

ALLAN COSTA MALAQUIAS

EXPOSIÇÃO À CONCENTRAÇÃO SUBLETAL DE METILMERCÚRIO:  
GENOTOXICIDADE E ALTERAÇÕES NA PROLIFERAÇÃO CELULAR

BELÉM-PA  
2015



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

ALLAN COSTA MALAQUIAS

EXPOSIÇÃO À CONCENTRAÇÃO SUBLETAL DE METILMERCÚRIO:  
GENOTOXICIDADE E ALTERAÇÕES NA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, da Universidade Federal do Pará – UFPA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr. María Elena Crespo López.

BELÉM-PA  
2015

ALLAN COSTA MALAQUIAS

EXPOSIÇÃO À CONCENTRAÇÃO SUBLETAL DE METILMERCÚRIO:  
GENOTOXICIDADE E ALTERAÇÕES NA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Plano de qualificação de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, da Universidade Federal do Pará – UFPA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr. María Elena Crespo López

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Banca Examinadora

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr. María Elena Crespo López - Orientadora-UFPA

---

Prof. Dr. Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira- UFPA-

---

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Lima - IEC-

---

Prof<sup>ª</sup> Dr. Cristiane do Socorro Ferraz Maia- UFPA-

BELÉM-PA  
2015

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a Deus como forma de agradecimento pela ajuda recebida, ao longo deste percurso, através das mãos dos que caminharam ao meu lado.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr. María Elena Crespo López, pela oportunidade de ingressar no seu grupo de pesquisa. Por seu tempo, dedicação e conhecimento fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Farmacologia Molecular, por todos os momentos de companheirismo e ajuda mútua.

Ao Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento, em nome do Laboratório de Neuroquímica Celular e Molecular e seus professores, técnicos e alunos pelo apoio obtido ao longo destes anos.

Ao Prof. Dr. Moisés dos Santos Miranda, em nome do Laboratório de Fertilização *in vitro*, e seus professores, técnicos e alunos pelo suporte ofertado para realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira, em nome do Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética, da Seção de Meio Ambiente do Instituto Evandro Chagas, e seus técnicos e alunos pela contribuição indispensável para realização desta Tese de doutoramento.

Aos membros da banca pelas sugestões e contribuições realizadas. Suas anotações foram importantes para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular que permitiram a possibilidade de estudo e aperfeiçoamento.

À Fundação Amazônia de Amparo à Pesquisa e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo suporte financeiro desta pesquisa.

Aos meus pais Yara Costa e Elcimith Malaquias, à minha irmã Swellen Tavares Cardoso, ao cunhado e Paulo Tavares Cardoso e à minha namorada Brena Feitosa pelo amparo e carinho que foram imprescindíveis para o sucesso desta realização.

*“Tudo pode ser veneno e nada pode não ser veneno. A dose é a única coisa que pode fazer uma coisa deixar de ser venenosa”.*

Philippus Aureolus von Hohenheim (Paracelsus)

1493-1541

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Farmacologia Molecular, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal da Pará – UFPA, sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dr. María Elena Crespo López e em parceria com o Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética da Seção de Meio Ambiente do Instituto Evandro Chagas – IEC. Este estudo contou com o auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES através do Projeto de pesquisa aprovado no Edital Universal 012/2011 e da bolsa de doutorado concedida pela Fundação Amazônia de Amparo à Pesquisa.

## RESUMO

O mercúrio é um metal que se destaca dos demais por se apresentar líquido em temperatura e pressão normais. Este xenobiótico se apresenta como a maior fonte de poluição em várias partes do mundo e tem como característica ser altamente tóxico ao Sistema Nervoso Central (SNC). O despejo é na forma líquida diretamente no solo e leito dos rios. Este metal pesado é complexado com vários elementos presentes no solo ou sedimentos sendo convertido à metilmercúrio (MeHg) pela microbiota aquática. O MeHg apresenta a capacidade de se acumular ao longo da cadeia trófica, um evento conhecido como biomagnificação, o qual afeta diretamente a vida humana. Nesse sentido, a Região Amazônica se destaca por possuir todos os componentes necessários para a manutenção do ciclo biogeoquímico do mercúrio, além de populações cronicamente expostas a este metal pesado, sendo este fato considerado um problema de saúde pública. Tem-se conhecimento que este xenobiótico após a exposição aguda a altas doses promove desordens relacionadas ao surgimento de processos degenerativos no SNC, entretanto, os efeitos a baixas concentrações ainda não são totalmente conhecidos. Nesse sentido, se destacam as células gliais que atuam como mediadores no processo de neurotoxicidade desse metal, principalmente em baixas concentrações. Apesar de este tipo celular exibir um importante papel no processo de intoxicação mercurial, a ação deste metal sobre as células gliais é pouco conhecida, principalmente sobre o genoma e a proliferação celular. Desta forma, este trabalho se propõe a avaliar o efeito da exposição a este xenobiótico em baixa concentração sobre o material genético e a proliferação celular em células da linhagem glial C6. As avaliações bioquímica (atividade mitocondrial – medida pelo ensaio de MTT –) e morfofuncional (integridade da membrana – avaliada pelo ensaio com os corantes BE e AA –) confirmaram a ausência de morte celular após a exposição ao metal pesado na concentração de 3  $\mu\text{M}$  por um intervalo de 24 horas. Mesmo sem promover processos de morte celular, o tratamento com esta concentração subletal de MeHg foi capaz de aumentar significativamente os níveis dos marcadores de genotoxicidade (fragmentação do DNA, formação de micronúcleos, pontes nucleoplásmica e brotos nucleares). Ao mesmo tempo, foi possível observar uma alteração no ciclo celular através do aumento do índice mitótico e uma mudança no perfil do ciclo celular com aumento da população celular nas fases S e G2/M, sugerindo um aprisionamento nessa etapa. Esta mudança no ciclo celular, provocada por 24h de exposição ao MeHg, foi seguida de uma redução no número de células viáveis e confluência celular 24h após a retirada do MeHg e substituição do meio de cultura, além do aumento no tempo de duplicação da cultura do mesmo. Este estudo demonstrou pela primeira vez que a exposição ao metilmercúrio em concentração baixa e subletal é capaz de promover eventos genotóxicos e distúrbios na proliferação celular em células de origem glial.

**Palavras-chave:** Mercúrio. Metilmercúrio. Glia. Genotoxicidade. Ciclo celular. Proliferação celular.

## ABSTRACT

Mercury is a metal that stands out from the rest for present liquid under normal temperature and pressure. This xenobiotic is the largest source of pollution in many parts of the world and has been characterized toxic to the central nervous system (CNS). After dumping in liquid form directly into soil and riverbed, this heavy metal complex with various organic elements or it is converted to methylmercury (MeHg) by aquatic microbiota. The MeHg can move up the food chain, an event known as biomagnification, which directly affects human life. Thereby, the Amazon stands out for having all the components necessary for the maintenance of biogeochemical cycle of mercury as well as populations chronically exposed with this heavy metal. And this metal is considered a public health problem. It is well known that this xenobiotic after acute exposure to high doses promotes disorders related to the emergence of degenerative processes in the CNS, however, the effects at low concentrations are not yet fully described. Despite this cell type play an important role in the mercury intoxication process, the role of this metal on glial cells is not well known, especially on the genome and cell proliferation. Thus, this study aimed to evaluate the effect of exposure to this xenobiotic at low concentration on DNA and cell proliferation in C6 glial lineage cells. The biochemical (mitochondrial activity - measured by MTT assay -) and morphofunctional evaluations (membrane integrity - measured by the assay with dyes and AA BE -) confirmed the absence of cell death after exposure to heavy metals in a concentration of 3  $\mu$ M for 24 hours. Even without causing cell death processes, the treatment with sublethal concentration of MeHg that was able to significantly increase the levels of markers of genotoxicity (DNA fragmentation, micronuclei, nuclear nucleoplasmic bridges and nuclear bud). At the same time, it was possible to observe a change in the cell cycle by increasing the mitotic index and a change in the cell cycle profile with increased cell population in S and G2 / M phases, suggesting an arrest cell cycle arrest. This change in cell cycle caused by MeHg exposure was followed by number of viable cells and cell confluence decrease, 24 hours after the withdrawal of MeHg of culture medium. The C6 cell line culture in addition showed an increase on doubling time parameter. This study demonstrates for the first time exposure to methylmercury low and sublethal concentration can promote genotoxic events and disturbances in cell proliferation in glial cell origin.

**Keywords:** Mercury. Methylmercury. Glia. Genotoxicity. Cell Cycle. Cell Proliferation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Fig 1:** Ciclo biogeoquímico do mercúrio no ambiente amazônico.
- Fig 2:** Controle do ciclo celular.
- Fig 3:** Eventos da divisão celular eucariótica.
- Fig 4:** Resumo esquemático da exposição ao MeHg em culturas de células gliais da linhagem C6.
- Fig 5:** Padrão utilizado para análise de células viáveis.
- Fig 6:** Imagem do nucleotídeo durante a avaliação da fragmentação do DNA através da técnica do ensaio do cometa.
- Fig 7:** Parâmetros de avaliação no ensaio de formação de micronúcleos.
- Fig 8:** Viabilidade celular da linhagem C6 exposta a diferentes concentrações de metilmercúrio por um intervalo de tempo de horas (a) e 24 horas (b).
- Fig 9:** (a) Avaliação da morfologia celular da linhagem C6 exposta a 10  $\mu\text{M}$  de metilmercúrio em diferentes períodos. (b) Viabilidade celular da linhagem C6 exposta a metilmercúrio na concentração de 10 $\mu\text{M}$  por um intervalo de tempo de 4 horas e 24 horas.
- Fig 10:** Viabilidade celular das culturas de células da linhagem C6 expostas a metilmercúrio por um intervalo de tempo de 24 horas em meio de cultura suplementado com Soro Bovino Fetal (SBF).
- Fig 11:** Morfologia celular da linhagem C6 exposta ao metilmercúrio na concentração de 5  $\mu\text{M}$  por um período de 24 horas na ausência de soro bovino fetal.
- Fig 12:** Viabilidade celular das culturas da linhagem C6 expostas à metilmercúrio (MeHg) na concentração de 3  $\mu\text{M}$  em DEMEM suplementando com 10% de soro bovino fetal por 24 horas.
- Fig 13:** Fragmentação de DNA detectada através do ensaio cometa.
- Fig 14:** Alterações genotóxicas detectadas com a técnica do micronúcleo em células C6 exposta por 24 horas a 3  $\mu\text{M}$  de metilmercúrio.
- Fig 15:** Células binucleadas pela técnica de micronúcleos em células C6 expostas a 24 horas a metilmercúrio (MeHg) 3  $\mu\text{M}$ .
- Fig 16:** Índice Mitótico de células C6 expostas a 3  $\mu\text{M}$  de metilmercúrio (MeHg) por 24 horas.
- Fig 17:** Ciclo celular de células C6 expostas a 3  $\mu\text{M}$  de metilmercúrio (MeHg) por 24 horas.
- Fig 18:** Viabilidade celular das culturas C6 expostas a 3  $\mu\text{M}$  de metilmercúrio (MeHg) por 24 horas posterior recuperação por mais 48 horas após a retirada de MeHg.
- Fig 19:** Número total de células viáveis presentes na cultura de C6 24 horas após o fim da exposição a 3  $\mu\text{M}$  de metilmercúrio (MeHg) por 24 horas.
- Fig 20:** Confluência celular das células C6 no início da experiência.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AA : Alaranjado de Acridina

ATCC: American Type Culture Collection

ANOVA: Análise de Variância de um Critério

ATP: Trifostato de adenosina.

BHE: Barreira hemato-encefálica

BE: Brometo de Etídio

BR: Índice de células contendo broto nuclear.

CBMN: Cytokinesis-Block Micronucleus Assay

CDKS: Cyclin-dependent kinase

DAP : 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMEM : Dulbecco Modified Eagle Medium

IM: Índice Mitótico

PI: Iodeto de Propídeo

OMS: Organização Mundial de Saúde

MeHg: Metilmercúrio

MN: Índice de células micronucleadas.

MTT: (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

PBS: Tampão Fosfato Salino

PT: Índice de células com pontes nucleoplasmáticas

SCGE: Single Cell Gel Electrophoresis

SNC: Sistema Nervoso Central

SBF: Soro Bovino Fetal

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>  | 13 |
| <b>1.1 Mercúrio: Considerações gerais, ciclo biogeoquímico e a Região Amazônica</b>  | 13 |
| <b>1.2 Toxicologia da intoxicação mercurial</b>  | 17 |
| <b>1.2.1 Toxicocinética e efeitos no sistema nervoso central</b>   | 17 |
| <b>1.2.2 Toxicodinâmica do mercúrio: eventos celulares e moleculares</b>   | 19 |
| <b>1.2.3 Toxicologia mercurial <i>in vitro</i></b>   | 20 |
| <b>1.3 Genotoxicidade e distúrbios de proliferação celular</b>   | 21 |
| <b>1.4 Ciclo celular: controle e resposta ao dano no DNA</b>   | 23 |
| <b>1.5 Genotoxicidade do Metilmercúrio</b>   | 30 |
| <b>2 OBJETIVOS</b>   | 33 |
| <b>2.1 Objetivo geral</b>  | 33 |
| <b>2.2 Objetivos específicos</b>   | 33 |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>  | 34 |
| <b>3.1 Preparo e estoque da solução de metilmercúrio</b>   | 34 |
| <b>3.2 Cultura celular da linhagem de glioblastoma de rato (C6)</b>  | 34 |
| <b>3.3 Tratamento</b>  | 34 |
| <b>3.4 Viabilidade celular</b>   | 35 |
| <b>3.5 Detecção de apoptose e necrose</b>  | 36 |
| <b>3.6 Análise da fragmentação do DNA pelo ensaio cometa</b>   | 37 |
| <b>3.7 Avaliação da genotoxicidade através da formação de micronúcleos</b>   | 38 |
| <b>3.8 Avaliação do índice mitótico pelo bloqueio do ciclo celular com colchicina</b>  | 40 |
| <b>3.9 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo</b>  | 40 |
| <b>3.10 Determinação do tempo de duplicação da cultura celular</b>   | 41 |
| <b>3.11 Avaliação da confluência e padrão morfológico da cultura celular</b>   | 41 |
| <b>3.12 Análise estatística</b>  | 42 |
| <b>4 RESULTADOS</b>  | 43 |
| <b>4.1 Metilmercúrio altera a viabilidade e morfologia celular de acordo com o tempo de exposição e a presença/ausência de soro no meio de cultura</b> | 43 |
| <b>4.2 A exposição ao metilmercúrio na concentração de 3 <math>\mu</math>M não está associado à processos iniciais de apoptose</b>                     | 49 |
| <b>4.3 A exposição ao metilmercúrio em concentração não letal está relacionada com o surgimento de danos genotóxicos em células de origem glial</b>    | 50 |
| <b>4.4 A exposição ao metilmercúrio promove alterações no equilíbrio do ciclo celular das células de origem glial</b>                                  | 53 |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4.5 Após o desequilíbrio no ciclo celular provocado pela exposição ao metilmercúrio segue-se um atraso no crescimento populacional da linhagem com a retirada do xenobiótico</b> | <b>55</b> |
| <b>5 DISCUSSÃO</b>  | <b>58</b> |
| <b>6 CONCLUSÃO</b>  | <b>71</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>   | <b>72</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Mercúrio: Considerações gerais, ciclo biogeoquímico e a Região Amazônica

O mercúrio é um metal que se destaca dos demais por se apresentar na forma líquida em temperatura e pressão normais. Este xenobiótico se apresenta como a maior fonte de poluição em várias partes do mundo e tem como característica ser tóxico ao sistema nervoso central (Hong, Kim et al. 2012). Apesar de ter uma origem natural, este poluente se acumula no meio ambiente principalmente pelo despejo incorreto dos resíduos provenientes de fábricas e áreas de mineração. Por este motivo, a extração de minérios de interesse econômico é fortemente associada ao acúmulo de mercúrio no meio ambiente (Boening 2000; Carocci, Rovito et al. 2014). O despejo do mercúrio no meio ambiente pode ser tanto na forma líquida quanto em vapor. O mercúrio metálico liberado no meio ambiente pelas fábricas e garimpos encontra na forma metálica ( $\text{Hg}^0$ ), que posteriormente é oxidado gerando íons de mercúrio.

No estágio iônico, pode ser encontrado em duas formas: mercúrio (I) e mercúrio (II) ( $\text{Hg}^{+1}$  e  $\text{Hg}^{+2}$  respectivamente) (Boening 2000). Quando liberado na forma de vapor, o metal é convertido na sua forma iônica, o que confere uma maior hidrossolubilidade a este metal, o qual retorna ao solo e bacias aquáticas através da chuva. O aumento da capacidade deste poluente se dissolver em água está relacionado a uma maior distribuição tanto nos organismos quanto no meio ambiente.

Dessa forma, quando o despejo é na forma líquida, diretamente no solo e leito dos rios, onde este metal é complexado com elementos orgânicos, (Wasserman, Hacon et al. 2003; Li, Feng et al. 2009) é possível observar a condução deste poluente em direção aos rios durante as chuvas, através de um processo denominado lixiviação. Sendo assim, após a liberação do mercúrio no meio ambiente, é descrito diversas rotas pelas quais o poluente pode seguir, e de forma geral, esses caminhos são denominados conjuntamente de ciclo biogeoquímico do mercúrio (Wasserman, Hacon et al. 2003; Li, Feng et al. 2009) (Figura 1).

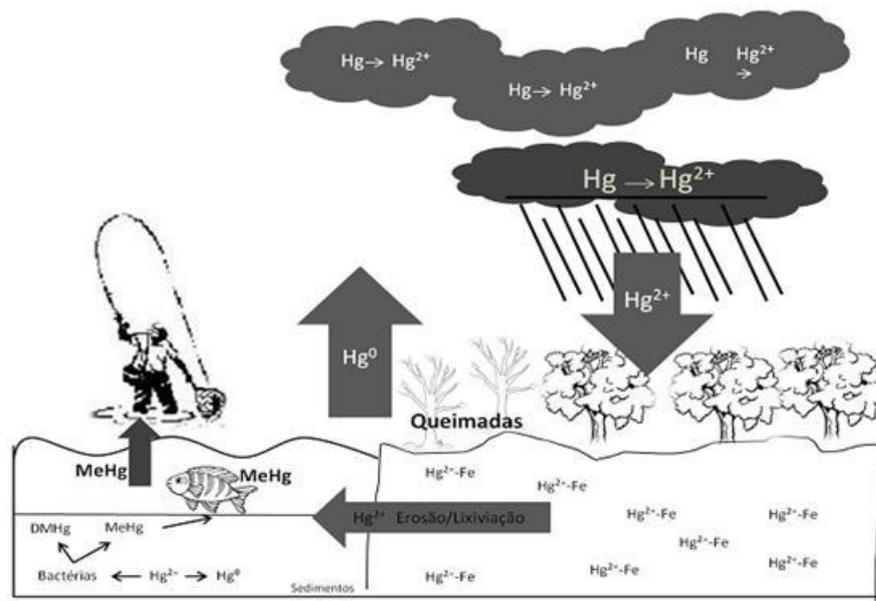


Figura 1: Ciclo biogeoquímico do mercúrio no ambiente amazônico. MeHg (metilmercúrio); DMHg (dimetilmercúrio);  $Hg^0$  (mercúrio metálico);  $Hg^{2+}$  (mercúrio iônico). Modificado de Wasserman e colaboradores (2001).

Uma vez no leito dos rios, o mercúrio é biotransformado na microbiota presente nesse sistema em espécies orgânicas, resultando, principalmente, na formação de metilmercúrio (MeHg) (Ekstrom and Morel 2008). A formação deste radical orgânico de mercúrio é de importância para a toxicologia, devido os compostos orgânicos de mercúrio possuírem uma maior capacidade de acumulação em tecidos quando comparada com a forma inorgânica (Harris, Pickering et al. 2003; Syversen and Kaur 2012). Sendo assim, ocorre um aumento na ingestão deste xenobiótico através da alimentação, de acordo com o aumento do nível trófico da cadeia alimentar, um evento denominado biomagnificação (Paez, Betancourt et al. 2012; Pouilly, Rejas et al. 2013). Como exemplo, é possível observar que peixes carnívoros apresentam uma concentração maior de mercúrio quando comparados com espécies não carnívoras (Pouilly, Rejas et al. 2013; Rodriguez Martin-Doimeadios, Berzas Nevado et al. 2014). Desta forma, o homem se mostra mais vulnerável à contaminação mercurial por estar no topo da cadeia trófica.

A presença constante de componentes na dieta, contendo este poluente, resulta em um quadro crônico de intoxicação, o qual é caracterizado pela exposição a baixas concentrações deste xenobiótico por um longo intervalo de tempo. (Hong, Kim et al. 2012). Apesar de haver sido relatada a presença do mercúrio em outros componentes da

dieta, o consumo de pescado contaminado com este metal é descrito como a principal fonte de intoxicação por este metal pesado (Li, Wang et al. 2010). Portanto, a exposição humana está diretamente relacionada ao nível de mercúrio encontrado na alimentação e na frequência do consumo destes peixes contaminados (Santos, Jesus et al. 2000; Pinheiro, Macchi et al. 2008).

Nesse contexto, a Região Amazônica se destaca por possuir todos os componentes necessários para a manutenção do ciclo biogeoquímico do mercúrio e a exposição humana a este xenobiótico (Berzas Nevado, Rodriguez Martin-Doimeadios et al. 2010; Rodriguez Martin-Doimeadios, Berzas Nevado et al. 2014). Os primeiros registros de despejo deste metal pesado são relacionados ao período colonial e pós-colonial na América do Sul, onde se estima a liberação de quase 200 mil toneladas de mercúrio pelos portugueses e espanhóis (Nriagu 1993), embora não seja conhecido ao certo, quanto deste total foi despejado na Região Amazônica. Ainda, a presença de quantidades significativas de ouro no ambiente amazônico resultou novamente em uma intensa extração aurífera, um evento que ficou conhecido como “corrida do ouro”. (Wasserman, Hacon et al. 2003). Estima-se que durante este período de intensa atividade aurífera (entre 1980-1990), foram despejadas, no meio ambiente, mais de duas mil toneladas de mercúrio (Wasserman, Hacon et al. 2003).

Por outro lado, outros autores defendem que a presença do mercúrio no solo amazônico poderia ter uma origem natural (revisado por Warsermann et al., 2001). Esta teoria surgiu em meados da década de 1990, a partir de avaliações químicas do solo amazônico. Estas análises revelaram uma presença elevada de mercúrio formando complexos com ferro (Roulet 1995). A partir desses dados, foi calculado que a quantidade presente de mercúrio nos solos amazônicos é muito superior ao que estima ter sido liberado neste ambiente através da extração aurífera (Roulet 1996). Contudo, é importante ressaltar que para estas conclusões, foram analisadas amostras cuja coleta foi realizada de forma muito pontual e os cálculos não levaram em consideração a heterogeneidade do solo amazônico (Wasserman 2001).

Independente da origem do mercúrio na Região Amazônica, é possível observar a presença deste metal pesado acima dos limites de segurança definidos para peixes (0,5 µg/g, peso unido) até mesmo em espécimes comercializados em Belém (capital do estado do Pará), uma região afastada das zonas de garimpo (Berzas Nevado, Rodriguez

Martin-Doimeadios et al. 2010; Rodriguez Martin-Doimeadios, Berzas Nevado et al. 2014).

Dessa forma, a presença deste metal pesado constitui um risco à saúde humana, uma situação que pode ser agravada em regiões em que o peixe constitui a principal fonte proteica, como é o caso das comunidades que residem às margens dos rios, conhecidas como “ribeirinhas”. Essas comunidades apresentam um estilo de vida comum, no qual a principal fonte de renda é a pesca, sendo esta também a principal responsável pela fonte proteica da dieta (Pinheiro, Oikawa et al. 2006).

Todavia, o monitoramento da exposição do mercúrio, nessas populações, vem sendo acompanhado nas últimas décadas. (Berzas Nevado, Rodriguez Martin-Doimeadios et al. 2010). Estudos avaliando a quantidade deste metal pesado em amostras biológicas dessas populações ribeirinhas, relataram a presença deste xenobiótico em altas concentrações, chegando até 25 ppm (partes por milhão) na década de 1990 (Berzas Nevado, Rodriguez Martin-Doimeadios et al. 2010). Dessa forma, é possível observar que essas populações apresentavam quantidades de mercúrio bem acima do limite de segurança proposto pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que é de 10 ppm para o cabelo (WHO 1990).

Afortunadamente, ao longo das últimas décadas, tem sido observada uma redução nos níveis de mercúrio nas amostras biológicas das populações ribeirinhas da região do Tapajós (uma das principais regiões amazônicas afetadas pela exposição mercurial), chegando próximo ao limite de segurança proposto pela Organização Mundial de Saúde (revisado por Berzas Nevado, Rodriguez Martin-Doimeadios et al., 2010). Cabe destacar que esses limites de segurança foram estabelecidos baseando-se em episódios agudos de intoxicação humana (Minamata, Iraque, etc.).

Por outro lado, as consequências de uma exposição crônica a níveis relativamente baixos de mercúrio, como as observadas na região do rio Tapajós, são pouco conhecidas (Berzas Nevado, Rodriguez Martin-Doimeadios et al. 2010). Assim, na última década vem crescendo a discussão se esses limites de segurança estabelecidos pela OMS seriam adequados, especialmente considerando que a exposição prolongada a doses relativamente baixas de mercúrio é capaz de produzir alterações subclínicas neurocomportamentais (relacionadas principalmente à coordenação motora) e alterações genotóxicas (Dourson, Wullenweber et al. 2001; Carta, Flore et al. 2003; Auger,

Kofman et al. 2005; Silva-Pereira, Cardoso et al. 2005; Crespo-Lopez, Lima de Sa et al. 2007; Crespo-Lopez, Macedo et al. 2011).

## **1.2 Toxicologia da intoxicação mercurial**

### **1.2.1 Toxicocinética e efeitos no sistema nervoso central**

Durante o ciclo biogeoquímico do mercúrio, é possível observar que a conversão do mercúrio em metilmercúrio é uma etapa fundamental para que ocorra o processo de biomagnificação deste metal. As formas orgânicas apresentam uma maior toxicidade quando comparadas com a forma inorgânica. Além disso, a maior fração do mercúrio encontrada em amostras está na forma de metilmercúrio (Berzas Nevado, Rodriguez Martin-Doimeadios et al. 2010). Quando comparado ao mercúrio metálico, o MeHg apresenta uma maior facilidade de atravessar barreiras biológicas, conferindo a este composto uma alta absorção e distribuição (Syversen and Kaur 2012). Interessantemente, as características químicas do metilmercúrio também conferem a este composto uma ampla distribuição no organismo e o longo tempo de meia vida, aproximadamente 60-70 dias (Brunton 2007; Syversen and Kaur 2012). A afinidade deste xenobiótico por grupamentos sulfidrila (-SH) é responsável pela ligação deste composto às proteínas plasmáticas e teciduais, o que resulta em uma facilidade na distribuição e de permanência deste metal no organismo (Brunton 2007).

Após alcançar o SNC, observa-se o início de uma série de eventos deletérios, no qual as células gliais apresentam um papel fundamental. O papel fisiológico das células gliais envolve a manutenção da concentração normal de íons e do pH, prevenção contra o aumento de neurotransmissores (por exemplo, glutamato), produção de fatores neurotróficos para divisão, diferenciação neuronal e fagocitose de restos celulares (debris) e mediação da resposta imune no SNC (Shanker, Syversen et al. 2003; Ni, Li et al. 2012). Este tipo celular, apresenta uma função protetora fundamental durante a intoxicação por MeHg (Shanker, Syversen et al. 2003). Inclusive, esse suporte pode ser detectado *in vitro* durante o cultivo simultâneo de células gliais e neuronais (cocultura ou cultura mista), em que é observado um aumento na resistência neuronal ao MeHg (Morken, Sonnewald et al. 2005).

As células gliais apresentam os astrócitos e microglias como componentes principais, (Ni, Li et al. 2012) e durante a intoxicação mercurial, algumas características podem ser observadas em ambos os tipos celulares (Ni, Li et al. 2012). Essas particularidades incluem o depósito de mercúrio intracelular, formação de eventos oxidativos o aumento na expressão do fator Nrf-2 (relacionado à expressão de enzimas antioxidantes). (Nevado, Martin-Doimeadios et al. 2011; Ni, Li et al. 2011).

Além disso, é conhecido que o MeHg é capaz de alterar a reposta dos astrócitos em relação aos níveis de glutamato, aumentando o nível deste neurotransmissor na fenda sináptica, o que resulta no quadro de excitotoxicidade neuronal (Shanker, Syversen et al. 2003). Este evento, é resultado da ação do MeHg sobre o sistema de captação do glutamato originando uma inibição da captação e ao mesmo tempo um aumento na liberação deste neurotransmissor (Aschner, Du et al. 1993).

Também é observado em células gliais uma ação inibitória do MeHg na captação de precursores para a síntese de glutamato (Shanker and Aschner 2001). É importante destacar que em células mamíferas, este composto é responsável por 90% dos tióis livres, não ligados às proteínas, e uma redução na síntese deste composto deixa as células mais vulneráveis à ação do MeHg (Anderson and Meister 1983; Belletti, Orlandini et al. 2002). Este mecanismo de ação pode estar associado com o fato de que os distúrbios celulares observados em células gliais ocorrem antes dos danos em células neuronais, durante a intoxicação com MeHg (Shanker and Aschner 2001).

De fato, após a exposição ao MeHg, foi observado que neurônios se destacam dos outros tipos celulares por reterem uma menor quantidade de metal pesado no interior celular (Charleston, Bolender et al. 1994) sendo essa característica também observada tanto em estudos conduzidos *in vitro* quanto *in vivo* (Charleston, Bolender et al. 1994; Nevado, Martin-Doimeadios et al. 2009). Como também é atribuído às células gliais, essa capacidade de acumulação de MeHg após a exposição, ocorre tanto em células astrocitárias quanto em microglias (Nevado, Martin-Doimeadios et al. 2009; Ni, Li et al. 2011). Em um cérebro adulto, esses eventos resultam em danos tissulares e perda neuronal no hipocampo e cerebelo, além de algumas áreas bem específicas do córtex cerebral. Estas regiões são denominadas “áreas primárias do córtex cerebral” e o comprometimento dessas estruturas afetam diretamente os sistemas visual, auditivo, somático sensorial e motor (do Nascimento, Oliveira et al. 2008).

A exposição aguda a altas doses de metilmercúrio está associada a dores de cabeça, tremor, redução da atividade cognitiva, constrição do sistema visual, distúrbios nos sistemas somático sensorial (perestésias), auditivo, ataxia cerebelar e deficiência na memória (do Nascimento, Oliveira et al. 2008). Em contrapartida, a exposição crônica é caracterizada por sintomas aparentemente mais brandos, incluindo tremores (principalmente em membros superiores), distúrbios emocionais (irritabilidade, timidez e ansiedade), insônia, perda de memória e déficit cognitivo (Brunton 2007).

### **1.2.2 Toxicodinâmica do mercúrio: eventos celulares e moleculares**

Os sintomas apresentados após a exposição ao metilmercúrio estão usualmente associados à degeneração celular em regiões cerebrais. Uma vez que este xenobiótico se acumula no tecido cerebral, é desencadeada uma série de eventos nocivos, que dependendo da intensidade resultam em processos de neurodegeneração. Apesar de os mecanismos celulares pelos quais o mercúrio exerce e os efeitos ainda não terem sido completamente elucidados, algumas ações têm sido associadas à exposição mercurial como o desequilíbrio nos níveis de neurotransmissores excitatórios, alterações na homeostase dos íons cálcio, desarranjo nos microtúbulos, falência da cadeia respiratória, formação de radicais livres, redução da capacidade antioxidante celular, estresse oxidativo e genotoxicidade (do Nascimento, Oliveira et al. 2008; Crespo-Lopez, Macedo et al. 2009)

Assim, o estresse oxidativo parece ter uma relação direta na formação de eventos genotóxicos. Este evento é capaz de promover a oxidação de biomoléculas como proteínas, lipídeos e DNA (Catala 2006; Negi, Pande et al. 2014; Ge, Yan et al. 2015). O mecanismo exato que o MeHg promove e sua ação genotóxica ainda não é completamente conhecido (Crespo-Lopez, Macedo et al. 2009).

Além da interação com microtúbulos, o estresse oxidativo e a interação direta do metal pesado com os ácidos nucleicos são eventos que podem estar subjacentes à ação genotóxica deste poluente (Crespo-Lopez, Macedo et al. 2009). Dentre os efeitos promovidos pelo estresse oxidativo, dois são especialmente importantes para indicar esta via como participante na formação de eventos genotóxicos dos compostos contendo mercúrio: a oxidação direta das bases nucleicas e a mudança conformacional das proteínas do sistema de reparo do DNA (Crespo-Lopez, Macedo et al. 2009).

Entretanto, outros eventos observados durante a exposição ao MeHg também

são apontados como possíveis mecanismos moleculares do estresse genotóxico, como, por exemplo, a interação do mercúrio com os microtúbulos do citoesqueleto celular (Crespo-Lopez, Macedo et al. 2009). Este fato pode estar intimamente relacionado com a afinidade deste metal pesado com os grupamentos sulfidrilas presentes na tubulina, componente monomérico dos microtúbulos, uma vez que este metal apresenta um tropismo por este tipo de molécula (Farina, Aschner et al. 2011). A associação deste xenobiótico aos microtúbulos resulta tanto na inibição do agrupamento dos monômeros de tubulina quanto na despolimerização dos filamentos já formados, inclusive em células do SNC (Sager, Doherty et al. 1983). Este evento se torna especialmente importante uma vez que os microtúbulos possuem um importante papel no desenvolvimento do sistema nervoso, atuando ativamente no processo de proliferação celular (do Nascimento, Oliveira et al. 2008).

Os microtúbulos apresentam um papel fundamental no ciclo celular, especialmente, durante a divisão dos cromossomos entre as duas células filhas. Portanto, é provável que um composto químico que tenha uma ação deletéria nestes filamentos do citoesqueleto resulte em erros na divisão do DNA. De fato, é possível observar um efeito genotóxico deste metal em células originárias do sistema nervoso central, com exposições que normalmente não induziriam alterações comportamentais (Crespo-Lopez, Lima de Sa et al. 2007; Crespo-Lopez, Macedo et al. 2011).

### **1.2.3 Toxicologia mercurial *in vitro***

Devido à diversidade de mecanismos moleculares subjacentes aos eventos deletérios do MeHg no SNC, a avaliação *in vitro* surge como uma importante ferramenta de estudo devido a possibilidade de avaliar um tecido ou tipo celular isoladamente (Ehrich and Veronesi. 1999). Em toxicologia, os testes *in vitro* utilizando células de mamíferos têm normalmente dois propósitos: investigar as formas e os mecanismos relacionados à ação biológica de compostos químicos e descrever novas moléculas químicas com potencial neurotóxico. Este modelo de avaliação apresenta vantagens como a possibilidade de conduzir os experimentos em um ambiente uniforme e altamente controlado, além de reduzir o número de animais sacrificados, o tempo e os custos dos experimentos (Giordano and Costa 2011).

Estes experimentos podem ser conduzidos com culturas primárias (tecido obtido diretamente de um doador, normalmente roedores) ou utilizando linhagens celulares

imortalizadas. Para a avaliação em toxicologia, os dados obtidos com esses modelos apresentam uma boa correlação tanto entre si quanto com os observados em modelos *in vivo* (Clemedson and Ekwall 1999; Ekwall 1999). O uso de linhagens celulares apresenta vantagens como possuir uma população homogênea de células, o cultivo ser rápido e fácil (Giordano and Costa 2011). Alguns tipos celulares podem ser induzidos a se diferenciar em um tipo mais específico, entretanto, estes novos fenótipos podem não exibir o mesmo observado em culturas primárias (Giordano and Costa 2011).

Para os estudos envolvendo MeHg, é observado o uso frequente de algumas linhagens de neuroblastoma e glioma como modelos para avaliação da ação tóxica deste metal pesado no SNC. Dentre as linhagens neuronais mais frequentemente utilizadas encontram-se B103, SH-5Y5 e PC12 (Crespo-Lopez, Lima de Sa et al. 2007; Zhang, Xu et al. 2009; Petroni, Tsai et al. 2012). Entretanto, é importante destacar que já foram registradas diferenças de sensibilidade ao MeHg entre linhagens de células neurais (Mundy, Radio et al. 2010). Por outro lado, dentre as linhagens de células gliais frequentemente utilizadas, podem ser destacadas U373, N9 e principalmente C6 (Chang 2007; Crespo-Lopez, Lima de Sa et al. 2007; Costa-Malaquias, Almeida et al. 2014).

Apesar de o mecanismo de neurotoxicidade do MeHg ainda não ser completamente conhecido, nas últimas décadas, têm sido descritos novos alvos moleculares deste metal com o uso de estudos *in vitro*, como, por exemplo, a formação de eventos genotóxicos em células do SNC após exposição a concentrações relativamente baixas de MeHg (Crespo-Lopez, Lima de Sa et al. 2007).

### **1.3 Genotoxicidade e distúrbios de proliferação celular**

As consequências da exposição humana a agentes genotóxicos têm sido relacionadas principalmente a dois processos: teratogênese e carcinogênese (Crespo-Lopez, Macedo et al. 2009). Estes dois processos estão relacionados com o surgimento de problemas ao organismo decorrente de alterações na informação genética levando à má formação da prole ou surgimento de tumores no próprio indivíduo respectivamente. As modificações no genoma celular são realizadas por compostos mutagênicos e esses agentes podem agir diretamente com o DNA celular ou através de mecanismos indiretos de genotoxicidade (Kirsch-Volders, Vanhauwaert et al. 2003; Magdolenova, Collins et al. 2014).

Dentre os fatores capazes de promover lesões diretamente ao DNA são descritos alguns tipos de vírus, fotossensibilização e compostos químicos com capacidade de ligação direta ou de reagir quimicamente com o DNA (Valko, Rhodes et al. 2006; Georgakilas, Mosley et al. 2010; Epe 2012). Por outro lado, também é possível observar a ocorrência de eventos genotóxicos através de interações com intermediários, ou seja, alvos diferentes da molécula de DNA. Essas vias são denominadas de forma genérica como mecanismos indiretos de genotoxicidade (Kirsch-Volders, Vanhauwaert et al. 2003). Esse grupo intermediário de biomoléculas é constituído principalmente por proteínas relacionadas com os sistemas enzimáticos de reparo do DNA e antioxidante, sistemas de controle do ciclo celular e apoptose ou componentes do citoesqueleto relacionados à mitose (Kirsch-Volders, Vanhauwaert et al. 2002; Kirsch-Volders, Vanhauwaert et al. 2003; Magdolenova, Collins et al. 2014; Weitzman and Weitzman 2014).

Uma vez que o sistema biológico é exposto ao agente mutagênico, são observadas agressões ao DNA que podem variar na intensidade. Dessa forma, são gerados diferentes tipos de danos que variam desde quebras na molécula de DNA ou trocas de nucleotídeos até lesões mais intensas envolvendo alterações cromossômicas de caráter numérico ou estrutural (Mateuca, Lombaert et al. 2006). Uma alteração estrutural cromossômica está relacionada com a perda da integridade resultante de uma quebra cromossômica (efeito clastogênico). Em contrapartida, uma alteração numérica está relacionada ao aumento ou redução no número de cromossomos (efeito aneugênico). Dessa forma, os agentes mutagênicos podem ser classificados em clastogênicos ou aneugênicos, caso apresentem potencial para induzir alterações estruturais ou numéricas, respectivamente (Mateuca, Lombaert et al. 2006).

Para avaliar o potencial mutagênico dos xenobióticos no organismo foram desenvolvidos ensaios citogenéticos capazes de detectar danos ao material genético nuclear, os quais são chamados de biomarcadores de danos ao DNA (Fenech 2002; Fenech 2002; Azqueta and Collins 2013). Assim, podem ser utilizados testes como o ensaio do cometa que avalia quebras na cadeia do DNA que resultam em fragmentação, ou testes capazes de identificar danos em níveis cromossomais como quebras ou perda da molécula de cromossomo, como a avaliação de micronúcleos. Além disso, o uso concomitante dos ensaios do cometa e de micronúcleos já demonstrou ter uma alta

especificidade para distinguir compostos genotóxicos e não genotóxicos com alta especificidade e sensibilidade (Le Hegarat, Mourot et al. 2014).

O ensaio do cometa possui tal nome devido às imagens produzidas do material genético celular, parecidas com corpos celestiais. Dentre as aplicabilidades mais comuns deste ensaio, encontra-se a avaliação genotóxica de xenobióticos encontrados no meio ambiente (Azqueta and Collins 2013). Esse teste é capaz de revelar, de forma individualizada para cada célula, o aumento no número de quebras que a molécula do DNA sofre durante a exposição ao poluente (Azqueta and Collins 2013). Quanto mais dano a molécula de DNA, durante o tratamento, maior é a fragmentação observada, e consequentemente aumento da quantidade de material genético na região da “cauda do cometa”.

Porém, para avaliar danos envolvendo danos estruturais ou numéricos, é utilizado o ensaio de micronúcleos ou (CBMN) (do inglês, *cytokinesis-block micronucleus assay*) (Fenech 2002; Fenech 2007). Esse teste é uma importante ferramenta para avaliação da instabilidade do genoma celular em nível molecular (Fenech 2002). Os parâmetros de morte celular são complementares aos de genotoxicidade, uma vez que o dano ao genoma está relacionado com uma menor taxa de proliferação celular e indução de morte (Lukas, Lukas et al. 2004). Interessantemente, o ensaio de micronúcleo também fornece um parâmetro associado à proliferação, chamado de Índice de Divisão Nuclear (Fenech 2007). Este indicador leva em consideração a proporção de células binucleadas fornecendo informações sobre a taxa de divisão celular através do sucesso no ciclo celular.

Nas últimas décadas, as alterações na técnica do ensaio de micronúcleos evoluíram permitindo a avaliação de biomarcadores relacionados à quebra e/ou perda cromossômica, rearranjo ou não disjunção cromossômica ou citostase, entre outros (Fenech 2007). Este último indicador, leva em consideração a proporção de células binucleadas fornecendo informações sobre a taxa de divisão celular através do sucesso do ciclo celular.

#### **1.4 Ciclo celular: controle e resposta ao dano no DNA**

A principal função do ciclo celular é a formação de uma nova célula, e para isso é necessário a duplicação exata do genoma celular e a divisão correta do material genético

entre duas células novas (Lukas, Lukas et al. 2004). Além do material genético, é necessário que a células dupliquem também organelas e biomoléculas. O ciclo celular é dividido em fases, denominadas G1, S, G2 e M, cada uma das quais são responsáveis por uma tarefa específica; e o controle de cada etapa do ciclo realizado por enzimas denominadas de cinases dependentes de ciclinas (CDKs) e suas respectivas ciclinas (Duronio and Xiong 2013). (Fig. 2).

Em organismos multicelulares, as células diferenciadas estão em um estágio metabolicamente ativo exercendo funções especializadas, onde não é observada atividade mitótica (fase G0). Sendo que, algumas células em G0 após serem estimuladas por agentes mitóticos, podem retornar ao ciclo celular, entrando na fase G1 (Duronio and Xiong 2013).

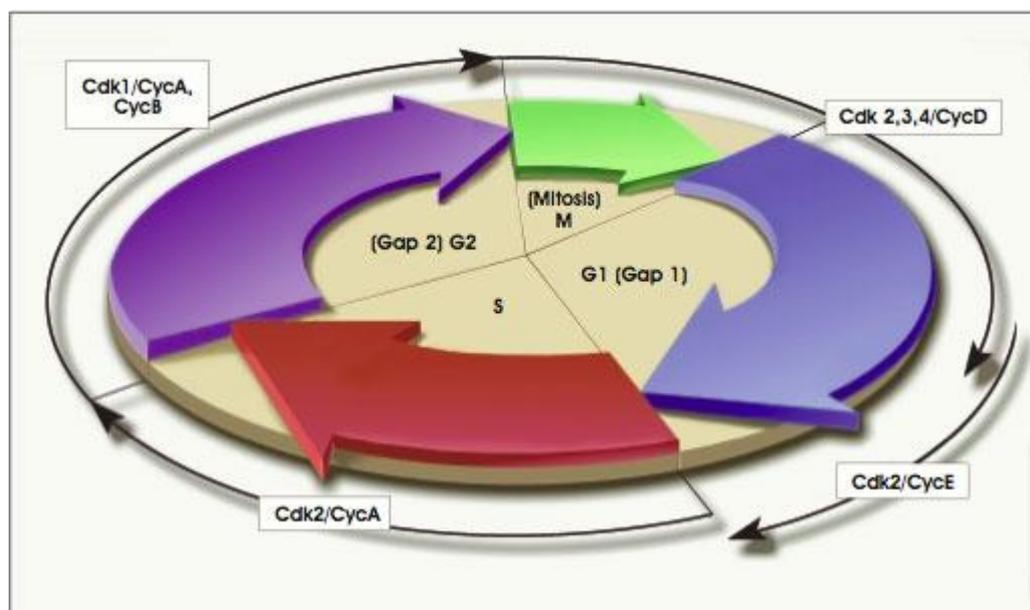


Fig. 2: Controle do ciclo celular. Fonte: stemcells.nih.gov.

O comprometimento celular com o evento de divisão ocorre na fase G1 do ciclo de divisão celular de uma célula de mamífero, nesse sentido, a entrada na fase S representa um ponto em que não há retorno e ocorre o completo envolvimento com o ciclo e a divisão celular. Na fase G1 é observado o controle por três CDKs distintas CDK2, CDK4 e CDK6. A primeira destas é regulada pela ciclina *E* enquanto que as outras duas são controladas por ciclina *D*. Durante o ciclo celular, os níveis de CDK2, CDK4 e CDK6 não alteram, entretanto, nestas enzimas sua atividade é regulada através

de proteínas inibidoras ou dos níveis de ciclinas no interior celular (Duronio and Xiong 2013).

Em mamíferos, a ciclina *D* parece ter uma participação pequena na regulação da transição G1/S (Malumbres, Sotillo et al. 2004). Por outro lado, a regulação dos níveis de ciclina *E* se mostra fundamental para a progressão do ciclo celular, e a ativação de CDK2 sinaliza o começo da replicação do DNA (Massague 2004). É descrito, então, a formação do complexo de CDK2 com a ciclina *E*; e posteriormente com a ciclina *A* (Massague 2004; Duronio and Xiong 2013).

A replicação do genoma celular é uma tarefa a ser concluída na fase S. O início do processo de replicação é coordenado pela ativação de CDK2 e está relacionada com o recrutamento de enzimas como DNA helicase, primase e polimerase pelo complexo pré-replicative, promovendo o desenrolamento e a replicação da dupla hélice do DNA (Massague 2004). Este evento deve ocorrer somente uma vez a cada ciclo de divisão celular, e este fato pode estar associado ao observado em células em proliferação que expressam um pico de ciclina *E* na transição G1/S e após este momento, está uma baixa concentração ou ausente (Duronio and Xiong 2013).

Após a duplicação do DNA celular, é iniciado o segundo estágio de pausa, (fase G2). O maior controle do ciclo celular, nesta etapa, é observado ao final de G2 pela CDK1, na qual forma o complexo CDK1-ciclina B para sinalizar a entrada no estágio de mitose (fase M) (Duronio and Xiong 2013). Assim, como as CDK2, responsável pela transição G1/S, a CDK1 mantém a sua concentração constante durante todo o ciclo celular (Deckbar, Jeggo et al. 2011). Dessa forma, é observado que varia apenas os níveis de ciclina *B* cujo pico máximo é ao final de G2 (Fung and Poon 2005).

O último estágio do ciclo celular é a fase M, a qual pode ser dividida em dois momentos: mitose ou cariocinese (divisão do núcleo) e citocinese (separação em duas filhas). A mitose celular apresenta cinco estágios: Prófase, Pró-metáfase, Metáfase, Anáfase e Telófase. O material genético replicado na fase S é condensado na forma de cromossomos no início da mitose (Prófase), e em seguida, é alocado na região equatorial do fuso mitótico celular (Metáfase). O fuso mitótico é a maquinaria responsável pela segregação dos cromossomos durante a mitose, o qual é composto por centenas de proteínas (Vicente and Wordeman 2015).

Apesar de algumas diferenças, todos os eucariotas estudados até hoje utilizam o sistema microtúbulos e cinesinas para segregação dos cromossomos (Wickstead, Gull et al. 2010). O estágio em que ocorre a separação é denominado Anáfase, resultando na separação das cromátides-irmãs a partir do centro do eixo em direção aos pólos celulares (Anáfase A), seguido do alongamento do fuso mitótico (Anáfase B). A última etapa da cariocinese é a Telófase, a qual é caracterizada pela formação do envelope nuclear envolvendo o conjunto de cromossomos filhos (Alberts 2004). O final da fase M coincide com o final do ciclo celular, o qual é denominado Citocinese. Esta etapa é caracterizada pela formação do anel contrário de actina e miosina (na região equatorial) e resulta na formação de duas células filhas (Fig. 3).

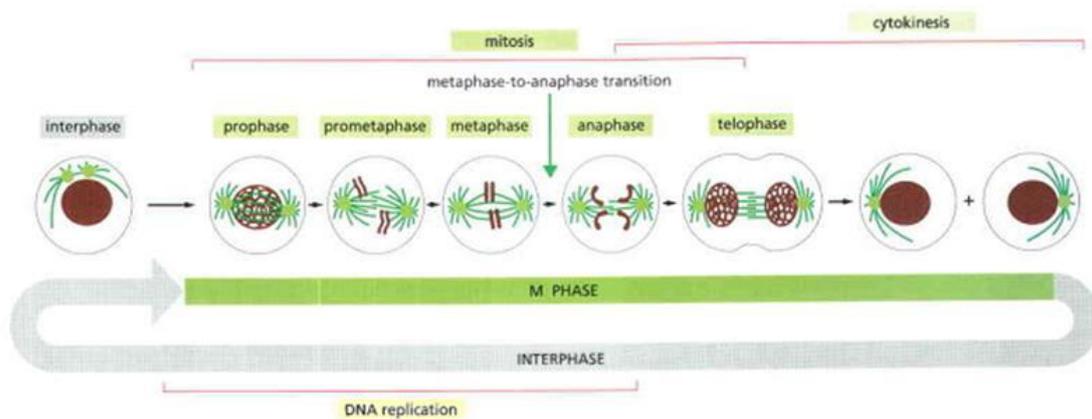


Fig 3: Eventos da divisão celular eucariótica. Adaptado de (Alberts 2004)

Estes eventos acima descritos ocorrem em situação normal, no qual não há uma exposição a compostos químicos capazes de atuar sobre o genoma ou citoesqueleto celular. Uma vez que a integridade da informação genética é fundamental para que a célula desempenhe a sua função no organismo, os sistemas biológicos contam com um conjunto de mecanismos para reverter os danos ao genoma. Este aparato é denominado de sistema de reparo do DNA, e apresenta diversas vias para restaurar o material genético os quais são ativados seletivamente de acordo com a natureza do dano causado (Ermolaeva, Dakhovnik et al. 2015). A importância deste sistema para o organismo é observado, principalmente, em algumas síndromes congênitas, cujo mau funcionamento ou ausência do sistema de reparo está associado a comprometimento no

desenvolvimento, susceptibilidade ao surgimento de câncer e envelhecimento precoce (Schumacher, Garinis et al. 2008; Wolters and Schumacher 2013).

Porém, o dano ao DNA não ativa somente a maquinaria responsável pelo reparo ao DNA. Outros eventos são observados, como a estagnação do ciclo de divisão celular (Ermolaeva, Dakhovnik et al. 2015). Esta parada em determinadas etapas do ciclo de divisão celular pode ocorrer até que o conteúdo genético esteja restaurado. Além disso, uma importante característica deste evento é a pausa em momentos bem definidos, denominados pontos de checagem (do inglês, *checkpoints*). Os pontos de checagem estão associados à conclusão de uma determinada etapa no ciclo e este controle evita o avanço sem a conclusão de uma fase anterior (Alberts 2004).

Os pontos de checagem formam um complexo constituído de sensores de dano ao DNA, moléculas sinalizadoras e várias vias efetoras enzimáticas. Durante a ação dessas enzimas de reparo é observado um aprisionamento do ciclo celular nas fases G1, S ou G2. De fato, no ciclo celular há pontos de checagem (ou rede de pontos de checagem) relacionados ao dano no DNA, os quais são importantes para prevenir que células com o genoma modificado se proliferem, dando a oportunidade de reparo (Bartek and Lukas 2007). Por outro lado, é possível observar também um ponto de checagem que, durante a Metáfase é acionado, caso não ocorra ligação correta dos cromossomos ao fuso mitótico (Jordan and Wilson 2004), causando um aprisionamento nesse estágio, no qual é denominado como aprisionamento mitótico (Jordan and Wilson 2004; Parker, Kavallaris et al. 2014) sofrem uma rápida morte (Jordan and Wilson 2004).

Para evitar a entrada na fase S com o genoma danificado, resultando em uma replicação do DNA defeituosa, existe um ponto de checagem no final do estágio G1. A presença de lesões no material genético aciona enzimas cinases cujos substratos interferem na maquinaria do ciclo celular causando um aprisionamento em G1 (Lukas, Lukas et al. 2004; Nojima 2004). Além disso, a retenção nesta etapa do ciclo é associada à síntese de uma proteína denominada P53. (Lukas, Lukas et al. 2004; Rodier, Campisi et al. 2007). O prolongamento ou a permanência neste ponto de checagem devido a danos ao DNA está relacionado com a indução de morte celular por apoptose (Lukas, Lukas et al. 2004; Blagosklonny 2007).

Assim como na fase G1, o estágio S possui um ponto de checagem sensível aos insultos no DNA. Entretanto, diferentemente do ponto encontrado em G1, a regulação

em S é menos intensa sendo observado apenas um transitório e reversível atraso no ciclo celular nesta fase (Lukas, Lukas et al. 2004). No entanto, é importante ressaltar que a falha nos pontos de checagem presentes nas fases G1 e S é particularmente nociva devido ao surgimento de aberrações cromossômicas e outras mutações no genoma podendo formar síndromes genéticas ou doenças como câncer (Nojima 2004).

Outro importante ponto de controle do ciclo celular se constitui na fase G2, no qual se encontra o ponto de checagem G2 também denominado G2/M. Este ponto de controle impede o início da mitose, caso o genoma celular possua algum dano adquirido durante o estágio G2 ou herdado de etapas anteriores (Lukas, Lukas et al. 2004). Uma vez que esta etapa é superada, ocorre a entrada no estágio de Prófase e nesse caso a célula está comprometida com a divisão celular (Rieder 2011). Assim, como observado no ponto de checagem em G1, o aprisionamento por danos ao DNA no ponto de controle em G2 atua através da ação de enzimas cinases e transcrição de fatores proteicos (Lukas, Lukas et al. 2004; Rieder 2011).

Na última etapa do ciclo celular também pode ocorrer uma retenção, mais especificamente, na transição entre a Metáfase e Anáfase (Jordan and Wilson 2004). Este fato também é chamado de aprisionamento mitótico e pode ocorrer após a ação de um xenobiótico diretamente sobre o citoesqueleto celular (Jordan and Wilson 2004; Parker, Kavallaris et al. 2014). Durante a mitose, os microtúbulos formam fusos responsáveis pela separação dos cromossomos. Dessa forma, drogas com potencial de ligação a estas proteínas provocam um aprisionamento mitótico promovendo rápida morte celular de células em divisão (Jordan and Wilson 2004; Parker, Kavallaris et al. 2014).

A perda da viabilidade ou morte celular após o processo de genotoxicidade envolve diversas vias de sinalização, as quais convergem para apenas dois destinos: necrose ou apoptose. Estas rotas parecem ser ativadas pela expressão de P53, uma proteína que surge em respostas ao dano ao DNA (Reinhardt and Schumacher 2012; Elkholi and Chipuk 2014)

O processo de necrose normalmente ocorre após a exposição a uma situação extrema, tais como, mudança de temperatura, de pH ou estresse mecânico. Esse evento pode ocorrer no organismo em situações como neurodegeneração, isquemia ou infecção, entre outras (Nikoletopoulou, Markaki et al. 2013). Uma característica marcante deste

tipo de morte celular é o colapso energético com rápida perda da capacidade de produção de ATP (Elkholi and Chipuk 2014).

É possível diferenciar morfológicamente se um processo degenerativo ocorreu por necrose ou apoptose, uma vez que cada via de morte celular apresenta características próprias. Durante a necrose, é observado um inchaço das organelas celulares, que pode ser acompanhada da lise à membrana plasmática. Caso esta membrana não seja rompida, a permeabilidade é rapidamente perdida, assim, juntamente com o formato celular. O núcleo celular tem uma característica distendida e permanece aparentemente intacto (Nikoletopoulou, Markaki et al. 2013)

Por outro lado, a morte celular por apoptose é um processo programado pelo qual o corpo elimina as células não necessárias ou potencialmente perigosas. Há duas rotas responsáveis subsidiando este evento, denominadas extrínseca e intrínseca (Nikoletopoulou, Markaki et al. 2013). A via extrínseca é iniciada pela ativação de receptores de membrana por ligantes extracelulares, enquanto que a via intrínseca é desencadeada por fatores internos, surgimento de fatores estressantes no interior celular ou dano ao genoma (Nikoletopoulou, Markaki et al. 2013).

O excesso de mutações no conteúdo genético resulta na expressão de p53 e pode iniciar o processo de morte celular por apoptose (Elkholi and Chipuk 2014). O resultado da ativação da via apoptótica culmina com a ativação de proteases denominadas caspases, que atacam a maquinaria proteica da célula. Além disso, é observada a condensação da cromatina e fragmentação do DNA (Nikoletopoulou, Markaki et al. 2013). Essas características morfológicas e funcionais são fundamentais para distinguir a apoptose do outro tipo de morte celular, a necrose.

Portanto, todas as respostas desencadeadas após o estresse genotóxico, como atraso no ciclo celular ou indução de morte estão relacionadas com a expressão gênica de fatores proteicos (Rodier, Campisi et al. 2007; Reinhardt and Schumacher 2012; Nikoletopoulou, Markaki et al. 2013). De fato, esse é um importante mecanismo na prevenção do desenvolvimento de carcinogênese (Rodier, Campisi et al. 2007). Este fato é especialmente importante, pois alterações em genes que controlam a morte ou proliferação celular podem resultar na proliferação descontrolada de células e carcinogênese (Rodier, Campisi et al. 2007; Reinhardt and Schumacher 2012).

## 1.5 Genotoxicidade do Metilmercúrio

Embora a exposição a metais pesados esteja associada à carcinogênese, dentre estes poluentes, parece haver uma diferença no potencial carcinogênico. Nesse sentido, a formação de neoplasias está mais relacionada aos metais arsênio, crômio, cádmio e níquel; enquanto o chumbo e o mercúrio são classificados como “fracos carcinogênicos” (Martinez-Zamudio and Ha 2011; Koedrith, Kim et al. 2013). A avaliação do potencial genotóxico dos compostos contendo mercúrio mostra que metilmercúrio é o que apresenta o maior potencial genotóxico (Crespo-Lopez, Macedo et al. 2009). Este fato se torna especialmente importante, uma vez que esta é a principal forma deste poluente, encontrado em peixes e nos seres humanos, expostos cronicamente a este metal pesado.

Os estudos que avaliam o potencial genotóxico do metilmercúrio são majoritariamente conduzidos em culturas de linfócitos. Estes constituem importante modelo de estudo, principalmente no biomonitoramento de populações cronicamente expostas a este metal pesado (Berzas Nevado, Rodriguez Martin-Doimeadios et al. 2010; Crespo-Lopez, Macedo et al. 2011). Interessantemente, a genotoxicidade relacionada à exposição crônica, já foi descrita até mesmo em indivíduos que apresentaram níveis de metais dentro dos limites de segurança preconizados pela OMS (Queiroz, Bincoletto et al. 1999; Amorim, Mergler et al. 2000).

Entretanto, o órgão-alvo do metilmercúrio é o SNC, no qual existe um acúmulo preferencial deste metal pesado. Neste contexto, as células gliais se destacam por possuir um papel fundamental em casos de intoxicação mercurial (protegendo os neurônios em virtude da retirada desse metal do meio extracelular). Em um SNC adulto, as células gliais atuam na homeostase ajudando na manutenção dos níveis de neurotransmissores, liberação de fatores tróficos e retirada do meio extracelular de componentes potencialmente nocivos, como o metilmercúrio (Aschner, Syversen et al. 2007). Esse fato pode estar relacionado com o acúmulo preferencial deste metal pesado em células gliais quando comparado àquele dos neurônios (Nevado, Martin-Doimeadios et al. 2011). Além disso, é neste tipo celular que são observados os primeiros eventos deletérios após a exposição ao MeHg.

De fato, a exposição a este xenobiótico é capaz alterar o papel fisiológico das células gliais através de uma série de eventos deletérios dos quais é possível destacar a

genotoxicidade. A genotoxicidade após a exposição mercurial é observada em concentrações tão baixas quanto 0,1  $\mu\text{M}$  em células de origem glial e neuronal (Crespo-López et al., 2007), fazendo deste um marcador muito sensível de dano por metilmercúrio. Desta forma, é possível que este evento aconteça *in vivo* mesmo na presença de baixas concentrações que não provocam sintomas neuropatológicos evidentes.

Uma das principais dificuldades ao analisar e comparar os estudos *in vitro* que mostram efeitos genotóxicos da exposição a este xenobiótico é a grande diversidade de condições experimentais encontradas, dificultando a tentativa de determinação dos níveis mínimos requeridos para promover danos ao DNA (Crespo-Lopez, Macedo et al. 2009). Esta variação tem sido relacionada com diferenças nas técnicas de avaliação e nos desenhos experimentais utilizados nos diferentes estudos (Crespo-Lopez, Macedo et al. 2009). Nesse sentido, é possível observar que o fator tempo de exposição ao MeHg ou a presença de soro são variáveis muito relacionadas à discrepâncias entre os dados registrados (Lee, Lin et al. 1997; Rao, Chinoy et al. 2001). Além disso, outras divergências entre os estudos que avaliaram a ação genotóxica do metilmercúrio podem ser observadas, principalmente, quanto aos resultados.

Resultados aparentemente contraditórios entre os dados registrados de diferentes estudos podem ser observados na avaliação de parâmetros como o índice mitótico (Silva-Pereira, Cardoso et al. 2005; Eke and Celik 2008; Crespo-Lopez, Macedo et al. 2009), a presença de micronúcleos (Bonacker, Stoiber et al. 2004; Crespo-Lopez, Lima de Sa et al. 2007) ou a presença de quebras na cadeia do DNA (Bhowmik and Patra 2013; Pieper, Wehe et al. 2014). Da mesma forma, também são observados desacordos na resposta à agressão genotóxica quanto ao ciclo e uma possivelmente proliferação celular. Além de poucos, os relatos divergem entre si sobre o ponto exato onde ocorre o aprisionamento no ciclo (Gribble, Hong et al. 2005; Bose, Onishchenko et al. 2012).

Entre os estudos que avaliaram a ação deste xenobiótico, há descrições que a exposição a baixas doses de MeHg está associado a um distúrbio no do ciclo celular com aprisionamento, que pode ocorrer em G1 ou G2/M (Gribble, Hong et al. 2005; Xu, Yan et al. 2010; Bose, Onishchenko et al. 2012). Entretanto, na literatura científica não é possível observar um estudo descrevendo a ação deste xenobiótico em células glias, apesar de a importância deste tipo celular para o processo de intoxicação mercurial.

Recentemente, nosso grupo lançou a hipótese de que o índice mitótico seria um dos primeiros parâmetros a ser afetado pela intoxicação mercurial e que baixas concentrações deste metal incrementariam a proliferação celular. Porém, doses relativamente mais elevadas (ou a exposição crônica por tempos mais prolongados) inibiriam a proliferação e/ou provocariam morte celular (Crespo-Lopez, Macedo et al. 2011). O fato de um dano genotóxico estar associado à exposição ao metilmercúrio em baixas concentrações (consideradas relativamente seguras até hoje) é muito preocupante, uma vez que o dano ao genoma tem uma relação direta com a ocorrência de distúrbios na proliferação celular (e, em consequência, o tipo de morte celular), podendo conduzir eventualmente a processos de carcinogênese e/ou teratogênese. Desta forma, um estudo mais detalhado da ação genotóxica de doses relativamente baixas de metilmercúrio e sua relação com a proliferação celular torna-se essencial.

Ainda, o estudo desse efeito é especialmente importante nas células de origem glial, considerando que esse tipo celular acumula preferencialmente esse metal e a maioria dos trabalhos *in vitro* conduzidos, até agora, com modelos de SNC priorizaram a ação deste metal pesado, em células neuronais, negligenciando a participação glial na intoxicação mercurial.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a genotoxicidade e as alterações na proliferação celular provocadas pela exposição à concentração baixa e não letal (permitindo 100% de viabilidade celular) de metilmercúrio em células de origem glial.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Estabelecer um desenho experimental adequado (considerando tempo de incubação e presença ou ausência de soro bovino fetal) para o estudo da resposta à exposição a uma concentração baixa e não letal de metilmercúrio;
- Avaliar o efeito dessa concentração de metilmercúrio no material genético da linhagem C6 de glioma;
- Elucidar a ação dessa concentração de metilmercúrio sobre o ciclo celular da linhagem de glioma C6;
- Descrever o efeito do metilmercúrio em concentração subletal sobre a proliferação celular da linhagem de glioma C6.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Preparo e estoque da solução de metilmercúrio

O cloreto de metilmercúrio (251,08 g/Mol) foi adquirido da Sigma-Aldrich. Sendo feita, então, uma solução estoque de MeHg na concentração de 1 mg/mL, (4 mM) em tampão fosfato salino (PBS) e armazenadas à temperatura de -20 °C. Para realizar o tratamento, a solução estoque de MeHg foi diluída em meio de cultura *Dulbecco Modified Eagle Medium* (DMEM).

#### 3.2 Cultura celular da linhagem de glioma de rato (C6)

A linhagem celular C6 foi adquirida da *American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas VA). O cultivo celular foi realizado com meio de cultura *Dulbecco Modified Eagle Medium* (DMEM), suplementado com Soro Bovino Fetal (SBF) (10%, v/v), penicilina (10 U/mL) e estreptomicina (10 µg/mL). As culturas foram incubadas em estufas a 37 °C contendo 5% CO<sub>2</sub>.

#### 3.3 Tratamentos

Para a realização dos tratamentos, as células viáveis foram quantificadas, e em seguida foi feita umas semeaduras padrão para todos os experimentos. A quantificação de células viáveis foi realizada pela diferenciação com o corante Azul de Tripán. Este composto não é capaz de entrar em células viáveis, que permanecem incolores, enquanto células não viáveis são coradas em azul. A contagem se realizou em câmara de Neubauer e a densidade celular calculada de acordo com protocolo já padronizado em nosso laboratório (Curi 2005). Dessa forma, todos os experimentos foram conduzidos com uma densidade celular inicial de aproximadamente  $25 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>, seguido de um período de 24 horas em estufa.

Após a incubação, as células foram expostas a concentrações crescentes de metilmercúrio (Sigma-Aldrich) diluído em DMEM (concentrações finais variando no intervalo de 1-100 µM). Para avaliar a influência do tempo de exposição ao MeHg, foram feitas curvas dose-resposta avaliando a viabilidade celular após o tratamento com metilmercúrio por 4 ou 24 horas. A determinação da influência do SBF, durante a exposição a este metal pesado, foi realizada comparando a viabilidade celular em curvas dose-resposta com meio de cultura livre de SBF ou suplementado na proporção de 10% (V/V).

Ao final dos experimentos acima, as condições escolhidas para a realização dos ensaios de genotoxicidade, ciclo celular e proliferação celular foram exposições por 24h a uma concentração de 3  $\mu\text{M}$  de MeHg em meio de cultura suplementado com SBF (10%, V/V) (Fig. 4).

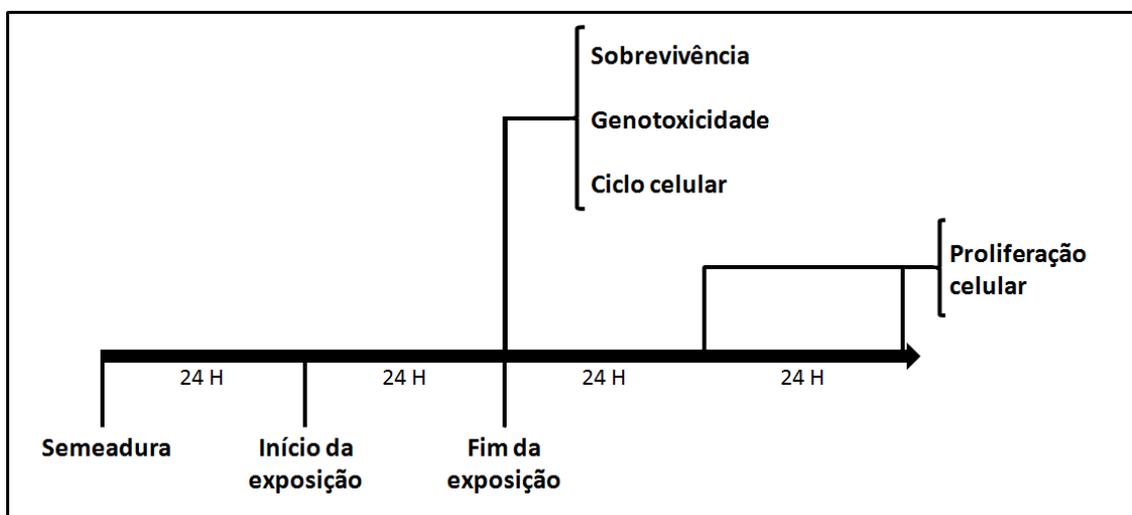


Fig. 4: Resumo esquemático da exposição ao MeHg em culturas de células gliais da linhagem C6.

### 3.4 Viabilidade celular

A quantificação de células viáveis foi realizada pelo método de conversão do 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) por enzimas desidrogenases presentes em mitocôndrias de células viáveis. A reação enzimática que ocorre nas células viáveis produz um sal pouco solúvel de cor púrpura, que pode ser solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO). A produção de cristais é diretamente proporcional ao número de células viáveis na colônia, podendo ser quantificado por espectrofotometria (Mosmann 1983).

Após o tratamento, as culturas de células C6 foram lavadas com PBS e incubadas com solução de MTT (0,05 mg/mL) por duas horas. Em seguida, se descartou o sobrenadante e os cristais insolúveis foram solubilizados com 300  $\mu\text{L}$  de DMSO. Posteriormente, adicionados 700  $\mu\text{L}$  de água ultrapura e a solução foi analisada em espectrofotômetro ( $\lambda = 570 \text{ nm}$ ). Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao grupo controle.

### 3.5 Detecção de apoptose e necrose

A confirmação da ausência de processos degenerativos foi realizada por microscopia de fluorescência através da dupla coloração com brometo de etídeo (BE) e alaranjado de acridina (AA). Esta metodologia combina a avaliação da integridade da membrana plasmática e o aspecto morfológico no núcleo. A membrana plasmática de uma célula viável é permeável somente ao alaranjado de acridina, enquanto que células em estágio tardio de apoptose e necrose são observadas a entrada de ambos os corantes (Takahashi, Matsumoto et al. 2004).

O núcleo de células viáveis tem uma característica uniforme e corada em verde devido à ligação do AA ao material genético (Fig. 5a). Por outro lado, células em necrose são observadas em vermelho intenso devido à ligação do BE com o DNA (Fig. 5b). Enquanto isso, células em estágio inicial de apoptose podem ser vistas com a cromatina parcialmente clivada resultando em aspecto fragmentado, entretanto, sem o vermelho intenso característico do BE, pois a membrana ainda se mostra impermeável a este corante (Fig. 5c). O estágio tardio de apoptose é caracterizado pela coloração com o BE, ao mesmo tempo, no qual se percebe a formação dos corpos apoptóticos (Fig. 5d) (Takahashi, Matsumoto et al. 2004).

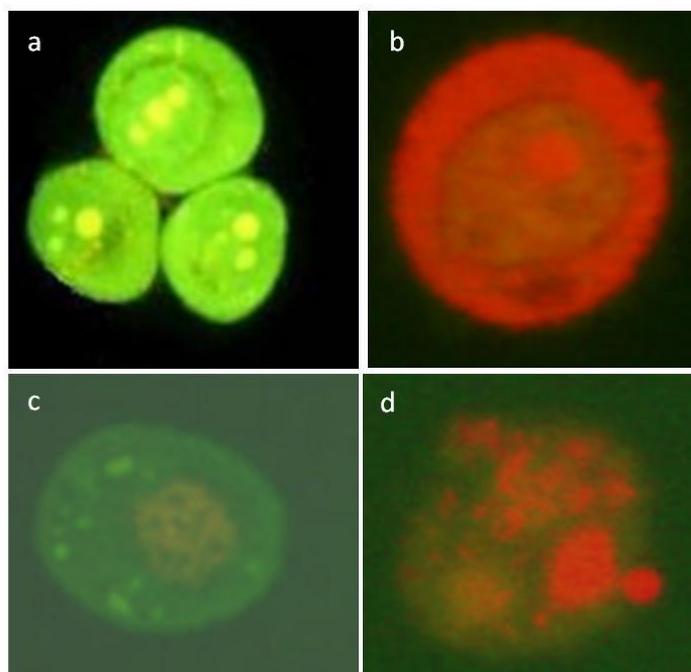


Fig 5: Padrão utilizado para análise de células viáveis (A) ou em processos degenerativos por necrose (B) ou apoptose (C) e (D) durante o ensaio de viabilidade celular pelo ensaio com os corantes BE e AA. (Paz 2005)

Para esta análise, realizou-se o protocolo descrito por Takahashi (2004). Após o tratamento, as culturas foram lavadas com PBS e em seguida, com auxílio de solução de tripsina (2,5 g/L, CULTILAB®), desprendidas da placa de cultura e formando uma suspensão celular.. Após adição de 2 ml de DMEM suplementado com 10% de SBF, as células foram centrifugadas (750 g, 3 minutos), resuspensas em DMEM ( $1 \times 10^6$  células/ml) e tratadas com uma solução de BE/AA (concentração final de 10 mg/ml de cada corante). Sendo a suspensão celular colocada em lâmina e observada no microscópio de fluorescência ( $\lambda_{\text{excitação}}= 490$  e 545 nm) foram contabilizadas 300 células de cada amostra, as quais foram classificadas entre células viáveis ou não-viáveis (células em apoptose ou necrose) de acordo com a morfologia e coloração (Fig. 2). Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis e não viáveis.

### **3.6 Análise da fragmentação do DNA pelo ensaio cometa**

O ensaio cometa ou SCGE (do inglês, *Single Cell Gel Electrophoresis*) é uma técnica de quantificação de danos ao DNA capaz de avaliar uma célula por vez. Após o processo de eletroforese é observado um local onde é mais intensa a coloração denominada “cabeça”, a qual possui o DNA intacto. Ao lado da “cabeça” é observada a região de cauda, no qual são observados pontos luminosos espaçados que consiste em DNA fragmentado, sendo a extensão proporcional à extensão de danos no DNA sendo possível quantificar o DNA presente nas regiões de cabeça ou cauda, com auxílio do software KOMET 6®.

Para realizar este teste foi seguido o protocolo estabelecido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética do Instituto Evandro Chagas (Singh, McCoy et al. 1988) com adaptações. Após a exposição ao metilmercúrio, a cultura foi lavada com tampão Hank's. Em seguida, as células foram ser resuspensas com auxílio de solução de tripsina-EDTA 0,025%, seguida de uma centrifugação (750g por 3 minutos) e descarte do sobrenadante, sendo o pellet resuspenso em 1ml de meio de cultura. 20  $\mu$ l de suspensão celular foram transferidos para tubo contendo 120  $\mu$ l de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%). O volume total transferido para uma lâmina de vidro previamente tratada com uma fina camada de agarose de fusão normal (1,5%). Em seguida, as lâminas contendo a suspensão celular foram incubadas por no mínimo 12 horas em uma solução de lise (1 ml de triton X-100, 10 ml de DMSO e 89 ml de solução de lise estoque – Solução de lise estoque: NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10

mM, pH 10). As lâminas foram colocadas em cubeta de eletroforese e cobertas com solução tampão a 4 °C recém-preparada (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM, pH > 13). Após esta etapa, as lâminas foram lavadas com PBS a 4 °C. Antes do início da eletroforese, as lâminas foram incubadas por 20 minutos, e após intervalo ocorreu o processo de eletroforese por 20 minutos utilizando os parâmetros: 20V da cubeta, 300 mA pelo intervalo de 20 minutos. Após isso, as lâminas foram lavadas três vezes com solução de neutralização (Tris 19,5 mM, pH 7,5), ficando 10 minutos em contato, antes do descarte da solução. Após o período para secagem, as lâminas foram imersas em etanol absoluto para fixação por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram coradas com 30 µl de solução de DAP (10µg/ml) acrescido com Antifade. Foram analisadas 100 células por lâmina.

As lâminas foram analisadas com um microscópio de fluorescência utilizando o comprimento de onda de 330nm, com aumento de 400x. Sendo nucléolos avaliados com auxílio do software KOMET 6®, foram utilizados como parâmetros: % de DNA na cauda e % de DNA na cabeça (Fig. 6).

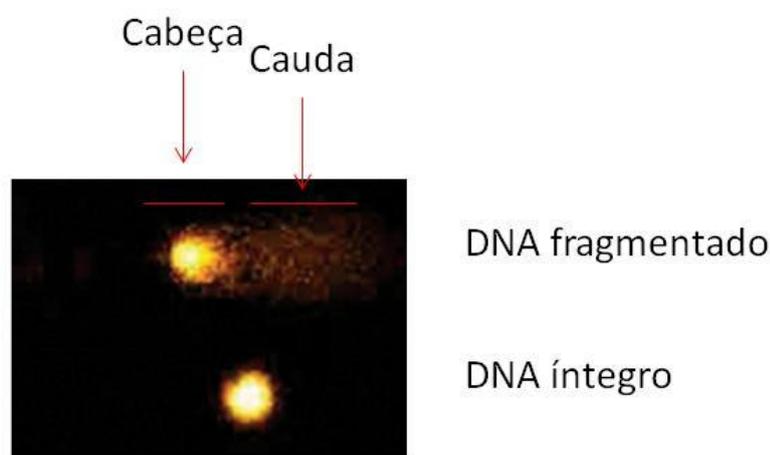


Fig. 6: Imagem do nucléolo durante a avaliação da fragmentação do DNA através da técnica do ensaio do cometa. Adaptado de Benhusein e colaboradores 2010 (Benhusein, Mutch et al., 2010)

### 3.7 Avaliação da genotoxicidade através da formação de micronúcleos

Os micronúcleos são produtos de uma divisão celular incorreta, na qual um cromossomo inteiro ou apenas uma parte são segregados do restante do material

genético celular, sendo observados como uma pequena massa nuclear delimitada por membrana separada no núcleo principal (Fenech 2002; Iarmarcovai, Bonassi et al. 2008). Após o período de tratamento, as culturas foram lavadas com tampão Hank's seguido da adição de 5 ml de meio de cultura novo contendo citocalasina B (3  $\mu\text{g/ml}$ ) e um período de incubação de 30 horas em estufa. Após este período, as culturas foram lavadas duas vezes com tampão Hank's e resuspensas com auxílio de solução de tripsina-EDTA (0,025%). Após centrifugação (400 g, 10 minutos), as células foram tratadas com 2 ml de solução hipotônica de KCl (0,85 mg/100ml) por 30 segundos. Posteriormente, adicionados 2,5 ml de fixador metanol: ácido acético (3:1). Após isso, as células foram transferidas para lâmina e coradas com Giemsa por 5 minutos. As lâminas foram analisadas através de microscopia de campo claro na objetiva 40x, sendo registrada a frequência de células mononucleadas, binucleadas e biomarcadores de genotoxicidade como micronúcleos, pontes nucleoplásmicas e brotos nucleares (Fig. 7).

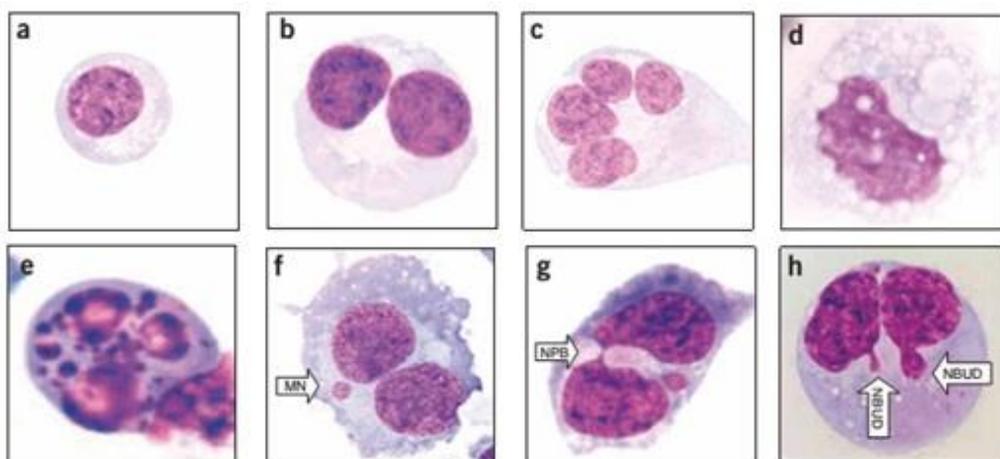


Fig. 7: Parâmetros de avaliação no ensaio de formação de micronúcleos. (a) células mononucleada, (b) células binucleada, (c) célula multinucleada, célula em processo degenerativo por necrose (d) ou apoptose (e), células apresentando micronúcleo (MN) (f), pontes nucleoplásmicas (NPB) (g) ou brotos nucleares (NBUD) (h). (Fenech 2007).

Foram analisadas três lâminas por amostra, contabilizando 500 células em cada lâmina. Os resultados foram expressos como índice de micronúcleos, brotos ou pontes nucleoplásmicas (número de células contendo micronúcleos, brotos ou pontes/ número total de células, respectivamente) e índice de células binucleadas (número de células binucleadas/número de células mononucleadas).

### **3.8 Avaliação do Índice Mitótico pelo bloqueio do ciclo celular com colchicina**

Para avaliar a ação do metilmercúrio sobre a taxa de células em metáfase foi avaliado o Índice Mitótico (IM) como parâmetro. Uma alteração no valor de IM indica uma mudança na taxa normal de divisão celular. Este ensaio leva em consideração a diferença estrutural do DNA nos estágios de intérfase e metáfase. Durante a intérfase, o DNA é encontrado em forma de cromatina, caracteristicamente menos condensado, enquanto que na metáfase, o material genético nuclear se encontra na forma de cromossomo, altamente condensado. Esta diferença é facilmente observada na microscopia de campo claro. Este ensaio foi realizado de acordo com o protocolo padronizado previamente no nosso laboratório (Crespo-Lopez, Lima de Sá et al., 2007; Crespo-Lopez, Macedo et al., 2011). Para realizar este ensaio, a cultura celular foi realizada sobre lâminas previamente tratadas com poli-ornitina (50 µg/ml, em tampão borato, pH 8,0) por 24 horas.

Após a exposição ao xenobiótico, foram adicionados 30 µL de colchicina (50 mg/ml), seguida de incubação por 4 horas. Depois de 4 horas adicionais de incubação, as culturas foram lavadas com tampão fosfato, sendo adicionado uma solução hipotônica de KCl 0,0075M à 37 °C por 10 minutos. Posteriormente, foi realizada uma fixação com metanol: ácido acético (3:1) gelado, por 5 minutos. Repetindo este procedimento mais duas vezes, totalizando três exposições à solução fixadora. Após a secagem das lâminas em temperatura ambiente, a coloração foi realizada com solução de Giemsa (5% em tampão Sorensen). As lâminas foram montadas e observadas em microscópio óptico de campo claro, e os resultados foram expressos como índice mitótico (número de metáfases/ 1000 células).

### **3.9 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo**

A análise do ciclo celular foi realizada por citometria de fluxo, utilizando como marcador o corante fluorescente de ácidos nucleicos Iodeto de Propídio (IP) (Krishan 1975). Devido à variação na quantidade de ácidos nucleicos e o tamanho celular durante o processo de duplicação, esse ensaio é capaz diferenciar as etapas do ciclo celular com base nestes parâmetros.

Após a exposição ao MeHg, as culturas foram resuspensas com auxílio de tripsina (2,5 g/L, CULTILAB ®) e centrifugadas (750 g, 3 minutos). Após uma nova lavagem com PBS e centrifugação ocorreu a fixação (etanol 70% a 4 °C) por no mínimo um e no

máximo sete dias. Após a retirada do fixador foram realizadas duas lavagens com PBS e posterior centrifugação (750g, 3 minutos). As células foram resuspensas em solução de RNase (100 µg/mL) e incubadas à 37 °C por 15 minutos. Imediatamente antes da análise no citômetro de fluxo, sendo adicionada solução de IP (50 µg/mL) e registrados 10<sup>4</sup> eventos por amostra (Krishan 1975).

### **3.10 Determinação do tempo de duplicação da cultura celular**

Após a exposição ao metilmercúrio por 24 horas, o meio de cultura foi substituído por DMEM recém-preparado, suplementado com SBF (10% V/V) e livre do metal pesado. A incubação após a troca do meio de cultura decorreu por mais 24 ou 48 horas (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) para permitir a proliferação da cultura celular. Após este período, as células foram lavadas com PBS, resuspensas auxílio de tripsina (2,5 g/L, CULTILAB®) e centrifugadas (750 g, 3 minutos). O excesso de sobrenadante foi descartado e após homogeneizar a suspensão celular, retirou-se o volume de 100 µL adicionando a um tubo contendo 100 µL de solução de Azul de Tripán (0,5 % p/v, em PBS). O número total de células viáveis em cada cultura foi calculado de acordo com o protocolo utilizado em nosso laboratório (Curi 2005). O tempo de duplicação celular foi calculado no software DOUBLING TIME® (Roth 2006). Os dados foram expressos em número total de células e tempo de duplicação celular.

### **3.11 Avaliação da confluência e padrão morfológico da cultura celular**

Para determinar diferenças entre a confluência celular e o padrão morfológico das culturas de células de C6, após a exposição ao metilmercúrio, foi utilizado microscopia de contraste de fase, sendo os resultados registrados com auxílio de um sistema de captura de imagem digital. A linhagem celular C6 de glioma normalmente apresenta um aspecto achatado, sendo estas células caracterizadas por uma morfologia típica semelhante a fibroblastos (Wypych and Baranska 2013). Dessa forma, alterações na morfologia após a exposição ao MeHg puderam ser avaliadas e registradas. Para a avaliação da mudança na morfologia celular, foram feitos registros nos tempo de 2, 4 8, 16 e 24 horas após a exposição ao xenobiótico.

Para a avaliação da confluência celular foram feitos registros no início e ao final da exposição ao metilmercúrio, Para os experimentos de proliferação, foi avaliada a confluência também 24 horas depois do fim do tratamento (troca do meio de cultura

trocado). Sendo realizados os registros fotográficos em campos com as mesmas coordenadas entre as diferentes placas placa de cultura.

### **3.12 Análise estatística**

Os dados obtidos foram avaliados através do software SIGMAPLOT® 12.5 utilizando, primeiramente, o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliação da normalidade. Para os dados considerados paramétricos, foi realizado o Teste *t* quando houve somente dois grupos. Com o número de grupos era maior ou igual a três, foram utilizadas a Análise de Variância de um Critério (ANOVA) e teste *post hoc* de Tukey. Para os dados apontados como não paramétricos, se analisou o teste de Mann-Whitney, por possui somente dois grupos. Em todos os casos, foram considerados os valores de  $P < 0,05$  como estatisticamente significativo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Metilmercúrio altera a viabilidade e morfologia celular de acordo com o tempo de exposição e a presença/ausência de soro no meio de cultura

Na figura 8, podem ser observadas curvas de viabilidade celular avaliando a taxa de sobrevivência da cultura após a exposição a concentrações crescentes de metilmercúrio com períodos de exposição de 4 (a) ou 24 horas (b). Em ambos os tempos de exposição, o decaimento na viabilidade da linhagem C6 apresentou perfis semelhantes, mas em intervalos de concentrações diferentes.

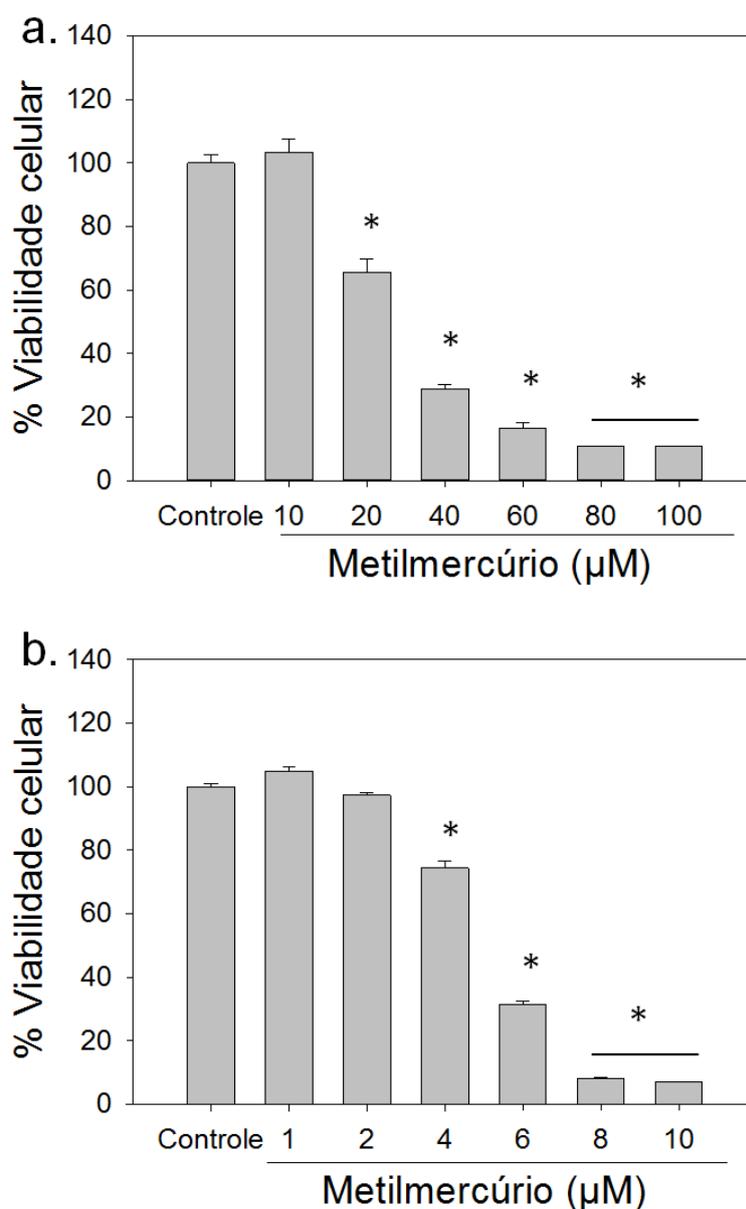


Fig. 8: Viabilidade celular da linhagem C6 exposta a diferentes concentrações de metilmercúrio por um intervalo de tempo de 4 horas (a) e 24 horas (b). Dados expressos em médias  $\pm$  erro padrão (N=4-8). \*P < 0,01 versus todos os grupos.

Entretanto, apesar da similaridade das curvas na exposição por 4 horas, são necessárias concentrações de metilmercúrio variando de 0-100  $\mu\text{M}$  para detectar o decaimento (Fig. 8a), enquanto que para 24 horas é necessário um intervalo menor de 0-10  $\mu\text{M}$  (Fig. 8b). A  $\text{LC}_{50}$ . Para o tratamento com o metal pesado variou de 30,04  $\mu\text{M}$  em 4 horas para 5,68  $\mu\text{M}$  com 24 horas de exposição.

Quando as células foram incubadas com 10  $\mu\text{M}$  de MeHg por 24h foi registrada uma intensa mudança na morfologia celular das culturas expostas (Fig. 9). O formato fusiforme característico desta linhagem celular que pode ser observado no início do experimento (Fig. 9) foi perdido paulatinamente com a exposição ao MeHg. As células foram adotando um formato esférico (Fig. 5; 2, 4, 8 e 16 horas), de forma que no final da exposição toda a colônia se mostrou esférica com grande número de células desprendidas do fundo da placa sugerindo morte celular (Fig. 9; 24 horas).

Outro fato a ser notado é que a taxa de sobrevivência celular das culturas expostas a 10  $\mu\text{M}$  de MeHg após 4 horas foi semelhante àquela do grupo controle (Fig. 9a) enquanto que posteriormente, no final das 24 horas de incubação, foi observada uma sobrevivência de aproximadamente 10% (Fig. 9b).

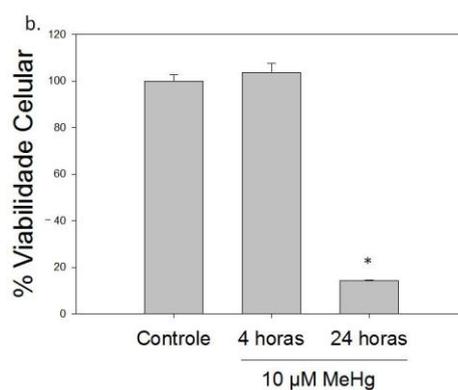
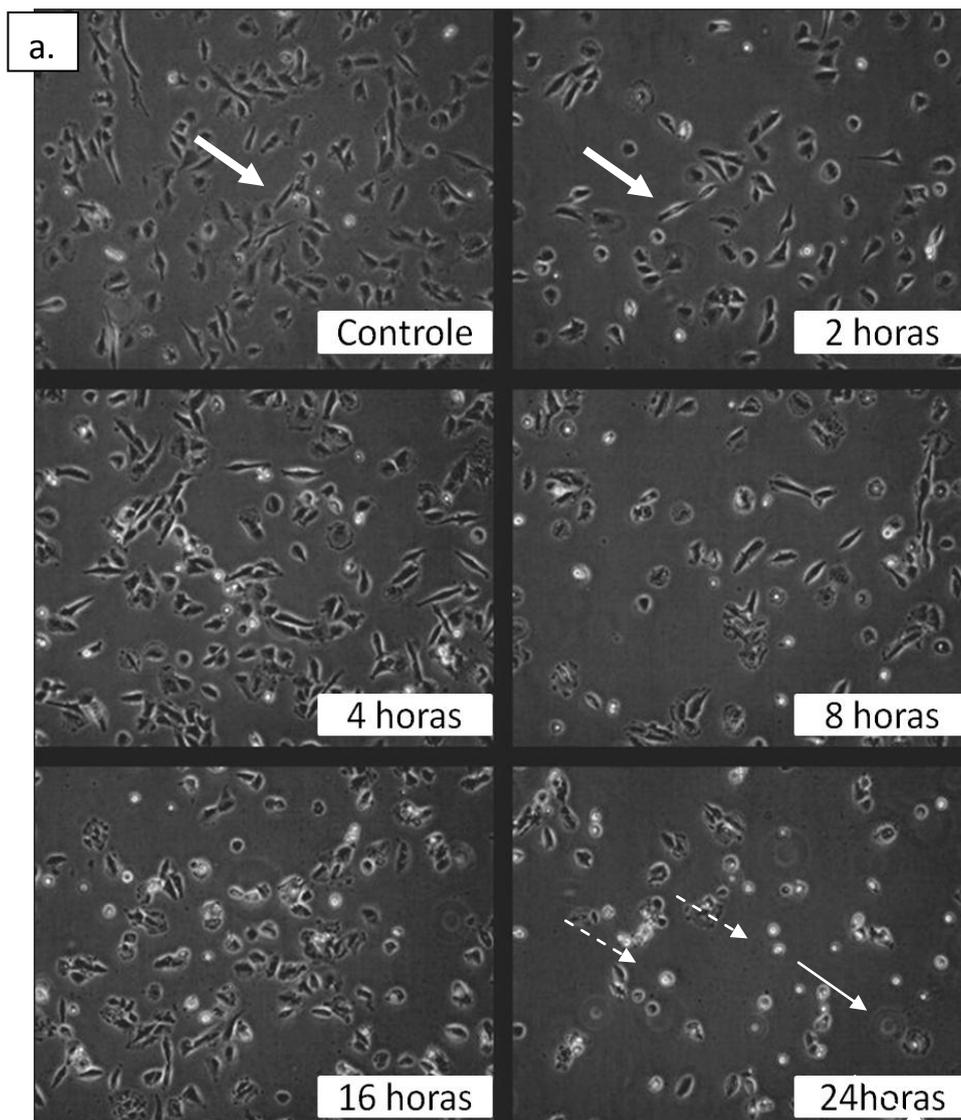


Fig. 9: (a) Avaliação da morfologia celular da linhagem C6 exposta a 10 µM de metilmercúrio em diferentes períodos. Células em formato semelhantes a fibroblastos (setas contínua grossa), característico da linhagem celular, células esféricas aderidas à placa (setas tracejadas) ou em suspensão (seta contínua fina). Aumento de 40x. (b) Viabilidade celular da linhagem C6 exposta a metilmercúrio na concentração de 10µM por um intervalo de tempo de 4 horas e 24 horas. Dados expressos em médias ± erro padrão (N=4-8). \*P < 0,01 versus todos os grupos.

Portanto, o aumento do tempo de exposição esteve associado a um efeito nocivo mais intenso do metilmercúrio. As concentrações não letais deste xenobiótico em cada caso foram bastante diferentes: a concentração subletal em 4 horas ( $10 \mu\text{M}$ ) foi capaz de promover a redução de viabilidade em praticamente 90% após 24 horas de exposição (Fig. 9b). Esse fato mostrou que uma quantidade de MeHg aparentemente não letal para curtos períodos de exposição, pode dar início a uma série de eventos deletérios que resultem na intensa formação de morte celular. Por este motivo, foi escolhido o tempo de 24 horas para o desenho experimental.

Em seguida foi avaliada a influência da presença/ausência do soro bovino fetal na exposição ao metilmercúrio por 24h. Na figura 6 são mostradas as curvas dose-resposta avaliando a viabilidade celular após a exposição ao MeHg pelo intervalo de 24 horas em DMEM livre de soro bovino fetal (Fig. 10a) ou suplementado na proporção de 10% (v/v) (Fig. 10b).

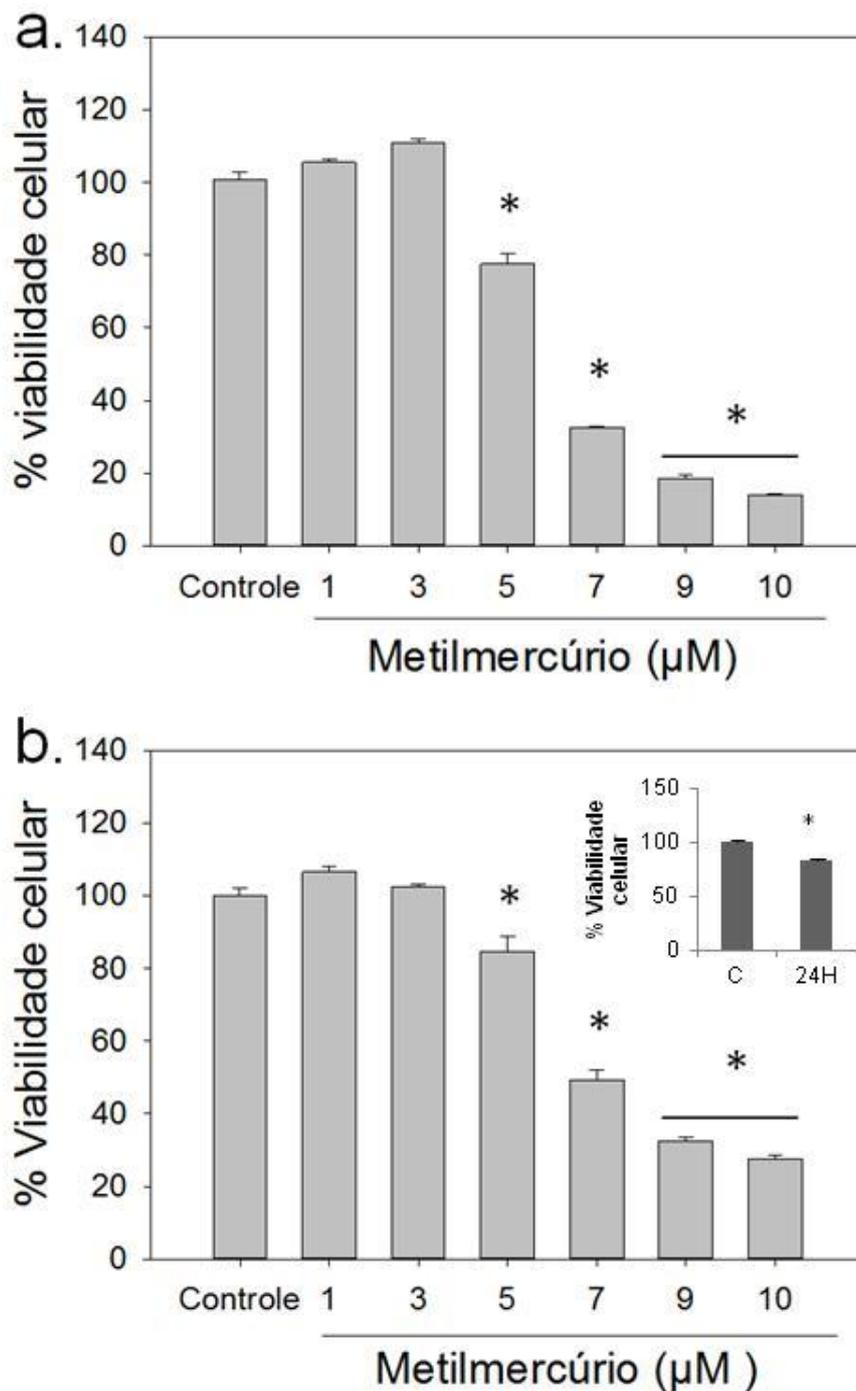


Fig. 10: Viabilidade celular das culturas de células da linhagem C6 expostas a metilmercúrio por um intervalo de tempo de 24 horas em meio de cultura suplementado com soro bovino fetal (SBF) na proporção de 10% (a) ou somente em meio de cultura (b). No canto superior direito da figura b é possível observar a ação da privação de SBF pelo período de 24 horas (24H) em relação à viabilidade inicial em 0 horas (C). Dados expressos em médias  $\pm$  erro padrão (N=4). \*P < 0,01 versus todos os grupos.

O decaimento da viabilidade celular com ambos os tratamentos iniciou com a mesma concentração testada de metal pesado (5  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 10). Além disso, tanto na exposição conduzida com meio de cultura suplementado quanto naquela isenta de SBF foram encontrados valores relativamente próximos de  $\text{LC}_{50}$  (6,08  $\mu\text{M}$  e 6,52  $\mu\text{M}$ ,

respectivamente). Entretanto, é importante ressaltar que exposições às concentrações mais altas apresentaram valores de viabilidade significativamente mais baixos em meio de cultura contendo SBF (Fig. 10).

Além da análise quantitativa, uma avaliação morfológica foi realizada para comparar ação do metilmercúrio sobre as culturas de células C6. O grupo tratado em meio de cultura suplementado com SBF apresentou a morfologia celular mais conservada do que o grupo exposto ao metal pesado na ausência de soro (Fig. 11).

Assim, considerando os resultados acima, foi escolhida a incubação em meio de cultura, suplementado com SBF, para conduzir os experimentos seguintes.

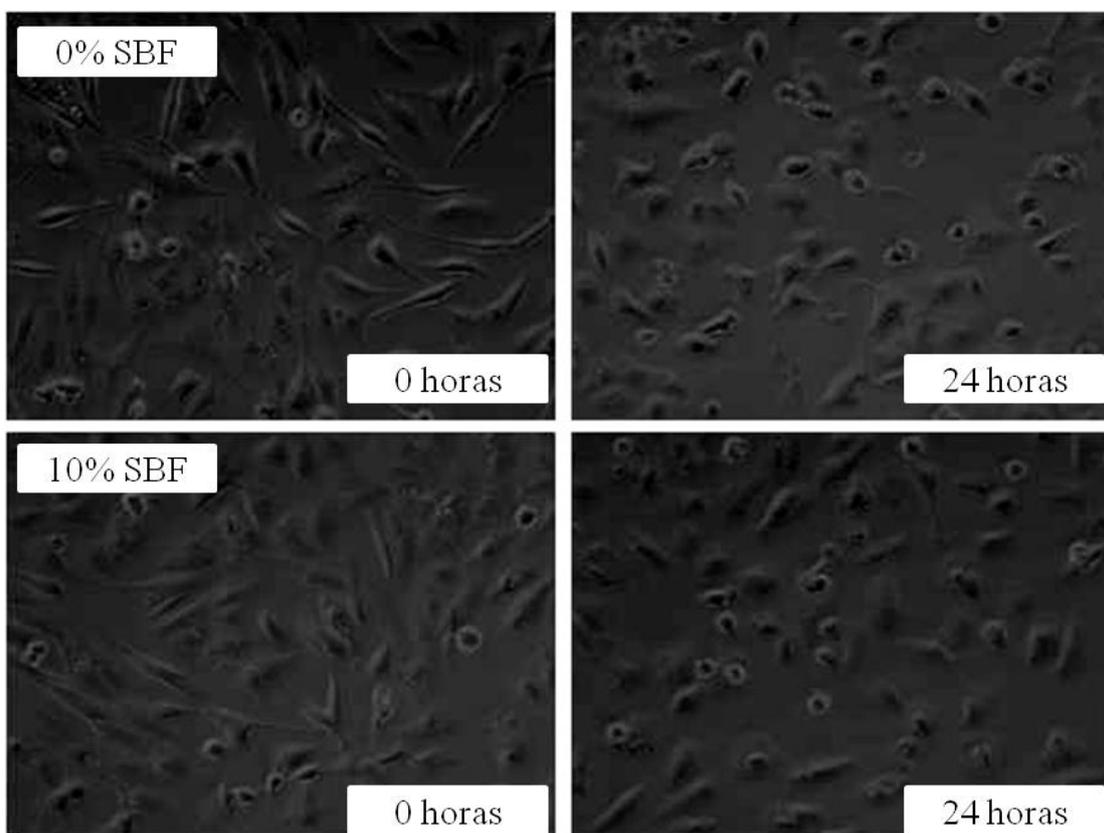


Fig. 11: Morfologia celular da linhagem C6 exposta ao metilmercúrio na concentração de  $5 \mu\text{M}$  por um período de 24 horas na ausência de soro bovino fetal (linha superior) ou suplementado na proporção de 10% (V/V; linha inferior). Aumento de 100x.

#### 4.2 A exposição ao metilmercúrio na concentração de 3 $\mu\text{M}$ não está associado à processos iniciais de apoptose

Com objetivo de avaliar o efeito de uma contração de MeHg não relacionada à morte celular, foi escolhida a concentração de 3  $\mu\text{M}$ , por ser a maior concentração que não reduziu a viabilidade celular (Fig. 10).

Entretanto, para descartar a possibilidade da presença de células em estágio inicial de apoptose foi realizado o ensaio de coloração diferenciado com brometo de etídio e alaranjado de acridina. Na figura 8, pode ser observado tanto no grupo controle quanto no tratado com MeHg (3  $\mu\text{M}$ ) há a mesma proporção de células viáveis e não viáveis.

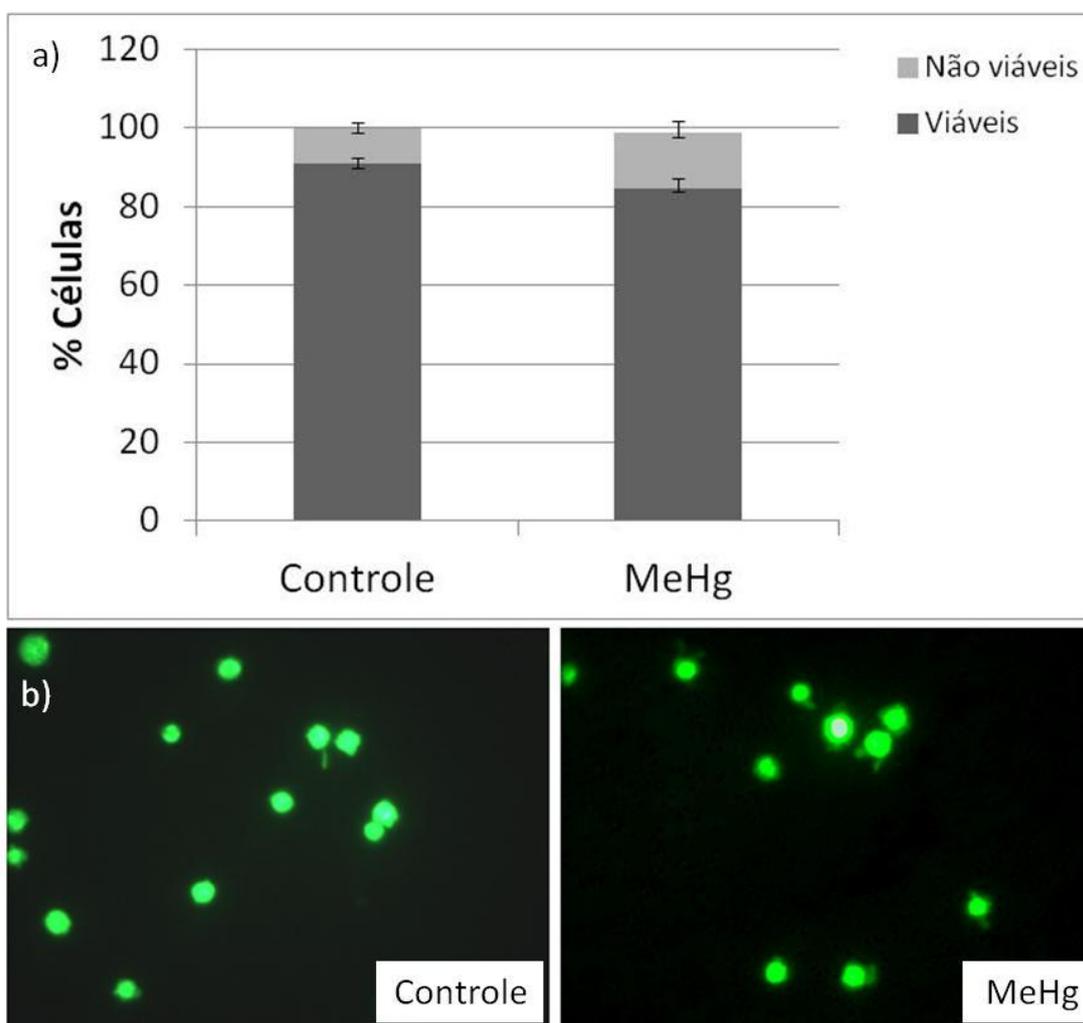


Fig. 12: Viabilidade celular das culturas da linhagem C6 expostas à metilmercúrio (MeHg) na concentração de 3  $\mu\text{M}$  em DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal por 24 horas. (a) resultados quantitativos da viabilidade celular utilizando o ensaio de coloração com alaranjado de acridina e brometo de etídio (b) registro fotográfico das células exibindo o mesmo padrão de coloração em ambos os grupos. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (N=3). Aumento de 100x.

### 4.3 A exposição ao metilmercúrio em concentração não letal está relacionada com o surgimento de danos genotóxicos em células de origem glial

Ensaio de cometa e de micronúcleos foram realizados para determinar a genotoxicidade da concentração não letal de MeHg ( $3 \mu\text{M}$ ) (Fig 9, 10, 11 e 12).

Na figura 13 é mostrada a fragmentação do DNA nuclear induzida pela exposição a uma concentração baixa deste metal pesado ( $3 \mu\text{M}$ ).

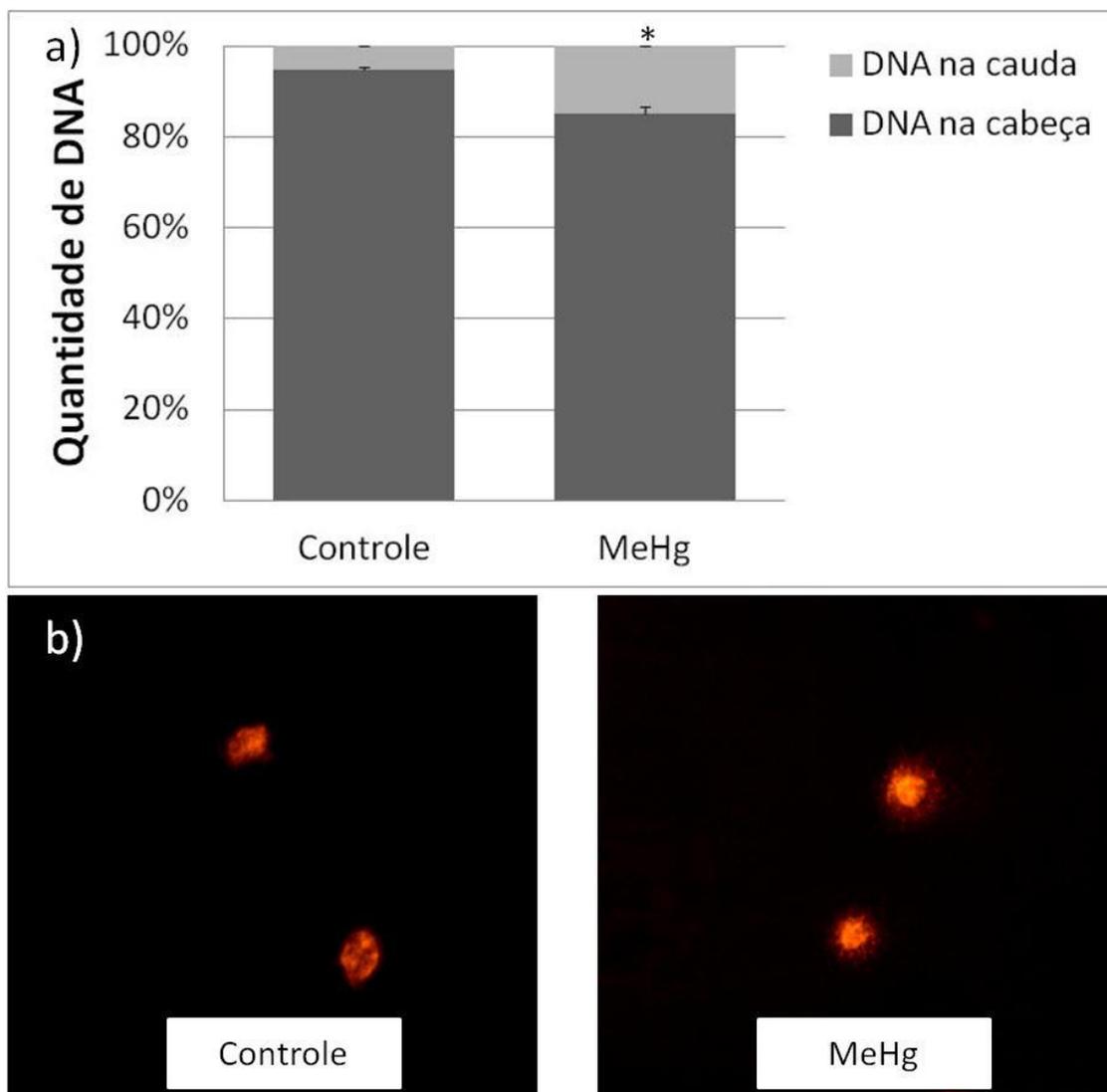


Fig. 13: Fragmentação de DNA detectada através do ensaio cometa (*Single cell gel eletroforesis assay*). (a) Quantidade de DNA, em porcentagem do total, presente na região da cabeça e da cauda dos grupos controle e exposto ao metilmercúrio na concentração de  $3 \mu\text{M}$  por 24 horas (MeHg). Dados expressos em médias  $\pm$  erro padrão (N=100). \*P < 0,01 versus grupo controle. (b) Registro fotográfico dos nucléolos dos grupos controle ou exposto ao MeHg. Aumento 400x.

Os resultados do ensaio cometa revelaram que a exposição a  $3 \mu\text{M}$  de MeHg, apesar de não resultar em morte celular significativa, é capaz de promover a

fragmentação do DNA nuclear (Fig. 13). Este evento pode ser observado pela redução da quantidade de DNA na região da “cabeça” (DNA íntegro) do nucléolo nas células expostas ao metilmercúrio quando comparada com as amostras do grupo controle (Fig. 9a). Em seguida, foi avaliada a ocorrência de danos genéticos a nível cromossomal. Como pode ser observado na figura 14, a exposição ao MeHg esteve associada ao aumento na frequência de alterações genotóxicas como micronúcleos (Fig. 14 a,b), brotos nucleares (Fig. 14 c,d) e pontes nucleoplásmicas (Fig. 14 e,f)..

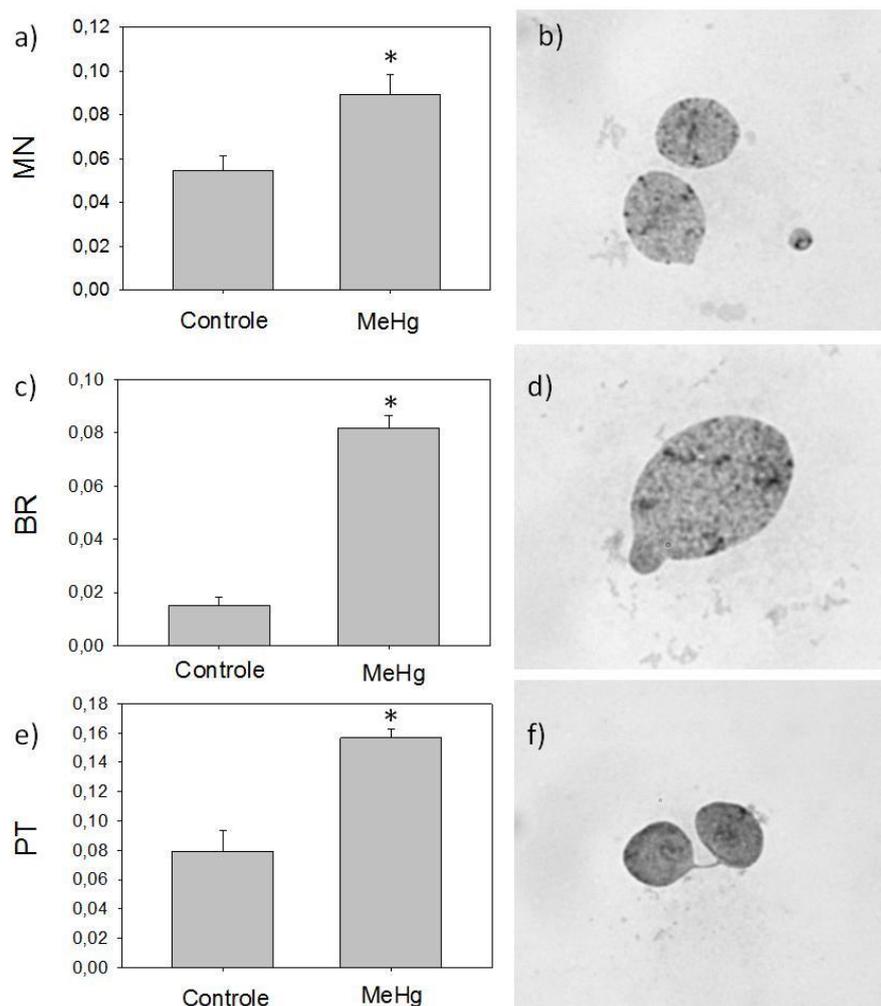


Fig. 14: Alterações genotóxicas detectadas com a técnica do micronúcleo em células C6 expostas por 24h a 3μM de metilmercúrio (MeHg). (a) Índice de células contendo micronúcleos (MN). (b) Célula binucleada com micronúcleo. (c) Índice de células apresentando broto nuclear (BR). (d) Células exibindo broto nuclear. (e) Índice de células com pontes nucleoplásmicas (PT). (f) célula binucleada com ponte nucleoplásmica. Dados expressos em média ± erro padrão (N=6). \*P < 0,01 versus grupo controle. Aumento de 100x.

Vale ressaltar que apesar de que o tratamento com MeHg, aumentou a frequência dos três biomarcadores de dano genômico (Fig. 14 a, c, e), a formação de pontes

nucleoplasmáticas destacou-se como a que apresentou a maior frequência nas culturas expostas ao MeHg (Fig. 14 e).

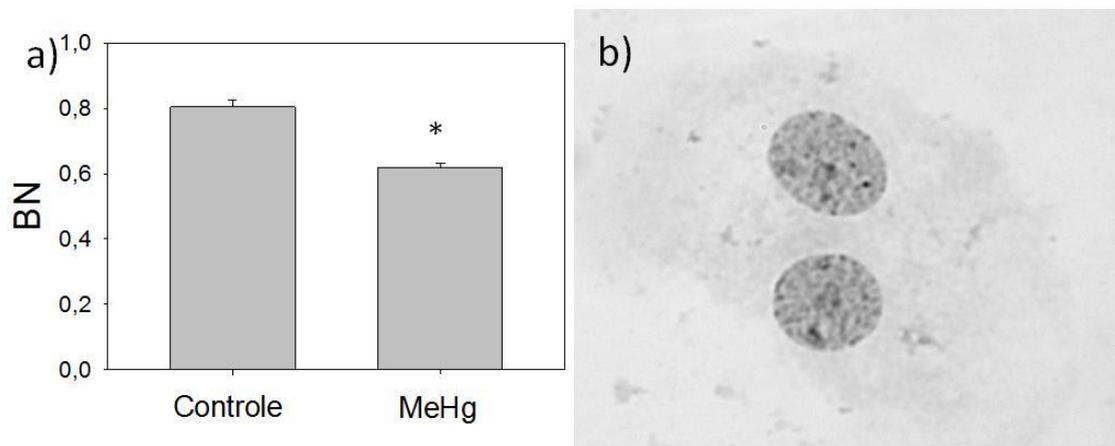


Fig 15: Células binucleadas detectadas pela técnica de micronúcleos em células C6 expostas 24h a metilmercúrio (MeHg) 3  $\mu$ M. (a) Índice de células binucleadas (BN). (b) Célula binucleada. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão (N=6). \*P < 0,01 versus grupo controle. Aumento de 100x.

O grupo exposto ao metilmercúrio apresentou um menor índice de células binucleadas quando comparado ao grupo controle (Fig. 15a). Uma vez que este dado pode estar relacionado à proliferação celular, a próxima etapa foi a avaliação do efeito deste metal pesado sobre o ciclo celular.

#### 4.4 A exposição ao metilmercúrio promove alterações no equilíbrio do ciclo celular das células de origem glial

Na figura 16, é possível observar um aumento no índice mitótico da linhagem glial C6 após a exposição ao MeHg.

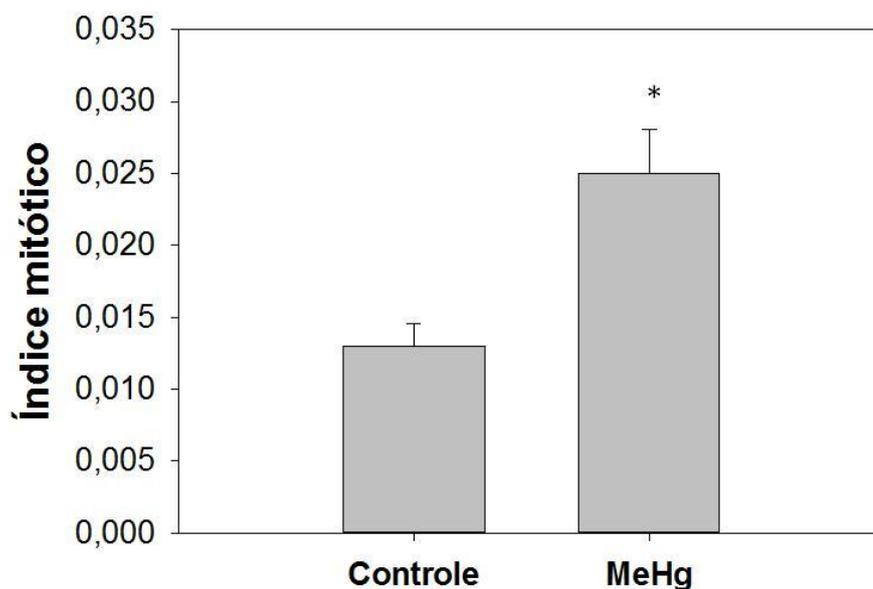


Fig. 16: Índice mitótico de células C6 expostas a 3  $\mu$ M de metilmercúrio (MeHg) por 24h. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (N=3). \*P < 0,05 versus grupo controle.

Este dado indica uma alteração no equilíbrio da divisão celular, e por este motivo uma análise mais aprofundada do ciclo foi realizada através da citometria de fluxo.

O tratamento com o metal pesado promoveu uma alteração no perfil do ciclo celular da linhagem C6, a qual apresentou uma redução na população celular nas fases G0 e G1 ao mesmo tempo em que se registrou um aumento nas fases S e G2/M simultaneamente (Fig. 17).

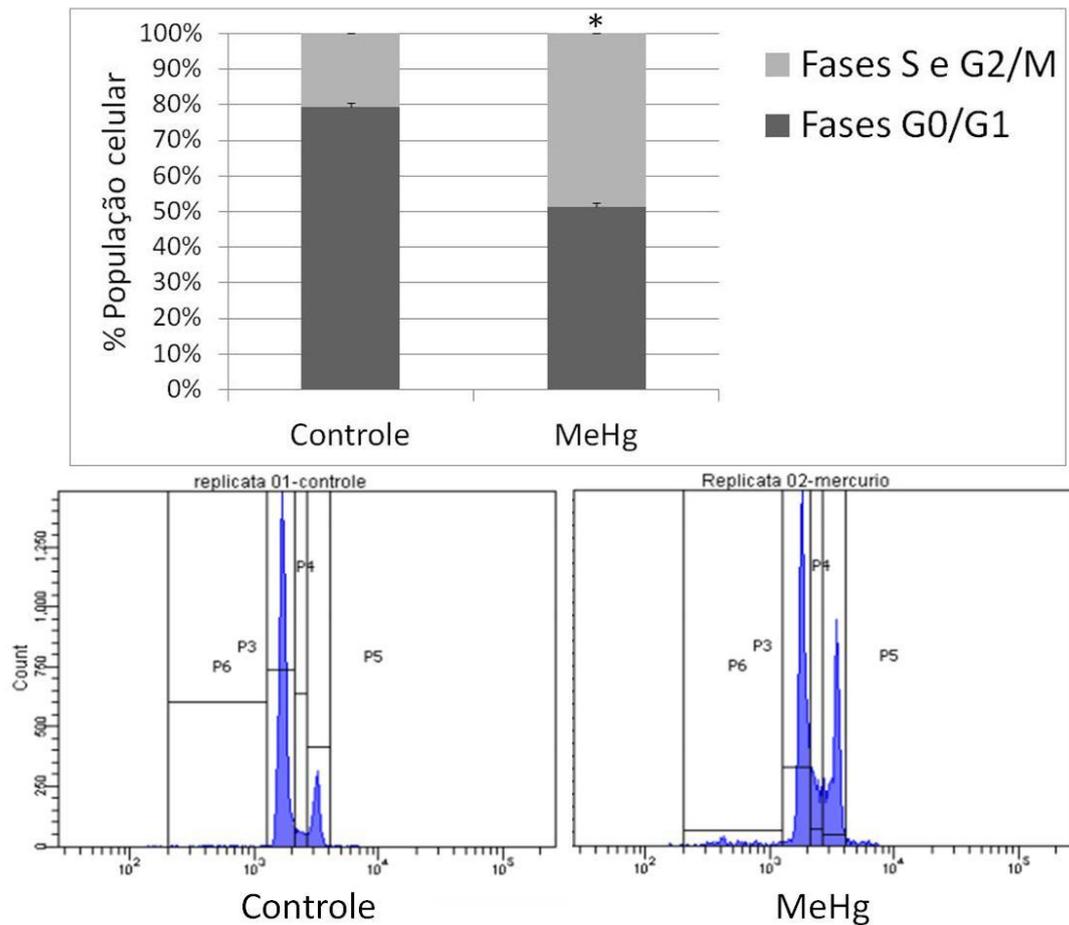


Fig. 17: Ciclo celular de células C6 expostas a 3  $\mu$ M de metilmercúrio (MeHg) por 24h: perfil do ciclo celular dos grupos controle (esquerda) e MeHg (direita) e análise quantitativa das populações celulares de acordo com a fase do ciclo celular. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (N=3). \*P < 0,01 versus grupo controle.

#### 4.5 Após o desequilíbrio no ciclo celular, provocado pela exposição ao metilmercúrio segue-se um atraso no crescimento populacional da linhagem com a retirada do xenobiótico

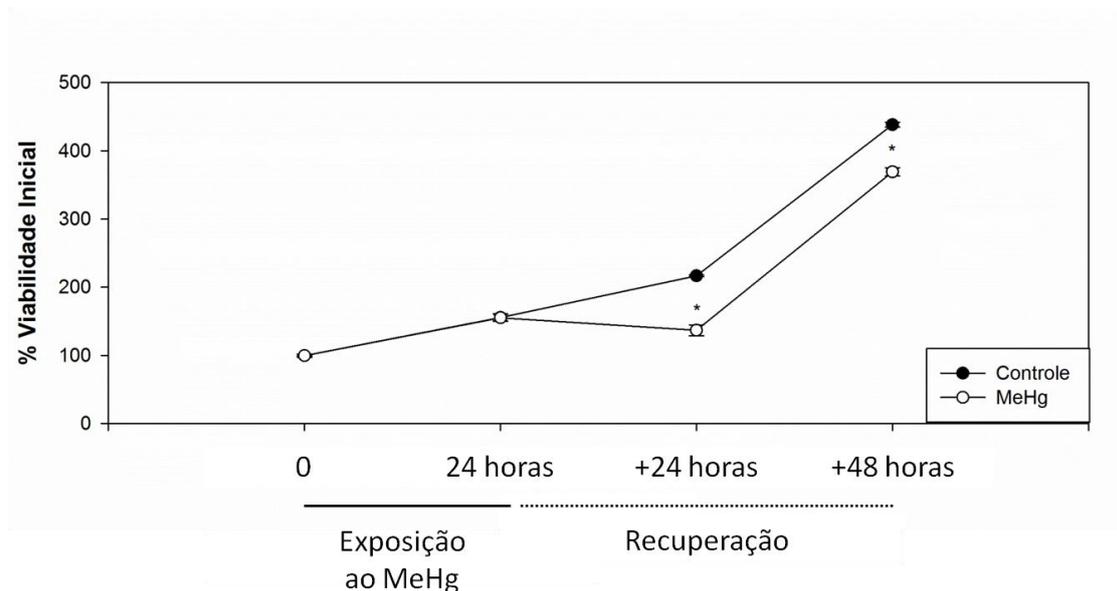


Fig. 18: Viabilidade celular das culturas C6 expostas a 3  $\mu$ M de metilmercúrio (MeHg) por 24h e posterior recuperação por mais 48h após a retirada do MeHg. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão (N=3). \*P < 0,01 versus grupo controle.

Embora não existam diferenças na viabilidade celular após 24h de incubação com 3  $\mu$ M de MeHg (Fig. 18), a viabilidade celular diminuiu significativamente após 24h da retirada do xenobiótico quando comparada àquela das células que nunca estiveram expostas (Fig. 18). Apesar de que 48h depois da retirada do MeHg, esse atraso ainda se manteve. As células apresentaram um perfil de crescimento exponencial semelhante àquele do grupo controle.

Para confirmar se esta diferença na viabilidade celular é de fato relacionada a uma diferença no número de células viáveis, foi avaliado o número de células viáveis e a confluência 24 horas após a retirada do MeHg do meio de cultura. (Figs. 19 e 20)

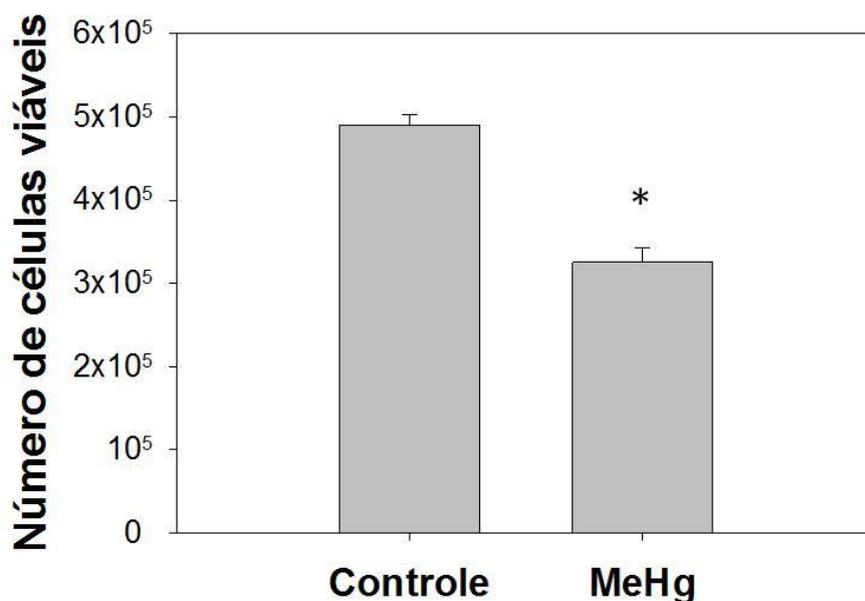


Fig. 19: Número total de células viáveis presentes na cultura de C6 24 horas após o fim da exposição a 3  $\mu$ M de metilmercúrio (MeHg) por 24h. O período de 24 horas de recuperação foi realizado em DMEM livre de MeHg. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (N=9). \*P < 0,01 versus grupo controle.

Na figura 19 é possível ver que o grupo exposto a MeHg apresentou um número menor de células viáveis quando comparado ao grupo controle (Fig. 19), confirmando o resultado encontrado com a técnica de MTT.

Quando calculado o tempo de duplicação da cultura, é constatado que o grupo controle necessita de 20,9 horas para que ocorra a duplicação do número de células. Por outro lado, o grupo previamente exposto ao metal pesado exigiu 28,2 horas para dobrar o tamanho da cultura.

A avaliação morfológica da cultura, após a exposição, revelou que depois do período de tratamento, as culturas expostas ao metal pesado mantiveram os parâmetros de morfologia e confluência celular semelhante ao observado no grupo controle. Entretanto, 24 horas após a retirada do MeHg, é possível perceber uma diferença na confluência celular entre os grupos controle e exposto ao MeHg (Fig. 20).

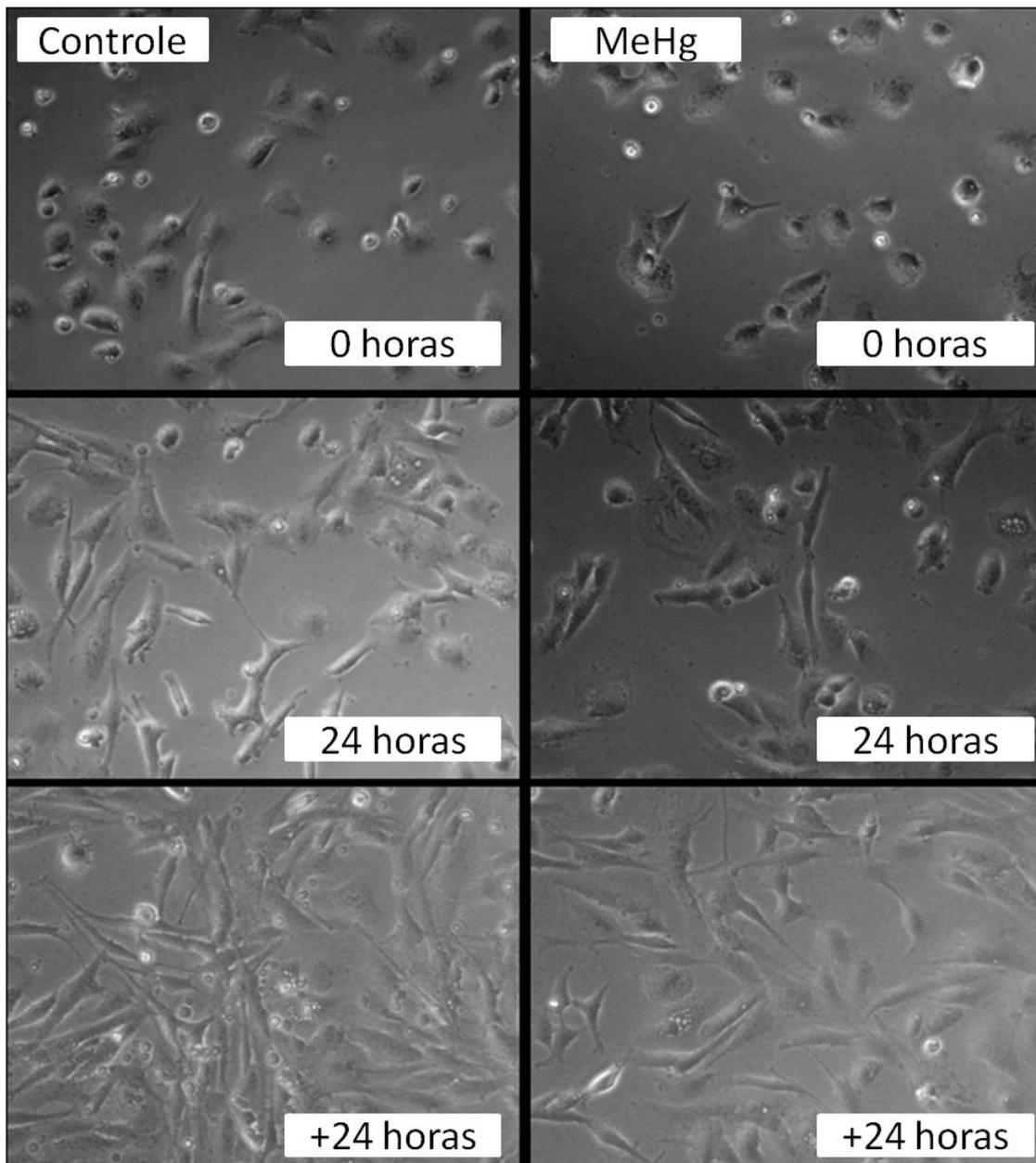


Fig. 20: Confluência celular das células C6 no início do experimento (linha superior), ao final da exposição ao metilmercúrio (MeHg)  $3 \mu\text{M}$  por um intervalo de 24 horas (linha média) e após o período de recuperação 24 horas após o fim da exposição ao metal pesado (linha inferior).

## 5 DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou, pela primeira vez, que a exposição ao metilmercúrio em concentração baixa e subletal é capaz de promover eventos genotóxicos e distúrbios na proliferação celular em células de origem glial. As avaliações bioquímica (atividade mitocondrial – medida pelo ensaio de MTT –) e morfofuncional (integridade da membrana – avaliada pelo ensaio com os corantes BE e AA –) confirmaram a ausência de morte celular após a exposição ao metal pesado na concentração de 3  $\mu\text{M}$  por um intervalo de 24 horas. Mesmo sem promover processos de morte celular, o tratamento com esta concentração subletal de MeHg foi capaz de aumentar significativamente os níveis dos marcadores de genotoxicidade (fragmentação do DNA, formação de micronúcleos, pontes nucleoplásmica e brotos nucleares).

Ao mesmo tempo, foi possível observar uma alteração no ciclo celular através do aumento do índice mitótico e uma mudança no perfil do ciclo celular com aumento da população celular nas fases S e G2/M, sugerindo um aprisionamento nessa etapa. Esta mudança no ciclo celular provocada por 24h de exposição ao MeHg, foi seguida de uma redução no número de células viáveis e confluência celular 24h após a retirada do MeHg e substituição do meio de cultura, além do aumento no tempo de duplicação da cultura mesmo. Assim, este trabalho demonstra que mesmo a exposição por um tempo limitado a uma concentração baixa e subletal de MeHg provoca um efeito citostático significativo que, após a retirada do xenobiótico, é seguida por uma diminuição no número total de células viáveis de forma continuada.

Este trabalho foi conduzido *in vitro* utilizando culturas de células da linhagem C6 de glioma, devido à importância desta ferramenta na avaliação de resposta a compostos neurotóxicos (Ehrich and Veronesi. 1999). Trabalhos *in vitro* utilizando linhagens celulares do SNC são úteis para a predição dos mecanismos moleculares de xenobióticos e por este motivo é amplamente utilizado em pesquisas nas áreas de neurofarmacologia e neurotoxicologia (Giordano and Costa 2011). Além disso, o uso deste sistema *in vitro* apresenta grandes vantagens como a redução de custos e de animais sacrificados para experimentos, permite a avaliação da resposta de um tecido ou tipo celular específico, minimiza a complexidade do sistema biológico, além de apresentar uma cultura celular de fácil crescimento e manutenção (Giordano and Costa 2011).

Os estudos *in vitro* permitem a avaliação do mecanismo de ação de compostos químicos relacionados ao surgimento de eventos neurotóxicos (Giordano and Costa 2011). Esses estudos usam tanto culturas primárias quanto linhagens celulares, como SH-5YH (neuroblastoma) e C6 (glioma) (Giordano and Costa 2011). Nos trabalhos que usam linhagens, é possível observar que este modelo gera resultados com boa correlação aos observados em culturas primárias e estudos conduzidos *in vivo* (Clemenson and Ekwall 1999; Ekwall 1999). Assim, o uso de linhagens é descrito como o primeiro passo para estudos toxicológicos (Crespo-Lopez, Lima de Sa et al. 2007).

Neste trabalho foram registrados valores de  $LC_{50}$  de 6,52  $\mu\text{M}$  e 6,08  $\mu\text{M}$  após a exposição ao MeHg por 24 horas em meio de cultura livre de SBF ou suplementado, respectivamente (Fig. 10). Esse valor encontra-se próximo à  $LC_{50}$  descrita em outros estudos que utilizaram linhagens celulares ou culturas primárias de células provenientes do SNC (Sanfeliu, Sebastia et al. 2001; Crespo-Lopez, Lima de Sa et al. 2007; Costa-Malaquias, Almeida et al. 2014). Em estudo prévio também utilizando linhagem C6, já foi descrita uma  $LC_{50}$  de 6,96  $\mu\text{M}$  após a exposição ao MeHg por 24 horas em meio livre de SBF (Costa-Malaquias, Almeida et al. 2014), próximo, portanto, ao observado neste trabalho. Estes dados também se aproximam das  $LC_{50}$  observadas em linhagens celulares humanas U373 (glioma) e B103 (neuroblastoma) após a exposição a este metal pesado por 24 horas, de 5,53  $\mu\text{M}$  e 6,12  $\mu\text{M}$  respectivamente (Crespo-Lopez, Lima de Sa et al. 2007). Mais relevante ainda, é o fato de que nossos resultados de  $LC_{50}$  com o modelo de C6 parecem ficar mais perto da  $LC_{50}$  já relatada para culturas primárias de astrócitos humanos expostas a este xenobiótico, que os dados de outros modelos de gliomas sob condições semelhantes a deste estudo (Sanfeliu, Sebastia et al. 2001).

Uma possível limitação do modelo *in vitro* é que barreiras fisiológicas como a proteção da barreira hemato-encefálica (BHE), são desconsideradas, sendo elas importantes para conservar as características farmacocinéticas dos xenobióticos. Entretanto, essa limitação não se aplica aos estudos envolvendo compostos cuja habilidade de transpor membranas biológicas já é bem conhecida, como o MeHg. Este composto atravessa facilmente a BHE, se acumulando no tecido cerebral (Syversen and Kaur 2012) e resultando em alterações histológicas, bioquímicas e comportamentais (Xu, Xu et al. 2012).

Outra característica do modelo *in vitro* é a possibilidade do rigoroso controle dos parâmetros de cultivo e exposição a drogas (Ehrich and Veronesi. 1999). Esse controle permite que possam ser estudadas de forma aprofundada as respostas ao xenobiótico em diferentes situações. Entretanto, a grande variabilidade nas condições usadas dificulta a comparação entre estudos. Entre os parâmetros com maior variação entre os estudos se destacam a composição do meio de cultura, a presença ou ausência de soro fetal, densidade celular e o tempo de exposição ao xenobiótico (Ehrich and Veronesi. 1999).

Analisando os estudos *in vitro* com linhagens celulares envolvendo MeHg, pode ser observado que a composição do meio e a densidade celular são parâmetros relativamente constantes (Crespo-Lopez, Lima de Sa et al. 2007; Costa-Malaquias, Almeida et al. 2014), entretanto, os fatores tempo de exposição e a quantidade de soro bovino fetal presente no meio se mostraram variáveis (Herculano, Crespo-Lopez et al. 2006; Kaur, Evje et al. 2010; Costa-Malaquias, Almeida et al. 2014).

Em estudo prévio realizado no nosso laboratório, já se levantou a hipótese de que algumas divergências entre os estudos poderiam ser atribuídas às diferenças no tempo de tratamento (Crespo-Lopez, Macedo et al. 2009). Assim, o presente trabalho iniciou-se analisando o efeito do MeHg em dois intervalos diferentes de tempo. Os desenhos experimentais de exposição ao MeHg conduzidos *in vitro*, apresentam desde exposições mais breves (de 50 minutos até 4 horas) (Herculano, Crespo-Lopez et al. 2006; Kaur, Evje et al. 2010) a exposições mais prolongadas (até 48 horas de tratamento) (Crespo-Lopez, Lima de Sa et al. 2007; de Melo Reis, Herculano et al. 2007; Culbreth, Harrill et al. 2012; Pieper, Wehe et al. 2014), sendo a duração de 24 horas a mais frequente. Por este motivo foram escolhidos os tempos de 4 e 24 horas de exposição para avaliar a diferença entre uma exposição curta e prolongada.

Neste estudo foi observado que o maior tempo de exposição está relacionado com uma redução no intervalo de concentração necessário para reduzir a viabilidade celular (Fig. 8). De fato, o fator tempo já se mostrou fundamental para que seja iniciada a formação de radicais livres e oxidação do DNA após a exposição ao MeHg em baixa concentração (Belletti, Orlandini et al. 2002).

O efeito do tempo de exposição ao MeHg nas culturas celulares pode ser observado, ainda, com o registro fotográfico realizado com a concentração de 10  $\mu\text{M}$  (Fig.9). Durante o início da exposição, a cultura ainda mantém o formato fusiforme

característico da linhagem celular (Fig. 9, Controle). Entretanto, após 24 horas é observada uma intensa alteração na conformação celular, exibindo um aspecto esférico, com volume celular aparentemente reduzido e intensa vacuolização (Fig. 9. 24 horas). Essas alterações vem confirmar dados prévios de exposição ao MeHg tanto em culturas de astrócitos humanos quanto nesta linhagem glial, sendo relacionados com processo de degeneração celular (Choi, Cho et al. 1981; Belletti, Orlandini et al. 2002). Este intervalo de tempo de 24 horas parece ser necessário para que concentrações relativamente baixas de MeHg, até 10  $\mu\text{M}$ , exerçam seus efeitos deletérios sobre as culturas de células C6. Dessa forma, foi escolhido o tempo de 24 horas de exposição para os experimentos subsequentes.

O segundo parâmetro avaliado em relação à resposta perante intoxicação por metilmercúrio foi a influência da presença do soro bovino fetal. Este xenobiótico possui uma grande afinidade pelos grupamentos sulfidrilas existentes nos resíduos de alguns aminoácidos que compõem as proteínas do soro (Chunmei, Cunwei et al. 2014). Assim, o acréscimo deste aditivo no meio de cultura poderia constituir um interferente por antagonismo químico (sequestro por interação química direta com o metal) (Chunmei, Cunwei et al. 2014). Por essa causa, alguns estudos prévios *in vitro* sobre intoxicação mercurial foram realizados na ausência de SBF (Crespo-Lopez, Lima de Sa et al. 2007; Costa-Malaquias, Almeida et al. 2014). Entretanto, também é possível observar alguns trabalhos *in vitro* conduzidos com meio de cultura suplementado com SBF (Belletti, Orlandini et al. 2002; de Melo Reis, Herculano et al. 2007; Pieper, Wehe et al. 2014).

Nesse sentido, foi avaliada a influência do SBF na resposta à intoxicação com metilmercúrio por 24h realizando curvas concentração-resposta em meio de cultura livre de SBF ou suplementado (10% V/V) (Fig.10). No nosso modelo, as concentrações até 3  $\mu\text{M}$  de MeHg não afetaram significativamente a viabilidade celular, tanto na presença como na ausência de soro (Fig. 10). Entretanto, as proporções de células viáveis no grupo exposto de 7 a 10  $\mu\text{M}$  de metilmercúrio em meio de cultura suplementado com soro bovino fetal foram menores que naquele sem soro (Fig. 10).

Apesar de inicialmente parecer que esse resultado indicaria um sinergismo do soro com o efeito deletério do MeHg (ou um efeito protetor da ausência de soro), cabe lembrar que esses resultados são proporcionais a cada grupo controle em cada caso (controle com soro e controle sem soro). Só a privação de SBF pelo período de 24 horas

é suficiente para provocar uma redução na viabilidade celular quando avaliada pelo ensaio do MTT em linhagem glial humana (Harhaji-Trajkovic, Arsikin et al. 2012). Nossos resultados demonstram pela primeira vez que a ausência de soro por 24h possui um efeito semelhante no modelo da linhagem C6 (ver resultados). Assim, quando recalculadas todas as proporções em relação ao controle com soro, pode ser observado que há uma diferença significativa entre o “grupo controle” da curva de viabilidade realizada em meio de cultura livre de SBF ou suplementado.

A presença do SBF no meio de cultura não foi relacionada com aumento da LC50 da curva de viabilidade, indicando a ausência de antagonismo químico. De fato, a intoxicação com uma contração próxima da LC<sub>50</sub> (5 µM) não provocou diferenças significativas entre os grupos com soro ou sem soro, mas pôde ser observada uma diferença na morfologia celular (Fig.11). Na ausência de soro, as células expostas ao metal pesado apresentaram uma morfologia mais esférica quando comparada àquela das culturas tratadas sem soro (Fig. 11), o que poderia indicar um dano celular mais intenso. A forma esférica celular após a exposição ao MeHg em células astrocitárias já foi relacionada com a formação de processos degenerativos (Choi, Cho et al. 1981; Belletti, Orlandini et al. 2002).

Considerando que a ausência de soro já é um interferente na viabilidade celular e que também é capaz de alterar o efeito do MeHg sobre a morfologia celular, todos os experimentos subsequentes foram realizados na presença de soro. Assim, as condições estabelecidas para a análise da genotoxicidade, ciclo celular e proliferação celular, neste trabalho, foram 24 horas de exposição a MeHg na presença de soro. A concentração selecionada foi 3 µM, por ser a maior concentração testada que não reduziu a viabilidade celular das culturas de células C6 (Fig.10).

Apesar do ensaio de redução de MTT ser um teste amplamente utilizado para avaliar a sobrevivência celular após a exposição a um xenobiótico, especialmente em linhagens celulares, há uma limitação a ser considerada. Este teste baseia-se na detecção da atividade mitocondrial, podendo subestimar, assim, processos iniciais de degeneração (como células nos estágios iniciais de apoptose) em que a atividade metabólica celular ainda está próxima dos níveis fisiológicos. Por este motivo foi realizado o ensaio de viabilidade com coloração diferenciada com Brometo de Etídio (BE) e Alaranjado de Acridina (AA), o qual é capaz de detectar processos degenerativos

de apoptose em estágio inicial (Cree 2011; Sumantran 2011). Este experimento indicou níveis semelhantes de células viáveis nos grupos controle e exposto ao metilmercúrio na concentração de 3  $\mu\text{M}$ , não sendo observada um aumento na frequência de células em apoptose (Fig. 12). Essa confirmação de ausência de processo degenerativo em nosso desenho experimental se faz necessária uma vez que a exposição ao metilmercúrio já foi relacionada com o surgimento de morte celular por apoptose em concentrações tão baixas quanto 1  $\mu\text{M}$  (Belletti, Orlandini et al. 2002). Um dos resultados mais preocupantes do presente trabalho é que a exposição a uma concentração baixa de MeHg não afetou a viabilidade celular nem provocou processos apoptóticos significativos, mas foi capaz de provocar uma marcada genotoxicidade, como revelada pelo aumento de todos os parâmetros de dano ao DNA (Figs. 13-15).

Embora não tenha sido observada uma intensa fragmentação do DNA celular, a avaliação através do ensaio cometa revelou uma significativa redução na proporção de DNA completamente íntegro após a exposição ao MeHg em baixa concentração (Fig. 13). De fato, a intensa fragmentação do genoma após a exposição ao MeHg está associada a ocorrência de processos degenerativos (Wilke, Kolbert et al. 2003). Por outro lado, estudos *in vitro* conduzidos com linhagem celulares provenientes do SNC parecem divergir na concentração mínima necessária para o surgimento de fragmentação do DNA não relacionado com morte celular (Das, Nageshwar Rao et al. 2011; Pieper, Wehe et al. 2014). Entretanto, a detecção de quebras na molécula de DNA em células de origem glial, sem a ocorrência de apoptose, só foi observada após o tratamento com MeHg na concentração de 25  $\mu\text{M}$  por 48 horas (Pieper, Wehe et al. 2014), uma concentração muito superior àquela usada neste estudo.

Esse fato poderia ser explicado pelas linhagens diferentes utilizadas nos trabalhos. Este trabalho foi conduzido com a linhagem C6 (glioma) enquanto que o estudo prévio utilizou a linhagem CCF-STTG1 (astrocitoma) (Pieper, Wehe et al. 2014), esta última aparentemente muito mais resistente que as próprias culturas primárias de astrócitos humanos (Sanfeliu, Sebastia et al. 2001). Essa linhagem de astrocitoma CCF-STTG1 parece ser até mais resistente que outras linhagens de astrocitoma, uma vez que foi capaz de manter a integridade lisosomal durante a exposição a 25  $\mu\text{M}$  de MeHg (48 horas), enquanto que danos à esta estrutura já foram observados com exposição à 1  $\mu\text{M}$  (1 hora) na linhagem D384 (astrocitoma) (Dare, Li et al. 2001; Pieper, Wehe et al.

2014). Assim, nosso modelo parece refletir melhor o que acontece nas células humanas apresentando uma  $LC_{50}$  mais próxima àquela das culturas primárias.

Uma vez demonstrado, neste trabalho, que uma concentração subletal e baixa de MeHg é capaz de provocar uma fragmentação significativa do DNA, nos perguntamos se esse dano seria refletido também no nível microssomal, considerando que um trabalho recente observou um aumento na frequência de células neuronais apresentando micronúcleos paralelamente ao aumento na quantidade de DNA fragmentado provocado pela exposição ao MeHg (Das, Nageshwar Rao et al. 2011). Ainda, um estudo realizado no nosso laboratório foi o primeiro a demonstrar que a exposição a concentrações baixas deste metal provoca aumento na frequência de micronúcleos e pontes nucleoplásmicas em linhagens de neuroblastoma e glioblastoma humanos (Crespo-Lopez, Lima de Sa et al. 2007).

Entretanto, esse estudo foi realizado na ausência de soro e com concentrações baixas, mas que matavam uma quantidade significativa de células (até 20%). Ambos os fatos poderiam supor uma limitação na hora de trasladar essas conclusões para o que acontece nas populações ribeirinhas expostas a concentrações no limite ou abaixo do limite de segurança estabelecido pela OMS. Assim, se fez necessário a avaliação deste evento na presença de soro e com uma concentração de MeHg que não reduz a viabilidade da cultura celular. Este trabalho demonstra pela primeira vez que, mesmo em essas condições, o MeHg é capaz de causar aumento na formação de micronúcleos, brotos nucleares e pontes nucleoplásmicas em células de origem glial (Fig. 14).

Em relação à genotoxicidade humana do MeHg, quatro mecanismos moleculares já foram propostos: dano molecular decorrente do estresse oxidativo, inibição do sistema de reparo do DNA, desarranjo de microtúbulos e ação direta do MeHg sobre a molécula de DNA (revisado por Crespo-López et al., 2009). Entretanto, esses mecanismos foram descritos, na maioria dos casos, com intoxicações com doses relativamente elevadas de MeHg e/ou em células de origem diferente do SNC. Assim, mais estudos se fazem necessários para esclarecer quais seriam os mecanismos moleculares envolvidos na genotoxicidade encontrados no nosso trabalho.

Neste estudo, a percentagem de células contendo micronúcleos no grupo controle (aproximadamente 5%) foi muito semelhante ao anteriormente descrito para outras linhagens de origem glial (Crespo-Lopez, Lima de Sa et al. 2007), validando nosso

modelo. Esta frequência mínima de células micronucleadas parece se repetir também para outras células do SNC, como as de origem neuronal (Crespo-Lopez, Lima de Sa et al. 2007; Das, Nageshwar Rao et al. 2011). Entretanto, no presente estudo foi demonstrado pela primeira vez que uma exposição a uma concentração tão baixa de MeHg é capaz de produzir um aumento significativo na incidência de células contendo micronúcleos em células de origem glial (Fig. 14,a).

A presença de micronúcleos está relacionada com a perda de um fragmento ou do cromossomo completo que se perde do restante do material genético celular durante a fase de Anáfase (Fenech 2000). Nesse sentido, o aumento na frequência de células micronucleadas observado neste trabalho (Fig. 14a) pode indicar que a exposição ao MeHg esteja associado ao surgimento de eventos clastogênicos e/ou aneugênicos nas células de origem glial. Por outro lado, a presença de pontes nucleoplásmicas está relacionada com eventos como reparo incompleto de quebra da cadeia de DNA ou a presença de rearranjos cromossômicos (Fenech 2005; Fenech 2006). Portanto, é possível que o aumento na frequência de pontes nucleoplásmicas esteja relacionado com o aumento na fragmentação de DNA observado no ensaio cometa (Fig. 13).

Neste sentido, é importante observar que a razão entre a frequência de células micronucleadas (MN) pela frequência de células contendo pontes nucleoplásmicas (PT) é um parâmetro capaz de caracterizar se um agente genotóxico possui características aneugênicas ou clastogênicas (Thomas, Umegaki et al. 2003). Dessa forma, agentes aneugênicos apresentam valores para PT/MN próximos de 0, enquanto um agente reconhecidamente clastogênico é capaz de promover uma razão de 0,77 (Thomas, Umegaki et al. 2003).

No nosso trabalho, a razão PT/MN foi de 1,75 sugerindo que o MeHg é um agente genotóxico capaz de promover eventos clastogênicos. Esse dado vem confirmar resultados preliminares com linhagem de glioblastoma onde foi observado também um efeito clastogênico do MeHg (Crespo-Lopez, Lima de Sa et al. 2007). Apoiando essa hipótese, um trabalho recente demonstrou que a exposição ao MeHg causa também com uma menor atividade da enzima Poli (ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1) a qual atua na reparação de quebras na cadeia de DNA (Pieper, Wehe et al. 2014).

A formação de broto nuclear está relacionada com a amplificação gênica ocorrida na fase S do ciclo celular, seguida da eliminação do DNA excedente (Fenech 2002).

Sendo assim, é possível que além dos danos genotóxicos associados à quebra da cadeia do DNA, a exposição ao metal pesado exerça uma ação deletéria também sobre o processo de replicação gênica. Essa hipótese também parece ser apoiada por um estudo recente que mostra que este xenobiótico altera a expressão de genes (Huyck, Nagarkar et al. 2015).

Sabendo que o MN pode ser originado tanto de quebras de pontes nucleoplásmicas quanto de brotos, além do ratio PT/MN calculado acima, o valor da razão entre a frequência de células contendo brotos (BR) e a frequência de células apresentando micronúcleos (MN) pode ser orientativo da origem dos MN. Para essa razão, foi encontrado um valor de 0,91 (muito inferior àquele observado para pontes nucleoplásmicas/micronúcleos de 1,75). Dessa forma, a comparação de ambos os ratios estaria apontando para a formação de pontes nucleoplásmicas como a principal causa da presença de micronúcleos.

O último parâmetro avaliado no ensaio de micronúcleos foi o índice de células binucleadas, que se mostrou menor no grupo exposto ao MeHg (Fig.15a). Uma vez que este parâmetro avalia a taxa de células que completaram o ciclo celular corretamente, este parâmetro está relacionado à proliferação celular (Akudugu, Gade et al. 2001; Fenech 2007), e de fato, já foi observada a sua associação com a exposição ao MeHg (Crespo-Lopez, Lima de Sa et al. 2007). Os dados do presente trabalho vêm confirmar que o efeito deste xenobiótico poderia estar alterando a proliferação celular de células de origem glial, diminuindo-a, mesmo em condições onde não existe morte celular.

Para verificar essa hipótese, foi avaliada a influência do MeHg sobre o índice mitótico (IM) das culturas de células C6 (Fig. 16). A escolha deste parâmetro foi realizada de acordo com a alta sensibilidade apresentada por este marcador para detectar distúrbios no ciclo celular após a exposição ao MeHg, em trabalhos previamente realizados no nosso laboratório (Crespo-Lopez, Lima de Sa et al. 2007; Crespo-Lopez, Macedo et al. 2011). Apesar de que o IM poderia ser calculado pela observação de células em metáfase na técnica de micronúcleos (que usa citocalasina B para deter o ciclo celular), preferimos usar colchicina para o bloqueio do ciclo celular e obtenção de lâminas para o cálculo do IM (ver metodologia). A colchicina atua sobre os microtúbulos, paralisando o ciclo celular na metáfase (Stanton, Gernert et al. 2011),

enquanto que a citocalasina B atua nos microfilamentos de actina e inibe o ciclo celular na etapa de citocinese (Fenech 2007).

A análise do IM revelou que a exposição ao metal pesado aumentou a frequência de células em estágio de metáfase quando comparado ao grupo controle (Fig. 16). Este aumento pode estar associado a um aprisionamento mitótico induzido pela exposição ao metal pesado, uma vez que ocorre um aumento na proporção de células em estágio de metáfase (Fig. 16), ao mesmo tempo em que é observada uma redução na proporção de células binucleadas (Fig.15), sugerindo, dessa forma, uma perturbação no ciclo normal de divisão celular da linhagem de origem glial.

Quando comparados nossos resultados do IM com aqueles do estudo anterior (Crespo-Lopez, Lima de Sa et al. 2007), é observada uma diferença nos dados absolutos entre os IM dos grupos controles com a linhagem C6 (0,015) e aqueles com a linhagem U373 de glioblastoma (0,05). A diferença encontrada entre os grupos controles de ambas as linhagens pode estar relacionada, entre outras causas, ao uso de técnicas diferentes para a avaliação do IM. Como já relatado, neste trabalho, foi utilizada a técnica de bloqueio do ciclo celular com colchicina (que promove a citostase através da ação nos microtúbulos, impedindo a chegada à anáfase) pelo período de 4 horas. Entretanto, o IM da linhagem U373 foi analisado utilizando a técnica de bloqueio do ciclo celular com citocalasina B pelo intervalo de 24 horas (Crespo-Lopez, Lima de Sa et al. 2007). Além disso, é importante ressaltar que cada linhagem celular possui um ritmo próprio de crescimento da cultura.

Entretanto, o efeito do MeHg sobre o IM foi semelhante proporcionalmente em ambos os estudos (aumento de aproximadamente 95%), revelando um maior número de células em metáfase dentro dessas populações, o que indica uma alteração do ciclo celular de forma consistente em diferentes modelos de célula glial expostos ao MeHg.

Mas como seria exatamente essa alteração? Como seria afetada cada fase do ciclo celular? Para responder a essas perguntas e completar os dados de IM, o ciclo celular completo foi analisado por citometria de fluxo. Essa análise resultou em um aumento na população celular nas fases S e G2/M (Fig.17). Por outro lado, nenhuma alteração é observada na fração sub-G1 (apesar de ser observada uma pequena cauda, não é considerado um aumento significativo) (Fig. 17b; janela P6), fração esta que poderia

sugerir a ocorrência de células em apoptose (Hong, Chung et al. 2014). Portanto, este resultado está de acordo com os dados obtidos nos ensaios de viabilidade (Fig. 10, 12).

De fato, a exposição ao MeHg tem sido relacionada com distúrbios no ciclo celular de alguns tipos celulares, principalmente linhagens neuronais e células progenitoras neuronais (Ponce, Kavanagh et al. 1994; Miura, Koide et al. 1999; Burke, Cheng et al. 2006; Xu, Yan et al. 2010). Alguns destes estudos descrevem que a exposição ao MeHg provoca um aprisionamento em G1 (Burke, Cheng et al. 2006; Xu, Yan et al. 2010). Entretanto, um aumento na população em S ou G2/M também já foi relatada (Miura, Koide et al. 1999; Zhang, Xu et al. 2009). Essa desigualdade entre os dados não parece ser relacionada às diferenças entre a origem das culturas de células do SNC (primária ou linhagens celulares), uma vez que a exposição a este metal pesado foi capaz de promover um aprisionamento em G2/M após o tratamento com este metal pesado também em células não relacionadas com o SNC, como fibroblastos (Mendoza, Ponce et al. 2002).

A diversidade entre os resultados parece estar mais relacionada com uma variação na concentração de MeHg, uma vez que a alteração neste parâmetro de exposição resulta em alteração no perfil do ciclo celular (Ponce, Kavanagh et al. 1994). Contudo, é importante destacar que o efeito do MeHg sobre o ciclo celular de células gliais ainda não havia sido descrito, sendo que o presente trabalho demonstra que em concentrações subletais este metal promove um aumento na população celular nas fases S e G2/M.

Por fim, é importante destacar que apesar de existir uma quantidade maior de células nas fases G2/M, a cultura de células C6 expostas ao MeHg apresentam um menor número de células alcançando o estágio de citocinese (como revelado pelo índice de binucleação; Fig. 15). Estes fatos juntos apresentam indícios de processos que teriam como consequência uma redução da proliferação celular.

A exposição ao MeHg já foi relacionada a uma redução na proliferação celular tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Burke, Cheng et al. 2006; Bose, Onishchenko et al. 2012; Ceccatelli, Bose et al. 2013; Sokolowski, Obiorah et al. 2013). Os estudos conduzidos *in vitro* utilizaram principalmente o modelo de células-tronco neurais para suas análises (Bose, Onishchenko et al. 2012; Ceccatelli, Bose et al. 2013). A exposição ao MeHg resultou em uma menor proliferação de CTN além de uma menor diferenciação celular

destas em células neuronais (Ceccatelli, Bose et al. 2013; Sokolowski, Obiorah et al. 2013).

Entretanto, o uso de células-tronco neurais se destaca por ser um modelo com uma sensibilidade maior aos xenobióticos quando comparados com células neuronais ou gliais diferenciada (Ceccatelli, Dare et al. 2010). Na avaliação de células diferenciadas é possível destacar que a exposição ao MeHg já foi associada a uma redução da proliferação celular de células de origem neuronal (Burke, Cheng et al. 2006; Mundy, Radio et al. 2010). Apesar de ser sugerido que este efeito pudesse ocorrer também em células de origem glial (Belletti, Orlandini et al. 2002; Crespo-Lopez, Lima de Sa et al. 2007; Pieper, Wehe et al. 2014), esta é a primeira vez que este evento é analisado. No nosso trabalho, o aparente sequestro do ciclo celular provocado pela intoxicação mercurial não afetou ao número total de células ou à viabilidade delas após 24 horas (Fig. 10 e 12). Uma possível explicação para isso seria que o tempo no qual medimos a viabilidade (24h) não foi suficientemente prolongado para que esse sequestro do ciclo celular tenha tido consequências significativas na proliferação celular. Assim, desenhamos um experimento no qual após a exposição à concentração subletal de MeHg por 24h, avaliamos a viabilidade celular durante as 48 horas seguintes já na ausência de MeHg.

Um aspecto interessante deste experimento, é que a dose e o tempo de exposição usados (equivalente a uma exposição por um tempo limitado e uma dose muito baixa), seriam considerados relativamente seguros quando comparados aos limites estabelecidos internacionalmente. Por isso, em princípio, não caberia esperar alterações significativas após essa exposição. Interessantemente, a curva temporal de viabilidade apontou que mesmo não havendo diferenças após 24 horas de exposição, poderia estar acontecendo um efeito inibitório na proliferação celular 24h após a retirada do MeHg (Fig. 18). Mas, por que é que a diferença na proliferação celular somente seria observada nesse momento e não antes? Apesar de serem necessários estudos mais aprofundados para responder a essa questão, uma possível explicação seria que, devido ao uso de uma concentração tão baixa de MeHg, torna-se necessário um acúmulo de alterações no DNA e no ciclo celular (como as que começaram a ser observadas após 24h de incubação com MeHg) para provocar, em um mais longo prazo, diferenças significativas na proliferação celular.

No entanto, cabe lembrar que o ensaio do MTT avalia a quantidade de células viáveis através da atividade mitocondrial. Sabendo que as mitocôndrias constituem um dos alvos celulares do MeHg sendo capaz de reduzir a produção de ATP celular (Belletti, Orlandini et al. 2002), é possível que a diferença observada após a retirada do MeHg do meio de cultura esteja relacionado com um dano mitocondrial, somente refletido de forma significativa na proliferação celular em um mais longo prazo (Fig. 15; + 24 horas). Para excluir essa possibilidade, foi avaliado o número de células viáveis e a confluência celular da cultura 24 horas após a exposição com MeHg (Fig. 19 e 20). A diferença na viabilidade celular observada na curva temporal foi de fato acompanhada por uma diferença no número de células viáveis e na confluência celular. Estes dados associados às alterações no ciclo celular observadas na exposição de MeHg, demonstram que, apesar de não promover morte celular, uma baixa concentração deste metal pode reduzir a proliferação de células gliais.

Um último aspecto interessante é que apesar de que as células expostas são capazes de recuperar um perfil semelhante de proliferação celular (curva exponencial de crescimento observada após 48h do fim da exposição ao MeHg), o atraso produzido nas 24h horas seguintes ao fim da exposição não é recuperado, produzindo uma redução significativa e relativamente permanente da população celular que foi exposta, em relação ao controle. A importância deste achado contribui mais uma vez para a polêmica estabelecida na última década sobre se os limites atuais estabelecidos para a exposição ao MeHg seriam realmente seguros (Carta, Flore et al. 2003; Auger, Kofman et al. 2005; Crespo-Lopez, Lima de Sa et al. 2007; Pinheiro, Crespo-Lopez et al. 2007). Nesse sentido pela primeira vez é demonstrado que a exposição ao MeHg, em baixa concentração subletal (considerada relativamente segura, de acordo aos limites atuais estabelecidos), é capaz de promover genotoxicidade e distúrbios na proliferação de células de origem glial. Este fato se torna especialmente importante, uma vez que este tipo celular apresenta um papel fundamental na proteção do SNC em casos de intoxicação crônica com este metal pesado.

## 6 CONCLUSÃO

As avaliações bioquímica (atividade mitocondrial – medida pelo ensaio de MTT–) e morfofuncional (integridade da membrana – avaliada pelo ensaio com os corantes BE e AA –) confirmaram a ausência de morte celular após a exposição ao metal pesado na concentração de 3  $\mu\text{M}$  por um intervalo de 24 horas. Mesmo sem promover processos de morte celular, o tratamento com esta concentração sub-letal de MeHg foi capaz de aumentar significativamente os níveis dos marcadores de genotoxicidade (fragmentação do DNA, formação de micronúcleos, pontes nucleoplásmica e brotos nucleares). Ao mesmo tempo, foi possível observar uma alteração no ciclo celular através do aumento do índice mitótico e uma mudança no perfil do ciclo celular com aumento da população celular nas fases S e G2/M, sugerindo um aprisionamento nessa etapa. Esta mudança no ciclo celular provocada por 24h de exposição ao MeHg, foi seguida de uma redução no número de células viáveis e confluência celular 24h após a retirada do MeHg e substituição do meio de cultura, além do aumento no tempo de duplicação da cultura mesmo.

À vista do que foi exposto, este trabalho, demonstra que mesmo a exposição por um tempo limitado a uma concentração baixa e subletal de MeHg, provoca um efeito citostático significativo, que após a retirada do xenobiótico, é seguida por uma diminuição no número total de células viáveis de forma continuada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akudugu, J., G. Gade, et al. (2001). "Cytotoxicity of azadirachtin A in human glioblastoma cell lines." *Life Sci* **68**(10): 1153-1160.
- Alberts, B. (2004). *Biologia Molecular da Célula*. Rio de Janeiro, Artmed.
- Amorim, M. I., D. Mergler, et al. (2000). "Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon." *An Acad Bras Cienc* **72**(4): 497-507.
- Anderson, M. E. and A. Meister (1983). "Transport and direct utilization of gamma-glutamylcyst(e)ine for glutathione synthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(3): 707-711.
- Aschner, M., Y. L. Du, et al. (1993). "Methylmercury-induced alterations in excitatory amino acid transport in rat primary astrocyte cultures." *Brain Res* **602**(2): 181-186.
- Aschner, M., T. Syversen, et al. (2007). "Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity." *Braz J Med Biol Res* **40**(3): 285-291.
- Auger, N., O. Kofman, et al. (2005). "Low-level methylmercury exposure as a risk factor for neurologic abnormalities in adults." *Neurotoxicology* **26**(2): 149-157.
- Azqueta, A. and A. R. Collins (2013). "The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair." *Arch Toxicol* **87**(6): 949-968.
- Bartek, J. and J. Lukas (2007). "DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation." *Curr Opin Cell Biol* **19**(2): 238-245.
- Belletti, S., G. Orlandini, et al. (2002). "Time course assessment of methylmercury effects on C6 glioma cells: submicromolar concentrations induce oxidative DNA damage and apoptosis." *J Neurosci Res* **70**(5): 703-711.
- Berzas Nevado, J. J., R. C. Rodriguez Martin-Doimeadios, et al. (2010). "Mercury in the Tapajos River basin, Brazilian Amazon: a review." *Environ Int* **36**(6): 593-608.
- Bhowmik, N. and M. Patra (2013). "Assessment of genotoxicity of inorganic mercury in rats in vivo using both chromosomal aberration and comet assays." *Toxicol Ind Health*.
- Blagosklonny, M. V. (2007). "Mitotic arrest and cell fate: why and how mitotic inhibition of transcription drives mutually exclusive events." *Cell Cycle* **6**(1): 70-74.
- Boening, D. W. (2000). "Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review." *Chemosphere* **40**(12): 1335-1351.
- Bonacker, D., T. Stoiber, et al. (2004). "Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function." *Arch Toxicol* **78**(10): 575-583.
- Bose, R., N. Onishchenko, et al. (2012). "Inherited effects of low-dose exposure to methylmercury in neural stem cells." *Toxicol Sci* **130**(2): 383-390.
- Brunton, L. L. C., BRUCE A. Knollmann, BJORN C. (2007). *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, Mr Gran Hill.
- Burke, K., Y. Cheng, et al. (2006). "Methylmercury elicits rapid inhibition of cell proliferation in the developing brain and decreases cell cycle regulator, cyclin E." *Neurotoxicology* **27**(6): 970-981.
- Carocci, A., N. Rovito, et al. (2014). "Mercury toxicity and neurodegenerative effects." *Rev Environ Contam Toxicol* **229**: 1-18.
- Carta, P., C. Flore, et al. (2003). "Sub-clinical neurobehavioral abnormalities associated with low level of mercury exposure through fish consumption." *Neurotoxicology* **24**(4-5): 617-623.
- Catala, A. (2006). "An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay." *Int J Biochem Cell Biol* **38**(9): 1482-1495.
- Ceccatelli, S., R. Bose, et al. (2013). "Long-lasting neurotoxic effects of exposure to methylmercury during development." *J Intern Med* **273**(5): 490-497.
- Ceccatelli, S., E. Dare, et al. (2010). "Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis." *Chem Biol Interact* **188**(2): 301-308.
- Chang, J. Y. (2007). "Methylmercury causes glial IL-6 release." *Neurosci Lett* **416**(3): 217-220.

- Charleston, J. S., R. P. Bolender, et al. (1994). "Increases in the number of reactive glia in the visual cortex of *Macaca fascicularis* following subclinical long-term methyl mercury exposure." Toxicol Appl Pharmacol **129**(2): 196-206.
- Choi, B. H., K. H. Cho, et al. (1981). "Effects of methylmercury on human fetal neurons and astrocytes in vitro: a time-lapse cinematographic, phase and electron microscopic study." Environ Res **24**(1): 61-74.
- Chunmei, D., J. Cunwei, et al. (2014). "Study of the interaction between mercury (II) and bovine serum albumin by spectroscopic methods." Environ Toxicol Pharmacol **37**(2): 870-877.
- Clemedson, C. and B. Ekwall (1999). "Overview of the Final MEIC Results: I. The In Vitro--In Vitro Evaluation." Toxicol In Vitro **13**(4-5): 657-663.
- Costa-Malaquias, A., M. B. Almeida, et al. (2014). "Morphine protects against methylmercury intoxication: a role for opioid receptors in oxidative stress?" PLoS One **9**(10): e110815.
- Cree, I. (2011). Cancer cell culture. London, Humana Press.
- Crespo-Lopez, M. E., A. Lima de Sa, et al. (2007). "Methylmercury genotoxicity: a novel effect in human cell lines of the central nervous system." Environ Int **33**(2): 141-146.
- Crespo-Lopez, M. E., G. L. Macedo, et al. (2011). "Genotoxicity of mercury: contributing for the analysis of Amazonian populations." Environ Int **37**(1): 136-141.
- Crespo-Lopez, M. E., G. L. Macedo, et al. (2009). "Mercury and human genotoxicity: critical considerations and possible molecular mechanisms." Pharmacol Res **60**(4): 212-220.
- Culbreth, M. E., J. A. Harrill, et al. (2012). "Comparison of chemical-induced changes in proliferation and apoptosis in human and mouse neuroprogenitor cells." Neurotoxicology **33**(6): 1499-1510.
- Curi, P. a. (2005). Como cultivar células. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Dare, E., W. Li, et al. (2001). "Methylmercury and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoke lysosomal damage in human astrocytoma D384 cells followed by apoptosis." Free Radic Biol Med **30**(12): 1347-1356.
- Das, S., B. Nageshwar Rao, et al. (2011). "Mangiferin attenuates methylmercury induced cytotoxicity against IMR-32, human neuroblastoma cells by the inhibition of oxidative stress and free radical scavenging potential." Chem Biol Interact **193**(2): 129-140.
- de Melo Reis, R. A., A. M. Herculano, et al. (2007). "In vitro toxicity induced by methylmercury on sympathetic neurons is reverted by L-cysteine or glutathione." Neurosci Res **58**(3): 278-284.
- Deckbar, D., P. A. Jeggo, et al. (2011). "Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints." Crit Rev Biochem Mol Biol **46**(4): 271-283.
- do Nascimento, J. L., K. R. Oliveira, et al. (2008). "Methylmercury neurotoxicity & antioxidant defenses." Indian J Med Res **128**(4): 373-382.
- Dourson, M. L., A. E. Wullenweber, et al. (2001). "Uncertainties in the reference dose for methylmercury." Neurotoxicology **22**(5): 677-689.
- Duronio, R. J. and Y. Xiong (2013). "Signaling pathways that control cell proliferation." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(3): a008904.
- Ehrich, M. and B. Veronesi. (1999). In vitro Neurotoxicology. T. H. A. H. G.J., Taylor & Francis.
- Eke, D. and A. Celik (2008). "Genotoxicity of thimerosal in cultured human lymphocytes with and without metabolic activation sister chromatid exchange analysis proliferation index and mitotic index." Toxicol In Vitro **22**(4): 927-934.
- Ekstrom, E. B. and F. M. Morel (2008). "Cobalt limitation of growth and mercury methylation in sulfate-reducing bacteria." Environ Sci Technol **42**(1): 93-99.
- Ekwall, B. (1999). "Overview of the Final MEIC Results: II. The In Vitro--In Vivo Evaluation, Including the Selection of a Practical Battery of Cell Tests for Prediction of Acute Lethal Blood Concentrations in Humans." Toxicol In Vitro **13**(4-5): 665-673.
- Elkholi, R. and J. E. Chipuk (2014). "How do I kill thee? Let me count the ways: p53 regulates PARP-1 dependent necrosis." Bioessays **36**(1): 46-51.

- Epe, B. (2012). "DNA damage spectra induced by photosensitization." Photochem Photobiol Sci **11**(1): 98-106.
- Ermolaeva, M. A., A. Dakhovnik, et al. (2015). "Quality control mechanisms in cellular and systemic DNA damage responses." Ageing Res Rev.
- Farina, M., M. Aschner, et al. (2011). "Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity." Toxicol Appl Pharmacol **256**(3): 405-417.
- Fenech, M. (2000). "The in vitro micronucleus technique." Mutat Res **455**(1-2): 81-95.
- Fenech, M. (2002). "Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology." Toxicology **181-182**: 411-416.
- Fenech, M. (2002). "Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer." Drug Discov Today **7**(22): 1128-1137.
- Fenech, M. (2005). "The Genome Health Clinic and Genome Health Nutrigenomics concepts: diagnosis and nutritional treatment of genome and epigenome damage on an individual basis." Mutagenesis **20**(4): 255-269.
- Fenech, M. (2006). "Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death." Mutat Res **600**(1-2): 58-66.
- Fenech, M. (2007). "Cytokinesis-block micronucleus cytome assay." Nat Protoc **2**(5): 1084-1104.
- Fung, T. K. and R. Y. Poon (2005). "A roller coaster ride with the mitotic cyclins." Semin Cell Dev Biol **16**(3): 335-342.
- Ge, W., S. Yan, et al. (2015). "Oxidative Stress and DNA Damage Induced by Imidacloprid in Zebrafish (*Danio rerio*)." J Agric Food Chem.
- Georgakilas, A. G., W. G. Mosley, et al. (2010). "Viral-induced human carcinogenesis: an oxidative stress perspective." Mol Biosyst **6**(7): 1162-1172.
- Giordano, G. and L. Costa (2011). In vitro Neurotoxicology, Humana Press.
- Gribble, E. J., S. W. Hong, et al. (2005). "The magnitude of methylmercury-induced cytotoxicity and cell cycle arrest is p53-dependent." Birth Defects Res A Clin Mol Teratol **73**(1): 29-38.
- Harhaji-Trajkovic, L., K. Arsin, et al. (2012). "Chloroquine-mediated lysosomal dysfunction enhances the anticancer effect of nutrient deprivation." Pharm Res **29**(8): 2249-2263.
- Harris, H. H., I. J. Pickering, et al. (2003). "The chemical form of mercury in fish." Science **301**(5637): 1203.
- Herculano, A. M., M. E. Crespo-Lopez, et al. (2006). "Methylmercury intoxication activates nitric oxide synthase in chick retinal cell culture." Braz J Med Biol Res **39**(3): 415-418.
- Hong, J. Y., H. J. Chung, et al. (2014). "Induction of Cell Cycle Arrest and Apoptosis by Physcion, an Anthraquinone Isolated From Rhubarb (Rhizomes of *Rheum tanguticum*), in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells." J Cancer Prev **19**(4): 273-278.
- Hong, Y. S., Y. M. Kim, et al. (2012). "Methylmercury exposure and health effects." J Prev Med Public Health **45**(6): 353-363.
- Huyck, R. W., M. Nagarkar, et al. (2015). "Methylmercury exposure during early *Xenopus laevis* development affects cell proliferation and death but not neural progenitor specification." Neurotoxicol Teratol **47**: 102-113.
- Iarmarcovai, G., S. Bonassi, et al. (2008). "Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature." Mutat Res **658**(3): 215-233.
- Jordan, M. A. and L. Wilson (2004). "Microtubules as a target for anticancer drugs." Nat Rev Cancer **4**(4): 253-265.
- Kaur, P., L. Evje, et al. (2010). "The in vitro effects of Trolox on methylmercury-induced neurotoxicity." Toxicology **276**(1): 73-78.
- Kirsch-Volders, M., A. Vanhauwaert, et al. (2002). "Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations." Mutat Res **504**(1-2): 137-148.

- Kirsch-Volders, M., A. Vanhauwaert, et al. (2003). "Indirect mechanisms of genotoxicity." Toxicol Lett **140-141**: 63-74.
- Koedrith, P., H. Kim, et al. (2013). "Toxicogenomic approaches for understanding molecular mechanisms of heavy metal mutagenicity and carcinogenicity." Int J Hyg Environ Health **216**(5): 587-598.
- Krishan, A. (1975). "Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining." J Cell Biol **66**(1): 188-193.
- Le Hegarat, L., A. Mourot, et al. (2014). "Performance of comet and micronucleus assays in metabolic competent HepaRG cells to predict in vivo genotoxicity." Toxicol Sci **138**(2): 300-309.
- Lee, C. H., R. H. Lin, et al. (1997). "Distinct genotoxicity of phenylmercury acetate in human lymphocytes as compared with other mercury compounds." Mutat Res **392**(3): 269-276.
- Li, L., F. Wang, et al. (2010). "Speciation of methylmercury in rice grown from a mercury mining area." Environ Pollut **158**(10): 3103-3107.
- Li, P., X. B. Feng, et al. (2009). "Mercury pollution in Asia: a review of the contaminated sites." J Hazard Mater **168**(2-3): 591-601.
- Lukas, J., C. Lukas, et al. (2004). "Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 997-1007.
- Magdolenova, Z., A. Collins, et al. (2014). "Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles." Nanotoxicology **8**(3): 233-278.
- Malumbres, M., R. Sotillo, et al. (2004). "Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6." Cell **118**(4): 493-504.
- Martinez-Zamudio, R. and H. C. Ha (2011). "Environmental epigenetics in metal exposure." Epigenetics **6**(7): 820-827.
- Massague, J. (2004). "G1 cell-cycle control and cancer." Nature **432**(7015): 298-306.
- Mateuca, R., N. Lombaert, et al. (2006). "Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring." Biochimie **88**(11): 1515-1531.
- Mendoza, M. A., R. A. Ponce, et al. (2002). "p21(WAF1/CIP1) inhibits cell cycle progression but not G2/M-phase transition following methylmercury exposure." Toxicol Appl Pharmacol **178**(2): 117-125.
- Miura, K., N. Koide, et al. (1999). "The involvement of microtubular disruption in methylmercury-induced apoptosis in neuronal and nonneuronal cell lines." Toxicol Appl Pharmacol **160**(3): 279-288.
- Morken, T. S., U. Sonnewald, et al. (2005). "Effects of methylmercury on primary brain cells in mono- and co-culture." Toxicol Sci **87**(1): 169-175.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
- Mundy, W. R., N. M. Radio, et al. (2010). "Neuronal models for evaluation of proliferation in vitro using high content screening." Toxicology **270**(2-3): 121-130.
- Negi, R., D. Pande, et al. (2014). "Association of oxidative DNA damage, protein oxidation and antioxidant function with oxidative stress induced cellular injury in pre-eclamptic/eclamptic mothers during fetal circulation." Chem Biol Interact **208**: 77-83.
- Nevado, J. J., R. C. Martin-Doimeadios, et al. (2011). "Comparison of gas chromatographic hyphenated techniques for mercury speciation analysis." J Chromatogr A **1218**(28): 4545-4551.
- Nevado, J. J. B., R. C. R. Martin-Doimeadios, et al. (2009). "Mercury speciation analysis on cell lines of the human central nervous system to explain genotoxic effects." Microchemical Journal **93**(1): 12-16.
- Ni, M., X. Li, et al. (2012). "Glia and methylmercury neurotoxicity." J Toxicol Environ Health A **75**(16-17): 1091-1101.

- Ni, M., X. Li, et al. (2011). "Comparative study on the response of rat primary astrocytes and microglia to methylmercury toxicity." *Glia* **59**(5): 810-820.
- Nikoletopoulou, V., M. Markaki, et al. (2013). "Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy." *Biochim Biophys Acta* **1833**(12): 3448-3459.
- Nojima, H. (2004). "G1 and S-phase checkpoints, chromosome instability, and cancer." *Methods Mol Biol* **280**: 3-49.
- Nriagu (1993). "Mercury pollution from silver mining in colonial South America." *Proceedings of the International Symposium on Environmental Geochemistry in the Tropical Countries*.
- Paez, Y. C., C. A. Betancourt, et al. (2012). "Increased mercury and body size and changes in trophic structure of *Gambusia puncticulata* (Poeciliidae) along the Almendares River, Cuba." *Arch Environ Contam Toxicol* **63**(4): 523-533.
- Parker, A. L., M. Kavallaris, et al. (2014). "Microtubules and their role in cellular stress in cancer." *Front Oncol* **4**: 153.
- Paz, M. C. d. (2005). Citotoxicidade induzida pelo extrato de *Pteridium aquilinum* sobre células HSG e OSCC. *Instituto de Ciências Biológicas*. Brasília, UNB. **MSc**.
- Petroni, D., J. Tsai, et al. (2012). "Low-dose methylmercury-induced oxidative stress, cytotoxicity, and tau-hyperphosphorylation in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells." *Environ Toxicol* **27**(9): 549-555.
- Pieper, I., C. A. Wehe, et al. (2014). "Mechanisms of Hg species induced toxicity in cultured human astrocytes: genotoxicity and DNA-damage response." *Metallomics* **6**(3): 662-671.
- Pinheiro, M. C., M. E. Crespo-Lopez, et al. (2007). "Mercury pollution and childhood in Amazon riverside villages." *Environ Int* **33**(1): 56-61.
- Pinheiro, M. C., B. M. Macchi, et al. (2008). "Mercury exposure and antioxidant defenses in women: a comparative study in the Amazon." *Environ Res* **107**(1): 53-59.
- Pinheiro, M. C., T. Oikawa, et al. (2006). "Comparative study of human exposure to mercury in riverside communities in the Amazon region." *Braz J Med Biol Res* **39**(3): 411-414.
- Ponce, R. A., T. J. Kavanagh, et al. (1994). "Effects of methyl mercury on the cell cycle of primary rat CNS cells in vitro." *Toxicol Appl Pharmacol* **127**(1): 83-90.
- Pouilly, M., D. Rojas, et al. (2013). "Trophic structure and mercury biomagnification in tropical fish assemblages, Itenez River, Bolivia." *PLoS One* **8**(5): e65054.
- Queiroz, M. L., C. Bincoletto, et al. (1999). "Presence of micronuclei in lymphocytes of mercury exposed workers." *Immunopharmacol Immunotoxicol* **21**(1): 141-150.
- Rao, M. V., N. J. Chinoy, et al. (2001). "Role of ascorbic acid on mercuric chloride-induced genotoxicity in human blood cultures." *Toxicol In Vitro* **15**(6): 649-654.
- Reinhardt, H. C. and B. Schumacher (2012). "The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer." *Trends Genet* **28**(3): 128-136.
- Rieder, C. L. (2011). "Mitosis in vertebrates: the G2/M and M/A transitions and their associated checkpoints." *Chromosome Res* **19**(3): 291-306.
- Rodier, F., J. Campisi, et al. (2007). "Two faces of p53: aging and tumor suppression." *Nucleic Acids Res* **35**(22): 7475-7484.
- Rodriguez Martin-Doimeadios, R. C., J. J. Berzas Nevado, et al. (2014). "Comparative study of mercury speciation in commercial fishes of the Brazilian Amazon." *Environ Sci Pollut Res Int* **21**(12): 7466-7479.
- Roth, V. (2006). from <<http://www.doubling-time.com/compute.php>>.
- Roulet, M. L., M. (1995). "Geochemistry of mercury in pristine and flooded ferralitic soils of a tropical rainforest in French Guiana, South America." *Water, air and Soil Pollution* **80**: 1079-1088.
- Roulet, M. L., M. Rheault, I. Tran, S. Farella, N. Canuel, R. Mergler, D. Amorim, M. (1996). *Mercury in amazon soils: accumulation and release*. IV International Conference on the Geochemistry of the Earth's Surface.

- Sager, P. R., R. A. Doherty, et al. (1983). "Interaction of methylmercury with microtubules in cultured cells and in vitro." *Exp Cell Res* **146**(1): 127-137.
- Sanfeliu, C., J. Sebastia, et al. (2001). "Methylmercury neurotoxicity in cultures of human neurons, astrocytes, neuroblastoma cells." *Neurotoxicology* **22**(3): 317-327.
- Santos, E. C., I. M. Jesus, et al. (2000). "Mercury exposures in riverside Amazon communities in Para, Brazil." *Environ Res* **84**(2): 100-107.
- Schumacher, B., G. A. Garinis, et al. (2008). "Age to survive: DNA damage and aging." *Trends Genet* **24**(2): 77-85.
- Shanker, G. and M. Aschner (2001). "Identification and characterization of uptake systems for cystine and cysteine in cultured astrocytes and neurons: evidence for methylmercury-targeted disruption of astrocyte transport." *J Neurosci Res* **66**(5): 998-1002.
- Shanker, G., T. Syversen, et al. (2003). "Astrocyte-mediated methylmercury neurotoxicity." *Biol Trace Elem Res* **95**(1): 1-10.
- Silva-Pereira, L. C., P. C. Cardoso, et al. (2005). "Cytotoxicity and genotoxicity of low doses of mercury chloride and methylmercury chloride on human lymphocytes in vitro." *Braz J Med Biol Res* **38**(6): 901-907.
- Singh, N. P., M. T. McCoy, et al. (1988). "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells." *Exp Cell Res* **175**(1): 184-191.
- Sokolowski, K., M. Obiorah, 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.
- Stanton, R. A., K. M. Gernert, et al. (2011). "Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective." *Med Res Rev* **31**(3): 443-481.
- Sumantran, V. N. (2011). "Cellular chemosensitivity assays: an overview." *Methods Mol Biol* **731**: 219-236.
- Syversen, T. and P. Kaur (2012). "The toxicology of mercury and its compounds." *J Trace Elem Med Biol* **26**(4): 215-226.
- Takahashi, A., H. Matsumoto, et al. (2004). "High-LET radiation enhanced apoptosis but not necrosis regardless of p53 status." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **60**(2): 591-597.
- Thomas, P., K. Umegaki, et al. (2003). "Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay." *Mutagenesis* **18**(2): 187-194.
- Valko, M., C. J. Rhodes, et al. (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." *Chem Biol Interact* **160**(1): 1-40.
- Vicente, J. J. and L. Wordeman (2015). "Mitosis, microtubule dynamics and the evolution of kinesins." *Exp Cell Res*.
- Wasserman, J. C., S. Hacon, et al. (2003). "Biogeochemistry of mercury in the Amazonian environment." *Ambio* **32**(5): 336-342.
- Wasserman, J. C. H., S. Wasserman, M. A. (2001). "O ciclo do Mercúrio no Ambiente Amazônico." *Mundo e Vida* **2**.
- Weitzman, M. D. and J. B. Weitzman (2014). "What's the damage? The impact of pathogens on pathways that maintain host genome integrity." *Cell Host Microbe* **15**(3): 283-294.
- WHO (1990). ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 101. I. P. O. C. SAFETY. Geneva.
- Wickstead, B., K. Gull, et al. (2010). "Patterns of kinesin evolution reveal a complex ancestral eukaryote with a multifunctional cytoskeleton." *BMC Evol Biol* **10**: 110.
- Wilke, R. A., C. P. Kolbert, et al. (2003). "Methylmercury induces apoptosis in cultured rat dorsal root ganglion neurons." *Neurotoxicology* **24**(3): 369-378.
- Wolters, S. and B. Schumacher (2013). "Genome maintenance and transcription integrity in aging and disease." *Front Genet* **4**: 19.
- Wypych, D. and J. Baranska (2013). "Cross-talk in nucleotide signaling in glioma C6 cells." *Adv Exp Med Biol* **986**: 31-59.

- Xu, B., Z. F. Xu, et al. (2012). "Protective effects of MK-801 on methylmercury-induced neuronal injury in rat cerebral cortex: involvement of oxidative stress and glutamate metabolism dysfunction." Toxicology **300**(3): 112-120.
- Xu, M., C. Yan, et al. (2010). "Effects of low level of methylmercury on proliferation of cortical progenitor cells." Brain Res **1359**: 272-280.
- Zhang, P., Y. Xu, et al. (2009). "Protection of pyrroloquinoline quinone against methylmercury-induced neurotoxicity via reducing oxidative stress." Free Radic Res **43**(3): 224-233.