

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

LUANA DE NAZARÉ DA SILVA SANTANA

**CARACTERIZAÇÃO DA INJÚRIA NO CÓRTEX MOTOR
DE RATOS EM UM MODELO DE EXPOSIÇÃO CRÔNICA
AO METILMERCÚRIO (MeHg)**

Belém
2016

LUANA DE NAZARÉ DA SILVA SANTANA

**CARACTERIZAÇÃO DA INJÚRIA NO CÓRTEX MOTOR
DE RATOS EM UM MODELO DE EXPOSIÇÃO CRÔNICA
COM METILMERCÚRIO (MeHg)**

Projeto de Tese de Doutorado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Neurociências
e Biologia Celular. Instituto de Ciências
Biológicas. Universidade Federal do Pará.
Área de Concentração: Neurociências.
Orientador: Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima.

Belém
2016

LUANA DE NAZARÉ DA SILVA SANTANA

**CARACTERIZAÇÃO DA INJÚRIA NO CÓRTEX MOTOR
DE RATOS EM UM MODELO DE EXPOSIÇÃO CRÔNICA
AO METILMERCÚRIO (MeHg)**

Projeto de Tese de Doutorado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Neurociências
e Biologia Celular. Instituto de Ciências
Biológicas. Universidade Federal do Pará.
Área de concentração: Neurociências.
Orientador: Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima.

Data da aprovação. Belém - PA: ____/____/____

Banca Examinadora:

_____- Orientador
Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima.
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Pará

Profª. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia
Instituto de Ciências da Saúde
Universidade Federal do Pará

Profª. Drª. Luanna Melo Pereira Fernandes
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Pará

Profª. Drª. Marcia Cristina Freitas Da Silva
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Pará

AO MEU PAI

Por toda sua sabedoria, paciência e sempre
acreditar na minha capacidade.

À MINHA MÃE

Por me inspirar a buscar sempre
dar o meu melhor.

AOS MEUS IRMÃOS

Pelo incentivo e por me fazerem sorrir
sempre que eu precisava.

À VOCÊ

Por estar lendo este trabalho em busca da conquista
de seus próprios sonhos como assim um dia eu também o fiz...

Luana de Nazaré da Silva Santana

AGRADECIMENTOS

A antes de tudo a Deus, pois sem ele não somos nada. Agradeço a Ele também por colocar em minha vida todas as oportunidades e desafios que tive de enfrentar, pois elas me levaram a conhecer essas pessoas tão especiais, maravilhosas e de tamanhas qualidades que me faltam palavras para descrever todo apreço que tenho por todas elas, e sem as quais nada disso seria possível.

Sou imensamente grata à minha família que sempre esteve ao meu lado torcendo por mim a cada passo, comemorando cada acerto e me apoiando em todas as minhas decisões. Obrigada por toda dedicação, todo o apoio que me foi dado e toda confiança que foi depositada em minha capacidade, mesmo quando os obstáculos pareciam difíceis demais para serem superados. Vocês são os maiores responsáveis por mais esta vitória, a minha motivação, a minha força, o meu tudo... amo vocês.

Ao meu orientador Rafael Rodrigues Lima, primeiramente, por uma orientação singular e por todo conhecimento repassado. Mas acima de tudo pelas lições, dentro e fora do laboratório, sem as quais não seria possível a concretização de mais esta etapa na minha vida.

Aos integrantes do LABEF, que foi minha segunda casa, por toda parceria, finais de semana e noites viradas trabalhando para a conclusão deste projeto, em especial os alunos de pós Bruno e Rafael Fernandes, e aos ICs Russel e Leonardo, por serem sempre tão solícitos e presentes.

Agradeço imensamente aos membros à Prof^{ra}. Cristiane e Prof. Enéas, como participaram ativamente da minha orientação. Aos integrantes do LAFICO, em especial às alunas de Pós Luanna e Sabrina e aos ICs Paulinha e Fábio por todo auxílio dado no desenvolvimento deste projeto. Obrigada por compartilharem de suas experiências e

conhecimento para a construção do meu próprio durante a concretização de mais esta etapa da minha vida.

À professora Lilian e aos alunos do grupo BIOPAQ de pesquisa por terem em recebido tão bem e acrescentado tanto a minha formação, em especial, Dani, Sarita, Lucas, Carla o meu muito obrigado.

À professora Marcia Freitas por ser tão prestativa e abrir um horizonte a mais na nossa linha de raciocínio para o entendimento e finalização deste projeto.

Ao centro de patologia veterinária de Castanhal por terem me acolhido tão bem quando precisei de ajuda para a execução do tecidual. Em especial à Adriana, que me provou que por mais que você seja íntimo de uma etapa ou técnica, sempre há alguém que pode lhe ensinar um pouco mais sobre ela com suas próprias experiências.

A todos os profissionais que participaram ativamente da minha formação profissional. E finalmente agradeço a Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante o doutorado que possibilitaram uma experiência e aprendizado sem igual ao qual poucos tem oportunidade.

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia, por que a vida é muito para ser insignificante.”

Charles Chaplin.

RESUMO

O mercúrio é um contaminante ambiental que representa um grande risco para a saúde humana. A exposição à este metal tóxico ocorre principalmente através de uma dieta contaminada por Metilmercúrio (MeHg), em baixas concentrações e por um longo período de tempo. Desta forma, neste estudo propomos uma avaliação dos efeitos do MeHg sobre o córtex motor em um modelo animal de exposição crônica e em baixa dose, semelhantemente a exposição alimentar em áreas de grande toxicidade ambiental por mercúrio. Ratos adultos foram expostos ao MeHg durante 60 dias, com uma dose de 0,04 mg/kg/dia, enquanto o grupo controle recebeu apenas o veículo. Após este período, foram submetidos a ensaios comportamentais com intuito de se avaliar o desempenho motor após exposição mercurial, sendo então sacrificados e avaliados por parâmetros bioquímicos oxidantes (alteração na concentração de Nitritos - NO, Peroxidação Lipídica - LPO e Capacidade Antioxidante Total) assim como avaliação dos depósitos totais de mercúrio no córtex motor e alterações da densidade celular de neurônios e astrócitos. Os dados foram tabulados e avaliados estatisticamente pelo teste t-Student ($p < 0,05$). Foi possível observar depósitos de mercúrio total no córtex motor, além de déficit nos parâmetros motores, com a redução na locomoção total, no equilíbrio e aumento no número de quedas, aliados à um significativo aumento nos níveis de NO e LPO e diminuição da capacidade antioxidante total dos animais expostos, com redução da população de astrócitos e neurônios, quando comparados aos animais controle esses achados sugerem que a exposição de animais adultos ao MeHg, mesmo em baixa dose e cronicamente, promove alterações no córtex motor com danos em suas funções.

Palavras-chave: Metilmercúrio, Córtex Motor, Alterações Motoras, Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

The mercury is an environmental contaminant which poses a great risk to human health. Exposure to this toxic metal occurs mainly through a diet contaminated by methylmercury (MeHg) in low concentrations and over a long period of time. Thus, in this study we propose an assessment of the effects of MeHg on the motor cortex in an animal model of chronic exposure and low dose, similar to dietary exposure in areas of high environmental toxicity of mercury. Adult rats were exposed to MeHg for 60 days with a dose of 0.04 mg/kg/day, while the control group received only the vehicle. After this period, they were subjected to behavioral testing in order to evaluate the motor performance after mercury exposure, and then sacrificed and evaluated for oxidative biochemical parameters (change in the concentration of nitrite - NO Lipid Peroxidation - LPO and Antioxidant Capacity Total) as well as evaluation of total deposits of mercury in the motor cortex and changes in cell density of neurons and astrocytes. Data were tabulated and statistically analyzed by Student's t-test ($p < 0.05$). It was possible to observe total mercury deposits in the motor cortex, and deficits in motor parameters, with a reduction in the overall locomotion, on balance and increase in the number of failure, coupled with a significant increase in the levels of NO and LPO and decreased ability antioxidant full of animals exposed, reducing the population of astrocytes and neurons compared to control animals these findings suggest that exposure of adult animals to MeHg, even at low dose and chronically, causes changes in the motor cortex with damage to their functions.

Keywords: Methylmercury, Motor Cortex, Motor Changes, Oxidative Stress.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Organização dos grupos experimentais e a distribuição do número de animais adotado, onde os animais Óleo representam os controles e os animais MeHg o grupo exposto cronicamente ao Metilmercúrio..... 29
- Figura 2.** Diagrama da exposição do animal ao aparato que compõe o Campo Aberto para realização do teste de atividade locomotora espontânea..... 31
- Figura 3.** Diagrama do animal durante sua exposição ao equipamento Rotarod..... 32
- Figura 4.** Apresentação das variações no ganho de massa sofridas por ambos os grupos durante todo o experimento (A), após ingestão diária de MeHg (0,04mg/kg/dia) e os depósitos de mercúrio total formados após essa exposição crônica (B)..... 36
- Figura 5.** A exposição crônica ao MeHg promoveu alterações no balanço oxidativo dos animais expostos cronicamente. Houve a redução na capacidade oxidante total (A) e consequente aumento dos parâmetros pró-oxidante: Peroxidação Lipídica (B) e níveis de Nitrito (C)..... 38
- Figura 6.** Fotomicrografia em coloração clássica (Hematoxilina e Eosina) apresentando os grupos Controle (A e C) e MeHg (B e D) ilustrando o panorama geral das populações celulares de cada grupo. Aumento de 10x (A e B) e 20x (C e D), escala 100µm e 50µm, respectivamente..... 39
- Figura 7.** Imunomarcção para o anticorpo GFAP apresentando os grupos Controle (A) e MeHg (B) ilustrando a redução da população astrocitária (ponta de seta) em cada grupo. Aumento de 10x, escala 100µm. Seguido do gráfico (C) com a quantificação dos respectivos grupos ($p > 0.0001$)..... 40
- Figura 8.** Imunomarcção para o anticorpo NeuN apresentando os grupos Controle (A) e MeHg (B) ilustrando a redução da população de neurônios maduros (ponta de seta) em cada grupo. Aumento de 10x 41

(A e B) e 20x (C e D), escala 100µm e 50µm, respectivamente. Seguido do gráfico (E) com a quantificação dos respectivos grupos (p=0,0074).....

Figura 9. A exposição crônica ao MeHg levou à um prejuízo no desempenho motor dos animais expostos cronicamente ao MeHg no teste do Campo Aberto (5min). Os animais sofreram não apenas uma redução no número de *rearing* (A) como no número de quadrantes cruzados (B)..... 42

Figura 10. A exposição crônica ao MeHg prejudicou o desempenho dos animais expostos no teste de locomoção forçada, Rotarod. Tanto na latência para a primeira queda (A), como no número de quedas (B)..... 43

LISTA DE SIGLAS

4HDA	Hydroxyalkenals
BHE	Barreira Hemato Encefálica
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HClO ₄	Ácido Perclórico
HE	Hematoxilina e Eosina
Hg ⁰	Mercúrio Elementar
Hg ²⁺	Mercúrio Inorgânico
HgCl ₂	Cloreto de Mercúrio
HNO ₃	Ácido Nítrico
LPO	Peroxidação Lipídica
MDA	Malonaldeído
MeHg	Metilmercúrio
OMS	Organização Mundial da Saúde
Ppm	Parte por Milhão
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SNC	Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	14
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE SIGLAS	17
1 INTRODUÇÃO	20
1.1. O MERCÚRIO E A SAÚDE PÚBLICA.....	20
1.2. NEUROTOXICIDADE DO METILMERCÚRIO.....	21
1.3. O MERCÚRIO E SUA INTERFERÊNCIA NO BALANCE OXIDATIVO.....	23
1.4. MERCÚRIO E COMPROMETIMENTOS FUNCIONAIS.....	25
1.5. JUSTIFICATIVA.....	26
2 OBJETIVOS	27
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	28
3.2. FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	28
3.3. EXPOSIÇÃO AO METILMERCÚRIO.....	29
3.4. ENSAIOS COMPORTAMENTAIS.....	30
3.4.1. Teste da atividade locomotora espontânea (<i>Open Field</i>)	30
3.4.2. Teste do Rotarod	31
3.5. ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	32
3.5.1. Análise da Capacidade Antioxidante Total	32
3.5.2. Concentração de Nitrito (NO)	33
3.5.3. Peroxidação Lipídica (LPO)	33
3.6. AVALIAÇÃO DOS DEPÓSITOS DE MERCÚRIO NO CÓRTEX MOTOR.....	34
3.7. ANÁLISE TECIDUAL.....	35
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
4. RESULTADOS	36
4.1. A EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO MEHG PROMOVEU A FORMAÇÃO DE DEPÓSITOS NO CÓRTEX DE RATOS MACHOS ADULTOS E ALTERAÇÃO NO GANHO DE MASSA.....	36

4.2. A EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO MEHG PROMOVEU UM AUMENTO NOS FATORES PRÓ-OXIDANTES E REDUÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL.....	37
4.3. ANÁLISE TECIDUAL: A EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO MEHG LEVOU A REDUÇÃO NA POPULAÇÃO ASTROCITÁRIA E PERDA NEURONAL.....	39
4.4. ENSAIOS COMPORTAMENTAIS.....	42
4.4.1. A exposição crônica ao MeHg induziu a redução na atividade locomotora espontânea horizontal e vertical durante o teste do Campo aberto.....	42
4.4.2. Houve a diminuição da latência e aumento do número de quedas nas 3 exposições do grupo exposto ao MeHg durante a execução do teste Rota-rod.....	43
5. DISCUSSÃO.....	44
6. CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXOS.....	57

1. INTRODUÇÃO

1.1. O MERCÚRIO E A SAÚDE PÚBLICA

O mercúrio é um dos metais pesados mais estudados devido à sua ampla distribuição na natureza, podendo ser encontrado na forma de vapor de mercúrio elementar (Hg⁰), mercúrio inorgânico (Hg²⁺) como o HgCl₂ e compostos orgânicos de mercúrio como etilmercúrio, metilmercúrio e dimetilmercúrio. Todas as formas de mercúrio são tóxicas e a gravidade dos efeitos tóxicos varia, dependendo da dose, da forma química e do tempo de exposição (CLARKSON, 2002; BERNHOFT, 2012). De acordo com a *Agency for Toxic Substances and Diseases Registry* (ATSDR) dos Estados Unidos, o mercúrio é listado como a terceira substância mais tóxica, no qual o mercúrio está incluso como um dos poluentes altamente tóxicos para a saúde humana, apenas perdendo o ranking para o arsênio e chumbo (ATSDR, 2011).

Segundo relatório em 2002 realizado pelo Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA/UNEP), concluiu-se que mercúrio e suas demais formas são poluentes de impacto global para a saúde e para o meio ambiente, e que se faz necessário uma ação mundial para reduzir, ou mesmo eliminar, este composto de fontes antropogênicas (UNEP, 2002).

Estima-se que cerca de 1960 toneladas das emissões de mercúrio para a atmosfera seja antropogênica, o que equivale a 30% do total de emissões no mundo. Enquanto que as fontes geológicas naturais correspondem à 10% e os 60% restante são de reemissões de mercúrio lançado anteriormente que se acumulou ao longo de décadas em solos superficiais e oceanos. Neste estudo conclui-se que as emissões do mercúrio para o ambiente praticamente dobraram desde 2005 com a prática da mineração do ouro, principalmente por sua utilização na extração do ouro em pequena escala e queima de carvão para gerar energia (UNEP, 2013).

Neste relatório realizado pela UNEP de 2013 inclui informações, pela primeira vez, sobre o lançamento e os impactos do mercúrio em ambientes aquáticos. O ambiente aquático é a principal via de exposição ao homem e à vida selvagem (MORAIS et al., 2012). Nos últimos cem anos, as emissões antropogênicas dobraram a quantidade de mercúrio nos primeiros 100 metros de profundidade dos oceanos. Em algumas espécies de animais marinhos do Ártico, o conteúdo de mercúrio aumentou 12 vezes, em média, desde o período pré-industrial, o que se deve a capacidade do mercúrio de alcançar longas distâncias e se acumular no meio ambiente. Este aumento implica que, mais de

90% do mercúrio nesses animais marinhos são atribuídos à atividade humana no século passado (UNEP, 2013).

Na natureza este metal é encontrado principalmente em ambiente aquático, onde acaba sendo convertido em Metilmercúrio (MeHg) através do processo de metilação do mercúrio inorgânico, realizado principalmente por microorganismos aquáticos (COMPEAU e BARTHA, 1985; BISINOTI e JARDIM, 2004). O ser humano é um dos principais responsáveis pela disponibilidade do MeHg no meio ambiente. Desta forma as comunidades ribeirinhas, cujas dietas consistem basicamente de peixes e mariscos, acabam sendo expostos cronicamente ao MeHg e seus efeitos citotóxicos (CHOI et al., 2009; CLARKSON, 2002; PAULO, 2007).

Esta exposição acaba se tornando um processo mais grave devido a capacidade que o mercúrio tem de se acumular (bioacumulação) e ter seu efeito magnificado (biomagnificação) nos organismos. A bioacumulação do mercúrio é facilitada por sua lipossolubilidade que torna mais fácil o transporte através das membranas celulares, e por sua capacidade de reagir e se ligar a componentes intracelulares (UNEP, 2011).

Embora MeHg seja absorvido e possa vir a se depositar em órgãos como o rim e o fígado (DIEGUEZ-ACUNA et al., 2004), este metal também é apontado como um importante fator de risco para doenças cardiovasculares (CHOI et al., 2009). Da mesma forma, pode promover danos ao Sistema Nervoso Central (SNC), que se mostra bastante sensível aos efeitos citotóxicos promovidos pelo MeHg, tendo como consequências desde alterações metabólicas (KONG, WONG e CHAN, 2013) quanto déficits nas funções neurais superiores (HUANG et al., 2008; HUANG et al., 2011).

1.2. MECANISMO DE NEUROTOXICIDADE DO METILMERCÚRIO

Um dos principais sítios alvo da ação dos efeitos tóxicos do MeHg é o SNC em qualquer estágio, seja maduro ou em desenvolvimento. No entanto este sistema encontra-se mais suscetível à ação tóxica durante o seu desenvolvimento do que no cérebro adulto (AMORIM et al., 2000; CLARKSON, 2002).

O interesse em conhecer os efeitos neurotóxicos e os mecanismos de ação do mercúrio está historicamente associado à doença de Minamata. Na autópsia de indivíduos portadores da doença de Minamata foram encontradas altas concentrações de mercúrio no cérebro (2,6 a 24,8 ppm) e entre as regiões mais acometidas estavam as áreas motoras. A morte neuronal, ativação microglial e desmielinização foram as

alterações estruturais mais observadas. Alterações semelhantes foram também diagnosticadas observadas em cérebros de crianças expostas a grandes concentrações de MeHg na vida intrauterina (CHOI et al., 2009; NINOMIYA, OHOMORI e HASHIMOTO, 1995; HARADA, 1995; TAKEUCHI et al., 1996).

Este metal atravessa a Barreira Hematoencefálica (BHE) na forma de MeHg–L-cisteína (ASCHNER e CLARKSON, 1988). Levando a morte neuronal tanto *in vivo* (CHARLESTON et al., 1994, DAVIS et al., 1994), como *in vitro* (SARAFIAN et al., 1994), acumula predominantemente dentro de astrócitos (OYAKE et al., 1966, CHARLESTON et al., 1996; Davis et al., 1994). A ação tóxica do MeHg sobre os astrócitos teria como consequência um grande prejuízo sobre o controle que estas células gliais exercem sobre o meio extracelular. Este fato foi reportado por Yin e colaboradores (2007), onde ao analisar a exposição de astrócitos de recém-nascidos ao MeHg estes apresentavam-se incapazes de manter o máximo controle sobre o meio extracelular, culminando na morte neuronal.

Esta morte neuronal se daria pelo excesso de glutamato livre no meio extracelular, consequência do mal funcionamento dos astrócitos, o que desencadearia, por sua vez, no acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) e, em última instância, a morte celular (CHOI, 1992). Este fato leva a entender que a neurotoxicidade do MeHg está intimamente relacionada com o efeito sinérgico dos níveis não tóxicos de glutamato livre no meio extracelular e a presença do mercúrio, simultaneamente (ALLEN et al., 2002). Esses estudos sugerem que a neurotoxicidade mercurial é, em parte, pelo aumento nos níveis de glutamato extracelular (CHARLESTON et al., 1996; ALLEN et al., 2002; YIN et al., 2007).

Estudos tem sido realizados nos últimos anos a fim de promover um melhor entendimento acerca dos eventos envolvidos no processo de neurotoxicidade induzida por MeHg, sendo estes realizados tanto *in vitro* como *in vivo*. Como por exemplo, o estudo *in vitro* realizado por Bose e colaboradores (2012) acerca da exposição de tecido nervoso de embriões de ratos ao MeHg; *in vivo*, como o estudo realizado em camundongos por Huang e colaboradores (2008) e em ratos por Daya, Reed e Newland (2005) e Kong e colaboradores (2013).

Nos estudos em que foram adotados a administração via oral do mercúrio esta escolhe se justifica como uma forma de mimetizar a ingestão diária deste metal, como se atrelado à uma dieta por contaminação do meio (água ou alimentos) (HUANG et al., 2008; KONG, WONG e CHAN, 2013).

O estabelecimento de modelos e protocolos de exposição permitem descrever eventos relacionados ao processo de citotoxicidade promovido pelo MeHg como:

- Redução da proliferação celular e alterações na expressão de fatores reguladores do ciclo celular (p16 e p21) e marcadores associados a senescência durante o desenvolvimento embrionário do córtex cerebral de ratos (BOSE et al., 2012);
- Redução da atividade mitocondrial de forma dose dependente (AYYATHAN; CHANDRASEKARAN e THIAGARAJAN, 2015; KAUR; ASCHNER e SYVERSEN, 2006);
- Alterações motoras, como redução na deambulação e equilíbrio (HUANG et al. 2011);
- Toxicidade através da ação das ROS e incremento da peroxidação lipídica (LPO, do inglês *Lipid Peroxidation*) (HUANG et al., 2008; HUANG et al., 2011);
- Redução no metabolismo do córtex somatossensorial (KONG, WONG e CHAN, 2013);
- Redução do fluxo sanguíneo e lesão endotelial pela ação das ROS (LEMOZ et al., 2012).

Estas alterações são consideradas lesivas por estarem relacionadas com o surgimento de doenças neurodegenerativas em pacientes expostos à longo prazo ao MeHg e consequentemente aos déficits clínicos e fisiológicos observados.

1.3. O MERCÚRIO E SUA INTERFERÊNCIA NO BALANCE OXIDATIVO

O MeHg, ao atravessar a BHE e se depositar no SNC, promove a alteração da homeostase tecidual que podem desencadear o prejuízo e consequente perda nas populações celulares, tanto glial como neuronal. Sendo que estas alterações metabólicas estão diretamente associadas ao incremento da produção de radicais livres (ASCHNER e CLARKSON, 1988; ALLEN, SHANKER, ASCHNER, 2001; CHARLESTON et al., 1994, DAVIS et al., 1994; SARAFIAN et al., 1994).

Este aumento na concentração de ROS seria responsável por lesões nas membranas intracelulares elevando os níveis de fatores pró-oxidantes sinalizadores da lesão celular (HUANG et al., 2008; HUANG et al., 2011).

Esta redução na capacidade antioxidante celular levaria o aumento na concentração de ROS intracelular, como reportado por Yin e colaboradores (2007). Onde uma das vias para o desequilíbrio no sistema antioxidantes intracelular apontado na literatura seria a capacidade do MeHg de induzir um déficit na atividade mitocondrial, centro da respiração celular e produção de energia, de forma dose dependente (AYYATHAN; CHANDRASEKARAN e THIAGARAJAN, 2015; KAUR; ASCHNER e SYVERSEN, 2006; YIN et al., 2007).

Esta alteração na sua atividade seria consequência de uma perturbação na permeabilidade mitocondrial e funções antioxidante intracelular, o que resultaria no acúmulo de ROS intracelular (ASCHNER et al., 2007). Este aumento na concentração de ROS seria responsável por lesões nas membranas intracelulares elevando os níveis de fatores pró-oxidantes sinalizadores da lesão celular (HUANG et al., 2008; HUANG et al., 2011).

Além disso, o incremento nas ROS seria um dos principais mecanismos de lesão e consequente morte celular envolvido na redução das populações celulares abordadas em nosso estudo (neuronal e astrocitária). A qual pode ter sido agravada pela redução do fluxo sanguíneo, como reportado por Lemos e colaboradores (2012), onde encontraram que mesmo uma exposição aguda a baixas concentrações de HgCl₂ é capaz de alterar a resistência vascular.

Com o aumento na concentração de ROS o ânion superóxido interage com NO e forma peroxinitrito, diminuindo desse modo a biodisponibilidade do NO para relaxamento do músculo liso (LEMOS et al, 2012). Estas alterações no balance oxidativo são apontadas como um fator chave para as alterações motoras observadas (ADEDARA et al., 2015; ATCHISON e HARE, 1994; DÓREA, 2015; FARINA, ASCHNER e ROCHA, 2011a; FARINA, ASCHNER e ROCHA, 2012).

1.4. MERCÚRIO E COMPROMETIMENTOS FUNCIONAIS

O déficit motor promovido pela exposição ao mercúrio é apontado na literatura não como uma alteração na morfologia muscular, mas como uma sequela clínica dos danos neuronais sofridos (DEBES et al. 2006). Estes efeitos ocorrem de forma dose

dependente, ou seja, quanto maior a dose e/ou o período de exposição, maior o prejuízo, acarretando redução da velocidade motora, atenção e da linguagem, como consequência do consumo de MeHg (DEBES et al., 2006).

Anormalidades no desempenho motor consequentes à exposição ao MeHg também são reportadas na literatura (ADEDARA et al., 2015; ATCHISON e HARE, 1994; DÓREA, 2015; FARINA, ASCHNER e ROCHA, 2011a e b; FARINA, ASCHNER e ROCHA, 2012). Estas alterações incluem o déficit na atividade locomotora e equilíbrio e tem sido apontadas como parâmetros importantes para a detecção de alterações funcionais consequentes à neurotoxicidade induzida pela ação do MeHg (ADEDARA et al., 2015; HUANG et al., 2008; HUANG et al., 2011).

Dados semelhantes foram encontrados recentemente em um estudo realizado por nosso grupo, em que o cloreto de mercúrio é capaz de promover alterações motoras e cognitivas quando administrado em baixas doses por um longo período (TEIXEIRA et al., 2014).

Vale ressaltar que essas alterações motoras decorrentes da exposição ao MeHg também são observadas em animais menores como *Nauphoeta cinerea* (barata), após exposição por 35 dias em diferentes concentrações (0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25 e 0.5 mg/g ao dia) resultando em déficit motor assim como o relatado em roedores (ADEDARA et al., 2015), o que torna estudos acerca da ação do MeHg sobre o sistema motor ainda mais importante devido a sua de capacidade afetar diferentes espécies em um mesmo parâmetro.

Estudos realizados com animais experimentais tem demonstrado que a exposição ao mercúrio acarreta perda, não somente da atividade motora espontânea, como redução no tônus muscular durante a execução do movimento (HUANG et al., 2008; HUANG et al., 2011; KONG, WONG e CHAN, 2013; TEIXEIRA et al., 2014), assim como no equilíbrio (HUANG et al. 2011), semelhante ao encontrado em seres humanos (CASTOLDI et al., 2001; CECCATELLI, DARÉ e MOORS, 2010).

Contudo, nos estudos em humanos, não há como ter um controle exato da dose ao qual o indivíduo esta sendo exposto, uma vez que a exposição acontece através da dieta (CHOI et al., 2009; FARIAS et al., 2008; HARADA, 1995; NINOMIYA, OHOMORI e HASHIMOTO, 1995; TAKEUCHI et al., 1996).

1.5. JUSTIFICATIVA

É de comum acordo dentro da literatura que a principal forma de exposição humana ao mercúrio ocorre principalmente através da dieta (como por exemplo o consumo de peixe contaminado). Estas circunstâncias acarretam a exposição do indivíduo de forma crônica à baixas concentrações de mercúrio (BISINOTI e JARDIM, 2004; BITENCOURT et al., 2013; MORGANO et al., 2005; MORGANO et al., 2007).

Os estudos controlados de exposição ao mercúrio em baixas concentrações frequentemente usam modelos animais, no entanto esta exposição ocorre em tempos muito curtos (HUANG et al., 2008; HUANG et al., 2011). Sabe-se que o efeito tóxico do mercúrio parece estar diretamente relacionado ao tempo e ao período de exposição (AYYATHAN; CHANDRASEKARAN e THIAGARAJAN, 2015), tornando-se necessário e essencial o desenvolvimento de um modelo experimental de intoxicação no qual o animal seja exposto cronicamente, de maneira controlada, a baixas doses de mercúrio.

Assim sendo, este estudo propõe não somente o estabelecimento de um modelo de exposição crônica por MeHg em baixas doses que simule o consumo humano a longo prazo que permita, pela primeira vez, avaliar a influência sobre as populações Neuronal e Glial (Astrócitos) no córtex motor de ratos machos adultos nessas condições experimentais.

A hipótese experimental a ser testada nesta investigação é que a exposição crônica ao MeHg, em valores semelhantes ao ingerido em áreas de contaminação ambiental, e sua relação direta com os danos motores, teciduais e na bioquímica oxidativa no córtex motor de ratos machos adultos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

Caracterizar as possíveis alterações no córtex motor de ratos após exposição crônica ao MeHg.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Avaliar o desempenho motor (locomoção espontânea, coordenação motora e equilíbrio) nos animais expostos durante 60 dias (G60) ao MeHg.
- b) Avaliar os depósitos de mercúrio total no córtex motor dos animais expostos;
- c) Descrever as principais alterações teciduais promovidas pela exposição crônica (60 dias) de ratos machos no córtex motor;
- d) Avaliar o padrão neurodegenerativo (sobrevivência/densidade de neurônios maduros e astrocitose) desencadeados perante o modelo de exposição crônica proposto;
- e) Determinar se há alterações entre animais dos diferentes grupos experimentais quanto ao níveis de Nitrito, LPO e capacidade antioxidante total.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo utilizou-se 40 ratos albinos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, machos, com massa corpórea entre 150g a 200g e com 90 dias de vida quando fornecidos pelo Biotério de Criação da Universidade Federal do Pará para o Biotério de Experimentação do Laboratório de Farmacologia do ICB-UFPA. Os animais foram alojados em gaiolas-viveiros de plástico, com dimensões de 30 cm x 20 cm x 12 cm, divididos em grupos de 5 animais por caixa. Durante o período de alojamento, os animais receberam ração balanceada e água, permaneceram em uma temperatura de 25°C e foram submetidos a um ciclo escuro/claro de 12 horas. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da UFPA (CEPAE-UFPA: 225-14) (Anexo 01).

3.2. FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

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

- Grupo Óleo (20 animais) – Animais que receberam diariamente somente o veículo (óleo de girassol) durante 60 dias;
- Grupo MeHg (20 animais) – Animais expostos diariamente ao MeHg durante 60 dias.

Cada grupo foi formado de acordo com a figura a seguir (Figura 1). De modo que 50% do N total dos animais que compõem cada grupo foi destinado para análise tecidual (sendo estes 50% compostos tanto por controles como por expostos) e outros 50% para análise dos parâmetros pró e antioxidante, assim como a mensuração dos depósitos de mercúrio total formados no córtex motor. Os procedimentos experimentais de cada grupo serão descritos a seguir.

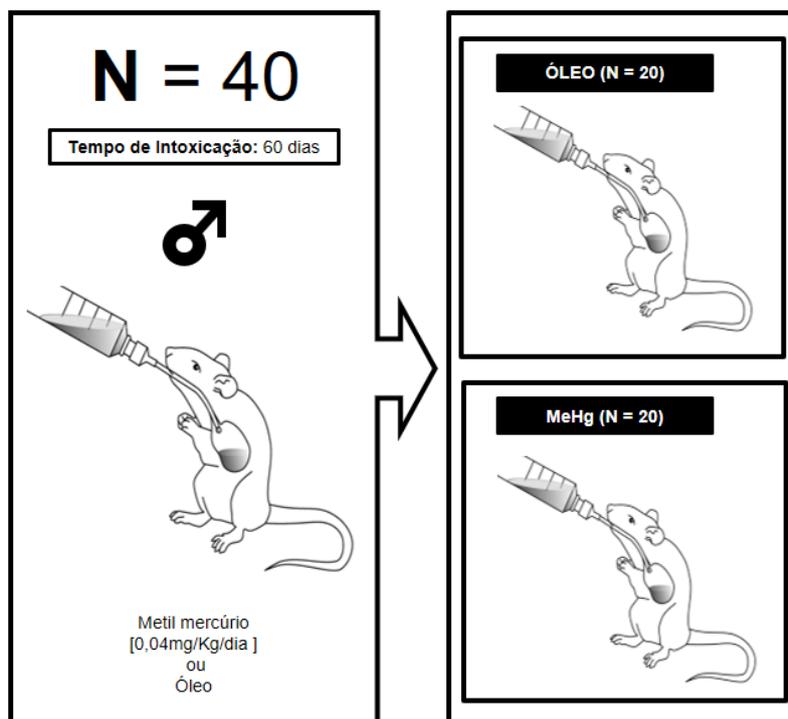


Figura 1. Organização dos grupos experimentais e a distribuição do número de animais adotado, onde os animais Óleo representam os controles e os animais MeHg o grupo exposto cronicamente ao MeHg.

3.3. EXPOSIÇÃO AO METILMERCÚRIO

Os animais chegaram ao biotério com 83 dias de idade e passaram por um período de ambientação de 01 semana antes do início dos experimentos, ao 90 dias de idade. Os animais pertencentes ao grupo tratado, receberam MeHg através de gavagem intragástrica em uma dose diária de 0,04 mg/kg durante 60 dias. As doses diárias foram ajustadas semanalmente a partir da mudança do peso corporal dos animais experimentais, tendo como veículo do metal o óleo de girassol, com a curva de peso realizada ao final do período experimental. Esta dose foi descrita no trabalho de Kong e colaboradores (2013) como sendo capaz de promover alterações bioquímicas e moleculares em regiões do cérebro, incluindo o córtex, de ratos expostos ao metilmercúrio no período de 60 dias, associando, então, a ingestão de baixas doses diárias de mercúrio através de frutos do mar à alterações de ordem neurodegenerativa. Os animais do grupo controle passaram pelos mesmos processos de exposição via gavagem, porém sem MeHg, apenas o veículo.

3.4. ENSAIOS COMPORTAMENTAIS

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

3.4.1. Teste da atividade locomotora espontânea (*Open Field*)

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

Para este teste foi utilizada uma arena em madeira (100x100x40cm), pintada com material não permeável, na qual o piso se encontra dividido em 25 quadrantes iguais de 20x20 cm (Figura 02).

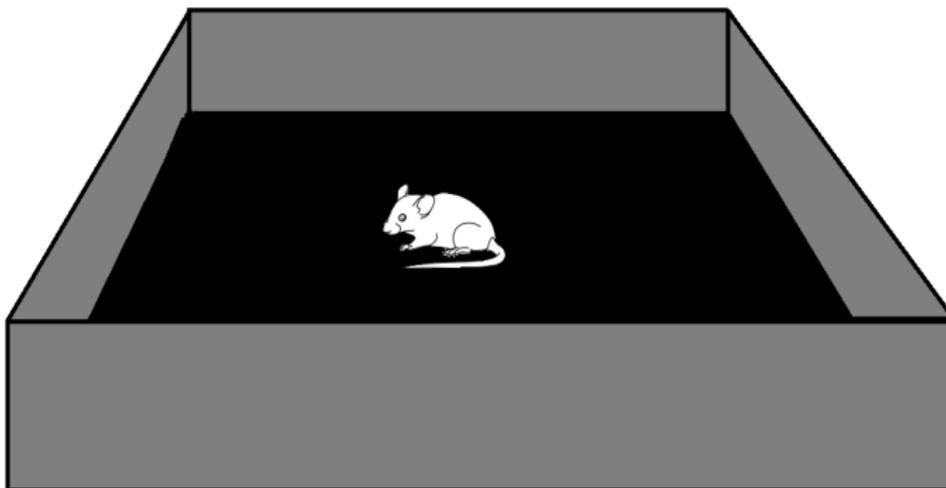


Figura 2. Diagrama da exposição do animal ao aparato que compõe o Campo Aberto para realização do teste de atividade locomotora espontânea.

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

Este teste já vem sendo realizado por nosso grupo (TEIXEIRA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015) e nele contabilizou-se o número de quadrantes totais percorridos pelo animal durante todo o teste através do Software Any-mazeTM versão 4.99 (Stoelting Co., USA), e o número de rearing manualmente de acordo com o protocolo de Pandolfo e colaboradores (2007) e Walsh e Cummins (1976), pois estes parâmetros são os que melhor indicam as possíveis alterações que possam ocorrer no córtex motor. Não sendo considerada locomoção quando o animal colocar uma, duas ou três patas em um dos quadrantes, com retorno ao quadrante original.

3.4.2. Teste do Rotarod

Este teste foi realizado no aparelho rotarod (Insight, Brasil) para avaliação da força e coordenação motora dos animais (DUNHAM e MEYA, 1957; OLIVEIRA et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2014). Os animais foram treinados a manterem-se sobre o eixo giratório do equipamento durante 3 minutos a quinze rotações por minuto (15 RPM). Após o treino, foram submetidos ao teste propriamente dito, onde os animais foram expostos ao aparelho em três etapas de 3 minutos a 15 RPM, sendo respeitado o período de 120 segundos entre as exposições e contabilizado o tempo de permanência do animal (latência) sobre a barra de rolagem até a primeira queda nas três etapas e o número de quedas totais (TEIXEIRA et al., 2014) (Figura 03).

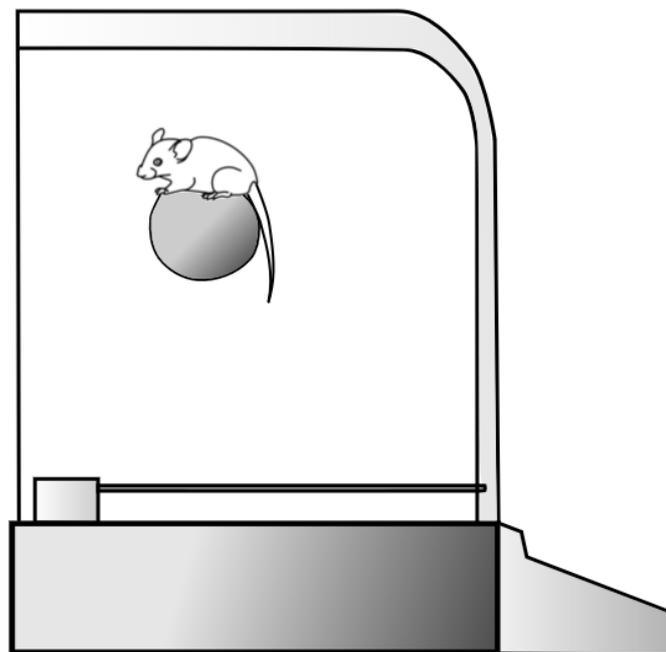


Figura 3. Diagrama do animal durante sua exposição ao equipamento Rotarod.

3.5. ANÁLISE BIOQUÍMICA

3.5.1. Análise da Capacidade Antioxidante Total

Após a realização dos ensaios comportamentais, 10 animais de cada grupo foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram seus cérebros removidos. Em seguida, um hemisfério do córtex de cada animal do grupo controle e grupo exposto ao MeHg foi dissecado para posterior homogeneização em Tampão Tris-HCl 20 mM (pH 7,4). Uma alíquota do homogenato bruto foi retirada para mensurar a capacidade antioxidante total através do método de avaliação da capacidade antioxidante contra os radicais Peroxil (Amado et al, 2009).

As amostras foram centrifugadas a 10.000 G durante 20 min a 4 °C. O sobrenadante das amostras foi exposto, em triplicatas em uma microplaca transparente de 96 poços, a um gerador de radicais peroxil, o 2,2'-azobis 2 methylpropionamide dihydrochloride (ABAP; 4 mM; Aldrich) e em outra triplicata recebem somente água ultrapura. Após 30 minutos de reação entre a amostra e ABAP, foram levadas para mensuração da fluorescência gerada, com leituras realizadas a cada 5 minutos durante um período de 1 hora em leitor de microplaca opaca (Victor 2, Perkin Elmer), a temperatura de 35 °C. Para facilitar o entendimento os resultados foram expressos como o inverso da diferença das áreas abaixo das curvas geradas das amostras com e sem

ABAP, pois quanto maior a área formada menor a competência em neutralizar os radicais peroxil e consequentemente a capacidade antioxidante total das amostras (Soluções e preparações ver Anexo 02).

3.5.2. Concentração de Nitrito (NO)

A quantificação de proteínas totais utilizada na correção dos valores de nitrito NO e LPO foi feita a partir do método colorimétrico de Bradford como descrito no protocolo de Lowry e colaboradores (1951) (Soluções e preparações ver Anexo 03).

Este teste foi realizado pois a exposição a baixas doses de mercúrio promove o aumento dos níveis de ROS e consequentemente alterações na biodisponibilidade de NO (no caso a sua redução), devido sua interação com o NO (HUANG et al., 2011; LEMOS et al., 2012).

Para o ensaio de níveis de nitritos, uma alíquota do homogenato bruto foi centrifugada a 21.000 g por 20 min a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado para a análise descrita por Lowry e colaboradores (1951). As amostras foram incubadas em temperatura ambiente com reagente de Griess [0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediaminedihydrochloride; 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid; 1:1]. A absorvância foi mensurada com o comprimento de onda igual a 550 nm e comparada com a das soluções padrões de nitrito de sódio (Soluções e preparações ver Anexo 04).

3.5.3. Peroxidação Lipídica (LPO)

A exposição a baixas doses de MeHg induz ao aumento da LPO no SNC. Este aumento é apontado como consequente de danos ao SNC via estresse oxidativo promovido por esta exposição, e que este dano está intimamente relacionado com as alterações comportamentais do tipo motoras observadas (HUANG et al., 2008; HUANG et al., 2011).

Este parâmetro foi mensurado pelo método de TBA-RS (thiobarbituric-acid reactive substances; HERMES-LIMA e STOREY, 1995). Onde uma alíquota do homogenato bruto foi centrifugada a 2500 g por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi processado com o kit Bioxytech LPO-568 (Cayman Chemical). Esse kit utiliza um cromógeno que reage com MDA e 4HDA a 45 °C, podendo ter a absorvância máxima obtida com comprimento de onda de 586 nm. Este método quantifica os produtos aldeídos da LPO, como o malonaldeído (MDA) e o 4-hidroxi-2-nonenal, os

quais reagem com o ácido tiobarbitúrico (MIHARA e UCHIYAMA, 1978). Embora a quantificação espectrofotométrica do TBA-RS não possa ser considerada uma técnica para determinar MDA em tecidos porque o ensaio superestima os níveis reais de MDA, é considerada efetiva para estudos comparativos (LAPANNA e CUCCURULLO, 1993), sendo os valores expressos pela variação na concentração de MDA (Soluções e preparações ver Anexo 05).

3.6. AVALIAÇÃO DOS DEPÓSITOS DE MERCÚRIO NO CÓRTEX MOTOR

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

O teor total de mercúrio nas amostras foi estimado por espectrometria de absorção atômica (CVAAS) (Semi-automatizado Mercúrio analisador, Modelo Hg-201, Sanso Seisakusho Co., Ltd., Tóquio, Japão) (TEIXEIRA et al., 2014).

Para quantificação do mercúrio total presente utilizamos a seguinte fórmula (SUSUKI et al., 2004):

Concentração de mercúrio total na amostra (mg/g) = $0,10 \text{ mg} \times (\text{amostra} - \text{amostra em branco}) / (\text{amostra padrão} - \text{branco amostra}) \times \text{fator de diluição} \times 1 / \text{peso amostra (g)} \times \text{relação de peso úmido / peso seco}$.

Todas as análises foram realizadas em duplicata e os valores expressos em parte por milhão (ppm).

3.7. ANÁLISE TECIDUAL

Os animais restantes (10 controles e 10 expostos) foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (90 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (9 mg/Kg), e perfundidos através do ventrículo esquerdo com solução salina a 0,9% heparinizada, seguida de paraformaldeído a 4%. Após a perfusão, os cérebros foram removidos da caixa craniana e pós-fixados em bouin por 6 horas. Em seguida os espécimes foram incluídos em Paraplast (McCormick™) e seccionados em micrótomo a 5 µm.

Algumas secções foram submetidas à coloração clássica por hematoxilina e eosina (HE) para uma observação do panorama geral da condição tecidual de cada grupo e imunohistoquímicas para neurônios com o anticorpo Anti-NeuN (1:100, Chemicon), um marcador de neurônios maduros muito utilizado para se investigar a sobrevivência neuronal (LIMA et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2014), e o Anti-GFAP (1:2000, Dako), um marcador de astrócitos que permite avaliar modificações na morfologia e número perante injúrias ao SNC (LIMA et al., 2007; FONTES-JÚNIOR et al., 2016).

Essas imunomarcações foram quantificadas em ambos os grupos através das contagens de células positivas feita em um aumento de 40x com o auxílio de uma gradícula acoplada à ocular do microscópio de luz com quadrantes de 0,0665 mm². Foram consideradas 3 secções por animal (grupo exposto e controle) e 3 campos por secção. Após a contagem foram realizadas as fotomicrografias dos campos mais representativos de cada grupo para cada técnica. Estas foram obtidas com um sistema de fotomicroscopia digital utilizando uma câmera digital (AxioCam ERc 5s, ZEISS) acoplada ao microscópio (Axiovert lab. A1, ZEISS).

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a contabilização dos fatores avaliados em cada teste comportamental e nas subsequentes análises dos depósitos de mercúrio, parâmetros de estresse oxidativo e análises imunohistoquímicas, estes foram inseridos no software GraphPad Prism 5.0 e a distribuição dos dados testada pelo método de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade. Em seguida foi utilizado o teste t-Student, considerando um valor significativo de $p < 0,05$. Os resultados foram expressos no corpo do texto e através de gráficos com a média acompanhada do erro padrão da média (média \pm erro padrão da

média). Enquanto que no teste de desempenho motor forçado (Rotarod), devido as particularidades do teste, utilizamos o teste ANOVA de uma via repetida.

4. RESULTADOS

4.1. A EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO MEHG PROMOVEU A FORMAÇÃO DE DEPÓSITOS NO CÓRTEX DE RATOS MACHOS ADULTOS E ALTERAÇÃO NO GANHO DE MASSA.

Após o período de intoxicação crônica durante 60 dias na dosagem de 0,04mg/kg/dia os animais expostos apresentaram um menor ganho de massa ao final do experimento em relação ao controle ($p < 0.0001$) (Figura 04A).

Foi observado também que o protocolo adotado promoveu a formação de depósitos de mercúrio no parênquima neural de ratos machos adultos ($0,0650 \pm 0,007895$) em relação ao grupo controle ($0,0048 \pm 0,0007348$) como disposto na figura 04B ($p < 0.0001$).

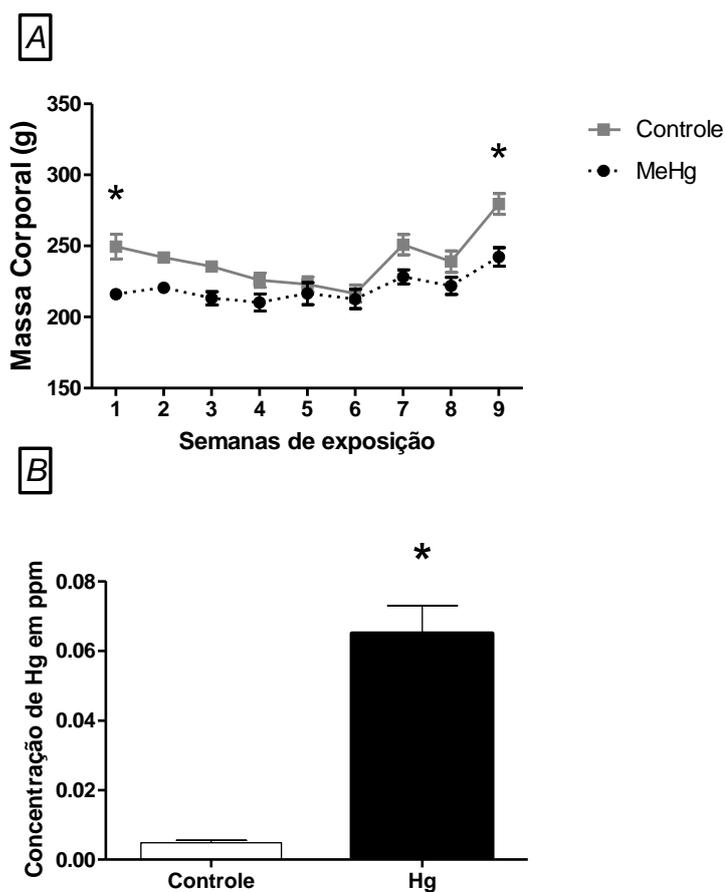


Figura 4. Apresentação das variações no ganho de peso sofridas por ambos os grupos durante todo o experimento (A), após ingestão diária de MeHg (0,04mg/kg/dia) e os depósitos de mercúrio total formados após essa exposição crônica (B).

4.2. A EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO MEHG PROMOVEU UM AUMENTO NOS FATORES PRÓ-OXIDANTES E REDUÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL.

A capacidade antioxidante total das amostras mostrou-se reduzida ($p=0,0150$) no grupo cronicamente exposto ao MeHg, sofrendo um decréscimo de 54,05% em relação ao grupo controle (considerado como valor padrão da capacidade antioxidante total igual à 100%) como apresentado na Figura 05A.

Consequentemente ambos os fatores pró-oxidantes avaliados neste estudo após exposição crônica ao MeHg sofreram um representativo aumento ($p=0,0272$ e $0,0009$, para NO e LPO respectivamente). Primeiramente temos o significativo aumento nos níveis de LPO do grupo exposto ($205,4 \pm 18,89\%$) em relação ao controle ($100,0 \pm 7,111$), ao dosarmos os níveis de MDA por miligrama de proteína ($p=0,0009$) (Figura 05B). Assim como nos níveis de Nitrito do grupo exposto, que apresentou quase que o dobro ($194,4 \pm 32,32\%$) ao confrontarmos com o grupo controle ($100,0 \pm 13,46\%$) por miligrama de proteína de amostra como disposto na Figura 05C.

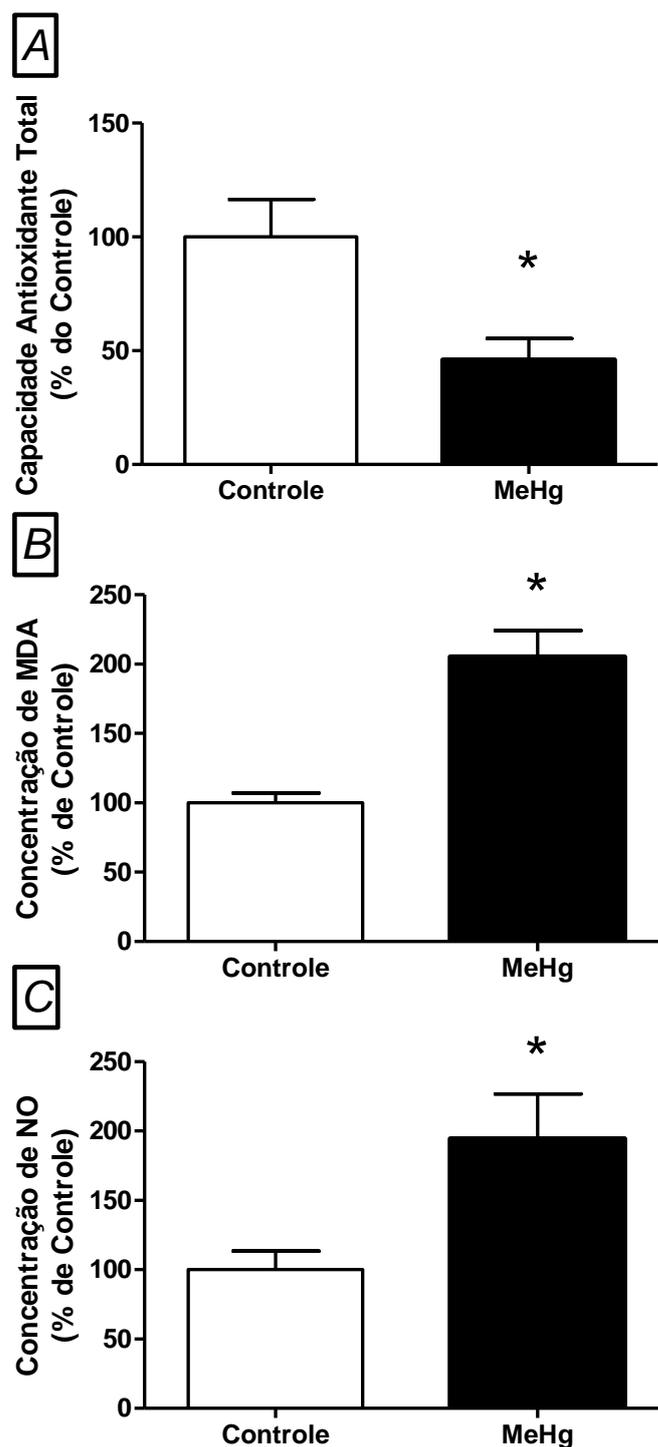


Figura 5. A exposição crônica ao MeHg promoveu alterações no balanço oxidativo dos animais expostos cronicamente. Houve a redução na capacidade oxidante total (A) e consequente aumento dos parâmetros pró-oxidante: Peroxidação Lipídica (B) e níveis de Nitrito (C).

4.3. ANÁLISE TECIDUAL: A EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO MEHG LEVOU A REDUÇÃO NA POPULAÇÃO ASTROCITÁRIA E PERDA NEURONAL

Durante a avaliação prévia das amostras através da coloração clássica por HE foi possível identificar uma clara redução na população celular geral do grupo MeHg em relação ao controle (Figura 06).

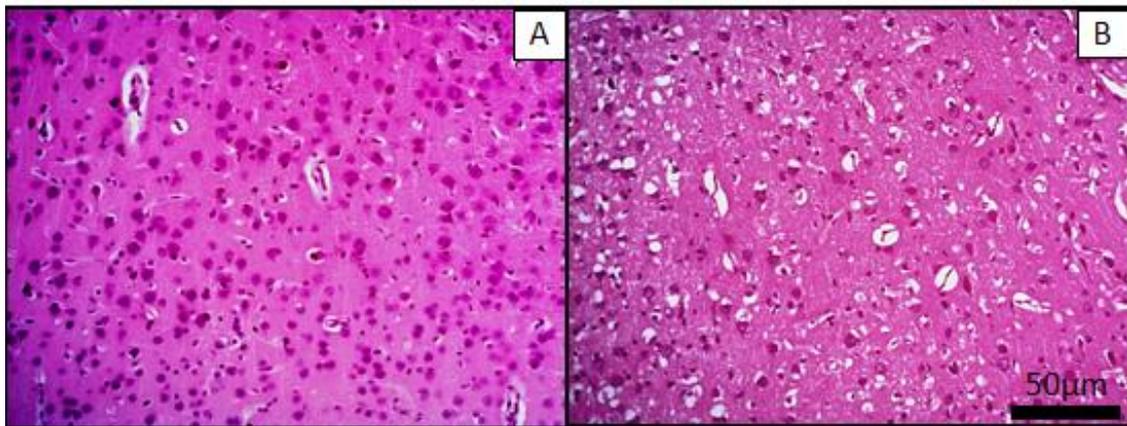


Figura 6. Fotomicrografia em coloração clássica (Hematoxilina e Eosina) apresentando os grupos Controle (A) e MeHg (B) ilustrando o panorama geral das populações celulares de cada grupo. Aumento de 10x (A e B) escala 50µm.

Ao realizar a imunomarcção com o anticorpo GFAP, que identifica um componente específico do citoesqueleto do astrócito (ponta de seta), foi observado uma significativa redução no número de células GFAP positivas no grupo exposto cronicamente ao MeHg ($17,79 \pm 1,202$), em relação ao grupo controle ($37,94 \pm 1,228$) ($p > 0,0001$) (Figura 07).

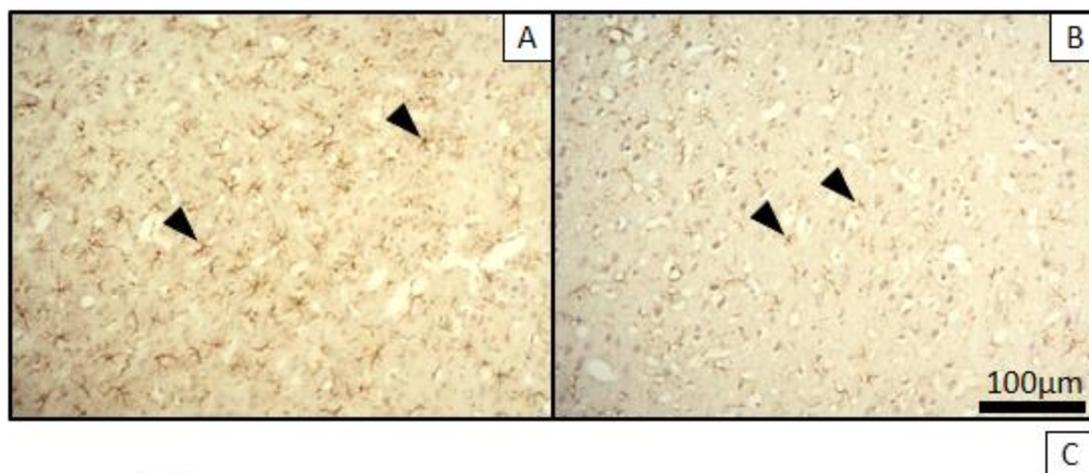


Figura 7. Imunomarcção para o anticorpo GFAP apresentando os grupos Controle (A) e MeHg (B) ilustrando a redução da população astrocitária (ponta de seta) em cada grupo. Aumento de 10x, escala 100μm. Seguido do gráfico (C) com a quantificação dos respectivos grupos ($p > 0,0001$).

Durante a avaliação das secções e quantificação das células imunoreativas ao anticorpo NeuN foi observado uma redução significativa na população de neurônios maduros (ponta de seta) ($p = 0,0074$) no grupo exposto ao MeHg ($29,64 \pm 2,609$) em relação ao grupo controle ($44,07 \pm 3,402$) (Figura 08).

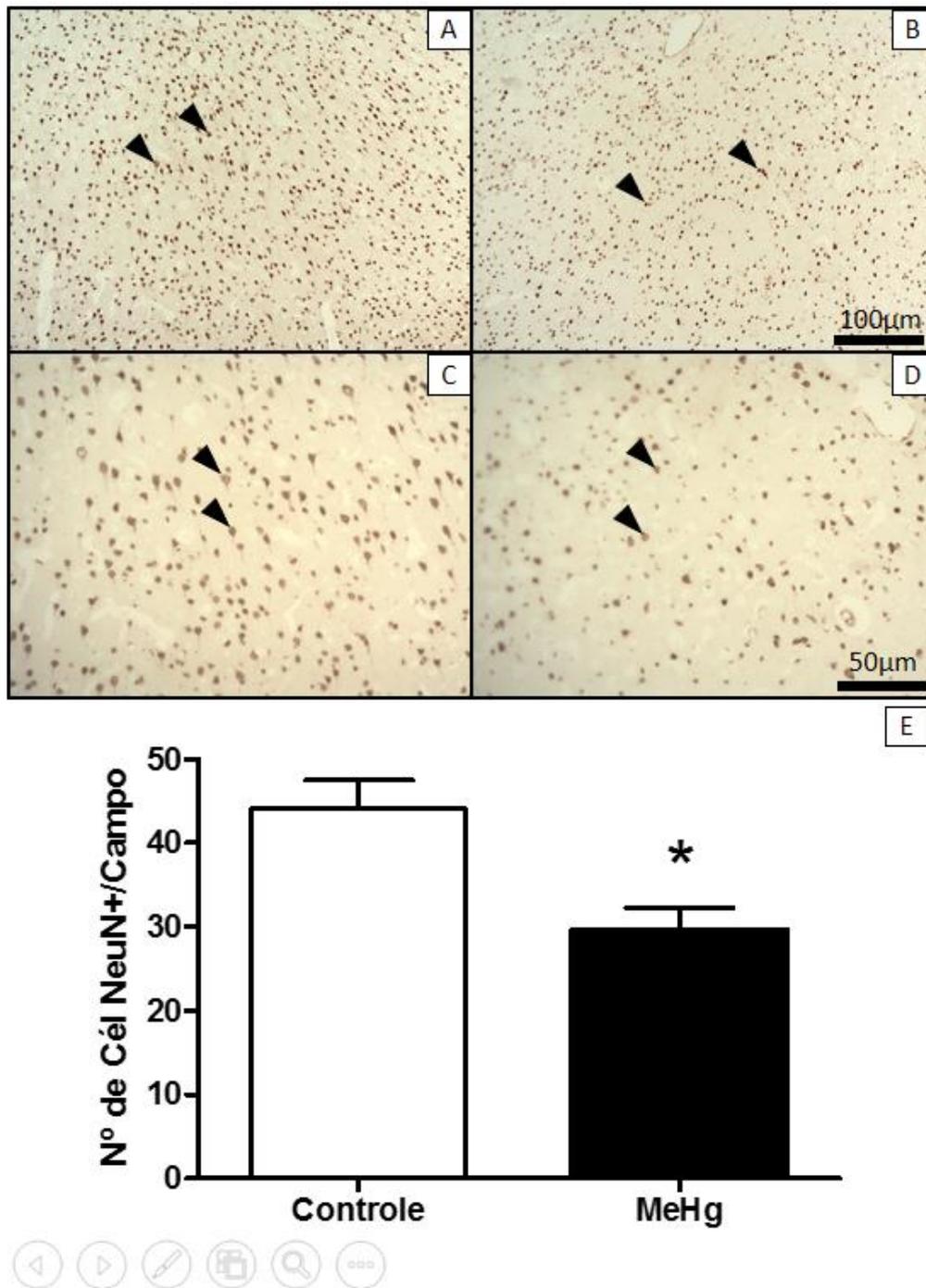


Figura 8. Imunomarcção para o anticorpo NeuN apresentando os grupos Controle (A) e MeHg (B) ilustrando a redução da população de neurônios maduros (ponta de seta) em cada grupo. Aumento de 10x (A e B) e 20x (C e D), escala 100μm e 50μm, respectivamente. Seguido do gráfico (E) com a quantificação dos respectivos grupos (p= 0,0074).

4.4. ENSAIOS COMPORTAMENTAIS

4.4.1. A exposição crônica ao MeHg induziu a redução na atividade locomotora espontânea horizontal e vertical durante o teste do Campo aberto.

Durante a execução do primeiro teste, um teste de atividade locomotora espontânea, foi observado um baixo desempenho com relação ao número de quadrantes cruzados pelos animais que compõem o grupo MeHg ($29,22 \pm 3,52$) em relação ao grupo controle ($45,50 \pm 4,696$) ($p = 0,0144$) (Figura 09A), assim como redução no número no número de rearing realizado pelo grupo MeHg ($6,44 \pm 0,64$), quando comparados com o controle ($12,63 \pm 2,14$) ($p = 0,02$) (Figura 09B).

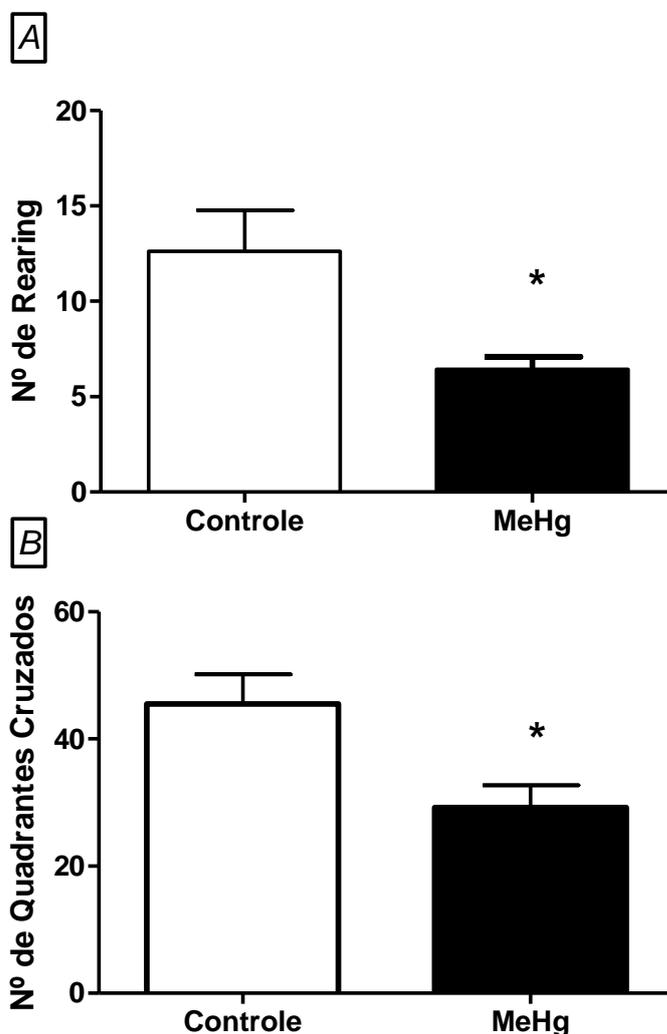


Figura 9. A exposição crônica ao MeHg levou à um prejuízo no desempenho motor dos animais expostos cronicamente ao MeHg no teste do Campo Aberto (5min). Os animais sofreram não apenas uma redução no número de rearing (A) como no número de Quadrantes Cruzados (B).

4.4.2. Houve a diminuição da latência e aumento do número de quedas nas 3 exposições do grupo exposto ao MeHg durante a execução do teste Rotarod

Durante a execução do último teste (um teste de atividade locomotora forçada), o rotarod, o grupo MeHg apresentou uma latência (tempo decorrido desde a sua colocação no aparato até a primeira queda) menor que o grupo controle (Figura 10A) em todas as três exposições após o treino ($p=0,005$, $p=0,014$ e $p<0,001$, respectivamente para cada exposição). Quanto ao critério do número de quedas sofrido por grupo, o grupo MeHg apresentou um maior número de quedas nas desde o treinamento às 3 exposições durante a execução do teste ($p < 0,05$) (Figura 10b).

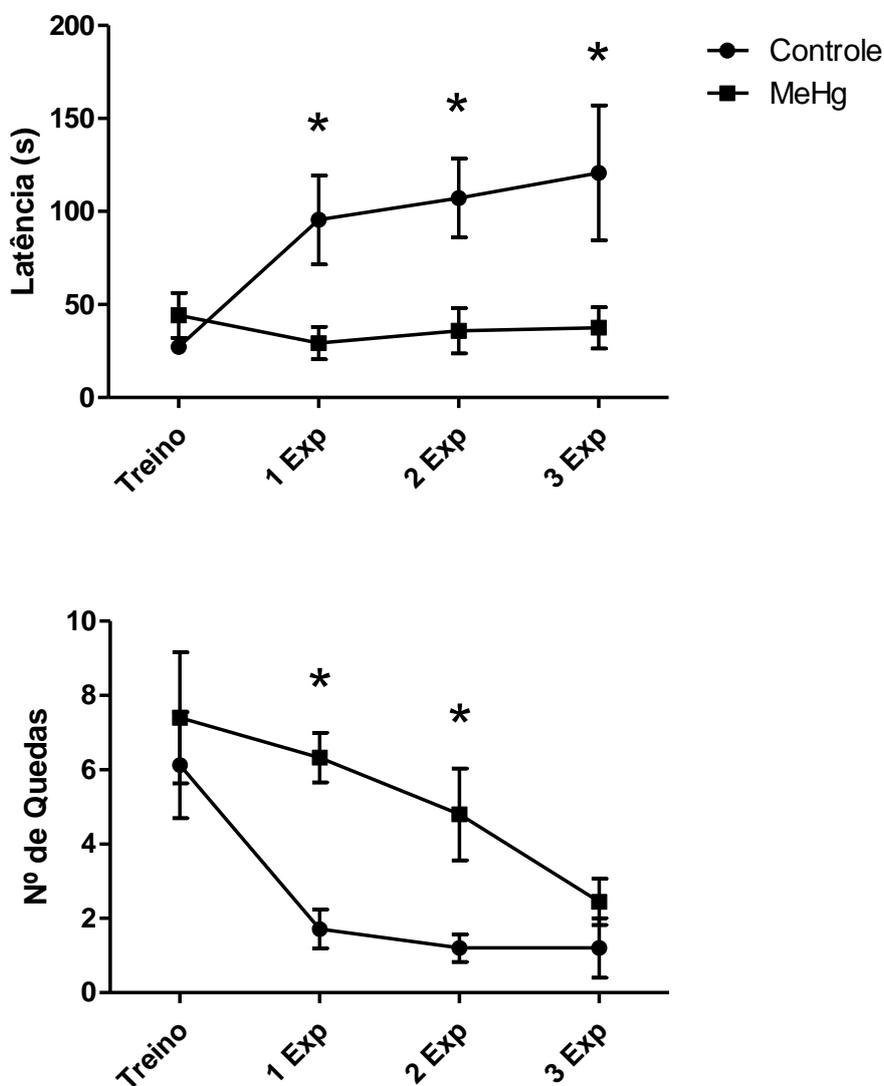


Figura 10. A exposição crônica ao MeHg prejudicou o desempenho dos animais expostos no teste de locomoção forçada, Rotarod. Tanto na latência para a primeira queda (A), como no número de quedas (B).

5. DISCUSSÃO

Este estudo provou que a exposição crônica à baixas concentrações do MeHg (0,04 mg/kg) é capaz de promover depósitos no córtex motor de ratos adultos, como é capaz de alterar as funções motoras, as populações celulares (neuronal e glial) e parâmetros bioquímicos (pró e anti-oxidantes), validando o protocolo proposto de exposição crônica à baixas concentrações de MeHg a fim de simular o consumo diário a longo prazo já na vida adulta de em baixas concentrações, semelhante a consumo de alimento em áreas de exposição crônica ao MeHg.

Estas alterações estariam intimamente ligadas à ação tóxica que este metal é capaz de exercer sobre SNC e os demais tecidos. Dentre elas apontamos a redução no metabolismo observada no SNC (KONG, WONG e CHAN, 2013). Uma vez que este é capaz de atravessar a BHE (ASCHNER E CLARKSON, 1988).

Uma das alterações consequentes da presença do MeHg no SNC temos observada em nosso estudo foi a redução da capacidade antioxidante total do córtex motor de ratos machos adultos que em 54,05% em relação ao grupo controle (tomado como padrão de normalidade para critérios de comparação). Esta redução na capacidade antioxidante celular levaria o aumento na concentração de ROS intracelular, como reportado por Yin e colaboradores (2007). Onde uma das vias para o desequilíbrio no sistema antioxidantes intracelular apontado na literatura seria a capacidade do MeHg de induzir um déficit na atividade mitocondrial, centro da respiração celular e produção de energia, de forma dose dependente (AYYATHAN; CHANDRASEKARAN e THIAGARAJAN, 2015; KAUR; ASCHNER e SYVERSEN, 2006; YIN et al., 2007). Esta alteração na sua atividade seria consequência de uma perturbação na permeabilidade mitocondrial e funções antioxidante intracelular, o que resultaria no acúmulo de ROS intracelular (Aschner et al, 2007).

Este aumento na concentração de ROS seria responsável por lesões nas membranas intracelulares elevando os níveis de fatores pró-oxidantes sinalizadores da lesão celular (HUANG et al., 2008; HUANG et al., 2011), tal como demonstrado em nosso estudo, onde pudemos observar o aumento nos níveis tanto de NO como de LPO. Além disso, este incremento nas ROS seria um dos principais mecanismos de lesão e consequente morte celular envolvido na redução das populações celulares abordadas em nosso estudo (neuronal e astrocitária). A qual pode ter sido agravada pela redução do fluxo sanguíneo, como reportado por Lemos e colaboradores (2012), onde encontraram

que mesmo uma exposição aguda a baixas concentrações de HgCl_2 é capaz de alterar a resistência vascular, uma vez que com o aumento na concentração de ROS o ânion superóxido interage com NO e forma peroxinitrito, diminuindo desse modo a biodisponibilidade do NO para relaxamento do músculo liso (LEMOS et al., 2012).

Esta alteração no fluxo sanguíneo conseqüentemente prejudicaria a atuação dos astrócitos como componente ativo da BHE. Como conseqüência da ação tóxica do MeHg sobre os astrócitos temos o prejuízo sobre o controle do meio extracelular. Este fato foi reportado por Yin e colaboradores (2007), onde ao analisar a exposição de astrócitos de recém-nascidos ao MeHg estes apresentavam-se incapazes de manter o máximo controle sobre o meio extracelular, culminando na morte neuronal. O que justificaria a significativa redução na população neuronal que observamos em nosso estudo (de $29,64 \pm 2,609$) no grupo exposto ao MeHg em relação ao grupo controle ($44,07 \pm 3,402$).

Como conseqüência do déficit funcional sofrido pelos astrócitos, temos o prejuízo de uma de suas principais funções no SNC que consiste na manutenção da homeostase do meio extracelular e uma das etapas para manutenção do meio é a recaptação de neurotransmissores da fenda sináptica, dentre eles o glutamato. Quando o glutamato, um neurotransmissor do tipo excitatório, se acumula no meio extracelular e/ou fenda sináptica, os neurônios acabam sofrendo um processo denominado excitotoxicidade (ASCHNER et al., 2007; YIN et al., 2007). Este processo consiste no acúmulo de aminoácidos excitatórios no meio extracelular provoca a ativação excessiva dos receptores ionotrópicos de glutamato NMDA e AMPA, levando a um aumento adicional da concentração de Ca^{+2} intracelular, que pode resultar no influxo passivo de água e, conseqüentemente, no edema celular e tecidual (LEKER e SHOHAMI, 2002). Estas alterações podem levar a lise celular por osmose, uma das principais características da morte celular por necrose em situações de excitotoxicidade (DIRNAGL, IADECOLA e MOSKOWITZ, 1999; MERGENTHALER, DIRNAGL e MEISEL, 2004; DOYLE et al., 2008).

Este processo de excitotoxicidade seria o principal mecanismo responsável pela redução na concentração de corpos celulares que observamos no grupo exposto ao MeHg durante a análise tecidual por imunomarcagem para o anticorpo NeuN, um marcador de neurônios maduros, onde quantificamos um número significativamente menor de corpos celulares no grupo exposto ao MeHg em relação ao grupo controle.

Essa perda celular estaria intimamente relacionada com o prejuízo motor relatado neste estudo.

Anormalidades no desempenho motor consequentes à exposição ao MeHg são reportadas na literatura (ATCHISON e HARE, 1994; DÓREA, 2015; FARINA, ASCHNER e ROCHA, 2011a e b; FARINA, ASCHNER e ROCHA, 2012). O déficit motor promovido pela exposição ao mercúrio é apontado na literatura não como uma alteração na morfologia muscular, mas como uma sequela clínica das alterações neuronais sofridas (DEBES et al. 2006). Estes efeitos ocorrem de forma dose dependente, ou seja, quanto maior a dose e/ou o período de exposição, maior o prejuízo, acarretando redução da velocidade motora, atenção e da linguagem, como consequência do consumo de MeHg (DEBES et al., 2006; HUANG et al., 2008; HUANG et al., 2011). No entanto, nosso estudo provou que mesmo uma exposição crônica à baixas concentrações de MeHg é capaz de promover um prejuízo motor em testes tanto de atividade locomotora espontânea e forçada (campo aberto e rotarod, respectivamente). Isto se deve provavelmente a sua capacidade de se bioacumular nos organismos intensificando seus efeitos citotóxicos (UNEP 2011). Estas alterações incluem o déficit na atividade locomotora e equilíbrio e têm sido apontadas como parâmetros importantes para a detecção de alterações funcionais consequentes à neurotoxicidade induzida pela ação do MeHg (HUANG et al., 2008; HUANG et al., 2011).

6. CONCLUSÃO

- Este estudo provou que a exposição crônica à baixas concentrações do MeHg (0,04 mg/kg) proposta é capaz de promover depósitos no córtex motor de ratos adultos;
- Estes depósitos seriam responsáveis pelo comprometimento funcionais observados no que se refere à capacidade motora destes animais, mesmo esta exposição tendo ocorrido após a maturação completa do SNC;
- O déficit funcional seria decorrente de um desequilíbrio na homeostase promovendo o aumento na concentração das ROS
- O acúmulo de ROS seria consequente de um desequilíbrio do sistema antioxidante intracelular, como observado, onde demonstramos que a exposição crônica à baixas concentrações de MeHg reduziu a capacidade antioxidante total e elevou os fatores pró-oxidativos (NO e LPO);
- O desequilíbrio no balance oxidativo teria como consequência o prejuízo funcional sofrido pelos astrócitos, um importante componente da BHE e responsável pela receptação de neurotransmissores do meio extracelular;
- Esta não recaptção dos neurotransmissores desencadearia um evento denominado excitotoxicidade pelo acúmulo de neurotransmissores excitatório na fenda sináptica;
- Estes eventos seriam responsáveis pela redução populacional astrocitária e neuronal no córtex motor de ratos adultos e consequentemente do déficit funcional sofrido.

REFERÊNCIAS

- ATSDR – Agency for Toxic Substance and Disease Registry. **Toxicological Profile for Mercury**. Atlanta: Division of Toxicology / Department of Health and Human Services, 2011.
- ALLEN, J. W., SHANKER, G., TAN, K. H., ASCHNER, M. The consequences of methylmercury exposure on interactive functions between astrocytes and neurons. **NeuroToxicol.**, v. 23, p.755-759, 2002.
- ALLEN, J. W., SHANKER, G., ASCHNER, M., Methylmercury inhibits the in vitro uptake of the glutathione precursor, cysteine, in astrocytes, but not in neurons. **Brain Research**, v. 894, p. 131-140, 2001.
- ALLAN, S. M. & ROTHWELL, N. J. Inflammation in central nervous system injury. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences** **358**. 1669-1677, 2003.
- AMORIM, M. I. M., MERGLER, D., BAHIA, M.O., DUBEAU, H., MIRANDA, D., LEBEL, J., BURBANO, R., R., LUCOTTE, M.. Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon. **Annais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 72, p.497-507, 2000.
- ASCHNER, M., CLARKSON, T. W. Uptake of methylmercury in the rat brain: effects of amino acids. **Brain Res.**, v. 462, p. 31-39, 1988.
- ASCHNER, M., SYVERSEN, T., SOUZA, D.O, ROCHA, J. B. T., FARINA, M. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 285-291, 2007.
- ADERADA, I. A., ROSEMBERG D. B., SOUZA, D. O., KAMDEM, J. P., FAROMBI, E. O., ASCHNER, M. ROCHA, J. B. T. Biochemical and behavioral deficits in the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea* model of methylmercury exposure. **Toxicol. Res.**, v. 4, p. 442-451, 2015.
- AKAGI, H. Analysis of methylmercury in fish and shellfish by dithizone extraction-gas chromatography. **Jpn. J. Hyg.**, v. 40, p. 293, 1985.
- ATCHISON, W. D., HARE, M. F. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity. **FASEB J.**, v.8, p. 622-629. 1994.
- AYYATHAN, D. M.; CHANDRASEKARAN, R.; THIAGARAJAN, K. Neuroprotective effect of Tagara, an Ayurvedic drug against methyl mercury induced

oxidative stress using rat brain mitochondrial fractions. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 268, 2015.

BERNHOF, R. A. Mercury toxicity and treatment: a review of the literature. *J. Environ. Public Health*, v. 2012, 2012.

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

BITENCOURT, P. R.; ABDALLA, F. H.; DE BONA, K. S.; MORETTO, M. B. Exposição aguda ao Metilmercúrio em ratos em desenvolvimento: mini-revisão. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 2, p. 137, 2013.

BOSE, R.; ONISHCHENKO, N.; EDOFF, K.; JANSON LANG, A. M. e CECCATELLI, S. Inherited effects of low-dose exposure to methylmercury in neural stem cells. **Toxicol Sci**, v. 130, n. 2, p. 383-390, 2012.

BUTOVSKY, O., TALPALAR, A. E., BEN-YAAKOV, K. & SCHWARTZ, M. Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective. **Molecular and cellular neurosciences**, v. 29: 381-393, 2005.

CARTER, R.J.; LIONE, L.A.; HUMBY, T.; MANGIARINI, L.; MAHAL, A.; DUNNETT, S.B.; MORTON, A.J. **Characterization of Progressive Motor Deficits in Mice Transgenic for the Human Huntington's Disease Mutation**. *Journal of Neuroscience*. 1999; 19: 3248-3257.

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

CECCATELLI, S., DARÉ, E., MOORS, M. Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. **Chemico-biological interactions**, v. 188, p. 301-308, 2010.

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

CHARLESTON, J. S., BODY, R. L., BOLENDER, R. P., MOTTET, N. K., VAHTER, M. E., BURBACHER, T. M. Changes in the number of astrocytes and microglia in the thalamus of the monkey *Macaca fascicularis* following long-term subclinical methylmercury exposure. **Neurotoxicology**, v. 17, p. 127-138, 1996.

- DAVIS, L. E., KORNFELD, M., MOONEY, H. S., FIEDLER, K. J., HAALAND, K. Y., ORRISON, W. W., CERNICHIARI, E., CLARKSON, T. W. Methylmercury poisoning: long-term clinical, radiological, toxicological and pathological studies of an affected family. **Ann. Neurol.**, v. 35, p. 680-688, 1994.
- CHOI, A. L., WIHE, P., BUDTZ-JORGENSEN, E., JORGENSEN, P. J., SALOMEN, J. T., TUOMAINEN, T., MURATA, K., NIELSEN, H. P., PETERSEN, M. S., ASKHAN, J., GRANDJEAN, P. Methylmercury exposure and adverse cardiovascular effects in egypt whaling men. *Environ. Health Perspect.* V. 117, p. 367-372, 2009.
- CLARKSON, T. W. The three modern faces of mercury. **Environ. Health Perspect.**, v. 110, p.11-23, 2002.
- ASCHNER, M. Mercury toxicity. **J. Pediatr.**, v. 138, p. 450-451, 2001.
- CHOI, D. W. Excitotoxic cell death. **J. Neurobiol.**, v. 23, p. 1261-1276, 1992.
- COMPEAU, G. C.; BARTHA, R. Sulfate-reducing bacteria: principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. **Applied and environmental microbiology**, v. 50, n. 2, p. 498–502, ago. 1985.
- DAY, J. J., REED, M. N., NEWLAND, C. Neuromotor deficits and mercury concentrations in rats exposed to methylmercury and fish oil. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 27, p. 629-641, 2005.
- DEBES, F., BUDTZ-JORGENSEN, E., WEIHE, P., WHITE, R. F., GRANDJEAN, P. Impact of prenatal methylmercury exposure on neurobehavioral function at age 14 years. **Neurotoxicol. Teratol.**, v. 28, p. 363-375, 2006.
- DESAI, A.; MITCHISON, T.J. Microtubule polymerization dynamics. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.13, p. 83-117, 1997.
- DIEGUEZ-ACUÑA, F. J.; POLK, W. W.; ELLIS, M. E.; SIMMONDS, P. L.; KUSHLEIKA, J. V.; WOODS, J. S. Nuclear Factor B Activity Determines the Sensitivity of Kidney Epithelial Cells to Apoptosis: Implications for Mercury-Induced Renal Failure. **Toxicol Scienc.** V. 82, p. 114–123, 2004. Doi:10.1093/toxsci/kfh236.
- DIRNAGL, U., IADECOLA, C. & MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends in neurosciences**, v. 22: 391-397, 1999.
- DOREA, J. G. Exposure to mercury and aluminum in early life: developmental vulnerability as a modifying factor in neurologic and immunologic effects. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 12, 1295-1313, 2015.

- DUNHAM, N. W.; MEYA, T. S. A note on simple apparatus for detecting neurological defects in rats and mice. **J Am Pharm Assoc**, v. 46, p. 208–209, 1957.
- ENDRES, M. & DIRNAGL, U. Ischemia and stroke. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 513: 455-473, 2002.
- FARINA, M., ASCHNER, M., ROCHA, J. B. T. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 255, p. 405-417, 2011.
- FARINA, M., ROCHA, J. B. T., ASCHNER, M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. **Life Sciences**, v. 89, p. 555-563, 2011.
- FARINA, M., ASCHNER, M., ROCHA, J. B. T. Special Issue: Environmental Chemicals and Neurotoxicity Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**. v. 256, n. 3, p. 405–417, 2012.
- FERNANDES, L.M.P., TEIXEIRA, F.B., ALVES-JUNIOR, S.M., PINHEIRO, J. DE J.V., MAIA, C.S.F., LIMA, R.R., 2015. Immunohistochemical changes and atrophy after chronic ethanol intoxication in rat salivary glands. **Histol. Histopathol.** 11604. Doi:10.14670/HH-11-604.
- FONTES-JÚNIOR, E. A., MAIA, C. S. F., FERNANDES, L. M. P., GOMES-LEAL, W, COSTA-MALAQUIAS, A., LIMA, R. R., PREDIGER, R.D., CRESPO-LÓPEZ, M. E. Chronic alcohol intoxication and cortical ischemia: study of their comorbidity and the protective effects of minocycline. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity (Print)**, v. 2016, p. 1-10, 2016
- GARRITANO, C. R., LUZ, P. M., PIRES, M. L. BARBOSA, M. T., BATISTA, K.M. Analysis of the mortality trend due to cerebrovascular accident in Brazil in the XXI century. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 98, p. 519-527, 2012
- GARNER, C. C.; NASH, J.; HUGANIR, R. L. PDZ domains in synapse assembly and Reagent. **Trends Cell Biol**, v. 10, p. 274–280, 2000.
- GOLDSTEIN, L.B.; DAVIS, J.N. **Beam-walking in rats: studies towards developing an animal model of functional recovery after brain injury.** J Neurosci Meth. 1990; 31: 101–107.
- GREEN, L.C., WAGNER, D. A., GLOGOWSKI, J., SKIPPER, P. L., WISHNOK, J. S., TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**. v.126, p. 131–138, 1982.

GRILLO, C. A.; PIROLI, G. G.; WOOD, G. E.; REZNIKOV, L. R.; MCEWEN, B. S. e REAGAN, L. P. Immunocytochemical analysis of synaptic proteins provides new insights into diabetes-mediated plasticity in the rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 136, n. 2, p. 477-486, 2005.

GUIMARAES, J. S.; FREIRE, M. A.; LIMA, R. R.; PICANCO-DINIZ, C. W.; PEREIRA, A. e GOMES-LEAL, W. Minocycline treatment reduces white matter damage after excitotoxic striatal injury. **Brain Res**, v. 1329, n. p. 182-193, 2010.

HARADA, M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. **Crit Rev Toxicol**, v. 25, p. 1-24, 1995.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, K.B. Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail. **Am J Physiol**, v. 268, p. 1386-1393, 1995.

HUANG, C. F.; HSU, C. J.; LIU, S. H. e LIN-SHIAU, S. Y. Neurotoxicological mechanism of methylmercury induced by low-dose and long-term exposure in mice: oxidative stress and down-regulated Na⁺/K⁽⁺⁾-ATPase involved. **Toxicol Lett**, v. 176, n. 3, p. 188-197, 2008.

HUANG, C. F.; LIU, S. H.; HSU, C. J. e LIN-SHIAU, S. Y. Neurotoxicological effects of low-dose methylmercury and mercuric chloride in developing offspring mice. **Toxicol Lett**, v. 201, n. 3, p. 196-204, 2011.

IKEDIABI, C. O.; BADISA, V. L.; AYUK-TAKEM, L. T.; LATINWO, L. M. e WEST, J. Response of antioxidant enzymes and redox metabolites to cadmium-induced oxidative stress in CRL-1439 normal rat liver cells. **Int J Mol Med**, v. 14, n. 1, p. 87-92, 2004.

ITO, D.; IMAI, Y.; OHSAWA, K.; NAKAJIMA, K.; FUKUUCHI, Y. e KOHSAKA, S. Microglia-specific reagent ion of a novel calcium binding protein, Iba1. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 57, n. 1, p. 1-9, 1998.

KAUR, P.; ASCHNER, M.; SYVERSEN, T. Glutathione modulation influences methylmercury induced neurotoxicity in primary cell cultures of neurons and astrocytes. **Neurotoxicology**, v. 27, n. 4, p. 492-500, 2006.

KNOLLER N, A. G., FULGA V, ZELIG G, ATTIAS J, BAKIMER R, MARDER JB, KONG, H., WONG, M., CHAN, H., LO, S. C. Chronic exposure of adults rats to low doses of methylmercury induced a state of metabolic deficit in the somatosensory cortex. **Journal of proteome research**, v. 12, p. 5233-5245, 2013.

YOLES E, BELKIN M, SCHWARTZ M, HADANI M. Clinical experience using

- incubated autologous macrophages as a treatment for complete spinal cord injury: phase I study results. **Journal of neurosurgery. Spine**, v. 3: 173-181, 2005.
- LAPANNA, D.; CUCCURULLO, F. TBA test and 'free' MDA assay in evaluation of lipid peroxidation and oxidative stress in tissue systems. **Am J Physiol**, v. 265, p. H1030-H1031, 1993.
- LEKER, R.R., SHOHAMI, E. Cerebral ischemia and trauma – different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. **Brain Research Reviews**, v. 39: 55–73, 2002.
- LEMOS, N. B.; ANGELI, J. K.; FARIA TDE, O.; RIBEIRO JUNIOR, R. F.; VASSALLO, D. V.; PADILHA, A. S. e STEFANON, I. Low mercury concentration produces vasoconstriction, decreases nitric oxide bioavailability and increases oxidative stress in rat conductance artery. **PloS One**, v. 7, n. 11, p. e49005, 2012.
- LIMA, R. R.; GUIMARAES-SILVA, J.; OLIVEIRA, J. L.; COSTA, A. M.; SOUZA-RODRIGUES, R. D.; DOS SANTOS, C. D.; PICANCO-DINIZ, C. W. e GOMES-LEAL, W. Diffuse axonal damage, myelin impairment, astrogliosis and inflammatory response following microinjections of NMDA into the rat striatum. **Inflammation**, v. 31, n. 1, p. 24-35, 2008.
- LO E.H.; DALKARA, T.; MOSKOWITZ, M. A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. **Nature reviews neuroscience**, v. 4, p. 399-415, 2003.
- LO, E. H., MOSKOWITZ, M. A. & JACOBS, T. P. Exciting, radical, suicidal: how brain cells die after stroke. **Stroke**, v. 36: 189-192, 2005.
- LOTUFO, P. A. Stroke in Brazil: a neglected disease. **ver Paulo Med J**, v. 123, p. 3-4, 2005.
- LOWRY, O.H, ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phen reagent. **J Biol Chem** v. 193, p. 265–27, 1951.
- MERGENTHALER, P., DIRNAGL, U. & MEISEL, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. **Metabolic brain disease**, v. 19: 151-167, 2004.
- MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal Biochem**. v. 86, n. 1, p. 271-8, 1978.
- MORAIS, S.; COSTA, F.G.; PEREIRA, M.L. Heavy Metals and Human Health. In *Environmental Health* 1st ed. Oosthuizen, J: **InTech Open Sci**, p. 227-246, 2012.
- MORGANO, A. M.; PEREZ, A. C. A.; MILANI, R. F.; MANTOVANI, D. M. B.; NEIVA, C. R. P.; FURLAN, E. F.; TOMITA, R. Y.; LOPES, R. G.; NETOS, M. J. L.

Total mercury in fishes from the productive chain at the Santos coastal region, São Paulo, Brazil *Rev Inst Adolfo Lutz*, 66 (2): 164-171, 2007.

MORGANO, M. A.; GOMES, P. C.; MANTOVANI, D. M. B.; PERRONE, A. A. M. e SANTOS, T. F. Níveis de mercúrio total em peixes de água doce de pisciculturas paulistas. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 25, n. p. 250-253, 2005.

MULLEN, R. J.; BUCK, C. R.; SMITH, A. M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. **Development**, v. 116, p. 201–211, 1992.

NEUMANN, J., SAUERZWEIG, S., RÖNICKE, R., GUNZER, F., DINKEL, K., ULLRICH, O., GUNZER, M., REYMAN, K.G. Microglia Cells Protect Neurons by Direct Engulfment of Invading Neutrophil Granulocytes: A New Mechanism of CNS Immune Privilege. **The Journal of Neuroscience** **28**: 5965–5975, 2008

NINOMIYA, T.; OHOMORI, H.; HASHIMOTO, K. Expansion of methylmercury poisoning outside of Minamata: An epidemiological study on chronic methylmercury poisoning outside of Minamata. **Environ Res**, v. 70, p. 47-50, 1995.

OLIVEIRA, G. B.; FONTES EDE, A., JR.; DE CARVALHO, S.; DA SILVA, J. B.; FERNANDES, L. M.; OLIVEIRA, M. C.; PREDIGER, R. D.; GOMES-LEAL, W.; LIMA, R. R. e MAIA, C. S. Minocycline mitigates motor impairments and cortical neuronal loss induced by focal ischemia in rats chronically exposed to ethanol during adolescence. **Brain Res**, v. 1561, n. p. 23-34, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. **Cardiovascular diseases (–VDs) - Fact sheet N°317**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>. Acesso em: 06 de janeiro de 2016.

PANDOLFO, P.; PAMPLONA, F. A.; PREDIGER, R. D. e TAKAHASHI, R. N. Increased sensitivity of adolescent spontaneously hypertensive rats, an animal model of attention deficit hyperactivity disorder, to the locomotor stimulation induced by the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. **Eur J Pharmacol**, v. 563, n. 1-3, p. 141-148, 2007.

PAULO, S. Total mercury in fishes from the productive chain at the Santos coastal region, São Paulo, Brazil - Mercúrio total em pescados da cadeia produtiva da Baixada Santista, São Paulo, Br ... Mercúrio total em pescado da cadeia produtiva da Baixada Santista. **Revista Do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 2, p. 164–171, 2007.

OYAKE, Y., TANAKA, M., KUBO, H. CHICHIBIU, M. Neuropathological studies on organic mercury poisoning with especial references to the staining and distribution of

- mercury granules. **Shinkei Kenkyu No Shimpo**, v. 10, p. 744-750, 1966.
- PERRY, T.A.; TORRES, E.M.; CZECH, C.; BEYREUTHER, K.; RICHARDS, S.; DUNNETT, S.B. Cognitive and motor function in transgenic mice carrying excess copies of the 695 and 751 amino acid isoforms of the amyloid precursor protein gene. **Alzheimer's Res.** v. 1, p. 5 – 14, 1995.
- SACCO, R. L.; KASNER, S. E.; BRODERICK, J. P.; CAPLAN, L. R.; CONNORS, J. J.; CULEBRAS, A.; ELKIND, M. S.; GEORGE, M. G.; HAMDAN, A. D.; HIGASHIDA, R. T.; HOH, B. L.; JANIS, L. S.; KASE, C. S.; KLEINDORFER, D. O.; LEE, J. M.; MOSELEY, M. E.; PETERSON, E. D.; TURAN, T. N.; VALDERRAMA, A. L. e VINTERS, H. V. An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke**, v. 44, n. 7, p. 2064-2089, 2013.
- SARAFIAN, T. A., VARTAVARIAN, L., KANE, D. J., BREDESEN, D. E., VERITY, M. A. bcl-2 expression decreases methyl mercury-induced free-radical generation and cell killing in a neural cell line. **Toxicol. Lett.**, v. 74, p. 149-155, 1994.
- SHARMA, D. R.; SUNKARIA, A.; BAL, A.; BHUTIA, Y. D.; VIJAYARAGHAVAN, R.; FLORA, S. J. e GILL, K. D. Neurobehavioral impairments, generation of oxidative stress and release of pro-apoptotic factors after chronic exposure to sulphur mustard in mouse brain. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 240, n. 2, p. 208-218, 2009.
- SOUZA-RODRIGUES, R. D.; COSTA, A. M.; LIMA, R. R.; DOS SANTOS, C. D.; PICANCO-DINIZ, C. W. e GOMES-LEAL, W. Inflammatory response and white matter damage after microinjections of endothelin-1 into the rat striatum. **Brain Res**, v. 1200, n. p. 78-88, 2008.
- STANLEY, J.L.; LINCOLN, R.J.; BROWN, T.A.; MCDONALD, L.M.; DAWSON, G.R.; REYNOLDS, D.S. The mouse beam walking assay offers improved sensitivity over the mouse rotarod in determining motor coordination deficits induced by benzodiazepines. **J Psychopharmacol**, v. 19, p. 221-227, 2005.
- TAKEUCHI, T.; ETO, K.; KINJO, Y.; TOKUNAGA, H. Human brain disturbance by methylmercury poisoning, focusing on the long-term effect on brain weight. **Neurotoxicology**, v. 17, p. 187-190, 1996.
- TEIXEIRA, F. B., FERNANDES, R. M., FARIAS-JUNIOR, P. M. A., COSTA, NATACHA, M. M., FERNANDES, L. M. P., SANTANA, L. N. S., SILVA-JUNIOR, A. F., SILVA, M. C. F., MAIA, C. S. F., LIMA R. R. Evaluation of the effects of

chronic intoxication with inorganic mercury on memory and motor control in rats. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v. 11, 9171-9185, 2014.

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

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

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME - UNEP. **Mercury in the Aquatic Environment: Sources, Releases, Transport and Monitoring**. In: ___ Global mercury assessment. Switzerland: UNEP, 2011. Disponível em: <http://www.unep.org/chemicalsandwaste/Mercury/ReportsandPublications/tabid/3593/Default.aspx>. Acesso em: 03 de outubro de 2015.

VIRTANEN, J. K.; VOUTILAINEN, S.; RISSANEN, T. H.; MURSU, J.; TUOMAINEN, T. P.; KORHONEN, M. J.; VALKONEN, V. P.; SEPPANEN, K.; LAUKKANEN, J. A. e SALONEN, J. T. Mercury, fish oils, and risk of acute coronary events and cardiovascular disease, coronary heart disease, and all-cause mortality in men in eastern Finland. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 25, n. 1, p. 228-233, 2005.

KONG, H.K.; WONG M.H.; CHAN H.M. Chronic exposure of adult rats to low doses of methylmercury induced a state of metabolic deficit in the somatosensory cortex. *J Proteome Res*, v. 12, p. 5233-45, 2013.

YIN, Z., MILATOVIC, D., ASCHNER, J. L., SYVERSEN, T., ROCHA, J. B. T., SOUZA, D. O., SIDORYK, M., ALBRECHT, J., ASCHNER, M. Methylmercury induces oxidative injury, alterations in permeability and glutamine transport in cultured astrocytes. *Brain Res.*, p. 1-10, 2007.

WALSH, R.N.; C UMMINS, R.A. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull*, v. 83, p. 482-504, 1976.

WANG, Q.; TANG, X. N.; YENARI, M. A. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol*, v. 184, p. 53-68, 2007.

ANEXO I

**PARECER 225-14**

Projeto: CARACTERIZAÇÃO DA INJÚRIA NO CÓRTEX MOTOR DE RATOS APÓS ACIDENTE VASCULAR ISQUÊMICO, EM UM MODELO DE INTOXICAÇÃO CRÔNICA COM METILMERCÚRIO

Coordenador: Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima

Área Temática: Neurociências

Vigência: 01/2013 a 12/2015

Nº no CEPAE-UFPA: 225-14

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação é de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 1032/2014 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação (N= 80, ratos Wistar) nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido.

As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 01 de janeiro de 2013

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

ANEXO II

**CAPACIDADE ANTIOXIDANTE CONTRA RADICAIS PEROXIL
(ACAP)****➤ Informação geral:**

- ✓ As espécies reativas de oxigênio (ERO) serão detectadas pela reação com o diacetato de 2', 7'diclorofluoresceína (H₂DCF-DA, Molecular Probes), essa reação produzirá um fluorocromo que será detectado utilizando comprimentos de ondas de 488 e 525 nm para excitação e emissão.
- ✓ As leituras serão realizadas em fluorímetro com leitura de microplacas (Victor 2, Perkin Elmer).

➤ Reagentes:

- ✓ Tampão Tris;
- ✓ Kit de Proteínas Biureto;
- ✓ Água de MilliQ;
- ✓ Tampão de Reação:
 1. 0,3575g de HEPES (30mM);
 2. 0,7455g de KCl (200mM);
 3. 0,0102g de MgCl₂ (1mM).
 4. Dissolver em 50 mL de H₂O Milli-Q e ajustar o pH em 7,20.
- ✓ Solução de H₂DCF-DA (Fotossensível)
 1. Pesar 0,5mg de H₂DCF-DA (16mM) dentro do eppendorf com as luzes apagadas e envolver em papel alumínio;
 2. Adicionar 4,275 ml de etanol 100%;
 3. Colocar o álcool no eppendorf e agitar em vórtex por 1 min.
- ✓ Solução de ABAP 4mM:
 1. Pesar 0,00271g de ABAP (2,2' –azobis (2 metilpropionamidina) dihidrocloro) em eppendorf;
 2. Adicionar 2,5mL de água Milli-Q e agitar em vórtex por 1 min.

➤ **Material e Equipamentos:**

- ✓ Micropipetas em todas as graduações;
- ✓ Ponteiras em todas as graduações;
- ✓ Micro Placa Transparente (Para Proteínas);
- ✓ Micro Placa Branca/Opaca (Para ACAP);
- ✓ Eppendorfs 1,5 mL e 0,5 mL;
- ✓ Recipiente para gelo.

➤ **Preparo do extrato de tecidos**

- Usar tampão de homogeneização Tris-HCl (20mM; pH 7,4; 4°C) na proporção adequada para o tipo de tecido;
- Realizar a desagregação sônica (concentração aproximada de 1 g/mL).
- Centrifugar e armazenar o sobrenadante em -80°C até o processamento.

➤ **Determinação da concentração de proteínas (Kit de Biureto)**

- ✓ 6.1. Colocar 700 µL de biureto em todos os eppendorfs;
- ✓ 6.2. Colocar 15 µL de tampão de homogeneização da GCL (só no branco);
- ✓ 6.3. Colocar 15 µL de padrão de proteínas - BSA (só no padrão);
- ✓ 6.4. Colocar 15 µL de amostra nos eppendorfs das amostras;
- ✓ 6.5. Colocar 1 gota de NaOH em todos os eppendorfs;
- ✓ 6.5. Colocar 350 µL de cada eppendorf nas poças correspondentes.
- ✓ Fazer a leitura da placa transparente.

➤ **Padronização do ACAP:**

Deve ser feita com amostras controles para as diluições de 0,5, 0,75 e 1 mg de proteína/ml, com o mesmo tampão usado para a homogeneização.

➤ **Montagem da microplaca (Placa Branca/Opaca)**

Só deve ser iniciada após o aparelho alcançar 37°C.

PLACA SEM ABAP

1. Colocar em todas as poças (poças de branco e de amostra) **127,5 µL** do **tampão de reação**;
2. Colocar **10 µL** de **tampão de homogeneização** nas poças de branco;
3. Colocar **10 µL** de **amostra** já diluídas nas poças de amostra;
4. Colocar **7,5 µL** de **H₂O milliQ** em todas as poças (branco e de amostra);
5. Colocar a microplaca para ler no fluorímetro com leitor de microplaca (Victor 2 Parkin Elmer);
6. Após a leitura, anota-se o código do background;
7. Tirar a placa do fluorímetro para adicionar 10µL de H₂DCF em todas as poças (em ambiente escuro);
8. Deixar o aparelho ler durante 60 minutos.

PLACA COM ABAP

1. Colocar em todas as poças (poças de branco e de amostra) **127,5 µL** do **tampão de reação**;
2. Colocar **10 µL** de **tampão de homogeneização** nas poças de branco;
3. Colocar **10 µL** de **amostra** nas poças de amostra;
4. Colocar **7,5 µL** de **ABAP** em todas as poças (branco e de amostra);
5. Colocar a microplaca para ler no fluorímetro com leitor de microplaca (Victor 2 Parkin Elmer);
6. Após a leitura, anota-se o código do background;
7. Tirar a placa do fluorímetro para adicionar 10µL de H₂DCF em todas as poças (em ambiente escuro);
8. Deixar o aparelho ler durante 60 minutos.

ANEXO III

DOSAGEM DE PROTEÍNA (Método de Bradford)

➤ **Reagentes:**

✓ Corante de Ensaio:

1. Dissolver 100 mg de Coomassie blue G-250 em 50 mL de Etanol ou metanol (95%), preferencialmente filtrar a solução após o preparo;
2. Adicionar 100 mL de Ácido fosfórico (85% v/v);
3. Diluir até 1 L com água destilada;
4. A solução deve ser Verde escuro/Marrom claro, ter pH de 1,1 e estável em recipiente escuro à 4°C (Semanas).

✓ BSA (2mg/mL)

1. Dissolver 2 mg de Bovine Serum Albumine (BSA) em 1000 µL de água destilada;
2. Fazer alíquotas da solução e estocar à 4°C.

➤ **Materiais e Equipamentos:**

- ✓ Microplaca.
- ✓ Pipetador
- ✓ Espectrofotômetro

➤ **Curva Padrão:**

Tubos	BSA [2 mg/mL]	Água Destilada ou Tampão	[BSA] µg/mL
P4	40 µL do estoque	20 µL	1500
P3	30 µL do P4	30 µL	750
P2	30 µL do P3	30 µL	375
P1	0µL	30 µL	0

➤ **Ensaio:**

- ✓ Aclimatar o corante de ensaio à temperatura ambiente, misturar por inversão antes do uso;
- ✓ Pipetar 5 μ L dos Padrões de BSA e Amostras nos poços da microplaca (96 poços), em triplicata;
- ✓ Adicionar 250 μ L do corante de ensaio dentro de cada poço contendo padrão ou amostra;
- ✓ Encubar em temperatura ambiente por até 5 minutos (Não ultrapassar 1 hora);
- ✓ Preparar o espectrofotômetro para o comprimento de onda $\lambda \approx 568$ nm, e quantificar as absorbâncias.

ANEXO IV

ANÁLISE DOS NÍVEIS DE NITRITO (Método de Griess)**➤ Reagentes:**

- ✓ Solução de Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 (P.M.: 121,14 g/mol; Fórmula: $C_4H_{11}NO_3$)

1. Dissolver o Tris em 80% do volume pretendido com Água destilada;
2. Ajustar o pH para 7,4 (Usar somente HCl 35%);
3. Adicionar água destilada até atingir o volume final pretendido;
4. Conservar a 4°C.

- ✓ NEDA = Naftietileno 0,1%, 50 mL (P.M.:259,17 g/mol; Fórmula: $C_{12}H_{14}N_2$):

1. Pesar 0,05 g de Naftietileno;
2. Adicionar 40 mL de água destilada até atingir o volume e completar até atingir 50 mL.

- ✓ SULFA = Sulfanilamida 1%, 50 mL (P.M.: 172,2g/mol; Fórmula: $C_6H_8N_2O_2S$):

1. Pesar 0,5 g de Sulfanilamida;
2. Adicionar 40 mL de Ácido Fosfórico 5% e completar até 50 mL.

- ✓ Solução Estoque de Nitrito 0,1 mM, 10 mL (P.M.: 69 g/mol; Fórmula: NO_2^-):

1. Pesar 69 mg de Nitrito de Sódio;
2. Adicionar 10 mL de água destilada.

➤ Materiais e Equipamentos:

- ✓ Microplaca.
- ✓ Pipetador
- ✓ Espectrofotômetro
- ✓ Centrífuga

➤ **Curva Padrão:**

Tubos	NO [100μM]	Água Destilada ou Tampão	[NO] μM
P5	20μL	80 μL	20
P4	15μL	85 μL	15
P3	10μL	90 μL	10
P2	5μL	95 μL	5
P1	0μL	100 μL	0

➤ **Ensaio:**

- ✓ Centrifugar a 14000 rpm por 10 min;
- ✓ Retirar o sobrenadante para o ensaio.
- ✓ Preparar eppendorfs, devidamente identificados de acordo com as amostras ou curva padrão;
- ✓ Adicionar 50 μL de NEDA nos poços da microplaca;
- ✓ Adicionar 50 μL de SULFA nos poços da microplaca;
- ✓ Adicionar 100 μL das amostras (Sobrenadante) ou padrão nos poços com o reagente de Griess;
- ✓ Aguardar tempo de incubação de 20 min em temperatura ambiente;
- ✓ Proceder à leitura no espectrofotômetro em comprimento de onda $\lambda \approx 550$ nm.

ANEXO V

ANÁLISE DOS NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (Método NMFI)

➤ **Reagentes:**

✓ Solução de Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 (P.M.: 121,14 g/mol; Fórmula: $C_4H_{11}NO_3$):

1. Dissolver o Tris em 80% do volume pretendido com Água destilada;
2. Ajustar o pH para 7,4 (Usar somente HCl 35%);
3. Adicionar água destilada até atingir o volume final pretendido;
4. Conservar a 4°C.

✓ Solução de N-Metil-2-Fenilindol (Sigma) 10,3 mM (P.M.: 207,27 g/mol; Fórmula: $C_{15}H_{13}N$):

1. Estoque: Dissolver a 0,0854 g de NMFI em 40 mL de Acetonitrila;
2. Ensaio: Diluir a solução de NMFI 10,3 mM em metanol (1:3 = ¼).

✓ Ácido Metanosulfônico P.A

➤ **Materiais e Equipamentos:**

- ✓ Microplaca
- ✓ Pipetador
- ✓ Espectrofotômetro
- ✓ Centrífuga

➤ **Curva Padrão:**

Tubos	MDA [200 η mol/mL]	Água Destilada ou Tampão	[MDA] η mol/mL
P5	80 μ L do estoque	120 μ L	80
P4	100 μ L do P5	100 μ L	40
P3	100 μ L do P4	100 μ L	20
P2	100 μ L do P3	100 μ L	10
P1	0 μ L	100 μ L	0

➤ **Ensaio:**

- ✓ Centrifugar a 5600 rpm (2700g) por 10 min;
- ✓ Retirar o sobrenadante para o ensaio;
- ✓ Preparar eppendorfs, devidamente identificados de acordo com as amostras ou curva padrão;
- ✓ Adicionar aos eppendorfs 325 μL de NMFI e 75 μL do Ác. Metanossulfônico;
- ✓ Adicionar 100 μL das amostras (sobrenadante) ou padrão;
- ✓ Aquecer em banho maria 45°C por 40 min;
- ✓ Proceder à leitura no espectrofotômetro em comprimento de onda $\lambda \approx 586$ nm.