



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

BRUNA PUTY SILVA GOMES

**ALTERAÇÕES DE EXPRESSÃO GÊNICA NA LINHAGEM DE
GLIOBLASTOMA HUMANO U87 APÓS EXPOSIÇÃO AO
MeHg E HgCl₂**

Belém
2016

BRUNA PUTY SILVA GOMES

**ALTERAÇÕES DE EXPRESSÃO GÊNICA NA LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA
HUMANO U87 APÓS EXPOSIÇÃO AO MeHg E HgCl₂**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular
como requisito parcial para obtenção do título de
Mestre

Área de Concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima

Co-Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correa
de Oliveira

Data: ____/____/____

Banca examinadora:

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

Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira – Co-orientador
Instituto de Ciências Exatas e Naturais – Universidade Federal do Pará/ Instituto Evandro
Chagas

Prof^a. Dra. Marta Chagas Monteiro
Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Pará

Prof^a. Dra. Bárbara do Nascimento Borges
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

Belém

2016

Não importa quanto a vida possa ser ruim, sempre há algo que você pode fazer, e triunfar. Enquanto há vida, há esperança.

Stephen Hawking

Agradecimentos

Ao meu orientador, Rafael Lima, por ter me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho, por confiar em mim, e por me ajudar a manter viva a vontade que tenho em fazer ciência.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Edivaldo Herculano que abriu as portas de seu laboratório e permitiu que eu conduzisse o projeto sobre a supervisão dos seus alunos. Obrigada por estar sempre disponível, pelos ensinamentos e pela magnífica contribuição à minha educação científica. Agradeço também aos alunos e técnicos do Laboratório de Cultura de Células do Instituto Evandro Chagas, pela rotina saudável e acolhedora e por estarem sempre disponíveis a me ensinar e me ouvir. Agradeço especialmente ao Michel por tudo, se hoje termino esta dissertação, devo isso a ele.

Aos colegas do LABEF com quem compartilho meus dias e discussões científicas. Agradeço a Luana, Nayara, Lucas, Brenda, Carol, Ana Paula e Liz por manterem minha mente sã, por garantirem momentos felizes e incríveis. Agradeço também a Flávia e Anna Paula que me acolheram e me mostraram que a esperança nunca tem fim. Vocês foram surpresas incríveis nesse ano complicado A Eunice, por ser a pessoa mais incrível que eu conheço e uma amiga excelente. Obrigada também por ter trazido ao mundo o João.

Aos meus pais, Paulo e Tânia que desde cedo me ensinaram a importância da educação, e sempre me apoiaram em cada escolha, por mais difícil que ela pudesse parecer. A cada sonho realizado há somente uma certeza: tudo é pra vocês e por vocês. Sem vocês a vida não teria sentido algum. Aos meus avós, Aldenor (*in memoriam*) e Antônia que participaram ativamente da minha criação, ajudando a me tornar a pessoa que sou hoje. Ao meu irmão, com quem dividi minha infância e meus dias. Se há algo na vida que não muda nunca, é o sentimento de uma irmã por um irmão.

Ao Bruno, por estar sempre ao meu lado nos piores e melhores momentos, por me amar, compreender e me fazer feliz. Obrigada pelos inúmeros ensinamentos, discussões científicas e por me ajudar a crescer profissionalmente. Hoje, ao terminar mais uma etapa importante em minha carreira científica, tenho a certeza que você é um dos meus melhores exemplos de força, humildade, inteligência e dedicação.

À UFPA, CAPES e CNPQ pelo auxílio financeiro para execução deste trabalho.

Resumo

As formas orgânicas e inorgânicas de mercúrio vem sendo apontadas como importantes contaminantes em várias regiões do mundo devido suas características toxicológicas. Diversos estudos já relataram que a intoxicação por metilmercúrio (MeHg) e cloreto de mercúrio (HgCl_2) podem ocasionar danos ao SNC. Acredita-se que as células da glia são reconhecidamente importantes para os mecanismos de proteção celular frente aos danos ocasionados pelo mercúrio. No entanto, pouco se sabe a respeito da influência deste metal no genoma dessas células. Desta forma, neste trabalho nós realizamos um mapeamento completo da rede gênica de células da glia humana, da linhagem U87 após exposição mercurial, com o intuito de identificar as possíveis alterações genéticas ocasionadas pelas formas orgânicas e inorgânicas do mercúrio. Nossos resultados demonstraram que as células U87 são mais sensíveis a exposição ao MeHg quando comparado com a exposição ao HgCl_2 . Após análise de curvas de concentração, foi identificado uma LC_{50} de $28.8\mu\text{M}$ e $10,68\mu\text{M}$ após 4h e 24h de exposição a MeHg e uma LC_{50} de $92.25\mu\text{M}$ e $62.75\mu\text{M}$ após o mesmo tempo de exposição a HgCl_2 . Em relação ao conteúdo gênico, nossos resultados demonstraram que ambos os metais ocasionaram alteração na dosagem gênica, sendo a exposição ao MeHg altamente influenciada pela concentração e tempo de exposição, enquanto a exposição a HgCl_2 parece ser fortemente influenciada pelo tempo de exposição. No total, foram identificados 205 genes com diminuição na dosagem gênica e 188 genes com expressão aumentada (Fold change > 5) após 4h de exposição a $5\mu\text{M}$ de MeHg e 204 genes down-regulados e 180 up-regulados após exposição na mesma concentração de HgCl_2 . As análises após 24h de exposição identificaram alteração em 90 genes down-regulados e 3 genes up-regulados após exposição a $1\mu\text{M}$ de MeHg, 116 genes down-regulados e 66 genes up-regulados após exposição a $10\mu\text{M}$ de MeHg. Já em relação ao HgCl_2 , foram identificados 98 genes down-regulados e 73 genes up-regulados nos grupos expostos a $5\mu\text{M}$ de HgCl_2 , 326 genes down-regulados e 66 genes up-regulados nos grupos expostos a $62,75\mu\text{M}$ de HgCl_2 . Nossos dados sugerem que ambas as formas mercuriais são capazes de alterar o perfil gênico das células da linhagem U87, interferindo assim em importantes vias de sinalização capazes de ocasionar alterações bioquímicas e fenotípicas nas células gliais.

Palavras-Chave: MeHg, HgCl_2 , Genotoxicidade, Alteração gênica, Glia, Sistema nervoso central

Abstract

The organic and inorganic forms of mercury have been pointed as important contaminants in several world regions due to its toxicological characteristics. Various studies have reported that the intoxication by methylmercury (MeHg) and mercury chloride (HgCl₂) can lead to central nervous system impairment. It is generally agreed that glial cells are important for the mechanisms responsible for cellular protection against the damages caused by the mercury. However, little is known about the influence of the mercury in the cells genome. Hence, in the present study we did a complete mapping of the human glial cells genetic network after mercury exposition with the aim to identify the possible genetic alterations that occurred via the organic and inorganic forms of mercury. Our results demonstrated that U87 lineage cells are more sensitive to MeHg exposition when compared with HgCl₂ exposition. Using an analysis of the concentration curves the LC₅₀ was obtained from 28.8µM and 10,68µM after 4h and 24h exposition to MeHg and a LC₅₀ of 92.25µM and 62.75µM after the same time periods exposition to HgCl₂. Regarding the genic pool, our results have shown that both metal forms led to alterations in the genic dosage where the MeHg exposition was highly influenced by the concentration and time, whereas the HgCl₂ exposition seemed have been strongly influenced by the exposition time. In total there were 205 identified genes with a lower genic dosage and 188 genes with elevated expression, (Fold change > 5) after 4h exposition and 5µM of MeHg, and 204 down-regulated genes; and 180 up-regulated genes after HgCl₂ exposition in the same concentration. The analysis after 24h exposition showed 90 down-regulated genes and 3 up-regulated genes after 1µM of MeHg; 116 genes were down-regulated and 66 genes were up-regulated after a 10µM exposition of MeHg. As for the HgCl₂, there were 98 down-regulated genes and 73 up-regulated genes for the groups exposed to 5µM of HgCl₂; 326 down-regulated genes and 66 up-regulated genes for the groups exposed to 62,75µM of HgCl₂. Our dataset suggests that both mercurial forms are able to alter the cell genetic expression profile thus interfering in important signaling paths prone to give rise to biochemical impairments and glial cells phenotypes.

Key-words: MeHg, HgCl₂, Genotoxicity, Genetic Alteration, Glial cells, Central nervous system.

LISTA DE FIGURAS

- Fig.1: Ciclo biogeoquímico do mercúrio. As vias de conversão do mercúrio em suas isoformas representa um mecanismo complexo onde o Hg+2 proveniente de fontes naturais ou da ação antropogênica se deposita nos rios onde é metilado por bactérias sulforredutoras a sua forma orgânica, MeHg. O depósito de MeHg nos peixes atinge os níveis tróficos mais altos da cadeia alimentar (seres-humanos) devido ao processo de biomagnificação trófica (Modificado de Wasserman e col., 2001).....4
- Fig.2: Sistema de detoxificação do mercúrio em eucariontes. A entrada do metal (M) favorece a transcrição das Metalotioneínas no núcleo da célula, de forma dependente de zinco (Zn). A princípio o fator de transcrição de metal (MTF) se encontra inibido por uma proteína inibidora da transcrição de metal (MTI). O zinco ativa o complexo MTF-MTI que dirige a transcrição gênica de MT através de elemento regulatório de metais (MRE). Uma vez produzida, a MT se liga ao metal presente no citosol da célula garantindo a detoxificação de proteínas importantes para o funcionamento celular. (Modificado de Roesijadi e col., 1996).....14
- Fig. 3: Novos mecanismos de defesa celular frente a toxicidade do mercúrio. O MeHg induz a ativação dos fatores de transcrição Hsf1 e Nrf2 que dirigem a síntese das proteínas de choque térmico (HSP) e as enzimas antioxidantes heme-oxigenase 1 (HO-1) e quinona 1 (NQO-1). Além disso, o MeHg também é capaz de induzir a produção do metabólito secundário, sulfeto de hidrogênio (H₂S) ocasionando o aumento de glutathiona reduzida (GSH). A produção dessas enzimas e proteínas induzido pela ação do MeHg atuam da diminuição da toxicidade do metal (Adaptado de Hwang, 2012).....16
- Fig.4: Mecanismo molecular da genotoxicidade do mercúrio. A entrada de mercúrio na célula ocasiona alterações no material genético por quatro vias distintas: pela indução de espécies reativas de oxigênio (ERO) que é capaz de atuar diretamente no DNA da célula (1), pela ligação do mercúrio diretamente ao DNA (2), pela ligação do mercúrio a proteínas importantes no núcleo celular que controlam a divisão e controle do ciclo (3) ou pela ligação aos microtúbulos (4) (Adaptado de Crespo-Lopez e col., 2009).....21

Figura 5: Esquema experimental para a produção de cRNA e análise de <i>microarray</i> de expressão de uma cor.....	27
Figura 6: Curva de concentração para o MeHg nos tempos de 4h (a) e 24h (b). Os dados foram avaliados com ANOVA de uma via, com pós teste Tukey, considerando como significativo um $p < 0,05$. * $p < 0,001$ vs controle.....	30
Fig.7: Curva de concentração para o HgCl ₂ nos tempos de 4h (a) e 24h (b). Os dados foram avaliados com ANOVA de uma via, com pós teste Tukey, considerando como significativo um $p < 0,05$. * $p < 0,001$ vs. controle. Ao lado imagens de microscopia de luz (10x)	31
Fig.8: Análise de clustering após exposição a MeHg e HgCl ₂ , nos tempos de 4h e 24h, com o auxílio do software GeneSpring GX. 1: controle 4h; 2: controle 24h; 3: MeHg 10 μ M 24h; 4: MeHg 1 μ M 24h; 5: MeHg 5 μ M 4h; 6: HgCl ₂ 5 μ M 4h; 7: HgCl ₂ 5 μ M 24h; HgCl ₂ 62,75 μ M 24h. Amarelo: dosagem gênica semelhante ao controle; Vermelho: dosagem gênica up-regulada; Azul: dosagem gênica down-regulada	34
Fig. 9: Representação por meio do Diagramas de Venn da dosagem gênica agrupada de acordo com a concentração de metal utilizada, nos tempos de 4h (A e B) e 24h (C e D)	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados estatísticos referentes a exposição a MeHg por 4h e 24h, a análise foi realizada com ANOVA de uma via, seguida de pós-teste <i>Tukey</i>	32
Tabela 2: Dados estatísticos referentes a exposição a HgCl ₂ por 4h e 24h, a análise foi realizada com ANOVA de uma via, seguida de pós-teste <i>Tukey</i>	32
Tabela 3: Genes up-regulados após 4h de exposição a MeHg e HgCl ₂ na concentração de 5µM. Os genes foram selecionados no programa GeneSpring GX, baseado na sua relação com as vias de estresse oxidativo, morte celular e controle de ciclo celular	37
Tabela 4: Genes down-regulados após 4h de exposição a MeHg e HgCl ₂ na concentração de 5µM. Os genes foram selecionados no programa GX baseado na sua relação com as vias de estresse oxidativo, morte celular e controle de ciclo celular	38
Tabela 5: Genes up-regulados após 24h de exposição a MeHg e HgCl ₂ na concentração de 5µM. Os genes foram selecionados no programa GX baseado na sua relação com as vias de estresse oxidativo, morte celular e controle de ciclo celular	40
Tabela 6. Genes down-regulados após 24h de exposição a MeHg e HgCl ₂ na concentração de 5µM. Os genes foram selecionados no programa GX baseado na sua relação com as vias de estresse oxidativo, morte celular e controle de ciclo celular	41
Tabela 7: Funções celulares identificadas após análise de OG em células expostas a MeHg e HgCl ₂ após 4h.....	48
Tabela 8: Funções celulares identificadas após análise de OG em células expostas a MeHg e HgCl ₂ após 24h.....	49

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCO	Citocromo C oxidase
CD	Superóxido dismutase
cDNA	DNA complementar
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FBS	Soro Fetal Bovino
GSH	Glutationa
Hg	Mercúrio
Hsf1	Fator de choque térmico 1
HSP	Proteína de choque térmico
mRNA	RNA mensageiro
MeHg	Metilmercúrio
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
MT	Metalotioneína
Nrf2	Fator nuclear eritróide relacionado ao fator 2
OMS	Organização Mundial da Saúde
O₂^{·-}	Radical superóxido
OH[·]	Radical Hidroxil

PBS	Solução Salina-Fosfato
SD	Sucinatodesidrogenase
-SH	Grupamentos sulfidrilas
SNC	Sistema nervoso central

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. Contexto histórico	1
1.2. Mercúrio e o meio ambiente: região amazônica	2
1.3. Toxicocinética e toxicodinâmica	8
1.3.1. HgCl ₂	9
1.3.2. MeHg	10
1.4. Genotoxicidade do mercúrio	18
1.5. Expressão gênica por <i>microarray</i>	22
2. Objetivos	23
2.1. Objetivo geral.....	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. Material e Métodos	24
3.1. Metais.....	24
3.2. Cultura de células.....	24
3.3. Grupos experimentais.....	24
3.4. Exposição aos metais	24
3.5. Teste de viabilidade celular.....	25
3.6. Análise da expressão gênica.....	25
3.7. Extração total de RNA.....	26
3.8. Microarray de expressão.....	26
3.9. Análise estatística.....	28
4. Resultados	29
4.1. Efeito do MeHg e HgCl ₂ na viabilidade e proliferação de glioblastoma U87.....	29
4.2. MeHg e HgCl ₂ ocasiona alteração no perfil de expressão gênica das células U87.....	33
5. Discussão	42
6. Conclusão	50
Referências	

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONTEXTO HISTÓRICO

Na Grécia antiga o mercúrio era conhecido como “hydrargyrus” (de onde se originou as iniciais Hg), que significa prata líquida. Era assim denominado devido se apresentar na forma líquida à temperatura ambiente, diferenciando-se dos outros metais então conhecidos (Morel e col., 1998; Damas e col., 2014). Dados históricos demonstraram que o primeiro composto contendo mercúrio, o cinábrio - que continha em sua estrutura o sulfeto de mercúrio - era utilizado para a obtenção de mercúrio metálico e também para a produção de tintas e pinturas rupestres. Além disso, relatos evidenciam a presença do Hg em tumbas egípcias datadas de 1500 antes de Cristo. Nessa época, já era conhecida a capacidade do Hg em se conjugar ao ouro, facilitando processos de extração, bem como processos de produção de ornamentos (Caley e col., 1928; Graeme e col., 1998; Damas e col., 2014).

No entanto, foi somente durante a revolução industrial que o Hg ganhou grande destaque, sendo utilizado para fabricar diversos compostos, como lâmpadas fluorescentes, células eletrolíticas destinadas a fabricação de cloro (Cl_2) e hidróxido de sódio (NaOH), fungicidas, germicidas e amálgamas de uso odontológico (Pacyna e col., 2010; revisado por Miccaroni, 2000). Além disso, o mercúrio e seus derivados foram bastante empregados pela indústria farmacêutica como conservante em vacinas, com o intuito de impedir contaminações bacterianas, além de também ter sido utilizado com fins medicinais para o tratamento de doenças como a sífilis (Tchounwou e col., 2003; Zambrano, 2004; Offit, 2007).

Apesar da intensa utilização do mercúrio na indústria ter levado a um gradativo aumento da liberação deste metal para o meio ambiente, é importante ressaltar que dados geobioquímicos também demonstraram que este metal pode ser encontrado naturalmente no meio ambiente (RouletandLuccote, 1995; Wasserman e col., 2003). De acordo com Schroeder e col. (1998), solos de determinadas regiões possuem elevadas concentrações de mercúrio que

contribuem com a liberação do metal para a atmosfera. Geralmente, sua origem é a partir do vapor de mercúrio, liberado por diversos processos naturais como queimadas, erupções vulcânicas, fontes geotérmicas e evasão de solos superficiais.

Os primeiros relatos de intoxicação humana por mercúrio e seus derivados, aconteceram durante a década de 50 na cidade de Minamata no Japão, onde centenas de pessoas foram intoxicadas, e dezenas foram acometidas por desconhecidos sintomas neurológicos que afetavam a fala e a locomoção, culminando com a morte (Harada,1995; Hachiya, 2006). Na década de 60, um grupo de pesquisadores da Universidade de Kumamoto, sugeriu que a doença de Minamata possuía íntima relação com os altos níveis de mercúrio orgânico encontrado nos peixes da região. O mercúrio era utilizado pela indústria química Chisso, como catalisador para a produção de acetaldeído e cloreto de vinila. Dados demonstraram que o composto foi lançado ao mar desde o ano de 1930 (Hachiya, 2006). A partir de então, o aumento do aparecimento de doenças crônicas e neurológicas, incentivou estudos relacionados com a problemática da intoxicação mercurial que havia alcançado níveis surpreendentes. Nesse sentido, diversos grupos passaram a estudar os mecanismos de intoxicação mercurial, nos diferentes organismos e tipos celulares, além de tentar compreender os agravantes toxicológicos do metal para a saúde pública e para o meio ambiente (Berzas Nevado JJ. e col., 2010; Pinheiro MC. e col.,2012; Caito S. e col., 2014; Lohren H. e col., 2015).

1.2. MERCÚRIO E O MEIO AMBIENTE: REGIÃO AMAZÔNICA

O Hg é um poluente global caracterizado pela sua capacidade toxicológica em sistemas biológicos. Como mencionado anteriormente, este metal é encontrado naturalmente no meio ambiente; no entanto, a maior parte do mercúrio encontrado em determinadas regiões deve-se à ação antropogênica, devido a utilização e descarte inadequado do material (Nriago, 1989; Schroeder e col.,1998; Hsu-Kim e col., 2013). O Hg pode facilmente se espalhar pelo meio

ambiente através de complexos sistemas de transporte e transformação. Na natureza, este metal pode ser encontrado sob duas formas: inorgânica e orgânica (Wasserman JC. e col., 2001). Na forma inorgânica o mercúrio existe em três diferentes estados de oxidação, que possuem diferentes características toxicológicas: mercúrio metálico ou elementar (Hg^0), íon mercúroso (Hg_2^{2+}) e íon mercúrico (Hg^{2+}), capazes de se ligar a compostos como cloro (Cl), enxofre (S) e oxigênio (O), dando origem aos sais de mercúrio, como o HgCl_2 (HgCl_2), que é igualmente tóxico para os seres vivos. Já as formas orgânicas do Hg são conhecidas como: etilmercúrio ($\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$), metilmercúrio (MeHg) e dimetilmercúrio ($[\text{CH}_3]_2\text{Hg}$) e são caracterizadas por sua maior solubilidade e toxicidade para os seres vivos (Morel e col., 1998; WHO, 2003; Zambrano e col., 2004).

Estudos toxicológicos sugerem que cada forma mercurial possui uma via de contaminação característica. A contaminação por HgCl_2 ocorre, na maior parte dos casos, através da exposição a produtos industriais, acidentes com lâmpadas fluorescentes, utilização de cosméticos e medicamentos que possuem o metal em sua composição, bem como através da ingestão de alimentos cultivados em áreas contaminadas (Dyall-Smith e Scurry, 1990; Weldon, 2000; Micaroni e col., 2000). Já a contaminação por MeHg ocorre principalmente através da ingestão de peixes contaminados. Esse tipo de contaminação é fortemente influenciado pelo o que se denomina ciclo biogeoquímico do mercúrio (Bradl e col., 2002; Lindberg e col., 2007).

O ciclo do mercúrio é um complexo sistema de conversão entre as diferentes formas do metal. Como demonstrado na Figura 1, o mercúrio proveniente da deposição atmosférica se encontra predominantemente em sua forma iônica (Hg^{2+}), que pode se depositar em solos ricos em ferro, como os solos da região amazônica, ou então se depositar diretamente na superfície de rios e lagos, onde poderá ser biotransformado para suas formas orgânicas, ou sedimentar para posteriormente ser liberado por difusão ou ressuspensão (Wasserman e col., 2001).

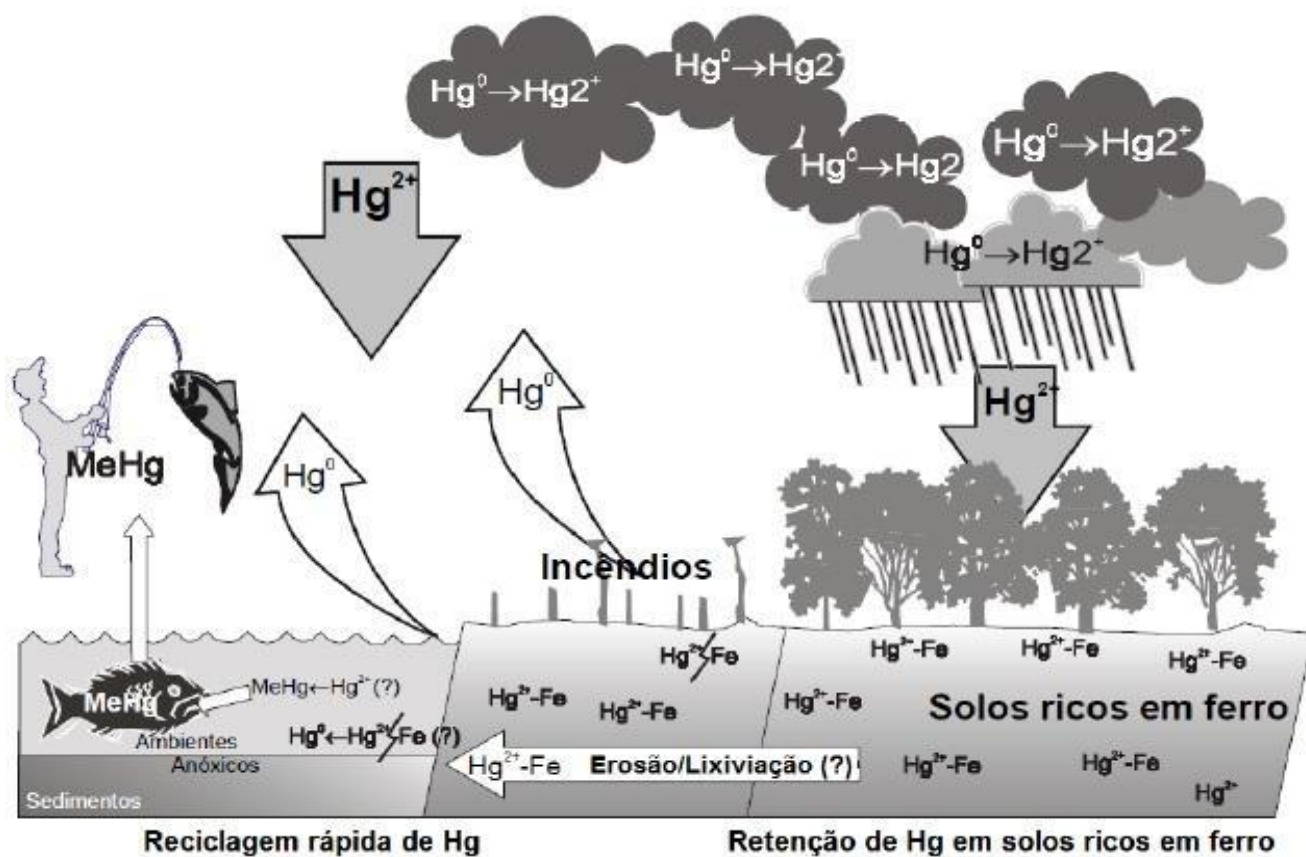


Fig.1: Ciclo biogeoquímico do mercúrio. As vias de conversão do mercúrio em suas isoformas representa um mecanismo complexo onde o Hg^{+2} proveniente de fontes naturais ou da ação antropogênica se deposita nos rios onde é metilado por bactérias sulforredutoras a sua forma orgânica, MeHg. O depósito de MeHg nos peixes atinge os níveis tróficos mais altos da cadeia alimentar (seres-humanos) devido ao processo de biomagnificação trófica (Modificado de Wasserman e col., 2001).

Em ambientes anóxicos, as formas iônicas do mercúrio podem ser metiladas por bactérias sulforredutoras, dando origem ao MeHg (Benoit e col., 2003; Wasserman e col., 2001, Lin e col., 2012). De todos os derivados do metal, o MeHg é o que apresenta maior capacidade de acúmulo nos tecidos biológicos, além de ser considerado de difícil eliminação. Por estes motivos, e pela sua lipossolubilidade - que confere a capacidade de atravessar membranas biológicas - o MeHg é considerado o mais tóxico de todos os derivados do metal (Boudou e col., 1997).

Essas características inerentes à propriedade química do MeHg, confere a ele a capacidade de se bioacumular à medida que aumentam os níveis tróficos da cadeia alimentar – um processo denominado biomagnificação (Wasserman JC. e col., 2001). Dados da literatura demonstraram que a concentração de MeHg em peixes carnívoros é superior a concentração encontrada em peixes que se alimentam de plânctons e crustáceos (Morel e col., 1998; Pouilly e col., 2013). Importante ressaltar que a presença do metal em peixes não carnívoros ocorre devido a rápida absorção por plânctons e algas, fazendo com que a contaminação mercurial atinja desde os níveis tróficos mais baixos aos mais elevados da cadeia alimentar, como o homem por exemplo (KehrigHdo e col., 2008). Dessa forma, os efeitos da contaminação por MeHg são facilmente evidenciados em populações ribeirinhas da região amazônica, que possuem o pescado como principal fonte proteica da sua dieta (Malm e col., 1995; Santos e col., 2000; Lacerda e col., 2004; Hacon e col., 2008; Berzas Nevado e col., 2010; Pinheiro e col., 2012).

Os primeiros relatos da utilização de mercúrio na Amazônia datam do final da década de 70 e início da década de 80, quando houve uma intensa exploração de ouro na região (Malm, 1998). O mercúrio era utilizado pelos garimpeiros para separar o ouro dos sedimentos dos rios, formando um composto denominado amálgama (mistura de ouro e mercúrio). Em seguida, esse amálgama era aquecido a elevadas temperaturas com o intuito de evaporar os resíduos de

mercúrio. Dessa forma, duas vias de contaminação eram estabelecidas para a população: a primeira por meio do depósito de mercúrio nos rios da região, e a segunda pela liberação de vapor de mercúrio para a atmosfera e consequente inalação pelos garimpeiros e população local. Estima-se que aproximadamente 130 mil toneladas de mercúrio foram lançadas por ano, durante a corrida do ouro na Amazônia, sendo responsável por deixar danos irreparáveis ao meio ambiente e à população da região amazônica (Malm e col.,1990).

Dentre as regiões amazônicas mais afetadas pela contaminação por mercúrio encontra-se a Bacia do rio Tapajós, no oeste do estado do Pará, com início de exploração ainda na década de 60, e a região do Carajás, que entrou na corrida do ouro a partir da década de 80. Estima-se que aproximadamente 500 toneladas de ouro tenham sido exploradas nessa região desde a década de 80, com um progressivo aumento de 4 toneladas de ouro por mês no início da década de 90. Essa intensa atividade garimpeira foi responsável pela liberação descontrolada de toneladas de mercúrio na região como mencionado anteriormente. Dados sugerem que aproximadamente 40% do Hg proveniente da ação extrativista foram depositados nos rios próximos as áreas de garimpo, e 60% liberados para a atmosfera, sendo consequentemente arrastado para regiões mais distantes devido à ação do vento (Santos; 2002).

A literatura sugere que peixes comercializados nas regiões impactadas pela exploração do ouro, bem como em regiões mais afastadas, como a cidade de Belém localizada no estado do Pará, possuem níveis de MeHg acima do permitido ($0,5\mu\text{g}/\text{Kg}$) pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2003; Berzas Nevado e col., 2010). Da mesma forma, a análise de amostras de cabelo da população ribeirinha revelou que os níveis de mercúrio se encontravam acima do limite tolerado pela OMS de $10\mu\text{g}/\text{g}$ de cabelo, sugerindo uma estreita relação com o consumo de peixes pela população (Oliveira Santos e col., 2000; Dolbec e col.,2001; Pinheiro e col., 2012). Vale ressaltar que o limite de $0,5\mu\text{g}/\text{Kg}$ de ingestão de mercúrio estabelecido pela OMS, aplica-se para um consumo de até 400 gramas de peixes por um adulto pesando em

média 60Kg. No entanto, sabe-se que o pescado é a principal fonte de proteínas para populações que vivem em torno dos rios na região amazônica, fazendo com que, na maior parte das vezes, esse limite estabelecido seja ultrapassado numa escala de dez vezes (WHO, 2003). Esta situação ainda é agravada devido as características da dieta proteica. Estudos demonstraram que pessoas que se alimentam primordialmente de peixes carnívoros possuem níveis mais elevados de mercúrio quando comparado com pessoas que se alimentam de peixes não carnívoros (Wasserman e col., 2003). De acordo com a agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA), o limite estabelecido como aceitável para o consumo de peixes considerados predadores é de 1mg/Kg, o dobro daquele aceitado para o consumo de peixes não carnívoros (Pouilly e col., 2013; Berzas Nevado e col., 2010).

Apesar do intenso consumo de pescado pela população ribeirinha na região amazônica e os altos níveis de MeHg encontrado em amostras de cabelo, urina, sangue e outros tecidos, nenhum caso com sintomas neurológicos semelhantes ao diagnosticado na cidade de Minamata no Japão foi até então identificado (Passos e col., 2007). No entanto, foi demonstrado que a população amazônica intoxicada por mercúrio pode apresentar alterações neurológicas (Lebel e col., 1998). Alguns autores, recentemente sugeriram que a dieta peculiar dessa região, rica em frutas e compostos antioxidantes, poderia proporcionar proteção frente aos danos ocasionados pela intoxicação por MeHg (Passos e col., 2007; Puty e col., 2014; Leão e col., 2015; Brasil e col., 2016).

Nesse sentido, fazem-se necessários estudos que avaliem os efeitos da intoxicação mercurial em diferentes tecidos e tipos celulares, com o intuito de elucidar os mecanismos relacionados com a toxicocinética e toxicodinâmica do mercúrio, bem como facilitar a compreensão dos seus efeitos deletérios a nível celular e molecular.

1.3. TOXICOCINÉTICA E TOXICODINÂMICA

Quando organismos complexos são expostos a metais como o mercúrio, vários eventos celulares e moleculares podem ser caracterizados desde a sua absorção até a sua excreção. É importante ressaltar que a absorção e excreção das diferentes formas do mercúrio (orgânica e inorgânica) possuem mecanismos distintos de ação. Essas diferenças ocorrem principalmente quando são comparados organismos intoxicados por diferentes vias de exposição (oral, contato, aérea). De maneira geral, a intoxicação por mercúrio ocasiona depósito em diversos tecidos e tipos celulares. Uma vez depositado nas células, o mercúrio é capaz de se conjugar com grupos heme das hemácias sendo transportado pela corrente sanguínea até atingir diversos tecidos, como rins, fígado, medula óssea, coração, músculos, placenta, glândulas salivares e sistema nervoso central (Gochfeld, 2003; Hong e col., 2012).

No SNC, as células da glia representam a primeira linha de defesa contra os efeitos toxicológicos do mercúrio. Estudos sugerem que em condições de intoxicação essas células possuem importante papel na manutenção da homeostasia, garantindo os níveis normais de neurotransmissores na fenda sináptica, como por exemplo o glutamato (Shanker G e Aschner M, 2001), bem como a produção adequada de enzimas antioxidantes que são capazes de proteger as células neuronais dos efeitos ocasionados pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO), já bem descritos no quadro de intoxicação mercurial. Dessa forma, estes trabalhos sugerem uma expressiva capacidade protetora das células gliais em prol da manutenção da viabilidade neuronal frente à exposição ao mercúrio (Shanker G e Aschner M, 2001).

Em seguida, será dado enfoque nas duas formas de mercúrio que serão utilizadas nesse estudo, salientando suas principais diferenças na toxicologia mercurial.

1.3.1. HgCl₂

A principal forma de intoxicação por mercúrio inorgânico, como o HgCl₂, ocorre através de exposições ocupacionais, que podem ocorrer tanto por vias pulmonares, como por via oral. Nos pulmões, é possível que ocorra um acúmulo de aproximadamente 75% da concentração do metal presente na atmosfera. Após se depositar nos pulmões, o HgCl₂ pode ser transportado para outros tecidos através da corrente sanguínea (Nielsen e Andersen, 1989; Naruse e col., 1991, Clarkson e col., 2007). Na contaminação via oral, foi observado uma baixa absorção pelo trato gastrointestinal, no entanto o efeito corrosivo dos sais de mercúrio na mucosa pode ocasionar danos severos a este órgão. Além disso, estudos posteriores demonstraram que, como consequência da diminuição da funcionalidade do intestino, é possível que sejam observados danos teciduais nos rins, ocasionado principalmente por necrose celular (Berlim, 1986; Nielsen e Andersen, 1989).

Dados da literatura sugerem que o fígado e os rins são os órgãos mais afetados pelo HgCl₂ (Rocha e col., 2009). Nielsen e Andersen (1989) demonstraram que a intoxicação por HgCl₂ via oral possui uma cinética de eliminação diferente quando comparado com a intoxicação via intravenosa. Após a absorção do HgCl₂, as principais vias de excreção consistem na urina, saliva, rins e pele (devido a sudorese).

Os resíduos de HgCl₂ que não são absorvidos pelas células, são excretados principalmente pelas fezes. No que se refere a toxicodinâmica do HgCl₂, estudos demonstraram que assim como outras formas mercuriais, o HgCl₂ possui afinidade por resíduos sulfidrilas, além de ocasionar despolarização da membrana interna da mitocôndria, gerando consequentemente a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). É importante ressaltar que o HgCl₂ possui baixa habilidade em atravessar membranas biológicas, como a barreira hematoencefálica e a placenta, sendo por este motivo incorporado as proteínas de membrana celular. No entanto, recentemente alguns autores demonstraram a presença de mercúrio

inorgânico no SNC, depositado preferencialmente em neurônios. De forma interessante, também foi demonstrado que o depósito de mercúrio inorgânico parece ser maior em neurônios motores quando comparados com neurônios sensoriais (Syversen e Kaur, 2012). Em 2014, Teixeira e colaboradores sugeriram pela primeira vez, que a exposição ao HgCl_2 ocasionou severos danos ao SNC de roedores, incluindo alterações cognitivas e motoras. Porém, os mecanismos de absorção e depósito de mercúrio inorgânico no SNC ainda não são bem esclarecidos.

1.3.2. MeHg

A principal via de contaminação por MeHg acontece devido a ingestão de água e alimentos contaminados. O MeHg é considerado a forma mais tóxica do metal para os seres humanos, devido sua completa absorção, enquanto as formas inorgânicas só possuem em média 2 a 16% de absorção (Abernethy e col., 2010; Syversen e Kaur, 2012). A absorção do MeHg ocorre ainda no duodeno, quando as moléculas químicas já foram previamente separadas pela ação do ácido gástrico e então ligadas às moléculas de L-cisteína e glutathione (GSH) (formando os compostos metilmercúrio-cisteína (MeHg-Cys) e metilmercúrio-glutathione (MeHg-GSH) respectivamente) (Do Nascimento e col., 2008). Sabe-se que a absorção do MeHg ocorre em média 17 a 35 vezes mais rápida quando comparada com a absorção do HgCl_2 .

Após a fase de absorção, o mercúrio segue pela corrente sanguínea e se acumula principalmente no sistema nervoso central. A capacidade que o MeHg tem em se acumular em diferentes tecidos se deve principalmente à sua afinidade pelos grupamentos sulfidrilas (-SH), o que facilita sua ligação em proteínas plasmáticas e teciduais, bem como sua permanência nos tecidos e células (Hultberg e col., 2001). Dessa forma, a dosagem de MeHg pode ser realizada de forma integral após analisar amostras de sangue e cabelo, demonstrando uma relação direta com as concentrações encontradas nos mais diversos tecidos (Hong e col., 2012).

O acúmulo de MeHg nas células ocorre devido a presença de proteínas transmembranas do sistema de transporte de aminoácidos do tipo L, responsável por transportar aminoácidos de elevado peso molecular (Aschner e col., 1990). Uma vez dentro das células, o MeHg pode ocasionar diversos efeitos deletérios que alteram a homeostasia da célula. Dentre as principais alterações, sabe-se que o MeHg possui a capacidade de se acumular nas mitocôndrias, ocasionando alterações bioquímicas, como por exemplo, a diminuição da atividade enzimática das enzimas mitocôndrias citocromo C oxidase (CCO), superóxido dismutase (CD) e succinatodesidrogenase (SD), contribuindo para a perda da homeostasia celular. Além disso, a intoxicação por MeHg pode ocasionar a formação de espécies reativas de oxigênio, como radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxil (OH^\cdot), estando esse fenômeno intimamente relacionado com os danos celulares ocasionados pela intoxicação, num processo denominado estresse oxidativo (Yee e col., 1996; Do Nascimento e col., 2008; Ercal e col., 2001).

Sabe-se que um dos principais efeitos ocasionados pela ação de ERO é a oxidação de lipídeos, proteínas e de moléculas de DNA, podendo dessa forma, a intoxicação por MeHg estar associada com alterações genéticas e aberrações cromossômicas (Ercal e col., 2011).

Além dos efeitos relacionados com o estresse oxidativo, diversos outros mecanismos celulares estão intimamente ligados com a intoxicação por MeHg. Outro evento observado é a capacidade que o MeHg tem de se associar aos microtúbulos. Os microtúbulos são estruturas proteicas que possuem importância reconhecida na formação do citoesqueleto celular. Essas estruturas são compostas de proteínas denominadas tubulinas, que possuem em sua composição grupamentos $-SH$ (Crespo-Lopez e col., 2009).

Como mencionado anteriormente, o MeHg possui uma grande afinidade por esse tipo de resíduo molecular, o que faz com que esse metal apresente uma espécie de tropismo por moléculas que tenham este resíduo em sua composição. A intoxicação por MeHg é capaz de

ocasionar efeitos deletérios nessas estruturas, principalmente através da despolimerização dos microtúbulos, o que é capaz de interferir na fisiologia da célula, levando a diversos problemas durante os processos de diferenciação e proliferação celular (Sager e col., 1983; Miura e col., 1984; Ercal e col., 2001; Bonacker e col., 2004; Stoiber e col., 2004). A literatura sugere que a despolimerização dos microtúbulos, ocasionada pela intoxicação por MeHg, ocorre em diversas linhagens de células, principalmente em cultura de células provenientes do SNC (Do Nascimento e col., 2008).

Dentre as regiões do sistema nervoso mais afetadas pela intoxicação por mercúrio, podemos citar o hipocampo e o cerebelo, onde ocorre o maior acúmulo do metal (Pedersen e col., 1999; Herculano e col., 2006). Quando avaliado o efeito do MeHg em cultura de células do SNC, foi demonstrado que o Hg é capaz de ocasionar problemas durante a proliferação, migração e diferenciação neuronal, sugerindo uma possível relação da intoxicação mercurial com a diminuição de neurônios no SNC (Pletz e col., 2016).

Outra importante modulação no SNC ocasionada pelo mercúrio, é a alteração no sistema de neurotransmissores. Na literatura encontra-se bem esclarecido os efeitos da intoxicação mercurial na captação e liberação de L-glutamato e D-aspartato pelas células gliais, sendo este um provável mecanismo de excitotoxicidade neuronal (Aschner e col., 1993). De maneira semelhante, Maximino e colaboradores (2011) demonstram que o MeHg é capaz de ocasionar a depleção dos níveis de serotonina no cérebro de zebrafish, via estresse oxidativo, ocasionando conseqüentemente a indução de comportamentos do tipo ansiedade neste modelo.

Buscando preservar o organismo dos efeitos ocasionados pela intoxicação, diferentes tipos celulares possuem mecanismos de defesa que auxiliam no combate contra os danos ocasionados pela intoxicação tanto pelas formas inorgânicas quanto orgânicas do mercúrio. Um mecanismo clássico de defesa observado em bactérias, é a presença de sequências gênicas que são responsáveis por ativar uma mesma via de ação, que atua na detoxificação celular. A

ativação dessa via se inicia quando o mercúrio no organismo se conjuga à proteínas do tipo mer, que possuem grupamentos –SH livres. Ao se conjugar com essa proteína citoplasmática, o mercúrio ocasiona a ativação de cinco genes *in tandem* (merP, merT, merA, merD e merB) (Sarafian e col., 1996).

Inicialmente, o mercúrio se conjuga com a proteína merP presente no meio periplasmático. Em seguida, ele é transferido para outra proteína denominada merT, que o transporta para o citoplasma celular, onde será alquilado (retirada de resíduos etil e metil) e conseqüentemente transformado em sua forma iônica Hg^{2+} . Em seguida, Hg^{2+} sofre a ação da proteína merA que o reduzirá então para a sua forma metálica e mais volátil Hg^0 , ocasionando a saída do metal do interior da célula (Sarafian e col., 1996).

Em eucariontes, tal mecanismo não foi observado, no entanto, estudos demonstraram que organismos superiores possuem outras formas de proteção igualmente úteis para a detoxificação de metais. Dentre os mecanismos clássicos de proteção observados em eucariontes, podemos destacar a utilização das metalotioneínas (MT), que são proteínas de baixo peso molecular e que possuem 20 grupamentos de cisteína em sua composição. Dentre as suas principais funções, essas proteínas foram descritas por possuírem alta afinidade por metais como o mercúrio, exercendo reconhecido papel no sequestro desse metal, bem como proteção frente ao estresse oxidativo (Fig.2) (Rising e col., 1995; Hidalgo e col., 2001; Gonzales-Duarte e col. 2003).

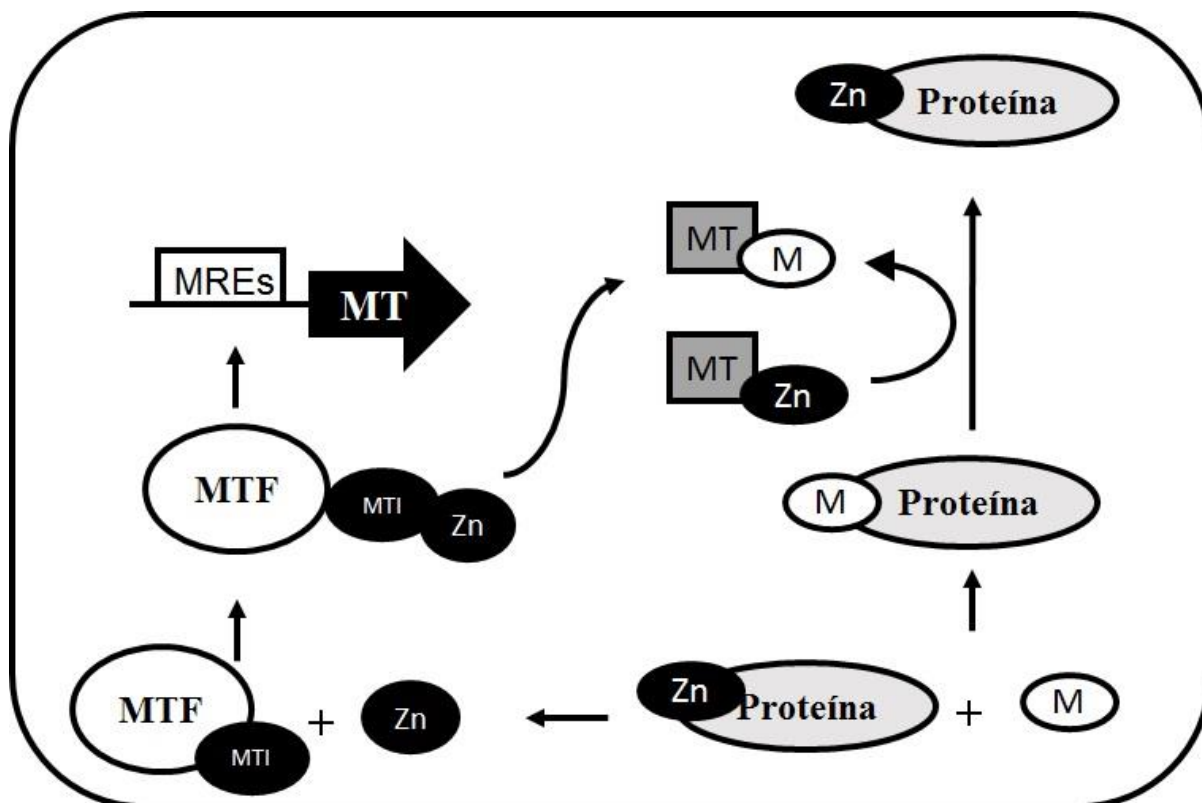


Fig.2: Sistema de detoxificação do mercúrio em eucariontes. A entrada do metal (M) favorece a transcrição das Metalotioneínas no núcleo da célula, de forma dependente de zinco (Zn). A princípio o fator de transcrição de metal (MTF) se encontra inibido por uma proteína inibidora da transcrição de metal (MTI). O zinco ativa o complexo MTF-MTI que dirige a transcrição gênica de MT através de elemento regulatório de metais (MRE). Uma vez produzida, a MT se liga ao metal presente no citosol da célula garantindo a detoxificação de proteínas importantes para o funcionamento celular. (Modificado de Roesijadi e col., 1996).

As metalotioneínas foram primeiramente descritas por Piscator em 1964 que demonstrou o aumento de MT em coelhos expostos a altas concentrações de cádmio. Dessa forma, estudos posteriores sugeriram a utilização dessa classe proteica como indicativo indireto da presença de altas concentrações de metais tóxicos para a célula. Procurando entender o mecanismo de ação, acredita-se que as MT se ligam à forma metálica do mercúrio que é incorporado pelas células e posteriormente promovem a remoção do metal dos ligantes não-tioneínas que são considerados alvos de toxicidade do mercúrio, proporcionando assim, a detoxificação do metal das estruturas celulares (Roesijadi e col., 1996).

Recentemente, foi demonstrado a presença de novos mecanismos de proteção celular que envolvem a ativação de fatores de transcrição como Nrf2 e Hsf1 e a produção de metabólitos secundários, como o sulfeto de hidrogênio (H_2S), que contribuem para a redução dos efeitos tóxicos do mercúrio (Fig.3). O fator de transcrição Nrf2 foi previamente identificado por atuar em diferentes mecanismos de proteção celular, sendo considerado de extrema relevância no metabolismo de xenobióticos, bem como na resposta frente ao estresse oxidativo (Hwang, 2012). Toyama e colaboradores (2007) demonstraram que células que expressam tal fator de transcrição possuem maior resistência aos danos ocasionados pelo mercúrio, enquanto que células com baixos níveis de Nrf2 se tornam mais sensíveis ao metal.

Procurando entender os mecanismos envolvidos na via do Nrf2, foi demonstrado que este fator é responsável por ativar a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas na proteção celular, como a enzima antioxidante heme oxigenase-1 (HO-1), bem como enzimas envolvidas no metabolismo de drogas, como por exemplo, a fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina desidrogenase [NAD (P)H], quinona I (NQO1) e a proteína associada a resistência a multidrogas (MRPs). Da mesma forma, demonstrou-se que o fator de transcrição Hsf1 atua na detoxificação de metais, principalmente por induzir a expressão de proteínas de

choque térmico (HSP), que são capazes de bloquear os efeitos tóxicos ocasionados pela intoxicação por MeHg (Morimoto e Santoro, 1998; Hwang, 2012).

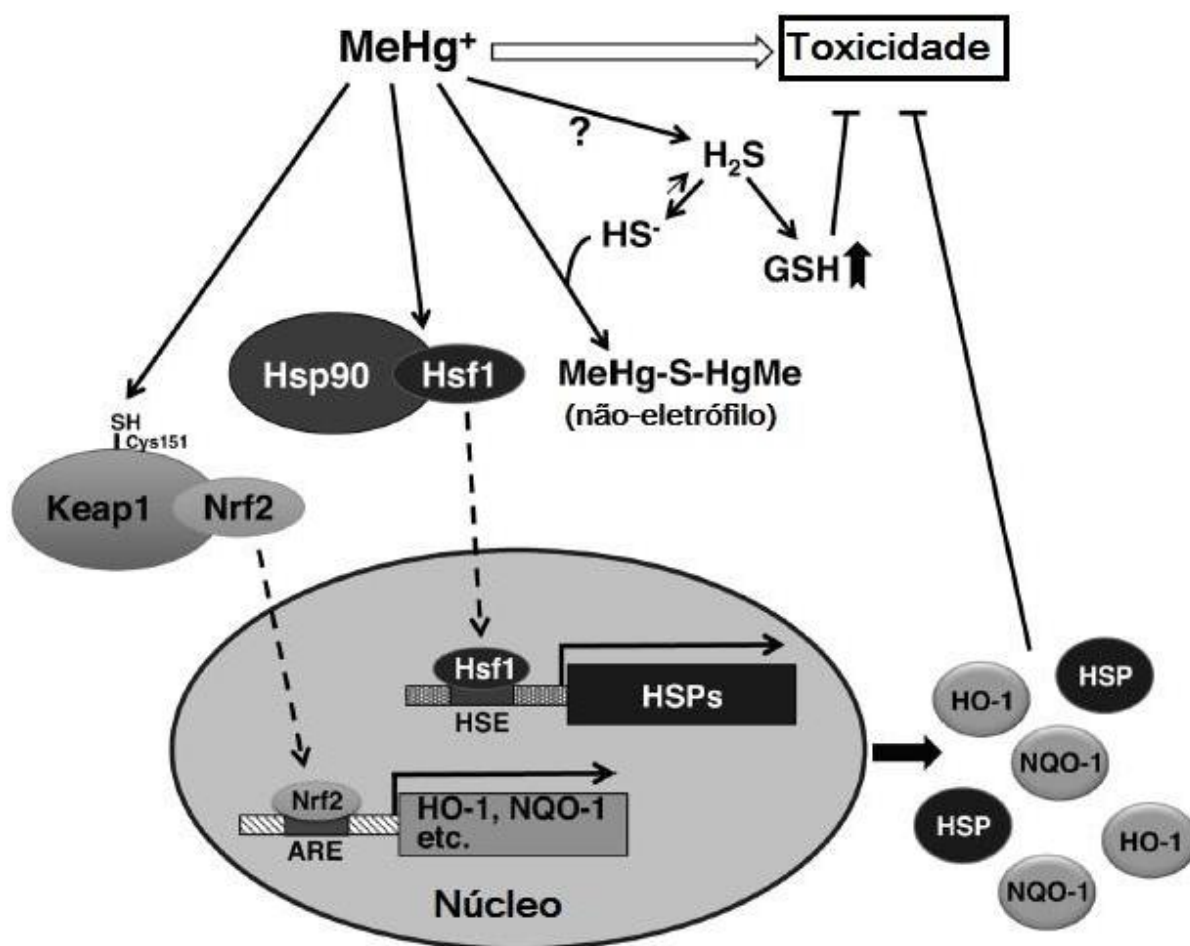


Fig. 3: Novos mecanismos de defesa celular frente a toxicidade do mercúrio. O MeHg induz a ativação dos fatores de transcrição Hsf1 e Nrf2 que dirigem a síntese das proteínas de choque térmico (HSP) e as enzimas antioxidantes heme-oxigenase 1 (HO-1) e quinona 1 (NQO-1). Além disso, o MeHg também é capaz de induzir a produção do metabólito secundário, sulfeto de hidrogênio (H₂S) ocasionando o aumento de glutatona reduzida (GSH). A produção dessas enzimas e proteínas induzido pela ação do MeHg atuam da diminuição da toxicidade do metal (Adaptado de Hwang, 2012).

Outra via de proteção, envolve a produção de H_2S a partir da L-cisteína. Kimura e colaboradores (2004) demonstraram que o H_2S produzido pelas células é capaz de se ligar covalentemente à duas moléculas de MeHg formando um resíduo menos tóxico, o sulfeto de bismetilmercúrio (MeHg-S-MeHg). Dessa forma, sugere-se que os altos níveis de mercúrio no meio intracelular induzem a formação de H_2S , podendo este ser considerado como um importante mecanismos de proteção intracelular.

Apesar das células possuírem diversos mecanismos de proteção a xenobióticos, como a indução de enzimas e proteínas que atuem na detoxificação e inibição dos danos ocasionados, os mecanismos de excreção celular são considerados de suma importância pois representam a principal via de eliminação intracelular (Hong e col., 2012). Dados sugerem que a meia vida do metal no organismo é de aproximadamente 70 dias após a primeira ingestão. Sabe-se que as principais vias de excreção de MeHg ocorre através da bile e das fezes. A maior parte do MeHg que não é absorvida, é demetilada e excretada na forma de Hg^{+2} . Além disso, é possível que o mercúrio ainda seja excretado através do leite materno, devido a sua alta capacidade de atravessar barreiras biológicas, onde foi identificado em níveis bem maiores em mulheres durante o período de amamentação (Hong e col., 2012). Em conjunto, tais processos de defesa e excreção celular, são capazes de amenizar os danos ocasionados pela intoxicação no que se refere tanto a nível celular, como as alterações bioquímicas mencionadas anteriormente, quanto a nível molecular, fazendo com que este metal possa ser caracterizado como potente agente mutagênico.

1.4. GENOTOXICIDADE DO MERCÚRIO

A grande maioria dos metais citotóxicos para o seres-vivos, possuem características que podem estar associadas com alterações genotóxicas e mutagênicas. De acordo com Crespo-Lopez e colaboradores (2009), esses compostos são capazes de causar alterações genéticas, resultando em mal-formações congênitas, além de ocasionar o desenvolvimento de tumores malignos, em processos denominados teratogênese e carcinogênese respectivamente. Diversos estudos têm demonstrado os possíveis efeitos genotóxicos das mais variadas isoformas do mercúrio, no entanto, os dados encontrados até hoje parecem não elucidar tal característica, visto que os efeitos genotóxicos e mutagênicos podem variar de acordo com o tipo celular estudado, bem como da via de intoxicação e forma do metal utilizado (De Flora e col., 1994; Crespo-Lopez e col., 2009).

Em 1994, De Flora e colaboradores sugeriram que os efeitos genotóxicos ocasionados pelo HgCl_2 variam de acordo com a espécie utilizada. Nesse sentido, foi demonstrado que em bactérias, fungos e plantas, a intoxicação por altas doses de HgCl_2 pode ocasionar o aparecimento de aberrações cromossômicas bem como diversas mutações somáticas. Utilizando roedores como modelo, Bhwmik e col. (2012) sugeriram que a administração intraperitoneal de HgCl_2 possui efeito tóxico e mutagênico mesmo em baixas doses (10 e 12mg/Kg), sendo capaz de ocasionar aberrações cromossômicas e alterações genéticas. No entanto, este efeito não foi observado quando culturas de células não-humanas foram expostas às altas concentrações de HgCl_2 . Nessas células, foi demonstrada a inibição da síntese de DNA bem como a presença de DNA fragmentado, o que pode estar relacionado com diversos problemas durante a divisão e replicação das células (Cavas e col., 2008).

Devido a grande diferença de dados e respostas frente a intoxicação mercurial, diversos grupos de pesquisas procuraram avaliar como cada tipo celular responde a intoxicação por HgCl_2 , de maneira isolada. As células da linhagem Hela quando expostas a altas doses de

HgCl₂, apresentaram mitose anormal, porém nesse tipo celular não foi identificado o aparecimento de alterações genéticas. Já em linfócitos humanos, estudos demonstraram que a intoxicação por HgCl₂ é capaz de ocasionar translocações nas cromátides-irmãs (Akiyama e col., 2001; Silva-pereira e col., 2005; Crespo-Lopez e col., 2011). Schurs e colaboradores (2000) sugeriram que a avaliação toxicológica em cultura de células pode ser prejudicada devido a uma baixa absorção do metal presente no meio de cultura, bem como da possível incorporação a componentes presentes nesse meio. No entanto, tal justificativa pode ser refutada pela análise da presença do metal nessas células tanto por técnicas de quantificação direta, quanto pela superexpressão de proteínas de defesa a intoxicação, como as metaloproteínas.

No que se refere ao MeHg, sabe-se que essa é a forma mercurial caracterizada por apresentar maior toxicidade para os organismos vivos, além de ser caracterizada como a de maior potencial genotóxico quando comparada com o HgCl₂ (Crespo-Lopez e col., 2009). Esse efeito pode ser facilmente evidenciado em bactérias, nas quais foi demonstrado que a ação genotóxica do MeHg ocorre em concentrações em média 10 a 15 vezes mais baixas quando comparadas com as concentrações do HgCl₂ que possuem mesmo efeito (Kanematsu e col., 1980). Da mesma forma, tal diferença pode ser observada quando a genotoxicidade do mercúrio é avaliada em cultura de células, sendo que o MeHg causa alterações no genoma celular em concentrações em média 2,5 vezes mais baixas do que as concentrações de HgCl₂ (Miura e col., 1978; Morimato e col., 1982; Pieper e col., 2014).

Dentre os possíveis mecanismos capazes de explicar os danos genéticos ocasionados pelo mercúrio (tanto orgânico quanto inorgânico), o aumento das espécies reativas de oxigênio parece ser a hipótese mais aceita. Estudos demonstraram que o aumento de ERO ocasionado pela intoxicação mercurial pode ocasionar diversas alterações genéticas devido a interações com os ácidos nucleicos. Além disso, foi observado que tais radicais livres são capazes de

ocasionar alterações conformacionais em proteínas importantes para a síntese e manutenção do DNA, como a tubulina, presente nos microtúbulos, a DNA-polimerase, e proteínas responsáveis pela segregação cromossômica e reparo de erros durante a divisão celular (Fig.4) (Stohs e col., 1995; Stoiber e col., 2004; Ercal e col., 2001).

O estudo do efeito toxicológico do mercúrio a nível celular e molecular é capaz de elucidar as possíveis complicações estruturais, morfológicas e comportamentais de indivíduos intoxicados. Schramm e colaboradores (1999), sugeriram que os organismos intoxicados respondem de forma coordenada e hierárquica, sugerindo que as alterações ocorrem de maneira sequencial afetando primeiramente as funções celulares e então a estrutura tecidual.

Apesar do grande enfoque em elucidar os mecanismos genotóxicos de metais, observa-se na literatura que a grande maioria dos estudos é direcionada para análise de casos clínicos em populações expostas ao mercúrio, direcionando-se assim para uma análise genética em linfócitos humanos (Crespo-Lopez, ME., 2009 e 2011). Esse fato faz com que haja uma grande necessidade de compreensão dos efeitos genotóxicos do mercúrio no SNC, principalmente no que se refere aos efeitos nas células neuronais e células da glia (Pieper I, 2014).

Em 2016, Crespo-Lopez e colaboradores demonstram que a exposição de células gliais de roedores da linhagem C6 são sensíveis a baixas concentrações de mercúrio. Neste trabalho, foi demonstrado que concentrações de $3\mu\text{M}$ de MeHg são capazes de ocasionar danos ao DNA bem como ocasionar a formação de micronúcleos que são formados após problemas durante a divisão celular. Além disso, observou-se alterações no controle do ciclo celular mesmo em condições que não levassem a célula a morte. Por outro lado, pouco se sabe a respeito do efeito do HgCl_2 nas células do sistema nervoso central, sendo por este motivo necessário a emergência de novos estudos capazes de elucidar os mecanismos genotóxicos do mercúrio no encéfalo.

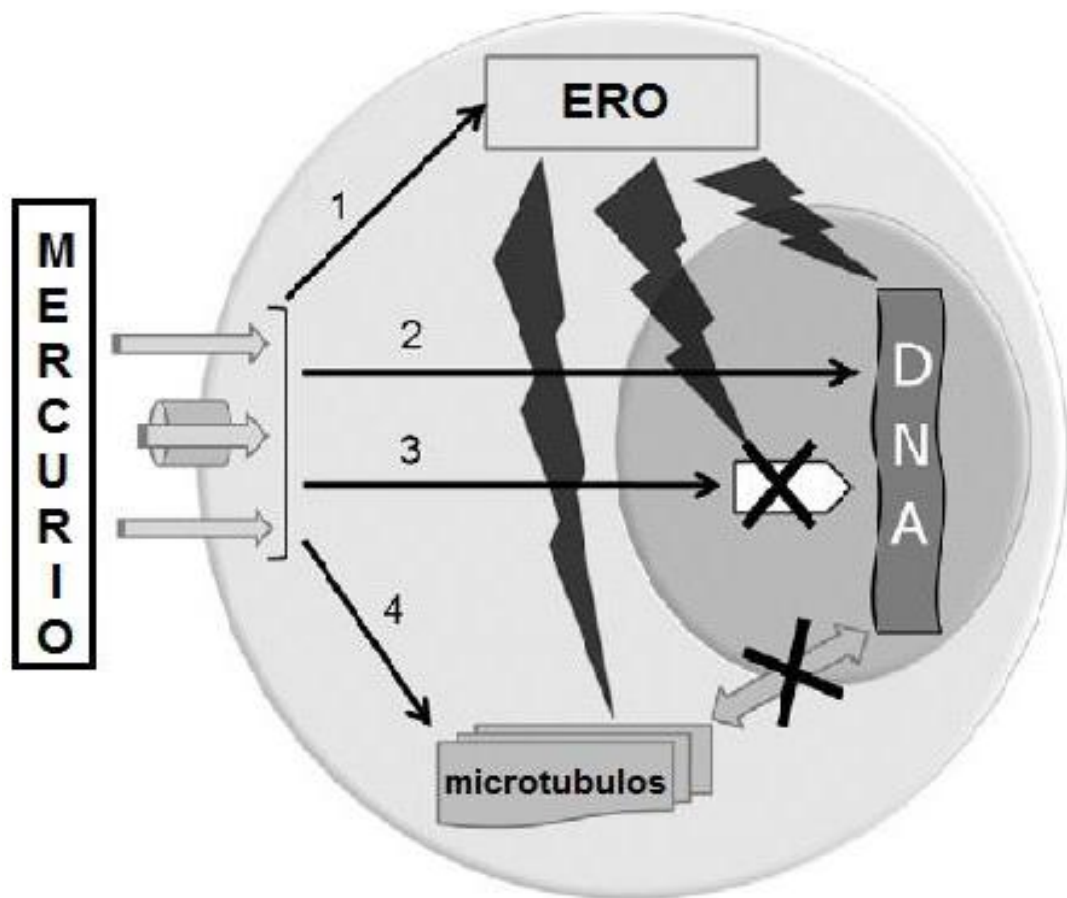


Fig.4: Mecanismo molecular da genotoxicidade do mercúrio. A entrada de mercúrio na célula ocasiona alterações no material genético por quatro vias distintas: pela indução de espécies reativas de oxigênio (ERO) que é capaz de atuar diretamente no DNA da célula (1), pela ligação do mercúrio diretamente ao DNA (2), pela ligação do mercúrio a proteínas importantes no núcleo celular que controlam a divisão e controle do ciclo (3) ou pela ligação aos microtúbulos (4) (Adaptado de Crespo-Lopez e col., 2009)

Apesar da importância de tais estudos na compreensão dos mecanismos genotóxicos de metais como o mercúrio, ainda se faz necessário uma análise que facilite a identificação de genes que possam servir tanto como marcadores toxicológicos, e que também possam ajudar na compreensão de patologias associadas a intoxicação por metais. Análises desse tipo têm surgido nos últimos anos com o advento de tecnologias mais refinadas que são capazes de proporcionar o mapeamento genético de diversos genes simultaneamente, o que torna as análises mais rápidas e confiáveis.

1.5. EXPRESSÃO GÊNICA POR *MICROARRAYS*

A análise do transcriptoma celular tem emergido como alternativa promissora para identificar alterações em dosagem gênica e suas influências nas vias de sinalização molecular. Dessa forma, a análise da rede gênica após a exposição de organismos a metais como o mercúrio pode ser aplicado na identificação de marcadores, além de auxiliar na compreensão dos mecanismos toxicológicos do metal. A técnica de *microarray* de expressão consiste na utilização de cDNAs, que em um único ensaio de hibridização nos permite conhecer a expressão de todo o genoma celular em diferentes condições experimentais (Brown, B, 1999). Os *microarray* são chips que contém sequências de cDNA e que com o auxílio de equipamentos de alta precisão, favorecem a hibridização com a amostra de interesse. Uma vez que as amostras são processadas, as sequências de mRNA são convertidas em cDNA e marcadas com o auxílio de peptídeos fluorogênicos que posteriormente são hibridizados ao chip de *microarray*. Cada lâmina contém centros de hibridização com diversas sequências hibridizadas, que quando escaneadas dão origem a valores numéricos referentes a intensidade das hibridizações.

Em 2011, Toyama e colaboradores demonstraram pela primeira vez as alterações a nível de mRNA em cultura de células neuronais humanas, sugerindo diversas alterações gênicas que podem ser responsáveis pelos danos ocasionados pelo mercúrio. Além disso tais

alterações podem servir como marcadores no diagnóstico de intoxicação, podendo futuramente ser usada para o monitoramento de doenças que possam estar relacionadas com a intoxicação mercurial. Compreendendo que as células da glia possuem reconhecido papel na manutenção neuronal, neste trabalho iremos identificar as alterações de mRNA de células gliais humanas expostas ao mercúrio orgânico e inorgânico, além de avaliar suas redes gênicas de interação em mecanismos de proteção e manutenção da viabilidade celular no SNC.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Identificar as alterações genéticas de células gliais humanas da linhagem U87 expostas ao mercúrio orgânico e inorgânico, além de avaliar suas redes gênicas de interação em mecanismos de proteção e manutenção da viabilidade celular no SNC.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Determinar as concentrações não-tóxicas e LC_{50} de MeHg e $HgCl_2$ em cultura de células U87 após exposição por 4h e 24h

2.2.2. Avaliar o efeito das concentrações não-tóxicas e LC_{50} de MeHg e $HgCl_2$ no perfil de mRNA de células U87

2.2.3. Identificar as alterações na rede gênica das células U87 após 4h e 24h de exposição a MeHg e $HgCl_2$

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. METAIS

MeHg (115-09-3) e HgCl₂ (10112-91-1) foram obtidos da Sigma Brasil. Os metais foram diluídos em água destilada (H₂O_d) em solução estoque de 5mM. As soluções foram filtradas com filtros de seringa (0,22µm) e em seguida mantidas a 4°C. Para os experimentos, foram feitas diluições seriadas em meio de cultivo DMEM+10% de FBS.

3.2. CULTURA DE CÉLULAS

Células humanas de glioblastoma da linhagem U87, armazenadas em nitrogênio líquido, foram descongeladas e diluídas em 5mL de meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e combinação de penicilina (10U/mL), estreptomicina (10µg/mL) e fungizona (1%). As células foram armazenadas em estufa a 5% de CO₂ e 37°C até atingir confluência de 95%. Para as condições experimentais, as células foram semeadas em placas de cultivo de 96 poços e/ou garrafas de cultivo de 25cm², e armazenadas em estufa por 24h para o início dos experimentos.

3.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os experimentos foram conduzidos de acordo com os seguintes grupos experimentais:

- Grupo controle: células incubadas em DMEM+10% de FBS
- Grupo veículo: células incubadas em DMEM+10% de FBS + H₂O_d (solução de diluição dos metais)
- Grupos exposição (teste de MTT): células incubadas com DMEM+10% de FBS + diferentes concentrações de MeHg nas concentrações de 1, 5, 10, 50 e 200µM, ou de HgCl₂ nas concentrações de 5, 10, 20, 50, 100 e 200µM.
- Grupo exposição (microarray de expressão): células incubadas com DMEM +10% de FBS + metais nas concentrações selecionadas após análise da curva de sobrevivência.

3.4. EXPOSIÇÃO AOS METAIS

Para a realização dos experimentos, as células viáveis foram quantificadas através do método de exclusão por azul de Tripán (Strober, 2001). Para a quantificação, as células foram

desprendidas das garrafas com tripsina + ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (0,0025%), centrifugadas a 1500rpm durante 5min, e posteriormente diluídas em DMEM +10%FBS. As células foram quantificadas com o auxílio de um contador automático de células e em seguida semeadas em placas de cultura de 96 poços (10^4 células/poço) ou em garrafas de cultivo (25cm^2 ; 7×10^5 células/poço). As células foram mantidas em estufa a 5% de CO_2 e 37°C por um período de 24h. Após esse período, as células foram expostas a diferentes concentrações de MeHg e HgCl_2 durante os tempos de 4h e 24h.

3.5. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

Para a obtenção das concentrações não-tóxicas e LC_{50} do MeHg e HgCl_2 , a viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT) proposto por Mosman (1983). Após os períodos de incubação com MeHg e HgCl_2 , as células foram lavadas 2x com tampão fosfato-salino (PBS), em seguida foi adicionado $100\mu\text{L}$ de solução de MTT em cada poço por um período de 2,5h a 37°C . Posteriormente, a solução de MTT foi retirada e os cristais de formazan diluídos em $100\mu\text{L}$ de dimetilsulfóxido (DMSO). A leitura do sobrenadante foi realizada com o auxílio do equipamento Glomax (Promega) com um filtro para comprimento de onda de 570nm. A densidade ótica do grupo controle foi considerada com 100% de células viáveis. Em posse da curva de concentração para ambos os metais em diferentes tempos, foi possível calcular a concentração letal (LC_{50}) para cada composto, com o auxílio do programa MatLab. Os experimentos seguintes foram realizados utilizando as concentração não-tóxicas e a LC_{50} .

3.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

Para a análise da expressão gênica, 7×10^5 células foram semeadas em garrafas de cultivo celular (25cm^2) contendo 7mL de meio (mantendo a proporção célula/área/metal) e armazenadas por 24h em estufa de CO_2 a 37°C . Em seguida, células do grupo controle receberam somente troca de meio de cultivo, enquanto as células dos grupos experimentais foram expostas aos metais (nas concentrações determinadas pela curva de concentração) e armazenadas em estufa por 4 e 24h.

3.7. EXTRAÇÃO TOTAL DE RNA

A extração de mRNA foi realizada através da utilização do Kit “SV total RNA isolation system” da Promega de acordo com as especificações do fabricante. Após o período de exposição, células do grupo controle e expostas aos metais foram preparadas para a extração de mRNA. As amostras foram lisadas com tampão contendo beta-mercaptoetanol e em seguida diluídas em tampão de diluição de RNA. As amostras foram centrifugadas por 10min a máxima velocidade. Em seguida, foi adicionado etanol 95% para garantir condições adequadas de ligação à membrana. As amostras foram então repassadas para colunas de centrifugação onde o RNA pôde se ligar à membrana da coluna, facilitando a lavagem para eliminação de possíveis contaminantes, além de favorecer a extração de RNA total de alta qualidade. Ao final do procedimento, o RNA foi diluído em 60µL de água livre de nuclease. A quantificação do RNA total foi realizada com o auxílio de espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 UV-VIS versão 3.2.1, onde também foi avaliado a qualidade do RNA através da análise da razão de A_{260}/A_{280} conforme especificações do fabricante. O RNA purificado foi estocado a -80°C para posterior ensaio de microarray de expressão.

3.8. MICROARRAY DE EXPRESSÃO

Para a leitura de *microarray*, foi utilizando o kit “*One-color microarrays-based gene expression. Analysis*” (Agilent technologies, EUA), de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante (Fig. 5). O perfil da expressão gênica foi avaliado nas células expostas e não expostas aos metais. O RNA total obtido durante a fase de extração foi utilizado como molde para a síntese da primeira fita de cDNA, que ocorre através de transcrição reversa com o auxílio da enzima T7 RNA polimerase. A síntese da segunda fita de cDNA serve de molde para a reação da transcrição *in vitro* para a produção de cRNA. O fluorocromo 3-cianina (Cy-3) foi então incorporado cRNA utilizando o kit “*Low Input Quick Amp Labeling*” (Agilent Technologies) e protocolo fornecido pelo fabricante.

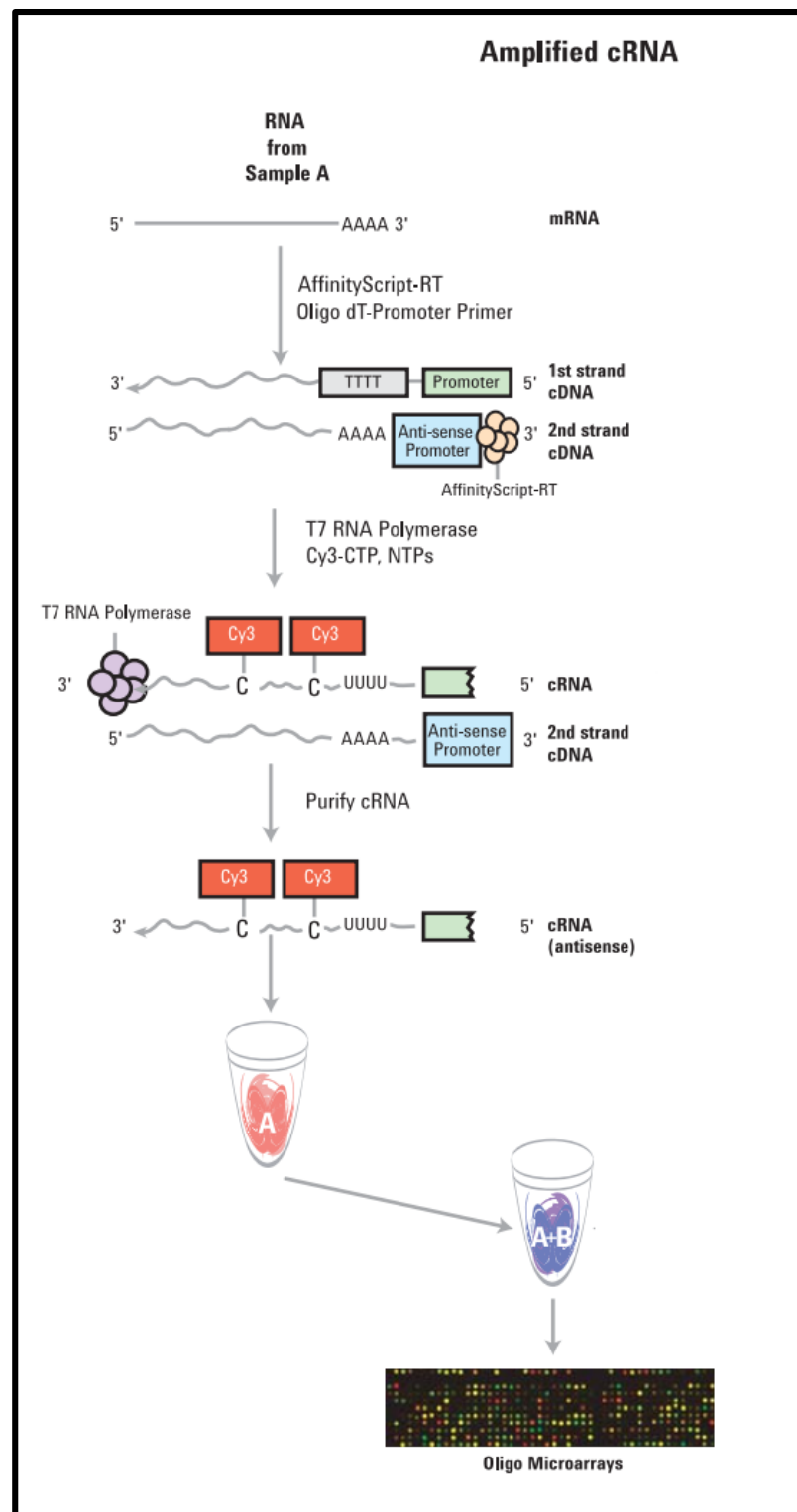


Fig.5: Esquema experimental para a produção de cRNA e análise de microarray de expressão de uma cor. (Agilent Technologies)

Em seguida, deu-se início ao processo de purificação do cRNA. Para isso 84µL de água ultrapura foram adicionados a 350µL de *buffer RLT* e 250µL de etanol 100%. A solução então foi transferida para a coluna de purificação do kit *RNeasy mini spin*. À cada amostra foi adicionado 500µL de *buffer RPE* e as amostras centrifugadas a 4°C por 60s. Em seguida, as amostras foram diluídas em 30µL de água livre de nuclease para eluição do RNA purificado. O cRNA foi então quantificado por espectrofotometria (em pmol/uL), onde pôde-se analisar a relação de absorbância em (260 nm/280 nm) e a concentração de cRNA (ng/µL) em cada amostra. Para a reação de hibridização, o RNA marcado foi adicionado ao mix de fragmentação (300ng de *Cyanine 3-labeled*, cRNA amplificado, 5µL de 10×*Gene Expression Blocking Agent*, 1µL de 25×*Fragmentation Buffer* e água ultra-pura) e incubado a 60°C por 30min, para fragmentar as amostras antes da hibridização. Em seguida cada amostra recebeu 25µL de 2×*Hi-RPM Hybridization Buffer* a 4°C. Para a hibridização, 40µL de cada amostra foram adicionadas às lâminas de hibridização, e em seguida deixados em câmara de hibridização por 17h a 65°C com rotação de 10rpm. Após esse período a lâmina foi lavada e imediatamente escaneada no scanner de *microarray* da Agilent (G4900DA). Foi utilizado o seguinte *setup* para escanear as lâminas de *microarray* de uma cor: área de escâner: 61 × 21.6 mm; resolução de 5µm; canal de marcação: verde. Em seguida, as imagens foram obtidas com auxílio do software *Feature Extraction v10.10* e os dados analisado com o auxílio dos programas GeneSpring GX 9.0 e *IPathwayguide* (ADVAITA Bioinformatics Company). A identificação dos genes seguiu um critério de restrição com um fold change > 5.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de viabilidade e morte celular foram analisados com o auxílio do programa Graphpad 5.0. A diferença estatística entre os grupos foi testada usando análise de variância de um critério (ANOVA) seguido de pós teste Tukey. Os dados expressos como média ± desvio padrão, sendo considerado como significativos os dados que possuem um $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. EFEITO DO MeHg E HgCl₂ NA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DE GLIOBLASTOMA U87

Células da linhagem U87 expostas a concentrações crescentes de metal (0 a 200 μ M) demonstraram uma relação independente de concentração quando avaliadas para a diminuição da viabilidade celular. As análises foram feitas após exposição ao MeHg por 4h (Fig.6A e Tabela 1) e 24h (Fig.6B e Tabela 1) com uma LC₅₀ de 28.8 μ M e 10,68 μ M respectivamente. A análise após a exposição ao HgCl₂ em 4h (Fig.7A) e 24h (Fig.7B) demonstrou uma LC₅₀ de 92.25 μ M e 62.75 μ M respectivamente.

Em posse da curva de concentração, foram estabelecidas as concentrações que seriam utilizadas para a análise do transcriptoma celular. Dessa forma, foi determinada a utilização das concentrações de 5 μ M de MeHg e 5 μ M de HgCl₂ para análises após 4h de exposição, sendo consideradas concentrações não tóxicas para a célula, ou seja, que não ocasionam morte celular. Para as análises após 24h de exposição, foi selecionado uma concentração não tóxica e a concentração correspondente a LC₅₀ do metal para o tempo em questão, com o intuito de observar os diferentes mecanismos de proteção da célula baseado na força do estresse causado. Dessa forma, foram selecionadas as concentrações de 1 μ M e 10,68 μ M de MeHg e as concentrações de 5 μ M e 62,75 μ M de HgCl₂.

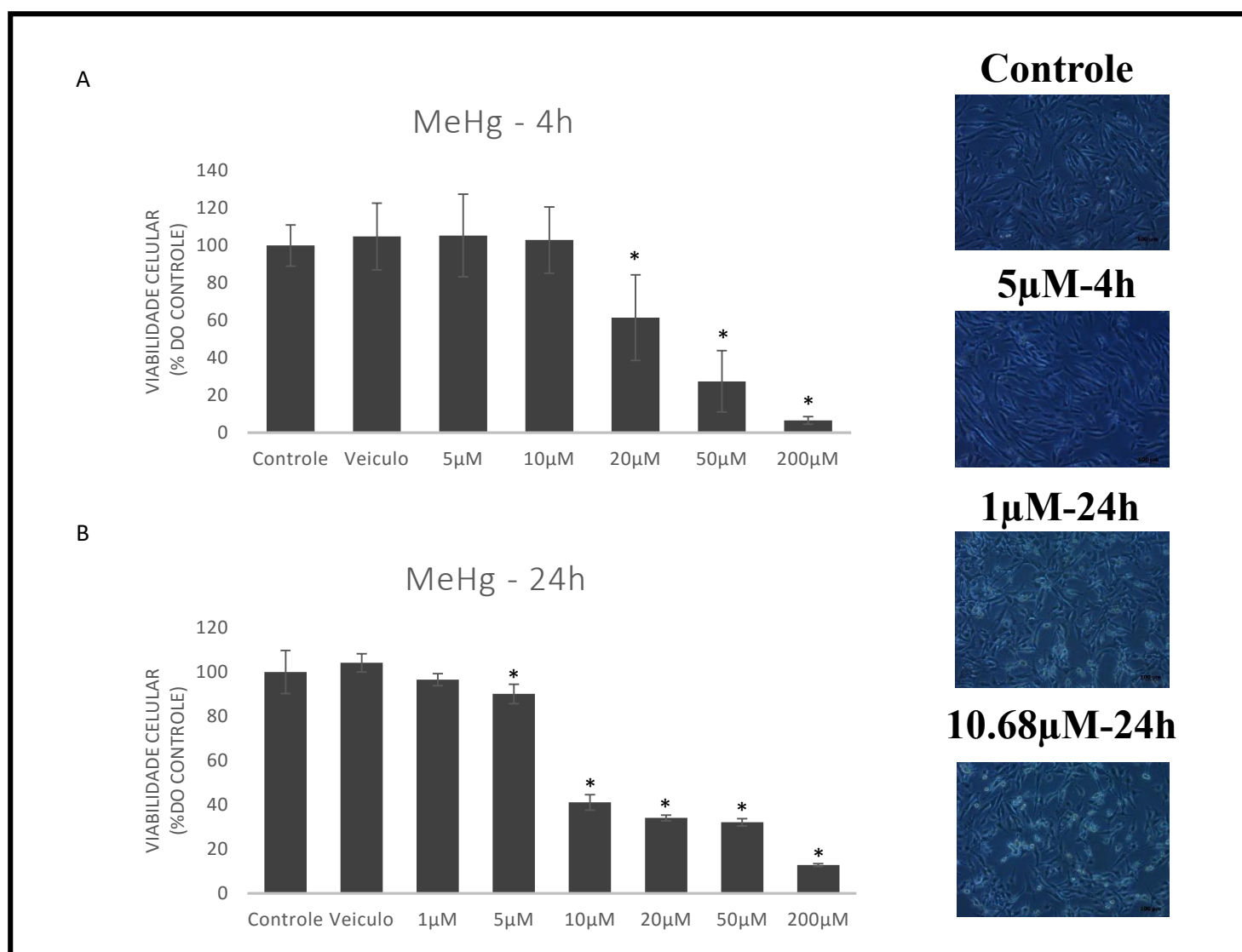


Fig.6: Curva de concentração para o MeHg nos tempos de 4h (a) e 24h (b). Os dados foram avaliados com ANOVA de uma via, com pós teste Tukey, considerando como significativo um $p < 0,05$. * $p < 0,001$ vs controle. Ao lado imagens de microscopia de luz (10x).

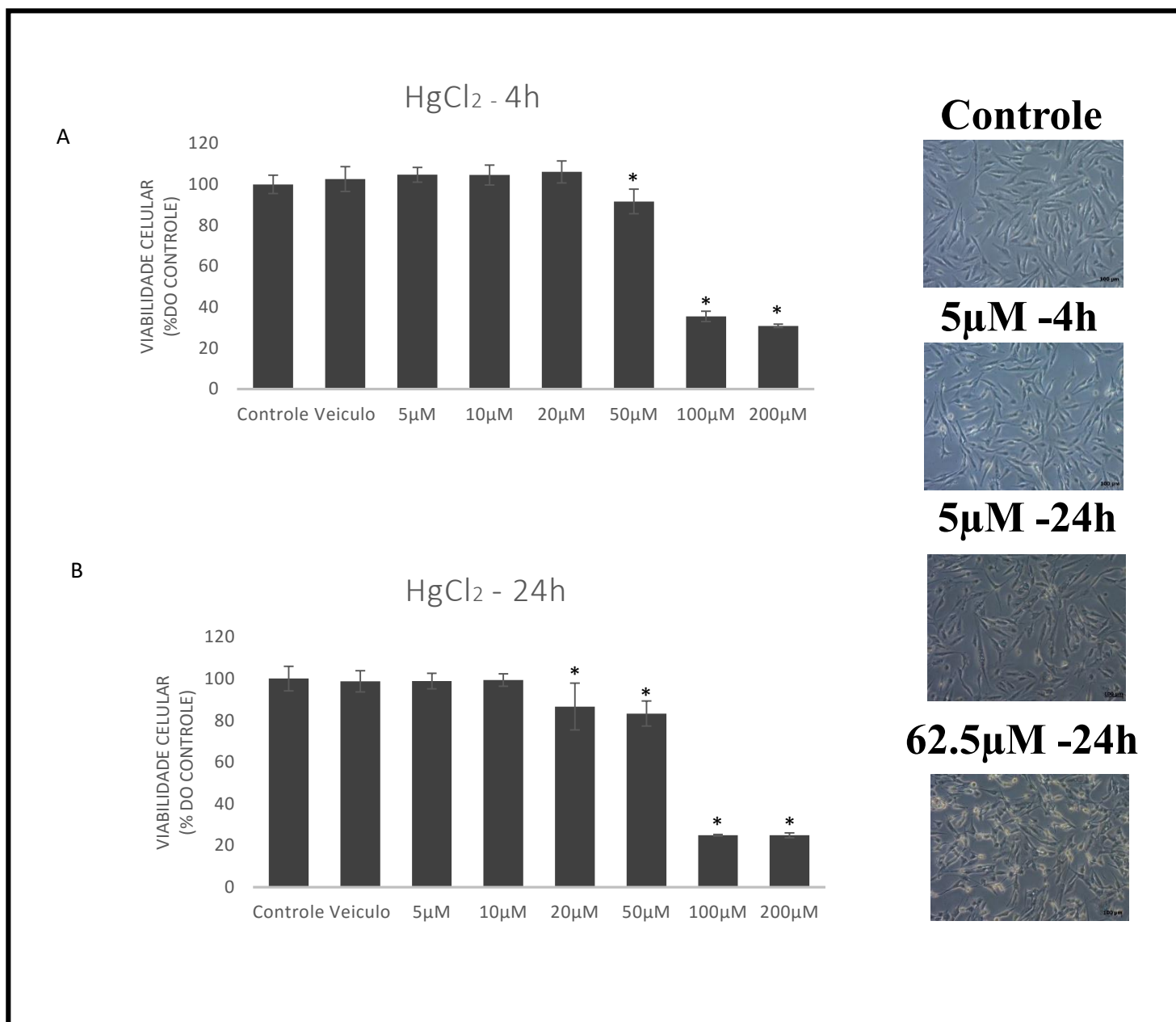


Fig.7: Curva de concentração para o HgCl₂ nos tempos de 4h (a) e 24h (b). Os dados foram avaliados com ANOVA de uma via, com pós teste Tukey, considerando como significativo um $p < 0,05$. * $p < 0,001$ vs controle. Ao lado imagens de microscopia de luz (10x).

Tabela 1: Dados estatísticos referentes a exposição a MeHg por 4h e 24h, a análise foi realizada com ANOVA de uma via, seguida de pós-teste *Tukey*

$F_{27,6} = 34,48; p < 0.0001$	4h	$F_{38,7} = 34,4; p < 0.0001$	24h
controle	100%±11.01	controle	100%±9,7
veiculo	104%±15	veiculo	104%±4.11
5µM MeHg	105,2%±20.2	1µM MeHg	96,5%±2.91
10µM MeHg	102%±17	5µM MeHg	90%±4.36
20µM MeHg	61,5%±20.2	10µM MeHg	41%±3.5
50µM MeHg	27.4%±16.3	20µM MeHg	34.04%±1,2
200µM MeHg	6,5%±2	50µM MeHg	32%± 1,6
		200µM MeHg	12.8%±0,6

Tabela 2: Dados estatísticos referentes a exposição a HgCl₂ por 4h e 24h, a análise foi realizada com ANOVA de uma via, seguida de pós-teste *Tukey*

$F_{47,7} = 252,1; p < 0.0001$	4h	$F_{31,7} = 214,4; p < 0.0001$	24h
controle	100%±4,45	controle	100%±5,8
veiculo	102,6%±6	veiculo	98,6%±5,07
5µM HgCl ₂	104,7±3,5	5µM HgCl ₂	98,8±3,7
10µM HgCl ₂	104,5%±4,8	10µM HgCl ₂	99,2%±3,01
20µM 106,14%±5,3	106,14%±5,3	20µM 106,14%±5,3	86,6%±11,2
50µM 91,6%±6,01	91,6%±6,01	50µM 91,6%±6,01	83,2%±6,03
100µM HgCl ₂	35,5%±2,5	100µM HgCl ₂	24,8%±0,35
200µM HgCl ₂	30,8%±0,8	200µM HgCl ₂	24,8%±1,1

4.2. MeHg E HgCl₂ OCASIONAM ALTERAÇÃO NO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DAS CÉLULAS U87

Buscando compreender os efeitos da exposição a metais como MeHg e HgCl₂ no genoma de células gliais, nós realizamos um mapeamento completo do transcriptoma da célula de glioblastoma da linhagem U87 em condições de exposição aos metais por 4h e 24h. Nossos resultados demonstraram uma significativa alteração na expressão de diversos genes do genoma da célula quando comparadas com a situação controle. Além disso, a análise não supervisionada de *clustering* hierárquico, que busca analisar a similaridade da rede gênica nas diferentes condições experimentais, demonstrou que a concentração do metal durante a exposição e o tempo de exposição representa um fator impactante na alteração do perfil gênico da célula (Fig.8). Após a análise de *clustering* também foi possível identificar um total de 3907 genes alterados após a exposição por um período de 4h e 5364 genes após a exposição por 24h.

Após analisar o efeitos das diferentes concentrações de metal de maneira supervisionada, levando em consideração alteração gênica com um fold change > 5, nossos dados demonstraram que após exposição a 5µM de MeHg por 4h, um total de 205 genes tiveram sua expressão diminuída quando comparado com células do grupo controle. A exposição ao HgCl₂ na mesma concentração (5µM) ocasionou a diminuição da expressão de 204 genes, sendo que desse total, 105 genes estavam presentes com expressão diminuída tanto no grupo exposto a MeHg quanto no grupo exposto a HgCl₂ (Fig.9A). Por outro lado, houve um aumento na expressão de 188 genes após exposição a 5µM de MeHg e 180 genes após exposição a HgCl₂, quando comparados ao controle. Deste total 19 genes foram identificados nas duas condições experimentais (Fig.9B).

A análise após 24h de exposição aos metais demonstrou uma diminuição da expressão (fold change >5) de 90 genes no grupo exposto a 1µM de MeHg e 116 genes no grupo exposto a 10µM de MeHg. Quando as células foram expostas ao HgCl₂, nossos dados demonstraram a diminuição da expressão de 98 genes no grupo exposto a 5µM e 325 genes no grupo exposto a 62,75µM de HgCl₂ (Fig. 9C). Em relação aos genes que tiverem sua expressão aumentada após 24h de exposição, nossos dados demonstraram que a 1µM de MeHg é capaz de ocasionar o aumento de expressão em 31 genes enquanto 10µM de MeHg ocasionou o aumento de 66 genes. Já a exposição a 5µM de HgCl₂ ocasionou a superexpressão de 73 genes enquanto a exposição a 62,75µM ocasionou o aumento da expressão de 66 genes quando comparado com o grupo controle (Fig. 9D).

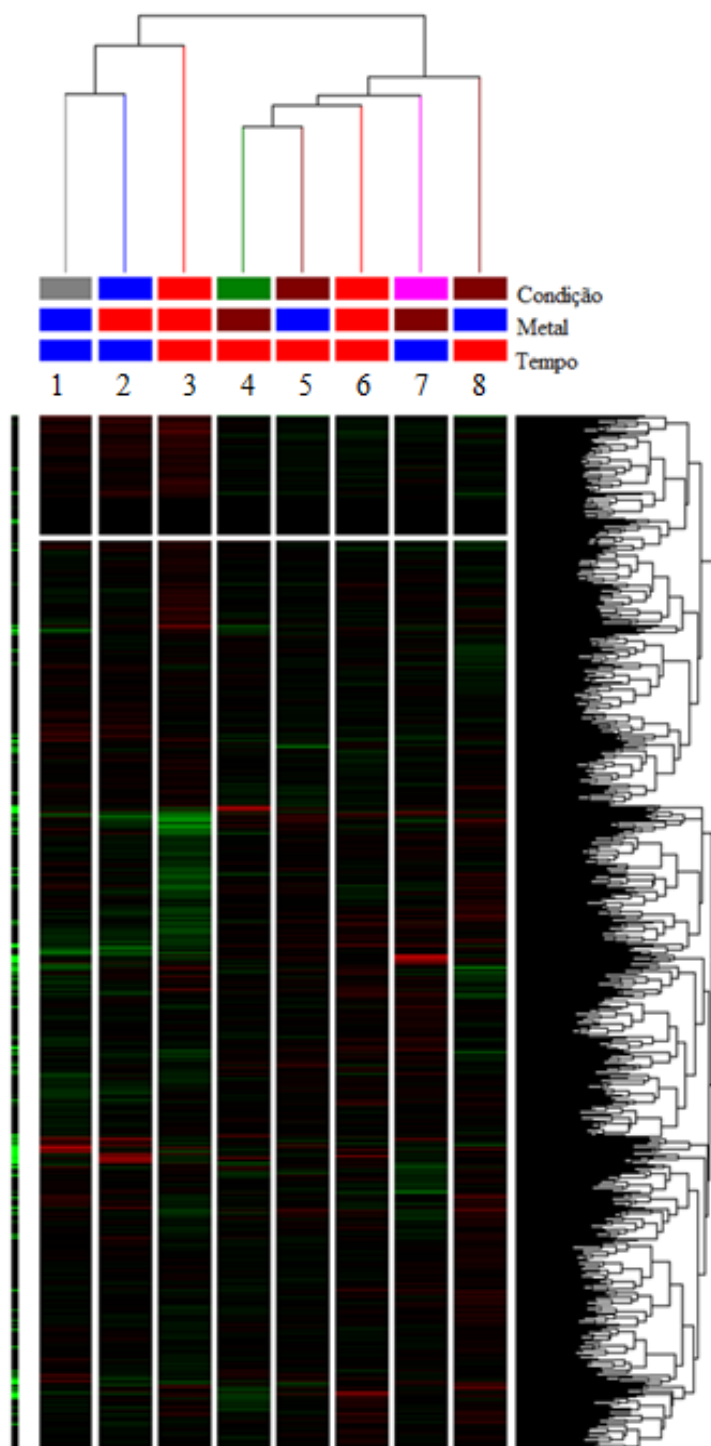


Fig.8: Análise de clustering após exposição a MeHg e HgCl₂, nos tempos de 4h e 24h, com o auxílio do software GeneSpring GX. 1: MeHg 5 μ M 4h; 2: HgCl₂ 5 μ M 4h; 3: HgCl₂ 62,75 μ M 24h; 4: controle 24h; 5: MeHg 1 μ M 24h; 6: HgCl₂ 5 μ M 24h; 7: controle 4h; 8 MeHg 10 μ M 24h. Vermelho: dosagem gênica up-regulada; Verde: dosagem gênica down-regulada.

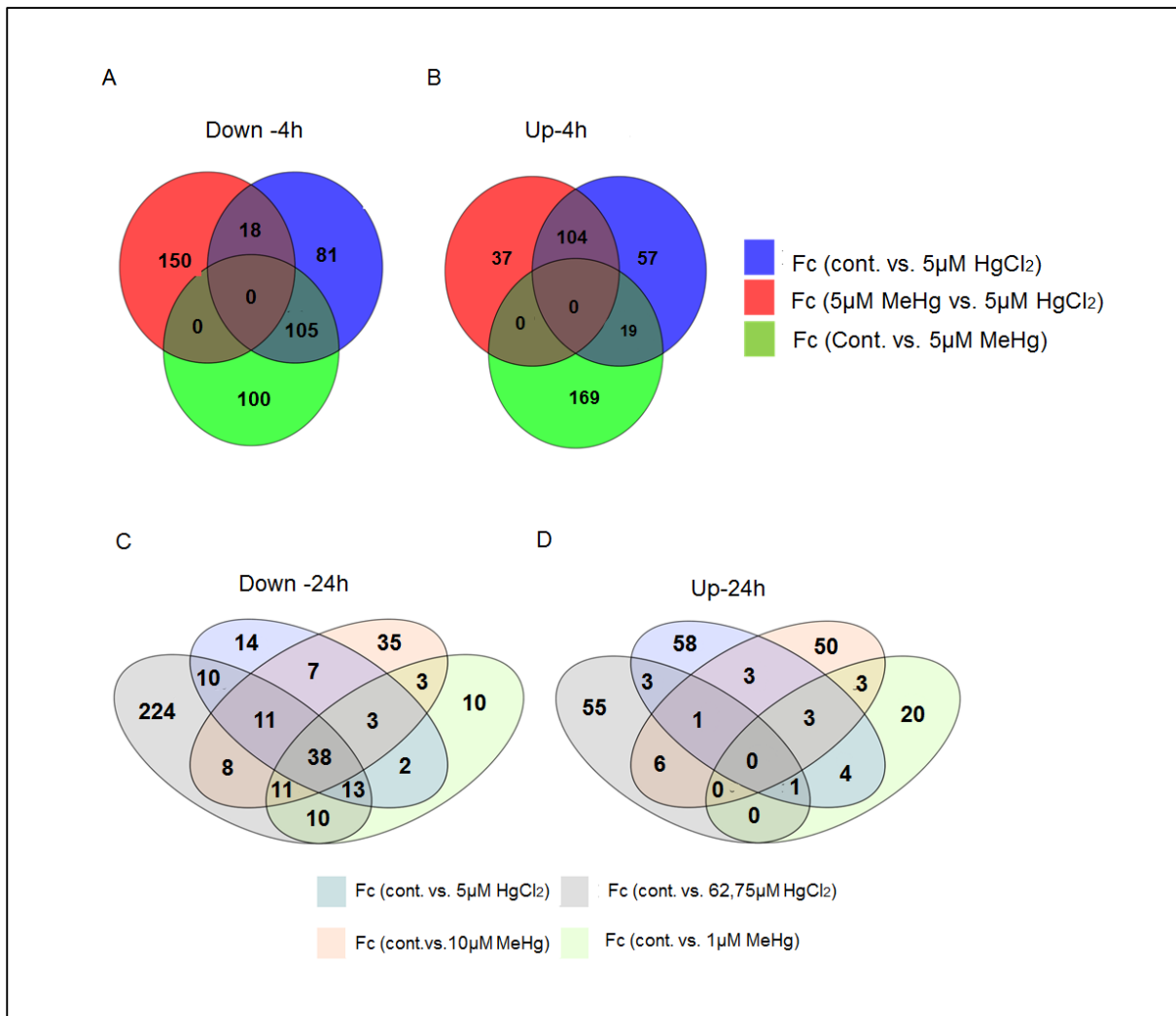


Fig. 9: Representação por meio do Diagramas de Venn da dosagem gênica agrupada de acordo com a concentração de metal utilizada, nos tempos de 4h (A e B) e 24h (C e D).

A partir desses resultados, a avaliação foi direcionada para alterações que poderiam estar relacionadas com os mecanismos básicos de toxicidade, buscando compreender como as alterações nas dosagens gênicas influenciam eventos moleculares e bioquímicos de células expostas ao mercúrio. Uma das principais hipóteses acerca do potencial citotóxico do mercúrio diz respeito ao aumento das espécies reativas de oxigênio e como o desbalanço energético da célula pode ocasionar danos ao DNA, afetando os principais mecanismos de controle do ciclo celular, culminando com a morte por apoptose.

Dessa forma, após identificar os genes que participam das vias moleculares de controle do ciclo celular, resposta ao estresse oxidativo ocasionado por mercúrio e morte celular, nossos resultados identificaram a alteração na expressão de genes já conhecidamente ativados da exposição ao mercúrio, como por exemplo os genes de metaloproteínas (MMP) e genes do ciclo da GHS (GSTO2) que participam durante os eventos de proteção do organismo frente aos danos ocasionados pelo mercúrio. Além disso, nossos dados demonstraram a expressão de genes de ativação de vias apoptóticas como FOS, e expressão de genes de resposta ao estresse como os genes da família de proteínas de choque térmico HSP que ocorrem durante a indução de estresse oxidativo. Nossos resultados também demonstraram alterações de outros genes que possuem relação com as vias de interesse e que não foram descritos anteriormente pela literatura (Tabelas 1-4).

Sendo assim, foi possível observar que o perfil de expressão gênica das células U87 não apresenta grandes diferenças quando comparado os grupos expostos ao MeHg e HgCl₂ na mesma concentração, por um período de 4h. Foram identificados 33 genes com diminuição na dosagem gênica após exposição aos metais (Tabela 1; Fig. 9A) e 26 genes que apresentaram aumento na expressão, quando comparados com o grupo controle (Tabela 2; Fig. 9B). Também foi possível observar que alguns genes, como *HSPB6*, *BATF2*, *HRK*, *RPS6KA5*, *IL2RA* e *KIF20A* tiveram sua expressão exclusivamente diminuída após a exposição a 5µM de MeHg. Já em relação aos genes que tiveram sua dosagem aumentada, nossos resultados sugerem que a exposição ao HgCl₂ ocasiona, exclusivamente, o aumento na dosagem gênica de *IL19*, *MDM1*, *AMBRA1*, *UGT2A1*, *MIR17HG*, *TTPA*, *NRAP* e *CREBRF*.

Tabela 3: Genes down-regulados após 4h de exposição a MeHg e HgCl₂ na concentração de 5µM. Os genes foram selecionados no programa GeneSpring GX, baseado na sua relação com as vias de estresse oxidativo, morte celular e controle de ciclo celular.

Genes down-regulados após 4h de exposição			
		5µM MeHg	5µM HgCl₂
Gene	Descrição	Fold change	Fold change
HSPB6	Família de proteínas de choque térmico 6	5.0	-
BATF2	Fator de transcrição do tipo 2	5.1	-
HRK	Harakiri, proteína de interação a Bcl2	5.4	-
RPS6KA5	Proteína ribossomal 6S cinase A5	5.6	-
IL2RA	Subunidade alfa do receptor de interleucina 2	5.7	-
KIF20A	Membro da família kinesina 20A	7.5	-
MAP3K9	Proteína-mitogena ativada cinase cinase cinase 9	5.0	11.0
MMP11	Metalopeptidase de matriz 11	9.2	21.0
MAP3K8	Proteína-mitogena ativada cinase cinase cinase 8	5.3	2,16
CCNB1	Ciclina B1	6.0	3,17
CDCA3	Divisão de ciclo celular associado 3	7.0	3,18
TRIB2	Pseudo cinase 2	6.8	2,17
NFATC4	Fator nuclear de ativação de células T4	3,13	5.6
L3MBTL1	L3MBT tipo 1	5.8	2,58
RAB25	Membro RAS da família de oncogene	7.4	10.1
ERBB4	Receptor Erb2 tirosina cinase 4	4,21	7.8
PLK1	Polo tipo cinase 1	8.7	3,29
SIRT4	Sirtuina 4	8.8	5.6
CABLES1	Substrato 1 cdk5 e Abl	9.6	12.3
TMEM102	Proteína transmembranas 102	9.9	2,81
GLI1	Família de ligação ao zindo GL1	4,66	10
ATRNL1	Atractina tipo 1	10.3	3,48
FOS	Osteosarcoma oncogênico viral homologo	11.3	16,4
FOSB	Osteosarcoma oncogênico viral homologo B	5.7	3,82
INSC	Homólogo Inscuteable	6.3	4,44
DDIT4	Indutor de dano ao DNA	4,44	6.7
PRL	Prolactina	7.8	8.4
GSTO2	Glutathiona S-transferase	39.2	42.3
GAS2L2	Controle de crescimento específico	5.7	6.3
AJAP1	Proteína 1 associada a junções aderentes	4,0	5.1
MID1	Midline 1	5.1	5.7
CORO2A	Coroína 2A	4,92	5.5

Tabela 4: Genes up-regulados após 4h de exposição a MeHg e HgCl₂ na concentração de 5µM. Os genes foram selecionados no programa GX baseado na sua relação com as vias de estresse oxidativo, morte celular e controle de ciclo celular.

Genes up-regulados após 4h de exposição			
Gene	Descrição	5µM MeHg Fold change	5µM HgCl₂ Fold change
IL19	Interleucina 19	-	5
MDM1	Proteína nuclear Mdm1	-	5.3
AMBRA1	Regulador de autofagia e beclina 1	-	6.1
UGT2A1	Família gluconosil transferase membro 2	-	6.2
MIR17HG	Cluster gene MiR-17-92a-1	-	6.5
TTPA	Proteína de transferência de tocoferol	-	6.8
NRAP	Proteína ancoradora relacionada a tubulina	-	13.5
CREBRF	Fator regulador CREBRF	-	111.0
WDR31	Domínio repetitivo 31	12.3	-
MAPK8	Proteína-mitogena ativada cinase cinase cinase 8	2,55	5.2
PTPRG	Proteína tirosina fosfatase, receptor tipo G	5.1	9.2
ADAMTS6	Metalopeptidase com trombospodina	12.7	3,11
CARD8	Família 8 recrutadora de caspase	12.1	3,24
KRTAP13-4	Proteína associada a queratina	8.1	2,02
CD274	Molécula CD274	8.7	5.8
HAS1	Síntese de hialurona 1	9.9	5.2
STRIP1	Proteína 1 integradora de estriatina	6.6	3,64
PMEPA1	Proteína transmembranas andrógena induzida 1	6.9	2,99
WNK1	Proteína cinase deficiente de lisina	6.6	3,09
CCNT2	Ciclina T2	5.1	4,29
FHL2	Domínio Quatro e LIM 2	5.2	3,35
KRTAP2-3	Proteína associada a queratina 2-3	13.6	12.0
THBS1	Trombospodina 1	7.7	6.7
PDCD1LG2	Ligante 2 de morte celular programada	6.6	6.8

A análise dos resultados após 24h de exposição identificou 28 genes com diminuição na dosagem gênica (Tabela 3) e 26 genes que apresentaram aumento na expressão gênica, quando comparados com o grupo controle (Tabela 4).

Alguns genes como, *HOOK2*, *FNI*, *CLN8*, *CDK13* e *DAPL1*, foram identificados por apresentarem sua expressão diminuída exclusivamente após exposição a 62,75 μ M de HgCl₂, enquanto que na concentração de 5 μ M de HgCl₂ foi possível identificar a expressão exclusiva de somente dois genes: *CDK1*, *MMPP7*. Já em relação aos genes que apresentaram aumento de sua dosagem gênica, somente no grupo exposto a concentração de 62,75 μ M HgCl₂ foi identificado os genes *TRIB3*, *MT1CP*, *MT1X*, *CHAC1*, *BEX2*, *GDF15*, *MT1M*, *MT1G* e *NLRP3*.

Tabela 5: Genes down-regulados após 24h de exposição a MeHg e HgCl₂ na concentração de 5µM. Os genes foram selecionados no programa GX baseado na sua relação com as vias de estresse oxidativo, morte celular e controle de ciclo celular.

Genes down-regulados após 24h de exposição					
		1µM MeHg	10µM MeHg	5µM HgCl₂	62,75µM HgCl₂
Gene symbol	Function	Fold change	Fold change	Fold change	Fold change
HOOK2	Proteína ancoradora de microtubulo	-	-	-	5,2
FN1	Fibronectina 1	-	-	-	5,3
CLN8	Ceróide-lipofuscinoide neural 8	-	-	-	7,7
CDK13	Cinase dependente de ciclina 13	-	-	-	7,8
DAPL1	Proteína associada a morte tipo 1	-	-	-	12,9
CDK1	Cinase dependente de ciclina 1	-	-	5,3	-
MMP7	Metalopetidase de matriz 7	-	-	7,0	-
BIRC7	Bucoloviral repetitivo contendo IAP 7	-	-	2,03	19,8
FOS	Osteosarcoma oncogênico viral homologo	-	-	44,5	13,3
ADRA1B	Adrenoreceptor alfa 1B	-	-	6,4	6,1
FOSB	Osteosarcoma oncogênico viral homologo B	-	-	16,3	8,8
DUSP1	Fosfatase dual específica 1	-	-	5,7	2,34
FNBP1L	Proteína ligadora tipo 1	-	5,4	-	-
EFHC1	EF contendo domínio 1	-	6,4	-	-
CDS1	CDP diaglicerol sintase 1	-	5,2	2,05	3,10
ID4	Inibidor De ligação ao DNA	-	2,62	4,22	6,0
EGR1	Fator de crescimento inicial tipo 1	-	2,23	16,4	7,1
CTGF	Fator de crescimento de tecido conectivo	-	2,75	6,3	2,61
SHROOM3	Membro da família SHROOM 3	-	6,5	5,6	-
ENC1	Córtex neuroectodermal 1	-	5,6	2,21	-
TIMP3	Metaloproteínas	-	2,54	-	10,1
HSD17B6	Hidroxiiesteróide desidrogenase	5,1	4,89	-	3,84
ANO8	Anoctamina 8	2,47	-	5,7	2,45
HSPB11	Proteína de choque térmico da família B	5,1	-	3,43	8,2
IL5	Interleucina 5	3,15	4,26	4,91	5,2
POLH	Polimerase Eta	3,75	6,19	6,1	4,2
ETV3	ETS variante 3	3,08	6,61	6,8	4,9
TTC28	Domínio repetitivo tetratricopeptídeo	5,86	6,19	5,45	9,7

Tabela 6. Genes up-regulados após 24h de exposição a MeHg e HgCl₂ na concentração de 5µM. Os genes foram selecionados no programa GX baseado na sua relação com as vias de estresse oxidativo, morte celular e controle de ciclo celular.

Genes up-regulados após 24h de exposição					
		1µM MeHg	10µM MeHg	5µM HgCl₂	62µM HgCl₂
Gene symbol	Fold change	Fold change	Fold change	Fold change	Fold change
TRIB3	Pseudocinase 3	-	-	-	6,2
MT1CP	Metationeína 1C	-	-	-	7,2
MT1X	Metalotioneína 1X	-	-	-	7,8
CHAC1	Gama-glutamil ciclo transferase específico a glutationa	-	-	-	8,4
BEX2	Expressão X cerebral	-	-	-	8,5
GDF15	Fator de diferenciação de crescimento 15	-	-	-	10,7
MT1M	Metalotioneína 1M	-	-	-	11,0
MT1G	Metaloteioneína 1G	-	-	-	308,3
NLRP3	Família NLR, domínio contendo pirina 3	-	-	-	5,3
BTG2	Membro da família BTG 2	-	-	2,41	5,2
TMPRSS6	Protease transmembranas serina 6	-	-	5,2	2,23
FERMT1	Membro da família fermitina 1	-	-	6,9	2,33
IL11	Interleucina 11	-	5,8	-	-
NAPRT	Nicotil fosforibosiltransferase	-	7,6	-	-
STYK1	Serina tirosina cinase 1	-	2,06	-	5,1
CRYAB	Cristilina alfa B	-	9,36	-	6,5
NAMPT	Fosforibosiltransferase nicotinamida	-	5,2	-	3,46
BRK1	Complexo de actina	5,0	-	2,53	-
PTPRG	Proteína tirosino fosfatase	2,16	5,9	-	-
RPS6KA2	Proteína ribossomal cinase A2	2,21	-	6,6	4,47
PRRG1	Prolina enriquecida e domínio Gla 1	2,67	2,62	-	5,2
MAPK8	Proteína-mitogena ativada cinase cinase cinase 8	2,30	3,48	5,2	2,53
REEP1	Receptor acessório a proteína 1	5,37	7,54	5,7	3,5
AGBL1	Proteína tipo 1 ligadora a ATP/GTP	5,78	7,24	5,0	4,77
HRH2	Receptor histamínico	2,6	2,35	7,0	3,99
MSI2	Proteína ligadora a RNA	3,13	3,01	4,03	7,7

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi demonstrado pela primeira vez que concentrações letais e não letais de MeHg e HgCl₂ após períodos de exposição de 4h e 24h, são capazes de ocasionar alterações na dosagem gênica de células da glia humana da linhagem U87, visto através da análise de transcriptoma total por *microarray*. Nossos resultados demonstram não haver diferenças robustas quanto ao perfil de mRNA quando comparado a ação do mercúrio orgânico e inorgânico nos tempos de 4h. No entanto, nas análises após 24h de exposição, nossos resultados sugerem uma maior alteração gênica nas células expostas ao HgCl₂, quando comparado com o MeHg.

Os efeitos neurotóxicos do mercúrio, já são bem descritos pela literatura (Maximino C e col., 2011; Syversena e Kaur, 2012; Teixeira B e col., 2014; Pletz e col., 2016). Estudos já demonstraram que, no SNC, as células da glia possuem reconhecida importância na detoxificação do mercúrio, garantindo proteção neuronal frente aos efeitos toxicológicos ocasionados pelo metal. Sendo assim, as células da glia representam a primeira linha de defesa no SNC frente aos danos ocasionados pelo mercúrio (Shanker G e Aschner M, 2001).

Acredita-se que a principal causa da toxicidade ocasionada por este metal esteja associado a indução de espécies reativas de oxigênio que levam a uma série de eventos bioquímicos prejudiciais para as células. Além disso, a literatura sugere que estas alterações bioquímicas ocasionadas pelo mercúrio possam ser influenciadas por danos ao conteúdo genético, levando assim a quadros de teratogênese e mutagênese (De Flora, 1994; Crespo-Lopez ME e col., 2009; Bhwmik e col. 2012; Pieper e col., 2014).

A utilização de linhagens de células para estudos toxicológicos tem demonstrado uma boa correlação com estudos realizados em culturas de células primárias e modelos animais (Ekwall B, e col., 1990). Além disso, é importante ressaltar que as células gliais da linhagem U87 possuem as características genótípicas e fenotípicas de células humanas (Xie Y, e col., 2015) representando assim um bom modelo de estudo para a compreensão dos mecanismos toxicológicos do mercúrio no SNC. Além disso, os testes *in vitro* tem sido utilizados como alternativa para prever mecanismos de ação de compostos tóxicos para os seres-vivos, minimizando assim a utilização de modelos animais de acordo com a lei ética de experimentação animal prevista pelo projeto dos 3R's (redução, reposição e refinamento).

Em modelo de cultivo celular é possível avaliar o efeito de xenobióticos em células isoladas, facilitando a compreensão de como a toxicidade pode atuar em diferentes tipos celulares. Sabendo-se da importância das células na glia em condições de exposição ao mercúrio e da capacidade que este metal tem em se acumular neste tipo de célula, são necessários estudos que elucidem como as células gliais respondem frente a exposição mercurial e quais os mecanismos de sinalização são ativados para manter a proteção neuronal. No entanto, é importante lembrar que a utilização de modelos de cultura de células para análises toxicológicas devem prever os mecanismos biológicos especializados de cada tipo celular bem como seus processos metabólicos, que podem interferir na análise e interpretação dos dados. Por estes motivos, é importante levar em consideração que cada tipo celular responde de maneira diferente ao mesmo estímulo, possuindo diferentes sensibilidades frente a exposição a xenobióticos (Ekwall B, e col., 1990).

Ao analisar a sensibilidade das células da linhagem U87 após exposição ao MeHg e HgCl₂ durante 4h e 24h, nossos resultados demonstraram que ambos os metais ocasionam uma diminuição da viabilidade celular de forma independente de concentração (Fig1 e 2). Os valores de LC₅₀ registrados para as células expostas ao MeHg foram de 28,8µM após 4h de exposição e 10,68µM após 24h. Já os valores registrados para exposição ao HgCl₂ após os períodos de 4h e 24h, foram de 92,25µM e 62,75µM respectivamente. Estes resultados se encontram próximos ao observado em outros estudos que utilizaram culturas de células secundárias para análises toxicológicas do mercúrio (Schurz F. e col., 2000; Crespo-Lopez ME e col., 2007; Costa-Malaquias A e col., 2014). Nossos resultados também sugerem que em relação a diminuição de viabilidade das células da linhagem U87, são necessárias menores concentrações de MeHg quando comparadas com a exposição ao HgCl₂. Levando em consideração que esta diminuição na viabilidade celular gera um indicativo de toxicidade do metal, nossos dados demonstraram que após exposições de curta duração, o MeHg apresentou uma LC₅₀ aproximadamente 3x menor que a indicada pela exposição ao HgCl₂, enquanto que após exposições de longa duração o MeHg apresentou LC₅₀ aproximadamente 6x menor que a apresentada pelo HgCl₂, sugerindo assim que concentrações elevadas de HgCl₂ são necessárias para ocasionar danos fisiológicos semelhantes ao observado após exposição ao MeHg.

A intoxicação mercurial varia de acordo com a forma em que o mercúrio se apresenta disponível para o organismo. Diversos trabalhos já demonstraram que as formas orgânicas do mercúrio possuem maior facilidade em atravessar as membranas biológicas, devido

principalmente a maior lipossolubilidade do MeHg quando comparado com o HgCl₂ (Boudou e col., 1997). No entanto, MeHg e HgCl₂ possuem a capacidade de se acumular em diferentes tecidos visto que ambos possuem afinidades por resíduos –SH (Hultberg e col., 2001). É importante ressaltar que as diferenças em relação aos mecanismos de absorção e excreção do metal, refletem principalmente nos eventos de sinalização e nas respostas de proteção celular frente aos danos ocasionados pelo mercúrio. Estas características são de extrema importância para a compreensão dos mecanismos toxicológicos do metal, visto que a capacidade de se ligar a proteínas importantes para a manutenção da fisiologia normal da célula representa um ponto chave na indução de alterações bioquímicas e genéticas ocasionadas pela intoxicação mercurial (Ercal e col., 2001).

Estudos *in vivo* têm demonstrado que o depósito de Hg no SNC de animais intoxicados por MeHg aparenta ser superior ao depositado após intoxicação por HgCl₂ em condições experimentais semelhantes (dados não publicados). Essas diferenças podem ser responsáveis por ocasionar impactos fisiológicos diferentes, como o observado nas alterações bioquímicas e comportamentais ocasionados pelo mercúrio neste trabalho. Além disso, estudos sugerem que são necessárias doses mais elevadas e maiores tempos de exposição ao HgCl₂ para ocasionar danos semelhantes ao observado pela intoxicação por mercúrio em sua forma orgânica. Esses dados reforçariam a hipótese de maior toxicidade associada ao MeHg.

De maneira geral o MeHg possui uma maior toxicidade tanto *in vivo* quanto *in vitro* quando comparado com o HgCl₂ (EFSA, 2012). Ao demonstrar uma LC₅₀ significativamente maior para o HgCl₂ após 4h e 24h de exposição em relação a LC₅₀ registrada para o MeHg, nossos resultados corroboram com o demonstrado pela literatura, sugerindo então que as células da linhagem U87 apresentam maior sensibilidade a exposição de curta ou longa duração ao MeHg quando comparada com a exposição ao HgCl₂.

É importante ressaltar que a comparação de dados da toxicologia aplicada a cultivo de células com modelos animais deve ser levada com cautela, visto que existem diversas limitações no modelo *in vitro*. Uma dessas limitações é a dificuldade em mimetizar a fisiologia das células quando presentes em organismos complexos, principalmente quando se trata de estudos que envolvem o SNC. Neste modelo, a principal limitação do cultivo de células da glia é a ausência da barreira hematoencefálica que pode levar a erros de interpretação de dados toxicológicos, visto que é esta barreira celular que mantém as características farmacológicas dos xenobióticos. No entanto, estudos sugerem que uma vez que a toxicocinética e

toxicodinâmica do composto seja conhecida, bem como sua habilidade em atravessar a barreira hematoencefálica, os erros de interpretação podem ser minimizados (Syversen e Kaur, 2012).

Outro ponto importante a ser levado em consideração é o tempo de exposição que pode induzir parâmetros toxicológicos diferentes para a análise. Dessa forma, é importante elucidar o momento em que a exposição ao mercúrio desencadeia resposta fisiológicas capazes de levar a alterações bioquímicas e genéticas nas células. De maneira geral, as análises toxicológicas apresentam ensaios com exposições de curta (exposição por 4h) e longa (exposição por 24h) duração visando compreender a interferência do tempo de exposição na ação dos xenobióticos (Ekwall B e col., 1990). Por este motivo, neste trabalho foram avaliados as alterações bioquímicas, como indicativas a diminuição da viabilidade celular, alterações morfológicas e alterações no perfil gênico da célula após 4h e 24h de exposição a MeHg e HgCl₂.

Nossos resultados sugerem que baixas concentrações de MeHg por curto período de exposição não são capazes de ocasionar morte celular nem alterações morfológicas. Sendo assim, células expostas a 5µM de MeHg por 4h mantém sua morfologia fusiforme semelhante ao observado no grupo controle. No entanto, em exposições prolongadas (24h) foi possível observar que mesmo em baixas concentrações onde não ocorre morte celular, há uma significativa alteração da morfologia da célula, semelhante ao observado nos grupos expostos a altas concentrações capazes de induzir morte celular (Fig.1). De maneira diferente, esse efeito não foi observado em células expostas ao HgCl₂, onde baixas concentrações mesmo após 4h ou 24h de exposição, não foram capazes de ocasionar morte celular nem alterações morfológicas. Este efeito só foi possível após exposição a altas concentrações de HgCl₂ por um longo período de exposição (Fig.2). Sendo assim, nossos resultados sugerem que a toxicidade do MeHg depende tanto da concentração utilizada, quanto do tempo de exposição. Já em relação ao HgCl₂ nossos resultados sugerem que o fator tempo parece ser mais importante, quando comparado com a concentração utilizada.

Toda e qualquer alteração em processos biológicos, como a diminuição da viabilidade celular e as alterações morfológicas observadas neste trabalho após a exposição ao mercúrio, podem ser diretamente relacionadas com a ativação ou supressão de sequências gênicas no DNA da célula. Estas alterações no genoma celular são responsáveis por ditar os principais mecanismos de sinalização, sejam eles de proteção ou adaptação, com o objetivo principal de garantir a sobrevivência da célula e a manutenção da carga genética do organismo. Dessa forma, sabendo-se que a expressão gênica representa as características estruturais e funcionais

da célula e como elas reagem frente a estímulos externos (Androulakis IP e col., 2007), após a análise de toxicidade do MeHg e HgCl₂ nas células da glia humana da linhagem U87, nós procuramos avaliar a interferência dos metais na rede gênica destas células.

Diversos trabalhos tem demonstrado como a intoxicação por metais pode interferir na expressão gênica ocasionando alterações no fenótipo celular (Wellington K e col., 2006; Cui Y e col., 2007). Dentre as inferências na maquinaria celular ocasionadas pelo mercúrio, estudos sugerem que após a intoxicação ocorre um aumento de proteínas envolvidas na proteção celular frente estímulos estressores como as proteínas de choque térmico (HSP) e as metaloproteínas, bem como a depleção de enzimas importantes para o controle redox da célula, como as enzimas oxidativas SOD, catalase e GPX (Hwang e col., 2012). Além disso, sabe-se que o mercúrio é capaz de interferir na síntese de proteínas importantes para a manutenção e síntese do DNA, como por exemplo a tubulina e proteínas presentes no citoesqueleto (Crespo-Lopes ME e col., 2009).

Após realizar o mapeamento completo da rede gênica das células U87 expostas ao MeHg e HgCl₂, nossos resultados demonstraram que a exposição aos metais durante 4h e 24h ocasionam uma significativa alteração no perfil gênico da célula. Essas alterações na dosagem gênica são fortemente influenciadas tanto pela concentração quanto pelo tempo de exposição. Nossos resultados sugerem que a exposição ao HgCl₂ por longos períodos de exposição e altas concentrações mantém a ativação da expressão gênica, enquanto que a exposição ao MeHg ocasiona ativação da expressão gênica em baixas concentrações e por curto período de exposição, enquanto que em exposições de longa duração parece haver uma diminuição na alteração da dosagem gênica (Fig. 8).

Quando comparado a interferência do tipo de metal a qual a célula foi exposta, nossos resultados demonstraram não haver grandes diferenças após o período de 4h de exposição. Ao analisar comparativamente a dosagem de genes, nos grupos expostos ao MeHg e HgCl₂, foi demonstrado que não houve diferenças significativas nas dosagem gênica, havendo uma similaridade em 105 genes down-regulados e 19 genes up-regulados (Fig.9A e B). O mesmo não foi observado após exposições por longa duração, onde foi observado uma baixa similaridade entre as dosagens gênicas, identificando 38 genes down-regulados em todas as condições experimentais e nenhum gene up-regulado simultaneamente em todos os grupos (Fig.9C e D).

Em posse dos dados de mapeamento completo da rede gênica das células U87, nós fizemos uma análise de enriquecimento gênico buscando compreender os principais processos biológicos alterados após a exposição mercurial. Dentre eles, a análise de ontologia gênica (OG) que consiste em agrupar genes de funções semelhantes, identificou alterações em genes que desempenham importante função no controle do ciclo celular, proliferação, morte por apoptose e estresse oxidativo (Tabelas 5 e 6).

Diversos trabalhos já demonstraram que os efeitos toxicológicos do mercúrio em células do SNC ocorre devido a formação de espécies reativas de oxigênio, que ocasionam a indução de cascatas de sinalização relacionadas a morte por apoptose (Aschner e col., 1990; Do Nascimento e col., 2008; Ercal e col., 2011). Nossos resultados demonstraram que após a análise supervisionada, foram indicados 33 genes down-regulados após exposição a 5 μ M de MeHg e 27 genes após exposição a 5 μ M de HgCl₂ (Tabela 1) indicando assim não haver diferenças significativas na dosagem gênica de grupos expostos a MeHg ou HgCl₂. Dentre os genes selecionados, encontram-se genes relacionados ao estresse oxidativo, síntese de microtúbulos, proteção redox, controle do ciclo celular, sobrevivência e apoptose (Tabela 1 e 2). Nossos resultados sugerem então, que as diferenças na dosagem gênica quando comparado células exposta a MeHg e HgCl₂ começam a ser marcantes após longos períodos de exposição. Quando as células foram incubadas com 1 μ M e 10,68 μ M de MeHg após 24h, não foram identificados genes unicamente regulados nesta condição. De maneira diferente, após a exposição de células a 5 μ M e 62,75 μ M de HgCl₂ houve a identificação da ativação de genes exclusivos que seriam importantes tanto para o controle do ciclo e manutenção da proliferação celular.

Estes resultados, aliados à hipótese de maior toxicidade do MeHg quando comparado com o HgCl₂ nas células U87 podem indicar uma maior facilidade em manter o funcionamento da maquinaria celular em situações de intoxicação por HgCl₂, sugerindo assim que além da menor influência toxicológica do mercúrio inorgânico na célula, há também um maior mecanismo de adaptação garantindo assim a sobrevivência celular frente estímulos estressores, quando comparado com o observado em células expostas ao MeHg.

Tabela 7: Funções celulares identificadas após análise de OG em células expostas a MeHg e HgCl₂ após 4h.

Nº DE ACESSO GO	TERMO GO	p-valor
GO:0048523 GO:0051243	negative regulation of cellular process	0.001
GO:0048519 GO:0043118	negative regulation of biological process	0.004
GO:0042325	regulation of phosphorylation	0.012
GO:0001932	regulation of protein phosphorylation	0.023
GO:0032693	negative regulation of interleukin-10 production	0.030
GO:0019220	regulation of phosphate metabolic process	0.030
GO:0071241	cellular response to inorganic substance	0.030
GO:0031399	regulation of protein modification process	0.030
GO:0051174	regulation of phosphorus metabolic process	0.030
GO:0051716	cellular response to stimulus	0.040
GO:0000942	condensed nuclear chromosome outer kinetochore	0.040
GO:0048518 GO:0043119	positive regulation of biological process	0.053
GO:0051239	regulation of multicellular organismal process	0.053
GO:0050896 GO:0051869	response to stimulus	0.059
GO:0043987 GO:0043986	histone H3-S10 phosphorylation	0.059
GO:0048522 GO:0051242	positive regulation of cellular process	0.064
GO:0004672 GO:0050222	protein kinase activity	0.064
GO:0043549	regulation of kinase activity	0.066
GO:0005515 GO:0045308	protein binding	0.066
GO:0006915 GO:0006917	apoptotic process	0.068
GO:0033129	positive regulation of histone phosphorylation	0.068
GO:0023014	signal transduction by protein phosphorylation	0.068
GO:0010038	response to metal ion	0.075
GO:0012501 GO:0016244	programmed cell death	0.075
GO:0009893	positive regulation of metabolic process	0.076
GO:0006468	protein phosphorylation	0.076
GO:0010033	response to organic substance	0.076
GO:0032570	response to progesterone	0.079
GO:0008219	cell death	0.080
GO:0009612	response to mechanical stimulus	0.080
GO:0046006	regulation of activated T cell proliferation	0.080
GO:0071310	cellular response to organic substance	0.081
GO:0070887	cellular response to chemical stimulus	0.081
GO:0071248	cellular response to metal ion	0.082
GO:0000778	condensed nuclear chromosome kinetochore	0.082
GO:0008017	microtubule binding	0.082
GO:0051246	regulation of protein metabolic process	0.082
GO:0018105	peptidyl-serine phosphorylation	0.082
GO:0048583	regulation of response to stimulus	0.090
GO:0016773	phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor	0.090
GO:0032653	regulation of interleukin-10 production	0.090
GO:0051338	regulation of transferase activity	0.090
GO:0046007	negative regulation of activated T cell proliferation	0.093

Cont. Tabela 7		
Nº DE ACESSO	TERMO OG	p-valor
GO:0033127	regulation of histone phosphorylation	0.093
GO:0001818	negative regulation of cytokine production	0.094
GO:0048584	positive regulation of response to stimulus	0.094
GO:0033043	regulation of organelle organization	0.094
GO:0032268	regulation of cellular protein metabolic process	0.096
GO:0002684	positive regulation of immune system process	0.098
GO:0050789 GO:0050791	regulation of biological process	0.098
GO:0000165	MAPK cascade	0.098
GO:0050794 GO:0051244	regulation of cellular process	0.098
GO:0018209	peptidyl-serine modification	0.098
GO:0042130	negative regulation of T cell proliferation	0.098

Tabela 8: Funções celulares identificadas após análise de OG em células expostas a MeHg e HgCl₂ após 24h.

Nº DE ACESSO	TERMO OG	p-valor
GO:0010941	regulation of cell death	0.01
GO:0048519 GO:0043118	negative regulation of biological process	0.01
GO:0071294	cellular response to zinc ion	0.01
GO:0010033	response to organic substance	0.02
GO:0042981	regulation of apoptotic process	0.02
GO:0043067 GO:0043070	regulation of programmed cell death	0.02
GO:0004514	nicotinate-nucleotide diphosphorylase (carboxylating) activity	0.03
GO:0048523 GO:0051243	negative regulation of cellular process	0.03
GO:0006769	nicotinamide metabolic process	0.06
GO:0007167	enzyme linked receptor protein signaling pathway	0.07
GO:0046686	response to cadmium ion	0.10
GO:0072559	NLRP3 inflammasome complex	0.10
GO:0051716	cellular response to stimulus	0.10
GO:0071363	cellular response to growth factor stimulus	0.10

Conclusão

A análise de viabilidade celular demonstrou uma maior sensibilidade das células ao MeHg quando comparado com a exposição ao HgCl₂. Já as alterações ocasionadas no perfil gênico das células U87 após exposição aos metais demonstrou ser fortemente regulada pela concentração do metal utilizado e pelo tempo de exposição. Juntos, nossos resultados demonstram que exposições de curta duração (4h) mantêm uma maior habilidade das células em ativar componentes gênicos para combater os danos ocasionados ao mercúrio, independente do metal utilizado, enquanto que em exposições de longa duração há uma maior habilidade em ativar componentes gênicos nos grupos expostos ao HgCl₂, sugerindo assim uma possível compreensão para a maior toxicidade do MeHg quando comparado com a toxicidade ocasionada pelo HgCl₂.

REFERÊNCIAS

Abernethy, D.R., Destefano, A.J., Cecil, T.L., Zaidi, K., Williams, R.L. Metal impurities in food and drugs. Pharm Res. 2010; 27(5):750-5.

Akiyama, M., Oshima, H., Nakamura, M. Genotoxicity of mercury used in chromosome aberration tests. Toxicol In Vitro. 2001; 15(4-5):463-7.

Androulakis IP, Yang E, Almon RR. Analysis of time-series gene expression data: methods, challenges, and opportunities. Annu Rev Biomed Eng.;9:205-28, 2007.

Aschner M, Aschner JL. Mercury neurotoxicity: mechanisms of bloodbrain barrier transport. Neurosci Biobehav Rev 1990; 14:169-76.

Aschner M, Du YL, Gannon M, Kimelberg HK. Methylmercury-induced alterations in excitatory amino acid transport in rat primary astrocyte cultures. Brain Res. 1993 Feb 5;602(2):181-6.

Benoit, J. M.; Gilmour, C. C.; Heyes, A.; Mason, R. P.; Miller, C. L. Geochemical and biological controls over methylmercury production and degradation in aquatic ecosystems. In Biogeochemistry of Environmentally Important Trace Elements, Cai, Y.; Braids, O. C., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 2003; Vol. 835, pp 262-297.

Berlin M. Mercury. In: Friberg L, Nordberg GF, Vouk V. Handbook on the toxicology of metals. Vol. II. Specific Metals. Elsevier, New York, 1986; pp 387-445

Berzas Nevado JJ, Rodríguez Martín-Doimeadios RC, Guzmán Bernardo FJ, Jiménez Moreno M, Herculano AM, do Nascimento JL, Crespo-López ME. Mercury in the Tapajós River basin, Brazilian Amazon: a review. Environ Int. 2010; 36(6):593-608.

Bhowmik, N., Patra, M. Assessment of genotoxicity of inorganic mercury in rats in vivo using both chromosomal aberration and comet assays. Toxicol Ind Health. 2015; 31(7):588-94.

Boudou A, Ribeyre F. Mercury in the food web: accumulation and transfer mechanisms. Metal Ions Biol. Syst., 1997; 34:289-319

Bonacker D, Stoiber T, Wang M, Böhm KJ, Prots I, Unger E, et al. Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function. Arch Toxicol 2004; 78:575-83

Bradl, H., editor. Heavy Metals in the Environment: Origin, Interaction and Remediation Volume 6. London: **Academic Press**; 2002.

Brasil, A., Rocha, F.A., Gomes, B.D., Oliveira, K.R., de Carvalho, T.S., Batista, E.J., Borges, R.D., Kremers, J., Herculano, A.M. Diet enriched with the Amazon fruit açai (Euterpeoleraacea) prevents electrophysiological deficits and oxidative stress induced by methyl-mercury in the rat retina. **NutrNeurosci**. 2016.

Caito S, Zeng H, Aschner JL, Aschner M. Methylmercury alters the activities of Hsp90 client proteins, prostaglandin E synthase/p23 (PGES/23) and nNOS. **PLoS One**. 2014 May 22;9(5):e98161.

Caley, E. R. Mercury and its Compounds in Ancient Times. **Journal of Chemical Education** 1928, 5, 419. [CrossRef]

Cavaş, T. In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: Micronucleus test on acridine orange stained fish cells. **Food Chem Toxicol**. 2008;46 (1):352-8.

Clarkson, T.W. Molecular and ionic Mimicry of Toxic Metals. Annu, **Research Pharmacol. Toxicol.**, 1993; 32:545 -71.

Clarkson, T.W. The toxicology of mercury. **Crit Rev Clin Lab Sci.**,1997; 34:369–403.

Clarkson,T.W.; Mechanisms of Mercury Disposition in the Body; **American Journal of Industrial Medicine**, 2007. Vol. 50 (10): 757-764.

Costa-Malaquias A, Almeida M,B, Monteiro J.R.S, Macchi B.M, do Nascimento J.L.M, Crespo-LopezM.E. Morphine Protects against Methylmercury Intoxication: A Role for Opioid Receptors in Oxidative Stress? **PLoS One**. 2014; 9(10): e110815.

Crespo-López ME, Lima de Sá A, Herculano AM, Rodríguez Burbano R, Martins do Nascimento JL. Methylmercury genotoxicity: a novel effect in human cell lines of the central nervous system. **Environ Int**. 2007 Feb;33(2):141-6.

Crespo-López, M.E.,Macêdo, G.L., Pereira, S.I., Arrifano, G.P., Picanço-Diniz, D.L., do Nascimento, J.L., Herculano, A.M. Mercury and human genotoxicity: critical considerations and possible molecular mechanisms. **Pharmacol Res**. 2009; 60(4):212-20.

Crespo-López, M.E., Macêdo, G.L., Arrifano, G.P., Pinheiro, Mda, C., do Nascimento, J.L., Herculano, A.M. Genotoxicity of mercury: contributing for the analysis of Amazonian populations. **Environ Int.** **2011**;37(1):136-41.

Cui Y, McBride SJ, Boyd WA, Alper S, Freedman JH. Toxicogenomic analysis of *Caenorhabditis elegans* reveals novel genes and pathways involved in the resistance to cadmium toxicity. *Genome Biol.*;8(6):R122, 2007.

Damas, G.B.; Bertoldo, B.; Costa, L.T. Mercúrio: da antiguidade aos dias atuais. **Rev. Virtual Quim.**, **2014**, 6 (4), 1010-1020.

D'Itri, P.A; D'Itri, F.M. Mercury contamination: A human tragedy. **Environmental Management January 1978**, Volume 2, Issue 1, pp 3-16

De Flora, S.,Bennicelli, C., Bagnasco, M. Genotoxicity of mercury compounds. A review. **Mutat Res.** **1994** Feb;317(1):57-79.

Do Nascimento, J.L., Oliveira, K.R., Crespo-Lopez, M.E., Macchi, B.M., Maués, L.A., Pinheiro, M.C., Silveira, L.C., Herculano, A.M. Methylmercury neurotoxicity & antioxidante defenses. **Indian J Med Res.** **2008** Oct;128(4):373-82.

Dolbec, J., Mergler, D., Larribe, F., Roulet, M., Lebel, J., Lucotte, M. Sequential analysis of hair mercury levels in relation to fish diet of an Amazonian population, Brazil. **Sci. Total Environ.** **2001**; 271 (1–3), 87–97.

Dyall-Smith, D.J.; Scurry, J.P. Mercury pigmentation and high mercury levels from the use of a cosmetic cream. **Med. J. Aust.** **1990**, 153, 409–415

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. **EFSA Journal** **2012**; 10(12):2985.[241pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2985. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal

Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. Toxicmetals and oxidative stress. Part I: Mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. **Curr Top Med Chem** **2001**;1:529–39

González-Duarte P. Metallothioneins. In: McCleverty J, Meyer TJ, editors. Comprehensive coordination chemistry II. **Amsterdam: Elsevier-Pergamon; 2003**; 8 : 213-28.

Gochfeld, M. Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. **Ecotoxicol Environ Saf.** **2003**. Sep;56(1):174-9.

Graeme, K. A. and Pollock Jr., C. V. Heavy metal toxicity, part I: arsenic and mercury. **The Journal of Emergency Medicine**, 1998; Vol 16, No 1, pp 45–56.

Hacon, S., Barrocas, P.R., Vasconcellos, A.C., Barcellos, C., Wasserman, J.C., Campos, R.C., Ribeiro, C., Azevedo-Carlioni, F.B. An overview of mercury contamination research in the Amazon basin with an emphasis on Brazil. **Cad Saude Publica**. 2008 Jul;24(7):1479-92.

Hachiya, N. Methylmercury Poisoning in Japan Caused by Environmental Pollution. **JMAJ**, 2006; 49(3): 112-118.

Harada M. Minamata Disease: Methylmercury Poisoning in Japan Caused by Environmental Pollution. **Crit Rev Toxicol**. 1995;25(1):1-24.

Herculano AM, Crespo-López ME, Lima SM, Picanço-Diniz DL, Do Nascimento JL. Methylmercury intoxication activates nitric oxide synthase in chick retinal cell culture. **Braz J Med Biol Res**. 2006; 39(3):415-8.

Hidalgo J, Aschner M, Zatta P, Vasák M. Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. **Brain Res Bull** 2001; 55 : 133-45.

Hong, Y.S., Kim, Y.M., Lee, K.E. Methylmercury exposure and health effects. **J Prev Med Public Health**. 2012.

Hultberg, B.; Andesson, A.; Isaksson, A. Interaction of metals and thiols in cell damage and glutathione distribution: potentiation of mercury toxicity by dithiothreitol. **Tox**. 2001, 156,93-100.

Hsu-Kim, H., Kucharzyk, K.H., Zhang, T., Deshusses, M.A. Mechanisms Regulating Mercury Bioavailability for Methylating Microorganisms in the Aquatic Environment: A Critical Review. **Environ. Sci. Technol**. 2013, 47, 2441–2456.

Hwang, G.W. Role of intracellular defense factors against methylmercury toxicity. **Biol Pharm Bull**. 2012;35(11):1881-4.

Kanematsu, N., Hara, M., Kada, T. Rec assay and mutagenicity studies on metal compounds. **Mutat Res**. 1980 Feb;77(2):109-16.

Kehrig Hdo A, Howard BM, Malm O. Methylmercury in a predatory fish (*Cichla* spp.) inhabiting the Brazilian Amazon. **Environ Pollut** 2008;154:68–76.

Kimura Y, Kimura H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. **FASEB J.** **2004**, 18, 1165–1167.

Lacerda, L.D., De Souza, M., Ribeiro, M.G. The effects of land use change on mercury distribution in soils of Alta Floresta, Southern Amazon. **Environ Pollut.** **2004** May;129(2):247-55.

Lebel, J.; Mergler, D.; Branches, F.; Luccote, M.; Amorin, L.F and Dolbec, J. Neurotoxic effects of low-level methylmercury contamination in the amazon basin. **Enviromental research**, **1998**;79: 20-32.

Leão, L.K.,Herculano, A.M., Maximino, C., Costa, A.B., Gouveia, A. Jr., Batista, E.O., Rocha, F.F., Crespo-Lopez, M.E., Borges, R., Oliveira, K. Mauritiaflexuosa L. protects against deficits in memory acquisition and oxidative stress in rat hippocampus induced by methylmercury exposure.**NutrNeurosci.** **2016.**

Lin, C.-C.; Yee, N.; Barkay, T. Microbial transformations in the mercury cycle. In Environmental Chemistry and Toxicology of Mercury; **John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, 2012**; pp 155–191.

Lindberg S, Bullock R, Ebinghaus R, Engstrom D, Feng X, Fitzgerald W, Pirrone N, Prestbo E, Seigneur C. A synthesis of progress and uncertainties in attributing the sources of mercury in deposition. **Ambio 2007**, 36 (1), 19–32.

Lohren H, Blagojevic L, Fitkau R, Ebert F, Schildknecht S, Leist M, Schwerdtle T. Toxicity of organic and inorganic mercury species in differentiated human neurons and human astrocytes. **J Trace Elem Med Biol.** **2015**;32:200-8

Malm, O. Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon. **Environ Res.** **1998** May;77(2):73-8.

Malm O, Pfeiffer WC, Souza CMM, Reuther R. Mercury pollution due to gold mining in the Madeira River Basin, Brazil. **Ambio 1990**; 19:11-5.

Malm, O., Branches, F.J., Akagi, H., Castro, M.B., Pfeiffer, W.C., Harada, M., Bastos, W.R., Kato, H. Mercury and methylmercury in fish and human hair from the Tapajós river basin, Brazil. **SciTotal Environ.** **1995** Dec 11;175(2):141-50.

Maximino C, Araujo J, Leão LK, Grisolia AB, Oliveira KR, Lima MG, Batista Ede J, Crespo-López ME, Gouveia A Jr, Herculano AM. Possible role of serotonergic system in the neurobehavioral impairment induced by acute methylmercury exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicol Teratol.* **2011** Nov-Dec;33(6):727-34.

Micaroni, R.C.M., Silveira Bueno, M.I.M., Jardim, W.F. compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. *Química nova*, 23(4) (2000).

Miura, K., K. Suzuki and N. Imura. Effect of methylmercury on mitotic mouse glioma cells, *Environ. Res.* **1978**,17, 453-471.

Miura K, Inokawa M, Imura N. Effects of methylmercury and some metal ions on microtubule networks in mouse glioma cells and in vitro tubulin polymerization. *ToxicolApplPharmacol* **1984**; 73: 218-31.

Morel, F. M.; Kraepiel, A.M.L.; Amyot, M. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annual reviews in ecology and systematics*, **1998**; 29, 543-566 pp.

Morimoto RI, Santoro MG. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nat. Biotechnol.***1998**, 16, 833–838.

Morimoto, K., S. Iijima and A. Koizumi. Selenite prevents the induction of sister-chromatid exchanges by methyl mercury and mercuric chloride in human whole-blood cultures, *Mutation Res.* **1982**, 102, 183-192.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* **1983** Dec 16;65(1-2):55-63.

Moore JW, Ramamoorthy S. Heavy metals in natural waters. **New York: Springer-Verlag; 1984.** p. 125–60.

Naruse, I., Matsumoto, N., Kajiwara, Y. Toxicokinetics of methylmercury and mercuric chloride in mouse embryos in vitro. *Bull Environ Contam Toxicol.* **1991** Nov;47(5):689-95.

Nielsen, J.B., Andersen, O. Oral mercuric chloride exposure in mice: effects of dose on intestinal absorption and relative organ distribution. *Toxicology.* **1989** Nov;59(1):1-10.

Nriagu, J.O. A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature*, **1989**; 338, 47 – 49.

- Offit, P.A.** Thimerosal and Vaccines — A Cautionary Tale. *N Engl J Med*, **2007**; 357;13.
- Passos CJ**, Mergler D, Fillion M, Lemire M, Mertens F, Guimarães JR, Philibert A. Epidemiologic confirmation that fruit consumption influences mercury exposure in riparian communities in the Brazilian Amazon. *Environ Res*. **2007** Oct;105(2):183-93.
- Pacyna, E.G.;**Pacyna J.M., Sundseth, K., Munthe, J., Kindbom, K, Wilson, S., Steenhuisen, F., Maxson, P. Global emission of mercury to the atmosphere from anthropogenic sources in 2005 and projections to 2020. *Atmospheric Environment*, **2010**; 44 :2487–2499.
- Pieper, I.**, Wehe, C.A., Bornhorst, J., Ebert, F., Leffers, L., Holtkamp, M., Hösel, P., Weber, T., Mangerich, A., Bürkle, A., Karst, U., Schwerdtle, T. Mechanisms of Hg species induced toxicity in cultured human astrocytes: genotoxicity and DNA-damage response. *Metallomics*. **2014** Mar;6(3):662-71.
- Pinheiro MC**, Farripas SS, Oikawa T, Costa CA, Amoras WW, Vieira JL, Silveira AJ, Lima AC, Souza GS, Silveira LC. Temporal evolution of exposure to mercury in riverside communities in the Tapajós basin, from 1994 to 2010. *Bull Environ Contam Toxicol*. **2012** Jul;89(1):119-24
- Piscator M.** On cadmium in normal human kidneys with a report on the isolation of metallothioneine from cadmium-exposed rabbit livers. *Nord HygTidskr*. **1964**;45:76-82.
- Pletz J**, Sánchez-Bayo F, Tennekens HA. Dose-response analysis indicating time-dependent neurotoxicity caused by organic and inorganic mercury-Implications for toxic effects in the developing brain. *Toxicology*. **2016**; 10;347-349:1-5.
- Pouilly, M.**, Rejas, D., Pérez, T., Duprey, J.L., Molina, C.I., Hubas, C., Guimarães, J.R. Trophic structure and mercury biomagnification in tropical fish assemblages, Iténez River, Bolivia. *PLoS One*. **2013** May 31;8(5):e65054.
- Puty, B.**, Maximino, C., Brasil, A., da Silva, W.L., Gouveia, A. Jr., Oliveira, K.R., Batista, E. J., Crespo-Lopez, M.E., Rocha, F.A., Herculano, A.M. Ascorbic acid protects against angiogenic-like effect induced by methylmercury in zebrafish: action on the serotonergic system. *Zebrafish*. **2014** Aug;11(4):365-70.

Rising L, Vitarella D, Kimelberg HK, Aschner M. Metallothionein induction in neonatal rat primary astrocyte cultures protects against methylmercury cytotoxicity. **J Neurochem** **1995**; 65: 1562-8.

Roulet, M. and Lucotte, M. Geochemistry of mercury in pristine and flooded ferralitic soils of a tropical rain forest in French Guiana, South America. **Water, Air, and Soil Pollution**, **1995**; 80: 1079-1088.

Rocha, A. Cádmio, Chumbo, Mercúrio – A problemática destes metais pesados na Saúde Pública? Dissertação Curso de Ciências da Nutrição, 2009.

Santos, B.A. Recursos minerais da Amazônia. **Estudos avançados**, **2002**; 16 (45).

Santos, E.C., Jesus, I.M., Brabo, E.S., Loureiro, E.C., Mascarenhas, A.F., Weirich, J., Câmara, V.M., Cleary, D. Mercury exposures in riverside Amazon communities in Pará, Brazil. **Environ Res.** **2000** Oct;84(2):100-7.

Sager PR, Doherty RA, Olmsted JB. Interaction of methylmercury with microtubules in cultured cells and in vitro. **Exp Cell Res** **1983**; 146 : 127-37.

Sarafian, T.A., Bredesen, D.E. and Verity, M.A. Cellular resistance to Methylmercury. **Neurotoxicology**, **1996**; **17**: 27-36.

Schramm, M., Bhrens, A., Braunbeck, T., Eckwert, H., Köler, H.R., Konradt, J. Müller, E., Pawert, M., Schwaiger, J., Segner, h., Triebkorn, R. Cellular, histological and biochemical biomarkers. **Environmental science**; **1996**;16: 33-64.

Schroeder, W.H. and Munthes, J. Atmospheric mercury-an overview. **Atmospheric Env.** **1998**; Vol.32, No 5, pp. 809.822.

Schurz, F., Sabater-Vilar, M., Fink-Gremmels, J. Mutagenicity of mercury chloride and mechanisms of cellular defence: the role of metal-binding proteins. **Mutagenesis.** **2000** Nov;15(6):525-30.

Silva-Pereira, L.C., Cardoso, P.C., Leite, D.S., Bahia, M.O., Bastos, W.R., Smith, M.A., Burbano, R.R. Cytotoxicity and genotoxicity of low doses of mercury chloride and methylmercury chloride on human lymphocytes in vitro. **Braz J Med Biol Res.** **2005** Jun;38(6):901-7.

Shanker G and Aschner M. Identification and characterization of uptake systems for cystine and cysteine in cultured astrocyte and neurons: evidence for methylmercury-targeted disruption of astrocyte transport. *J Neurosci Res* 66(5):998-1002, **2001**.

Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* **1995**;18:321–36.

Stoiber T, Bonacker D, Böhm KJ, Bolt HM, Thier R, Degen G, et al. Disturbed microtubule function and induction of micronuclei by chelate complexes of mercury (II). *Mutat Res* **2004**; 563:97–106.

Stoiber T, Bonacker D, Böhm KJ, Bolt M, Their R, Degen G, et al. Disturbed microtubule function and induction of micronuclei by chelate complexes of mercury (II). *Mutat Res* **2004**; 563 : 97-106.

Syversen T e Kaur P. The toxicology of mercury and its compounds. *Trace Elements in Medicine and Biology.* **2012**; **215– 226**.

Toyama T, Sumi D, Shinkai Y, Yasutake A, Taguchi K, Tong KI, Yamamoto M, Kumagai Y. Cytoprotective role of Nrf2/Keap1 system in methylmercury toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**,363, 645–650.

Tchounwou, P.B., Ayensu, W.K., Ninashvili, N., Sutton, D. Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. *Environ. Toxicol.* **2003**; 18: 149–175.

Xie Y, Bergström T, Jiang Y, Johansson P, Marinescu VD, Lindberg N, Segerman A, Wicher G, Niklasson M, Baskaran S, Sreedharan S, Everlien I, Kastemar M, Hermansson A, Elfineh L, Libard S, Holland EC, Hesselager G, Alafuzoff I, Westermark B, Nelander S, Forsberg- Nilsson K, Uhrbom L. The Human Glioblastoma Cell Culture Resource: Validated Cell Models Representing All Molecular Subtypes. *EBioMedicine.* 15;2(10):1351-63, 2015.

Yee S, Choi BH. Oxidative stress in neurotoxic effects of methylmercury poisoning. *Neurotoxicology* **1996**; 17:17–26.

Wasserman JC., Hacon, S.S., Wasserman, M.A. Mercury speciation in sediments of a tropical coastal environment. *Mundo&Vida* vol.2 (1/2) **2001**.

Wasserman, 2002. Mercury speciation in sediments of a tropical coastal environment. **Environ Technol.** 2002 Aug;23(8):899-910.

Wasserman JC, Hacon S, Wasserman MA. Biogeochemistry of mercury in the Amazonian environment. **Ambio** 2003; 32:336-42.

Weldon, M.M., Smolinsk, M.S., Maroufi, A., Hasty, B.W., Gillis, D.L., Boulanger, L.L., Balluz, S.L., Dutton, R. Mercury poisoning associated with a Mexican beauty cream. **West J Med** 2000; 173:15-18.

Wellington K. Ayensu, and Paul B. Tchounwou. Microarray Analysis of Mercury-Induced Changes in Gene Expression in Human Liver Carcinoma (HepG2) Cells: Importance in Immune Responses. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, 3(2), 141-173, 2006.

WHO, 2003. Elemental mercury and inorganic mercury compounds: human health aspects. Concise International Chemical Assessment Document 50.

Zambrano, B. Consideraciones generales sobre el mercurio, el timerosal, y su uso en vacunas pediátricas. **RevMedUruguay** 2004; 20: 4-11.