



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

AILIN CASTELO BRANCO

**EFEITO DO METILMERCÚRIO EM GIRINOS E RECÉM-
METAMORFOSEADOS DE *Physalaemus ephippifer* (STEINDACHNER, 1864)
(ANURA, LEPTODACTYLIDAE)**

**BELÉM-PA
2016**

AILIN CASTELO BRANCO

**EFEITO DO METILMERCÚRIO EM GIRINOS E RECÉM-
METAMORFOSEADOS DE *Physalaemus ephippifer* (STEINDACHNER, 1864)
(ANURA, LEPTODACTYLIDAE)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará para a obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia celular.

Área de concentração: Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Oliveira Bahia.

Co-orientadora: Profa. Dra. Verônica Regina Lobato de Oliveira Bahia.

**BELÉM-PA
2016**

Dados Internacionais de Catalogação- na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Castelo Branco, Ailin

Efeito do metilmercúrio em girinos e recém-metamorfoseados de *Physalaemus ephippifer* (Steindachner, 1864) (anura, leptodactylidae) / Ailin Castelo Branco ; Orientador, Marcelo Oliveria Bahia ; Co-orientadora, Verônica Regina Lobato de Oliveira Bahia. - 2016.

77 f. : il.

Inclui bibliografia

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2016.

1. Anfíbios. 2. Sistema nervoso central . 3. Locomoção animal. 4. Metilmercúrio – contaminação. I. Bahia, Marcelo Oliveira, orientador. II. Bahia, Verônica Regina Lobato de Oliveira. III. Título.

CDD – 22 ed. 597.875

AILIN CASTELO BRANCO

**EFEITO DO METILMERCÚRIO EM GIRINOS E RECÉM-
METAMORFOSEADOS DE *Physalaemus ephippifer* (STEINDACHNER, 1864)
(ANURA, LEPTODACTYLIDAE)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará para a obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia celular.
Área de concentração: Biologia celular

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia. ORIENTADOR
Instituto de Ciências Biológicas – ICB – UFPA

Avaliadora: Profa. Dra. Maria Auxiliadora Pantoja Ferreira.
Instituto de Ciências Biológicas – ICB – UFPA

Avaliador: Prof. Dr. Carlos Alberto Machado da Rocha.
Instituto Federal do Pará – IFPA

Suplente: Profa. Dra. Adriana Guimarães.
Instituto de Ciências Biológicas – ICB – UFPA

EPÍGRAFE

Se tivésseis fé como um grão de mostarda, diríeis a esta montanha: Transporta-te daqui para ali, e ela se transportaria, e nada vos seria impossível.

(São Mateus, cap. XVII)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à professora Verônica de Oliveira-Bahia, por tanto apoio, dedicação, compromisso e acima de tudo por acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

Ao meu adorado Deus e a todas as maravilhosas pessoas que amo, pois são o meu amparo e o sentido da minha vida, minha eterna gratidão.

Minha gratidão a todos as pessoas amigas que de alguma forma ajudaram e contribuíram na realização desse projeto.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1. 1 MERCÚRIO	14
1. 1. 1 CICLO BIOGEOQUÍMICO DO MERCÚRIO	14
1. 1. 2 BIOACUMULAÇÃO, BIOMAGNIFICAÇÃO E TOXIDINÂMICA	15
1. 2 MERCÚRIO NA AMAZÔNIA	18
1. 3 INTOXICAÇÃO MERCURIAL EM ANFÍBIOS	19
2 JUSTIFICATIVA	22
3 OBJETIVOS	24
3.1 GERAL	24
3.2 ESPECÍFICOS	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4. 1 CRIAÇÃO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS	25
4. 2 ENSAIO TOXICOLÓGICO EM GIRINOS	26
4. 3 DESEMPENHO FISIOLÓGICO	27
4. 3. 1 Girinos G30 a G40	27
4. 3. 2 Recém-metamorfoseados G45 e G46	28
4. 4 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS	28
4. 4. 1 Girinos G30 a G40	28
4. 4. 2 Recém-metamorfoseados G45 e G46	29
4. 5 ANÁLISE HISTOLÓGICA	30
4. 5. 1 MICROSCOPIA DE LUZ	30
4. 5. 1. 1 A técnica de microscopia de luz	30
4. 5. 1. 2 Análises morfológicas de microscopia de luz	30
4. 5. 2 Microscopia eletrônica de varredura	31
4. 6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	31
5 RESULTADOS	32
5.1. TEMPO DE DESENVOLVIMENTO E OCORRÊNCIA TERATOGENICA EM <i>P. ephippifer</i> EXPOSTO AO MeHg	32
5. 2. ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS DE <i>P. ephippifer</i> APÓS EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA AO MeHg	34
5. 2. 1 Desempenho locomotor dos girinos	34

5. 2. 2 Desempenho locomotor dos recém-metamorfoseados	35
5. 3 ALTERAÇÕES MORFOMÉTRICAS EM <i>P. ehippifer</i> APÓS EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA AO MeHg	37
5. 3. 1 Morfometria dos girinos	37
5. 3. 2 Morfometria dos recém-metamorfoseados	38
5. 4. ANÁLISE HISTOLÓGICA DE GIRINOS E RECÉM-METAMORFOSEADOS DE <i>P. ehippifer</i> EXPOSTOS AO MeHg NO ENSAIO TOXICOLÓGICO	39
5. 4. 1 Encéfalo de <i>P. ehippifer</i>	39
5. 4. 2 Retina de <i>P. ehippifer</i>	47
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO	60
8 REFERÊNCIAS	61
ANEXO A	72
ANEXO B	75
ANEXO C	77

RESUMO

A contaminação por metais em anfíbios tem sido levada em consideração como um dos fatores que contribui para o declínio populacional desses animais. O mercúrio (Hg) é um contaminante ambiental que apresenta altos níveis de toxicidade. A sua forma orgânica, o metilmercúrio (MeHg), pode ser bioacumulável alcançando níveis elevados na cadeia trófica. Para as populações de anfíbios, a bioacumulação de metais se torna importante, pois esses animais podem ser difusores de MeHg do ambiente aquático para o ambiente terrestre devido ao seu ciclo de vida duplo. Concentrações de MeHg em altas doses podem provocar óbvios efeitos letárgicos e a mortalidade da larva do anfíbio, porém as dúvidas se desvelam em buscar conhecimentos quanto aos efeitos das doses sub-crônicas do MeHg. Portanto, a presente pesquisa tem por objetivo explorar os efeitos da exposição subcrônica do MeHg em um modelo experimental, a espécie *Physalaemus ephippifer*, descrevendo, identificando e caracterizando as possíveis alterações no desempenho físico das larvas e dos recém-metamorfoseados, além de alterações teratogênicas e alterações morfológicas no sistema nervoso e sensorial. Após o ensaio toxicológico, nas concentrações de 0,007 µg/ml, 0,004 µg/ml, 0,0007 µg/ml e 0,0004 µg/ml e controle negativo, os animais foram analisados pelo emprego das técnicas de análise comportamental simulando fuga predatória, análises morfométricas e análises de microscopia de luz e eletrônica de varredura. A pesquisa revelou que as concentrações utilizadas não provocam debilidades locomotoras nos girinos e nem danos morfológicos anatômicos aparentes, porém, levam ao aparecimento de uma massiva quantidade de células com núcleos picnóticos nas áreas do cerebelo e *tectum* óptico. Tal alteração, que se mantém no indivíduo mesmo depois da metamorfose, leva a uma debilidade locomotora na concentração de 0,007 µg/ml, no qual é também a concentração em que se observa um aumento da incidência de danos teratogênicos (má formação da córnea). Dessa maneira, concluiu-se que o MeHg é um agente neurotóxico e teratogênico para *P. ephippifer* e que tais características levam a um decréscimo na performance locomotora. O presente trabalho pode fornecer subsídios para a compreensão da ação do MeHg nas populações de anfíbios que convivem em ambientes em que este contaminante está presente como integrante do ecossistema.

Palavras-chave: anfíbios, sistema nervoso central, núcleos picnóticos, debilidade locomotora e teratogênese.

ABSTRACT

The metal contamination in amphibians has been taken into account as one of the factors contributing to the population decline of these animals. The mercury (Hg) is an environmental contaminant showing high levels of toxicity. Its organic form, methylmercury (MeHg), may bioaccumulate reaching high levels in the trophic chain. For amphibian populations, bioaccumulation of metals is important once that such animals may be MeHg diffusers from the aquatic environment to the terrestrial environment because of their double life cycle. MeHg concentrations in high doses can cause obvious lethargic effects and larvae mortality of amphibians, however little is known about subchronic effects of MeHg doses. Therefore, the present research aims to explore the effects of subchronic exposure to MeHg in one experimental model, the species *Physalaemus ephippifer*, describing, identifying and characterizing the possible changes in physical performance of larvae and newly metamorphosed, in addition to teratogenic and morphological changes in the sensory and nervous system. After the toxicological test, with MeHg concentrations of 0.007 µg/ml, 0.004 µg/ml 0.0007 µg/ml and 0.0004 µg / ml and negative control, the animals were assessed by behavioral analysis simulating breakout predatory, morphometric and analysis in light microscopy and scanning electron microscopy. Our results revealed that MeHg concentrations did not induce locomotor weaknesses in tadpoles and nor apparent anatomical morphological damage, however, it induces the appearance of a massive cell count of pyknotic nuclei in the areas of the cerebellum and optic *tectum*. Such alteration, which remains in the animal even after metamorphosis, induces a locomotor weakness in concentration of 0,007µg/ml which is also the concentration where one increased teratogenic damage effect (corneal malformation) is observed. Therefore, we conclude that MeHg is a neurotoxic and teratogenic agent for *P. ephippifer* and that such features lead to one decrease in locomotor performance. The present work may contribute to the knowledge on effect of MeHg in amphibian populations that live in environments where this contaminant is present as member of the ecosystem.

Key-works: amphibious, central nervous system, pyknotic nuclei, locomotor weakness and teratogenic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo biogeoquímico do mercúrio.....	16
Figura 2 - Processo de bioacumulação e biomagnificação do MeHg na cadeia trófica terrestre e aquática através dos anfíbios.....	20
Figura 3 – A: Distribuição da espécie B: adulto de <i>P. ephippifer</i>	23
Figura 4 – Coleta e criação das posturas <i>P. ephippifer</i>	25
Figura 5 – Medidas morfométricas do girino.....	29
Figura 6 – Medidas morfométricas do recém-metamorfoseado.....	29
Figura 7 – Alterações na formação dos dedos de girinos de <i>P. ephippifer</i> exposto a concentrações crescentes de MeHg.....	32
Figura 8 – Alterações nas fileiras dos denticulos labiais de girinos de <i>P. ephippifer</i> exposto a concentrações crescentes de MeHg.....	33
Figura 9 – Alterações na córnea em recém-metamorfoseados de <i>P. ephippifer</i> exposto a concentrações crescentes de MeHg.....	34
Figura 10 – Alterações da formação dos dedos de recém-metamorfoseados de <i>P. ephippifer</i> exposto a concentrações crescentes de MeHg.....	34
Figura 11 - O número de saltos executados pelos recém-metamorfoseados tratados em concentrações diferentes de metilmercúrio (ANOVA $F_{4, 108}=0.923$; $P=0.453$).....	35
Figura 12 - Média do espaço total percorrido pelos recém-metamorfoseados do ensaio toxicológico de MeHg ao longo da simulação de fuga predatória (ANOVA $F_{4,105} = 2,4379$ $P = 0,0508$).....	36
Figura 13 – Média da distância dos saltos dos recém-metamorfoseados do ensaio toxicológico de MeHg ao longo da simulação de fuga predatória (Kruskal Wallis $H_{4,3.164} = 76,128$ $P <0,001$). Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (pós-teste Dunn).....	36
Figura 14 – Encéfalo de <i>P. ephippifer</i> em estágio G46.....	39
Figura 15 – Fotomicrografias do encéfalo de <i>P. ephippifer</i> em estágio G46.....	40
Figura 16 – Fotomicrografias de área do <i>tectum</i> óptico de girinos dos diferentes tratamentos de exposição ao MeHg.....	42
Figura 17 – Fotomicrografias da área do <i>tectum</i> óptico de recém-metamorfoseados dos diferentes tratamentos de exposição ao MeHg.....	43

Figura 18 – Fotomicrografias da área do cerebelo de girinos dos diferentes tratamentos de exposição ao MeHg.....	45
Figura 19 – Fotomicrografias da área do cerebelo de recém-metamorfoseados dos diferentes tratamentos de exposição ao MeHg.....	46
Figura 20 – Retina de <i>P. ephippifer</i>	48
Figura 21 – Micrografias de retina de girinos dos diferentes tratamentos do ensaio toxicológico ao MeHg.....	50
Figura 22 – Micrografias da retina de recém-metamorfoseados dos diferentes tratamentos do ensaio toxicológico ao MeHg.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – O ensaio toxicológico realizado em 3 replicatas.....	27
Tabela 2 – Monitoramento de condições experimentas do ensaio toxicológico....	27
Tabela 3 – Tempo em dias da ocorrência da primeira metamorfose.....	32
Tabela 4 – Médias da velocidade, distância percorrida e velocidade alcançada no primeiro estímulo dos girinos nos testes de desempenho físico de fuga natatória. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (pós-teste Dunn).....	35
Tabela 5 – Registros morfométricos dos girinos (mm) expostos ao MeHg (µg/ml). Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (pós-teste Tukey).....	37
Tabela 6 – Registros morfométricos dos recém-metamorfoseados (mm) expostos ao MeHg (µg/ml).....	38
Tabela 7 - Média de células com núcleos picnóticos e células de Purkinge no cerebelo de recém-metamorfoseados de <i>P. ephippifer</i> exposto ao ensaio toxicológico de MeHg. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (pós-teste Dunn).....	47
Tabela 8 : Medidas da largura total e das camadas de celulares da retina. Letras desiguais demonstram diferenças significativas. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (pós-teste Dunn).....	49

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas vêm se discutindo o declínio da população de anfíbios no mundo todo (LEFCORT et al., 1998; SILVANO & SEGALA, 2005; STUART et al., 2004; TOLEDO et al., 2010). Este cenário tem sido associado a vários fatores que vem interferindo nas condições físico química do ambiente aquático e terrestre que são: aumento na radiação ultra-violeta, chuva ácida, destruição e fragmentação do hábitat, contaminação do ambiente, introdução de espécies invasoras, comércio ilegal de animais silvestres e doenças causadas por fungos (GREEN, 1997; LEFCORT et al., 1998; SILVANO & SEGALA, 2005).

Em se tratando do declínio global da população de anfíbios todos os fatores acima citados somam 48%, cerca de 52% permanecem desconhecidos. Neste contexto destaca-se a contaminação por metais pesados como um dos fatores que contribui para a diminuição destas populações. Assim, estudos foram realizados correlacionando a sensibilidade dos anfíbios com a contaminação por metais como chumbo, arsênico, cádmio, manganês e mercúrio (BANK et al., 2007; BLAUSTEIN et al., 2015; LEFCORT et al., 1998; UNRINE et al., 2004, 2005).

Esses metais podem ser encontrados naturalmente no ambiente e por ação antropogênica sob duas formas a inorgânica e a orgânica, e de acordo com seu grau de toxicidade pode ser prejudicial a biota animal (COSTA et al., 2006). No ambiente esses metais podem combinar com outros elementos, e através de uma ciclagem, formar compostos que podem se depositar em corpos d'água e sofrer biotransformação estando disponíveis para bioacumulação e contaminação de solos, rios e toda a biota associada (BAIRD, 2008).

Para as populações de anfíbios, que possuem um ciclo de vida com uma fase aquática e outra terrestre, a bioacumulação de metais pesados se torna importante, pois esses animais podem acumular os metais do meio aquático, enquanto são larvas, e transportá-los para o meio terrestre, na sua fase adulta disponibilizando este contaminante para cadeia trófica terrestre (BANK et al., 2007; BURKE et al., 2010). Além do mais, a contaminação por metais de rios, lagos e corpos d'água, em geral, influencia diretamente adultos e larvas que necessitam desse hábitat para reprodução, desenvolvimento e sobrevivência (BURKE et al., 2010).

Dentre os metais pesados, o que tem maior representatividade quanto a toxicidade é o mercúrio. A região Amazônica tem um histórico de presença mercurial

nos solos, em corpos d'água e, conseqüentemente, na própria biota associada (BASTOS & LACERDA, 2004). A Amazônia brasileira possui uma grande diversidade de anfíbios, distribuídos por diversos habitats aquáticos e terrestres e estão sujeitos a contaminação de mercúrio. A fase de embrião e da metamorfose são momentos críticos em que possivelmente as populações de anfíbios estão expostas a altas concentrações de mercúrio no ambiente e não são alvos de pesquisas na Região Amazônica.

Estudos que correlacionem a sensibilidade das populações de anfíbios ao mercúrio e seus possíveis efeitos podem ser ferramentas para projetos de conservação e manejo das espécies, devido ao reconhecimento das alterações na composição, distribuição, riqueza e abundância da anurofauna. Além disso, podem auxiliar na identificação de espécies potencialmente bioindicadoras, nas possíveis alterações morfofuncionais e no monitoramento das fontes de poluição às quais tais espécies estão expostas.

1. 1 MERCÚRIO

1. 1. 1 CICLO BIGEOQUÍMICO

O mercúrio (Hg) é um elemento químico que ocorre no solo e é liberado da crosta terrestre, por ação de erupção vulcânica, por processos de mineração, desmatamento, queimadas e queima de combustível fóssil (PASSOS & MERGLER, 2008). É um contaminante ambiental que desencadeia grande preocupação ecológica a nível global, devido a sua ampla difusão em vários ambientes como solo, água, biota e atmosfera (LACERDA, 2007) e principalmente por ser o causador de vários efeitos tóxicos em animais e seres humanos (BURKE et al., 2010; GIBSON, 2006; WADA et al., 2011).

Naturalmente o mercúrio está presente sob duas formas, a orgânica e a inorgânica. Na forma orgânica, o mercúrio forma o composto chamado metilmercúrio (CH_3Hg) e o dimetilmercúrio ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$), onde o íon de mercúrio liga-se covalentemente ao radical carboxílico podendo bioacumular no ecossistema (MIRANDA et al., 2007; WIENER et al., 2003).

Na forma inorgânica encontra-se os íons Hg^0 , que é a forma simples ou elementar, o Hg^{1+} íon mercurioso, dímero de forma pouco estável nos sistemas naturais e o Hg^{2+} também chamado mercúrico ou mercúrio gasoso divalente ou reativo (MIRANDA et al., 2007; SISINNO & OLIVEIRA-FILHO, 2013; WIENER et al., 2003).

No ciclo biogeoquímico, o mercúrio inorgânico na sua forma simples (Hg^0) proveniente do solo e da água é volatilizado, chamado assim mercúrio elementar gasoso, e transportado globalmente (GIBSON, 2006). O vapor de mercúrio presente na atmosfera pode assim permanecer até ser convertido na forma solúvel (Hg^{+2}) retornando ao ambiente terrestre pelas águas da chuva (WASSERMAN et al., 2001).

Neste momento ocorrem duas importantes alterações químicas: o metal pode ser convertido novamente em vapor de mercúrio e retornar à atmosfera ou pode permanecer em contato com o solo ou água, estando disponível para ser “metilado” (MIRANDA et al., 2007) (Figura 1).

A metilação pode ocorrer por meio de duas vias: uma via biológica, através da ação de microorganismos metiladores presentes nos sedimentos do fundo do ambiente aquático (Figura 1) e uma via química ou fotoquímica, no qual ocorre a transferência de um grupamento metil na presença da radiação ultravioleta, conhecida como reação de transalquilação (MIRANDA et al., 2007).

O processo de metilação por via biótica pode ocorrer a partir da ação da coenzima metilcobalamina, presente em bactérias. Esta enzima é responsável por acrescentar um ou dois grupamentos metil (CH_3) ao mercúrio inorgânico (Hg^{2+}), transformando-o em mercúrio orgânico (CH_3Hg) (BISINOTI & JARDIM, 2004; MIRANDA et al., 2007). O mercúrio orgânico torna-se biodisponível, acumulando-se em torno da cadeia trófica e assim causando efeitos tóxicos ao organismo (BISINOTI & JARDIM, 2004).

1. 1. 2 BIOACUMULAÇÃO, BIOMAGNIFICAÇÃO E TOXICODINÂMICA

O mercúrio é um metal de grande interesse ambiental, pois está presente nos efluentes industriais e agrícolas, além disso, diversas regiões apresentam naturalmente concentrações relativamente elevadas do metal nos solos, como é o caso da Amazônia (BASTOS & LACERDA, 2004). Este metal na sua forma orgânica (metilmercúrio – MeHg) é capaz de bioacumular nos organismos e sofrer biomagnificação ao longo das cadeias tróficas (CANO, 2014; KEHRING & MALM, 2011; MARR & ROBERTSON, 2014; MIRANDA et al., 2007).

O metilmercúrio é bioacumulado em até um milhão de vezes ao longo da cadeia trófica aquática, desde a sua base (microorganismos e plâncton) até os organismos do topo (peixes predadores). Animais do topo da cadeia alimentar, como

peixes carnívoros, possuem uma concentração de metilmercúrio maior do que o ambiente ao seu redor, devido ao alto poder de biomagnificação do metilmercúrio.

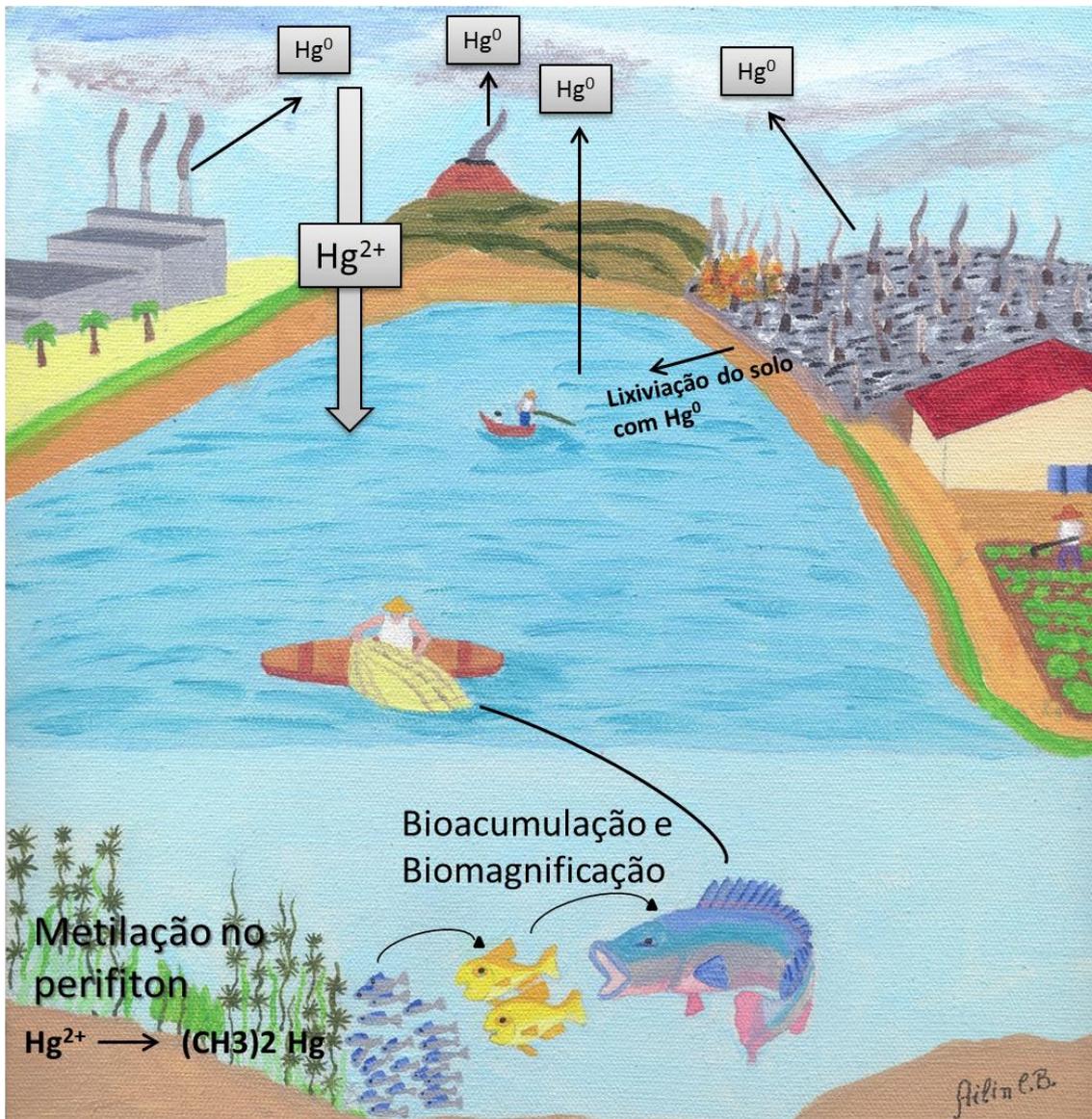


Figura 1. Ciclo biogeoquímico do mercúrio. Na sua forma elementar, o Hg^0 pode evaporar a partir de fontes como indústrias, erupções vulcânicas, queimadas, etc. Na atmosfera será convertido para sua forma solúvel Hg^{2+} que retornará pela água da chuva. O ambiente aquático pode ser contaminado tanto pelas águas da chuva quanto pelo processo de lixiviação do solo. A partir daí o metal pode seguir dois percursos: pode retornar a atmosfera por evaporação ou pode ser depositado no fundo dos rios e lagos. No sedimento, onde encontra-se o perifíton, ocorre o processo de metilação, pelo qual bactérias metiladoras vão transformar o Hg^{2+} solúvel em Hg orgânico, o metilmercúrio. O metilmercúrio torna-se dessa maneira disponível para bioacumulação na biota aquática, onde peixes maiores e de maior longevidade terão uma carga mercurial maior que peixes pequenos. Finalmente, o ser humano e animais piscívoros poderão bioacumular este metal (Fonte: acervo do autor).

Sendo assim, peixes carnívoros possuirão concentrações de metilmercúrio maior que peixes herbívoros, que por sua vez, possuem uma concentração maior do que seu alimento, ou seja, a comunidade microbiana associada ao sedimento (BASTOS & LACERDA, 2004; CANO, 2014; MARR & ROBERTSON, 2014; MIRANDA et al., 2007).

A bioacumulação do metilmercúrio ocorre devido a sua forte ligação com proteínas com radicais sulfidrilas (-SH) ou selenidrilas (SeH). Tal ligação forma complexos que circulam pela corrente sanguínea, permitindo uma melhor absorção e captação do contaminante pelos tecidos, o que levará a sua concentração máxima nos tecidos dos organismos aquáticos (BISINOTI & JARDIM, 2004; BITENCOURT, 2013; ROOS, 2011).

O mercúrio é listado atualmente como um dos metais de maior toxicidade para o homem e para os animais (SOUZA & SANTANA, 2013). E dentre as espécies mercuriais a que maior representa toxicidade é o metilmercúrio (BISINOTI & JARDIM, 2004; BONSIGNORE et al., 2013; CLARCKSON, 2002).

Para seres humanos, a principal fonte de contaminação de metilmercúrio é o consumo do pescado contaminado (LAMEIRÃO, 2008; ROOS et al., 2010; SANTOS et al., 2006). Em peixes, o metal é absorvido através do sistema digestório, assim alcançando a circulação sanguínea, onde circulará facilmente ligado a proteínas com resíduos de radicais sulfidrilas (-SH) ou selenidrilas (SeH) (BITENCOURT, 2013; CLARCKSON & STRAIN, 2003). A partir da sua conjugação com proteínas, o metilmercúrio é distribuído e depositado em vários tecidos e órgãos como rins, fígado, sangue, ossos e pulmões (BITENCOURT, 2013), chegando assim ao seu órgão alvo, o sistema nervoso central, podendo ser responsável por muitas alterações neurológicas (AZEVEDO et al., 2012) e permanecendo por longos períodos em níveis elevados, (CLARCKSON, 2002). Ao atravessar a barreira hematoencefálica, o metal pode ser acumulado em regiões do cerebelo, córtex cerebral e retina, podendo causar graves alterações (ZACHEU, 2009).

Os sintomas relatados por pessoas expostas ao MeHg são, principalmente, os sintomas relacionados a neurodegeneração. Tais casos de neurodegeneração podem ocorrer tanto por necrose quanto por apoptose celular, sendo o MeHg considerado responsável por causar os dois processos. Foi observado em cultura de células de ratos, por Castoldi et al. (2000), que as células cerebelares são sensíveis ao MeHg *in vitro*. Segundo esses autores, foram testadas altas doses do contaminante (5-10 µmol), além de

doses mais baixa (0,5-1 μmol). A alta dose causou um intenso dano mitocondrial, lise celular e resultou na necrose celular, enquanto que a exposição a dose mais baixa, apesar de inicialmente não comprometer a viabilidade celular nem o potencial de membrana mitocondrial, mostrou como resultado mais tardio o processo de apoptose celular.

O MeHg é considerado um agente mutagênico e genotóxico. Como efeito mutagênico, é capaz de inibir a formação do fuso mitótico, levando a uma distribuição anormal dos cromossomos resultando na formação de células poliploides ou aneuploides. Esta ação resulta da afinidade do metal pelos grupos sulfidrilas encontrados nas proteínas do fuso (CARDOSO et al., 2001).

Em relação à genotoxicidade, investigações com testes genotóxicos como o teste do micronúcleo e do cometa tem mostrado que o MeHg induz danos ao DNA em células de organismos aquáticos. Rocha (2009), em um estudo experimental com os peixes amazônicos *Colossoma macropomum* (tambaqui, onívoro) e *Aequidens tetramerus* (acará sela, peixe carnívoro) demonstrou que animais tratados com metilmercúrio apresentavam índice de dano ao DNA maior em relação aos animais não tratados. O autor também observou uma maior frequência de micronúcleos em animais tratados com metilmercúrio.

Apesar de o mecanismo genotóxico do metilmercúrio não estar perfeitamente elucidado, existem pesquisas que mostram que este metal pode influenciar a rede estrutural de microtúbulos, causando desarranjos na perfeita distribuição de cromossomos metafásicos ao longo do processo de divisão celular (CANO, 2014; ROCHA, 2009). O MeHg pode também estar envolvido com mecanismos moleculares de estresse oxidativo, pelo aumento na formação de espécies reativas (ROOS, 2011).

1.2 MERCÚRIO NA AMAZÔNIA

A região Amazônica possui uma elevada concentração de mercúrio em peixes, principalmente carnívoros (ROULET et al., 2001; WASSERMAN et al., 2001). Foram estudados por Brabo et. al. (1999) os níveis de mercúrio para peixes de diferentes espécies e hábitos alimentares. Os autores observaram que a concentração média de mercúrio nos peixes carnívoros foi de $0,293 \pm 0,104 \mu\text{g Hg/g}$, o que corresponde mais que o dobro da concentração encontrada em peixes não carnívoros, $0,112 \pm 0,036 \mu\text{g Hg/g}$. Entre as espécies carnívoras, as de maior preocupação foram as espécies de

tucunaré e traíra, por serem peixes com altas concentrações e serem consumidas pela população. Dentre as espécies não carnívoras, sobressaíram-se o jaraqui e o aracu, também de elevado consumo.

Estudos sobre o mercúrio nos rios e peixes Amazônicos demonstraram como hipótese, por um certo período, que este contaminante era proveniente da atmosfera, sendo esta considerada a maior via de transporte (WASSERMAN et al., 2001). No entanto, outra hipótese muito aceita foi a de ser proveniente da extração do ouro em áreas de garimpo a qual utiliza o mercúrio. Este metal residual é descartado nas margens e nos leitos dos rios, no solo, ou é lançado na atmosfera durante o processo de queima da amálgama (WASSERMAN et. al, 2001).

Atualmente a mineração decresceu em relação aos anos 80, porém a contaminação mercurial continua em índices elevados, dessa forma, as últimas descobertas tem proposto que o mercúrio que estaria contaminando os rios é proveniente do processo de lixiviação (COELHO-SOUZA et al., 2007) e erosão como foi demonstrado por Roulet et. al. (2001). Estes autores demonstraram que a erosão do solo é responsável pelo alta contaminação de Hg no ecossistema aquático do rio Tapajós. Foi proposto que cerca de 90% do mercúrio presente nos solos amazônicos é provenientes de origem natural (ROULET et al. 2001).

O mercúrio presente nos rios estaria dessa forma em condições favoráveis ao processo de metilação (OLIVEIRA et al., 2007). A alta concentração de mercúrio nos peixes amazônicos é explicado pelo processo de bioacumulação ao longo da cadeia trófica (WASSERMAN et al., 2001).

1.3 INTOXICAÇÃO MERCURIAL EM ANFÍBIOS

Assim como foi relatada a intoxicação mercurial em peixes (BERNTSSEN et al., 2003; LAMEIRÃO, 2008; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2002; ROCHA, 2009), aves (HEINZ & HOFFMAN, 1998) e mamíferos (AULERICH et al., 1974; NAGASHIMA, 1997; WREN et al., 1987;), os anfíbios também podem sofrer variados efeitos causados por poluentes como metilmercúrio. A contaminação por metais é uma das hipóteses pra explicar o declínio documentado mundialmente da população de anfíbios (UNRINE et al., 2004).

Com um ciclo de vida duplo, ou seja, parte terrestre e parte necessariamente aquática, os anfíbios apresentam várias vias de captação de poluentes da água, tanto na

sua fase adulta, mas principalmente na sua fase larval, fase esta na qual o indivíduo é completamente dependente do meio aquático para sua sobrevivência (BANK et al., 2007).

Os anfíbios constituem um grupo que pode ser útil como bioindicador de contaminantes metálicos, principalmente para aqueles ambientes aquáticos no qual não há peixes, pois são bioacumuladores e são animais com alta sensibilidade a ação de metais (HOTHEM & JENNINGS, 2010). Durante a fase larval, podem absorver contaminantes diluídos através da respiração branquial, pela própria permeabilidade cutânea e pela via da alimentação que é considerada por Unrine et al. (2004, 2007) a via mais significativa de exposição mercurial. Desta maneira, bioacumulando o MeHg, o metal será biomagnificado em cadeias tróficas e terrestres (Figura 2).

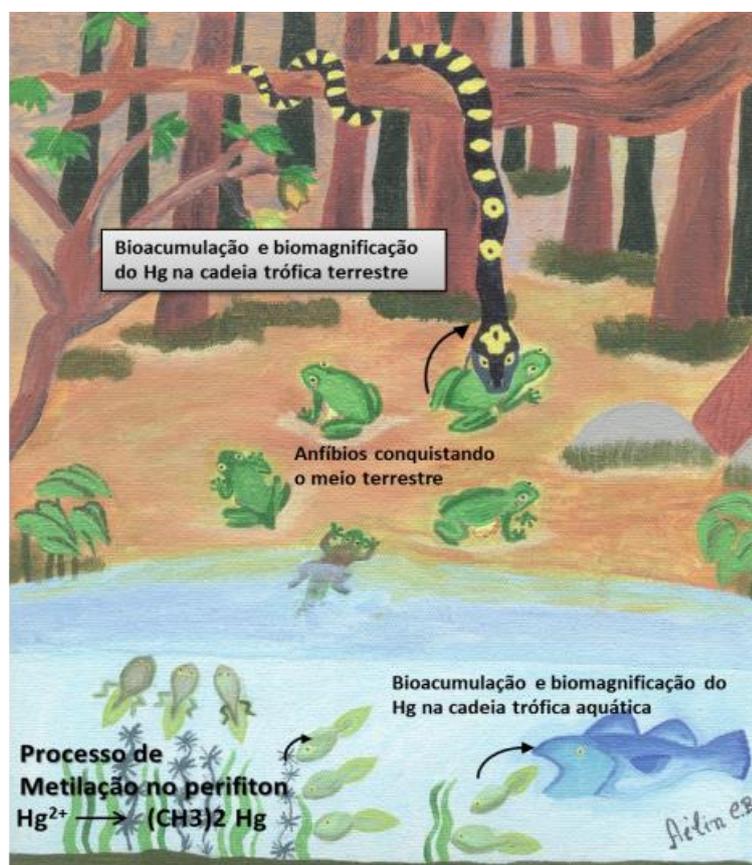


Figura 2. Processo de bioacumulação e biomagnificação do metilmercúrio na cadeia trófica terrestre e aquática através dos anfíbios. No fundo dos lagos e rios, onde encontra-se o perifiton, ocorre o processo de metilação, pelo qual bactérias metiladoras transformam o Hg^{2+} solúvel em Hg orgânico, o metilmercúrio. Este poderá bioacumular-se em girinos, que apresentam uma alimentação baseada muitas vezes na própria microbiota aquática. Posteriormente, peixes podem se alimentar de muitos girinos, bioacumulando e biomagnificando o metilmercúrio. A larva do anfíbio sofre metamorfose e dessa maneira o MeHg estará biodisponível para bioacumulação na biota terrestre, como a alimentação de cobras, por exemplo (Fonte: acervo do autor).

Hothem e Jennings (2010) quantificaram mercúrio total (THg) e metilmercúrio (MeHg) em tecidos do fígado, músculo, carcaça e corpo total de *Lithobates catesbeianus* (bullfrog) coletados em região próxima a mina de mercúrio. Os autores encontraram uma média de THg e MeHg de 0,956 ug/g no fígado e 1,09 ug/g na carcaça, corroborando com a idéia de os anfíbios serem bioacumuladores de componentes mercuriais.

Em experimentos com girinos de *Rana sphenoccephala* submetidos a uma dieta com baixa concentração de metilmercúrio (49 ng/g), observou-se escoliose severa e má formação dos membros posteriores dos animais, alterando o crescimento e desenvolvimento normal da larva do anfíbio (UNRINE et al., 2004).

Bergeron et al. (2011) realizaram uma análise experimental com girinos da espécie *Bufo americanus* submetido a exposição de Hg e MeHg na dieta e por transferência maternal. Foi observado que a combinação dessas formas de transferências podem representar risco letal ao girino. A combinação das exposições dietética e por transferência maternal levou a redução de 50% do sucesso metamórfico da larva do anfíbio e provocou mortalidade das larvas, comparado as larvas de mães não expostas e de controle dietético. A contaminação mercurial também levou a mortalidade de indivíduos pequenos durante o climax metamórfico, além de uma perda significativa de tamanho corporal de girinos em estágio GS42 e GS46 para indivíduos expostos em relação aos não expostos.

Outro efeito em girinos pela exposição via transferência maternal foi observado por Todd et al. (2011) o qual observaram uma possibilidade de 5 vezes mais chances da larva de *Bufo americanus* apresentar malformação espinhal pela exposição mercurial, conseqüentemente uma dificuldade de fuga predatória. Os autores observaram a seletividade predatória de larvas mal formadas e um aumento de densidade de algas no mesocosmo experimental.

Foi ainda observado que o mercúrio associado a outros contaminantes pode causar problemas na sobrevivência, crescimento e metamorfose em anfíbios. Britson e Threlkeld (1998) estudaram os efeitos da mistura de 3 agroquímicos com metilmercúrio em girinos de *Hyla chrysoscelis*. Foi detectada uma relação significativa entre casos de malformações no desenvolvimento dos girinos e os contaminantes químicos uma relação positiva entre concentração de metilmercúrio e dias de metamorfose, e por último comportamento anormal de natação.

2. JUSTIFICATIVA

Verifica-se em geral que a contaminação mercurial em altas doses e concomitantemente associados a outros contaminantes, pode provocar vários efeitos na larva do anfíbio, desde efeitos letárgicos até a própria mortalidade. Destacando-se entre esses efeitos: malformações embrionárias, problemas no desenvolvimento larval como diminuição da massa corpórea, distúrbios comportamentais de natação, alimentação e de fuga predatória, entre outros.

A realização de ensaios toxicológicos em condições laboratoriais oferece a vantagem de avaliar a toxicidade de um contaminante em concentrações específicas, além de dar a possibilidade de eliminar e monitorar ocorrência de ações antagônicas de outros elementos do meio ambiente.

Neste contexto uma análise morfo-funcional de animais expostos seria de fundamental importância para avaliar danos induzidos pelo MeHg. Portanto, propõem-se investigar quais efeitos morfológicos e comportamentais causados pelo MeHg no desenvolvimento larval do anfíbio *P. ephippifer* como modelo experimental.

A hipótese é que anfíbios expostos ao metilmercúrio, mesmo em concentrações baixas na água, podem sofrer uma debilidade locomotora. Essa debilidade estaria associada a alterações teratogênicas e neuronais.

A espécie *Physalaemus ephippifer* (Figura 3B) foi escolhida por ter uma ampla distribuição na Amazônia Brasileira, pela facilidade de identificação, coleta e manipulação das posturas. Além disso, suas larvas apresentam resistência ao serem transportadas e são fáceis de serem aclimatadas em condições experimentais em laboratório.

P. ephippifer (STEINDACHNER, 1864) pertence à família Leptodactylidae. O gênero *Physalaemus* (FITZINGER, 1826) contém 41 espécies conhecidas e distribui-se do México até a Argentina (FROST, 2000). É membro do grupo *cuvieri*.

A espécie ocorre ao longo da Amazônia central e oriental no Brasil, sul da Guiana, Suriname, Guiana Francesa e leste da Venezuela (Figura 3A). Habita ambientes antrópicos, clareiras florestais, florestas de bordas, florestas subtropicais ou tropicais úmidas, pastagens, jardins rurais e florestas secundárias altamente degradadas (LUI & WHITTAKER, 2014).

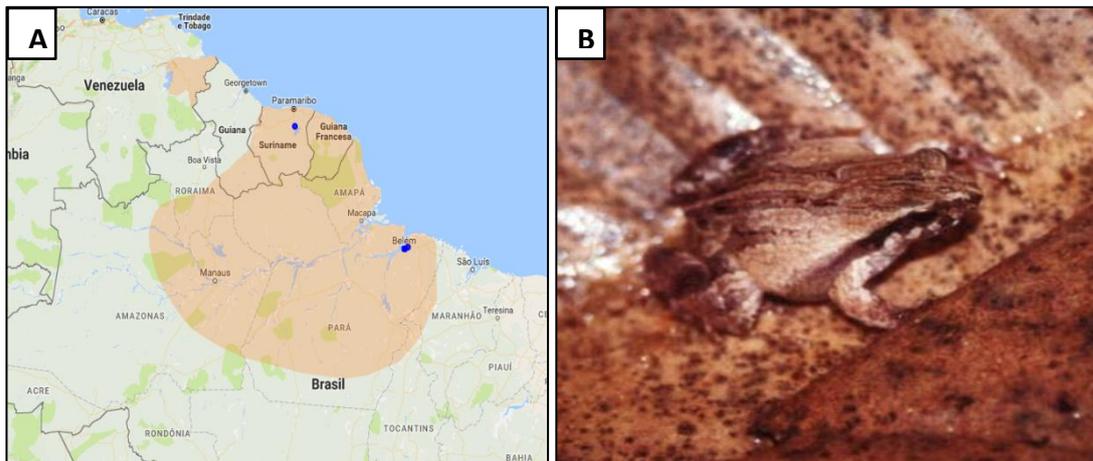


Figura 3 – A: Distribuição da espécie (Fonte: LUI & WHITTAKER, 2014). **B:** Adulto de *P. ephippifer* (Fonte: Verônica Oliveira-bahia).

O seu período reprodutivo compreende de janeiro a abril, o que coincide com o pico da estação das chuvas na região. Esta espécie utiliza pequenas poças temporárias para reprodução, onde deposita seus ovos em pequenos ninhos de espuma (CRUMP, 1971; HODL, 1990). Os ovos são liberados três horas após o acasalamento com a construção do ninho de espuma (HODL, 1990) (Figura 4A).

De acordo com Hodl (1990) o girino de *P. ephippifer* se desenvolve em pequenas lagoas temporárias sem peixes e com poucos insetos predadores. O tempo de desenvolvimento larval em condições de laboratório e a uma temperatura entre 23° - 25° C é de 45 a 58 dias.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Analisar os efeitos da exposição subcrônica do MeHg no desenvolvimento larval e em recém-metamorfoseados de *P. ephippifer*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1) Observar e caracterizar alteração no desempenho físico das larvas e dos recém-metamorfoseados (jovens) de *P. ephippifer* submetidos à exposição de MeHg.

2) Identificar e caracterizar as possíveis alterações teratogênicas e morfológicas ocasionadas pela exposição ao MeHg durante o desenvolvimento larval e na metamorfose de *P. ephippifer*.

3) Descrever as possíveis alterações morfológicas e celulares nos sistema nervoso e na retina ocasionadas pela exposição ao MeHg em girinos e recém-metamorfoseados de *P. ephippifer*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CRIAÇÃO DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas posturas de *P. ephippifer* (Figura 4 - A) coletadas na estação da Reserva Ecológica do Gunma, no município de Santa Bárbara, PA, (S 01°12' 17''; W 48° 18' 05''), durante a estação de chuva da região, meses de dezembro a abril, sob a autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO para coleta de animais silvestre (ver ANEXO A).

As posturas foram depositadas em recipientes de 45 x 29 x 10 cm com água de poço com o sistema de recirculação de água em aeração permanente, com monitoramento de pH, temperatura da água e 12/12 horas de claro e escuro.

A definição de estágio de desenvolvimento larval foi realizada com o auxílio da tabela de Gosner (1960). Esta definição de estágio larval serviu como embasamento para marcar momentos de importantes mudanças ao longo do experimento.

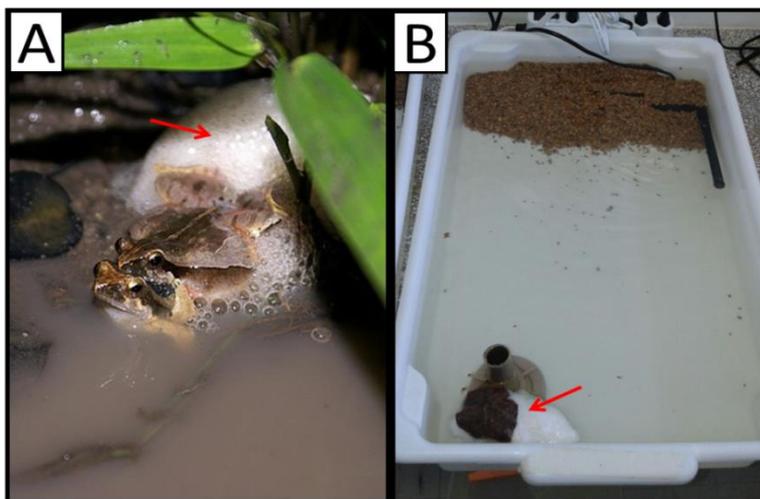


Figura 4 – Coleta e criação das posturas *P. ephippifer*. **A:** Amplexo de *P. ephippifer* (Fonte: EIJK, 2007), formação do ninho de espuma (seta vermelha). **B:** Banheira de criação dos girinos, acondicionamento do ninho de espuma (seta vermelha) (Fonte: acervo do autor).

A tabela de Gosner é dividida em 46 estágios de desenvolvimento, nos quais, os estágios de G01 ao G24 correspondem a fase de fecundação, clivagem e eclosão, os estágios de G25 ao G35 correspondem a fase de desenvolvimento da larva com o início da alimentação exógena, crescimento do corpo e o desenvolvimento dos membros posteriores. Nos estágios de G36 ao G41 há uma estabilização do crescimento corporal e uma maturação dos membros posteriores e, finalmente, nos estágios G42 ao G46

ocorre a metamorfose propriamente dita, com desenvolvimento dos membros anteriores, reabsorção da cauda e reestruturação da mandíbula (ver ANEXO B).

Após a eclosão, os girinos foram alimentados uma vez ao dia com ração de peixe comercial (45% de proteína), até o início da metamorfose (Figura 4B).

Os experimentos ocorreram no Biotério do Instituto de Psicologia, Teoria e Pesquisa do Comportamento – UFPA, sob o consenso e liberação da Comissão de Ética no Uso de animais CEUA (ver ANEXO C).

4. 2 ENSAIO TOXICOLÓGICO EM GIRINOS

Para determinar os efeitos do metilmercúrio, larvas em estágio G25 de *P. ephippifer* foram submetidas a uma exposição subcrônica por um período de 32 a 36 dias, tempo suficiente para a ocorrência da metamorfose da espécie na temperatura e condições que se encontravam. Foi escolhido o estágio G25 pois é a partir deste estágio, as larvas estão aptas a se alimentarem.

As concentrações de metilmercúrio utilizadas no ensaio foram previamente definidas com base no estudo experimental de identificação da concentração letal (CL) 50% e CL 1%. A tabela 1 sistematiza as concentrações que foram usadas no ensaio toxicológico e a quantidade de girinos expostos.

Foi estabelecido o controle negativo para o tratamento 1 com a concentração 0 µg/ml de MeHg. Foram utilizadas exatamente as concentrações CL 1% e CL 50% de MeHg (verificados em estudos prévios) para compor as concentrações do Tratamento 4 (0,004 µg/ml de MeHg) e Tratamento 5 (0,007 µg/ml de MeHg), respectivamente. Por conseguinte, as concentrações dos tratamentos 2 e 3 foram concentrações 10 vezes mais diluídas que a CL 1% (0,0004 µg/ml de MeHg) e CL% 50 (0,0007 µg/ml de MeHg), respectivamente (ver tabela 1).

Foram expostos 60 girinos em estágio de desenvolvimento G25 por tratamento, sendo o ensaio repetido em triplicata. Girinos e recém-metamorfoseados foram amostrados para posteriores análises histológicas e para verificação de possíveis alterações decorrentes da exposição do metilmercúrio. Girinos em estágios de desenvolvimento G30 a G40 e recém-metamórficos G46 foram submetidos a avaliação morfométrica, teratogênica e a análise de desempenho fisiológico.

Os experimentos foram realizados nos períodos de março à abril e de maio à junho de 2015 e levaram em média 34 dias com a temperatura em torno de $27,02 \pm 2,4$ e

o pH em torno de $8,22 \pm 0,22$. A tabela 2 demonstra os dados de período de experimento, temperatura e pH para cada replicata.

Tabela 1 – Ensaio toxicológico realizado em 3 replicatas

Tratamentos	Concentrações de MeHg	Quantidade de animais expostos	Estágio
Tratamento 1	0 µg/ml	60 girinos	G25
Tratamento 2	0,0004 µg/ml	60 girinos	G25
Tratamento 3	0,0007 µg/ml	60 girinos	G25
Tratamento 4	0,004 µg/ml	60 girinos	G25
Tratamento 5	0,007 µg/ml	60 girinos	G25

Tabela 2 – Monitoramento de condições experimentais do ensaio toxicológico

	1ª Replicata	2ª Replicata	3ª Replicata
Tempo de experimento	32 dias	35 dias	36 dias
Temperatura média (°C)	26,57± 2,35	27,50±2,949	27,54±2,606
pH	7,5±0,5	8,20±0,21	8,25±0,17

4. 3 DESEMPENHO FISIOLÓGICO

4. 3. 1 Girinos G30 a G40

Para avaliar o efeito do metilmercúrio nas habilidades locomotoras dos girinos nos estágios de G30 a G40, realizou-se a análise do comportamento de fuga do animal, utilizando o modelo de simulação de um ataque predatório proposto por Bridges (1997).

A simulação do ataque foi realizada com o toque de um pincel na região caudal do animal para estimular sua fuga ao ataque. O percurso da fuga natatória foi medido quanto à distância e ao tempo percorrido, sendo assim foi obtida a velocidade média de cada fuga.

Uma raia de 1 m de comprimento confeccionada com um cano de PVC de 3 mm cortado longitudinalmente foi utilizada nesta análise. A raia foi preenchida com água de poço formando uma profundidade de 1 cm ao longo de todo o percurso de 1 m. Ao lado da raia foi colocada uma trena. Foram utilizados um termômetro, para

monitoramento da temperatura da água, além de um cronômetro e uma câmera digital Nikon.

O girino foi colocado na raia por um tempo de 2 minutos para aclimação. A velocidade média da fuga natatória foi calculada em 5 simulações de ataques. Posteriormente o animal foi fixado em Karnovsky. Foram escolhidos aleatoriamente 5 girinos em estágios G30 a G40 de cada tratamento para compor a análise de desempenho fisiológico.

4. 3. 2 Recém-metamorfoseados G45 e G46

Para avaliar o efeito do metilmercúrio nas habilidades locomotoras dos animais recém-metamorfoseados foi realizada uma análise do comportamento de fuga do animal através da simulação de um ataque predatório (CHARBONNIER & VONESH, 2015).

Com o auxílio de uma arena branca de plástico com medidas de 45 x 29 x 10 cm e um pincel, a simulação do ataque predatório foi realizada da seguinte maneira: o animal recém-metamorfoseado foi colocado no centro da arena por um período de aclimação de 2 minutos, após esse tempo iniciou-se a simulação dos ataques no qual o pesquisador, vestido de jaleco e usando luva branca, se aproxima da arena e encosta o pincel na região dorsal do animal, assim o animal foge dando saltos.

Cada vez que o animal se colocava em repouso, era estimulado novamente e assim sucessivamente até completar um tempo de 3 minutos. Cada fuga foi registrada na arena com uma caneta piloto, marcando-se o início e o fim do percurso de cada fuga. As análises da fuga foram baseadas na distância percorrida, no número de saltos e na distância de cada salto.

Foram escolhidos aleatoriamente 8 animais de cada tratamento. Esses animais foram fixados em Karnovsky ao término da análise do desempenho fisiológico.

4.4 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS

4. 4. 1 Girinos G30 a G40

Nos girinos foram registrados o comprimento total e parcial, altura da cauda, musculatura da cauda, largura da musculatura da cauda, diâmetro dos olhos e espaço entre os olhos e diâmetro da boca (Figura 5).

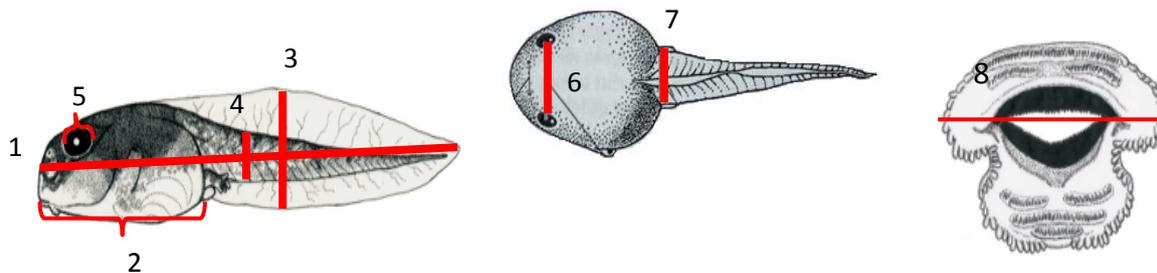


Figura 5 – Medidas morfométricas do girino. Comprimento total (1), comprimento parcial (2), altura da cauda (3), altura da musculatura da cauda (4), diâmetro do olho (5), espaço entre os olhos (6), largura da musculatura da cauda (7), diâmetro do disco oral (8) (Fontes: VIEIRA & ARZABE (2008), MCDIARMID & ALTIG (2008)).

4. 4. 2 Recém-metamorfoseados G45 e G46

Dos recém-metamorfoseados foram registrados o comprimento total, comprimento dos fêmures, das tíbias (esquerdo e direito), diâmetro dos olhos, largura da mandíbula (Figura 6). Os animais utilizados nessa análise foram os mesmos que participaram das análises de desempenho fisiológico.

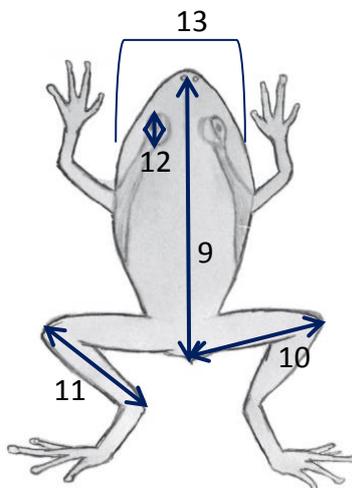


Figura 6 – Medidas morfométricas do recém-metamorfoseado. Desenho esquemático de *P. ephippifer*. Comprimento total (9), comprimento dos fêmures (10), comprimento das tíbias (11), diâmetro dos olhos (12), largura da mandíbula (13). Fonte: Doação de Thiago Santos.

Com a finalidade de registrar as possíveis alterações teratogênicas de *P. ephippifer* exposto ao MeHg foram registradas as seguintes características anatômicas: presença da córnea nos olhos, alterações na quantidade de dedos para recém metamorfoseados e presença de bico córneo e alterações nas fileiras de dentículos córneos somente para girinos.

4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para avaliação das alterações morfológicas teciduais decorrentes da exposição ao MeHg foram realizadas análises histológicas do encéfalo e olhos de recém-metamorfoseados. A estrutura tecidual foi analisada através das técnicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura.

4.5.1 MICROSCOPIA DE LUZ

4.5.1.1 A técnica de microscopia de luz

Para esta análise foram utilizados 3 girinos (G30 a G40) e 3 recém-metamorfoseados (G45 e G46) de cada tratamento de cada replicata. Os animais foram inteiramente fixados em solução de Bouin por 24 horas. Após a fixação, o material foi transferido para álcool 70% para conservação.

Os animais recém-metamorfoseados foram dissecados para remoção completa dos olhos e encéfalo. Os girinos não precisaram ser dissecados. Posteriormente as amostras foram processadas seguindo a sequência padronizada de procedimentos histológicos, a saber: desidratação em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), diafanização em xilol e infiltração e inclusão em parafina.

Em seguida foram realizados cortes de 5 μ m de espessura, esses foram corados em hematoxilina e eosina.

4.5.1.2 Análises morfológicas de microscopia de luz

Para as análises morfológicas teciduais encefálicas dos girinos e recém-metamorfoseados submetidos ao experimento foram registradas as seguintes características: integridade celular, presenças de vacúolos, células picnóticas, hipertrofia e hiperplasia celular, além do número e da constituição de camadas celulares.

Para os animais recém-metamorfoseados quantificou-se as células do cerebelo baseado no modelo de contagem de células realizado por Casco et al. (2006). Foram realizadas contagem de células de Purkinje e contagem de células com núcleos picnóticos por toda a extensão do corte na área cerebelar.

A caracterização das células com núcleos picnóticos foi baseada no modelo de Casco et al. (2006), através de contagem manual, com o auxílio de um contador de células. A análise foi executada por um investigador, em estudo cego, no qual as lâminas histológicas receberam códigos como nomeação, para evitar possíveis vieses. A

análise se deu em microscópio Zeiss – Primo Star, com objetiva de 100, com o auxílio do óleo de imersão.

A contagem de células de Purkinje e de células com núcleos picnóticos se deu por toda a extensão do cerebelo em cada corte. Para estimar a quantidade de células, foram selecionados o número de 20% do total de cortes obtidos do encéfalo de cada animal, os cortes foram escolhidos com o critério de integridade. Obteve-se o número total de células e as médias de células com núcleos picnóticos e células de Purkinje por tratamento.

Para as análises morfométricas do tecido da retina dos recém-metamorfoseados submetidos ao experimento, foram quantificados a espessura da retina total e 4 camadas de células da retina com o auxílio do analisador de imagem acoplado ao microscópio, utilizando o programa NIS.

4. 5. 2 Microscopia eletrônica de varredura

Para o procedimento das análises de microscopia de varredura, as amostras de retinas foram fixadas em solução de Karnovsky por 24 horas, lavadas em tampão cacodilato de sódio e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 2% por quatro horas. Em seguida, foram lavadas novamente em tampão cacodilato de sódio, desidratadas em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90% 95%, 100%), submetidas a secagem em ponto crítico com CO₂ líquido, montadas em suporte de alumínio, metalizadas em ouro paládio e eletronicografadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO – 1430).

4. 6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para medir as diferenças de desempenho fisiológico e as análises morfométricas foram realizados os testes gráficos para distribuição normal. Para verificar as homogeneidades das variâncias foi utilizado o teste de Levene. Em caso de variância homogêneas foi realizado a Análise de Variância (ANOVA) com pós teste de Tukey e Bonferroni. No caso de não normalidade dos dados e variância heterogêneas, utilizou-se o teste não paramétricos de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn.

5. RESULTADOS

5.1. TEMPO DE DESENVOLVIMENTO E OCORRÊNCIA TERATOGENICA EM *P. ehippifer* EXPOSTO AO MeHg

Durante a execução do experimento não houve diferenças significativas no tempo de desenvolvimento dos animais ($P > 0,05$) (Tabela 3). Nesta análise utilizou-se como critério de avaliação o tempo da ocorrência da primeira metamorfose de cada tratamento.

Tabela 3 – Tempo em dias da ocorrência da primeira metamorfose

	0,007	0,004	0,0007	0,0004	Controle
1ª Replicata	21 dias	22 dias	20 dias	20 dias	25 dias
2ª Replicata	20 dias	20 dias	24 dias	20 dias	20 dias
3ª Replicata	19 dias	21 dias	22 dias	19 dias	22 dias

ANOVA $F_{4,15}=1,6447$ $P > 0,05$

Em relação a formação dos dedos não se observou dados significativos de alteração teratogênicas (Figura 7).

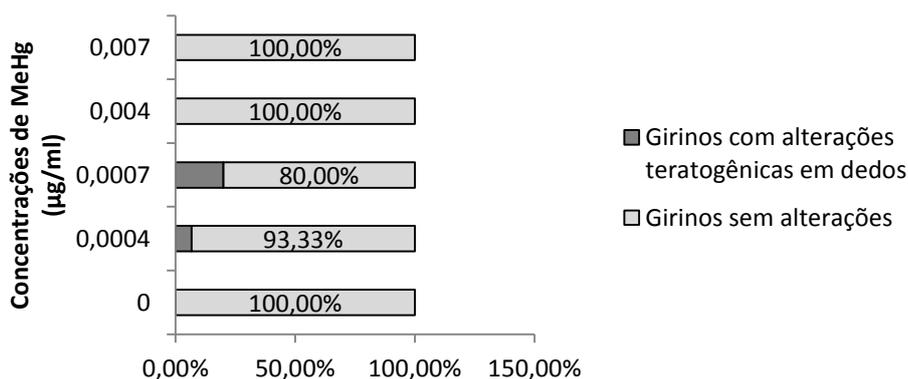


Figura 7 – Alterações na formação dos dedos de girinos de *P. ehippifer* exposto a concentrações crescentes de MeHg.

As fileiras de dentículos labiais dos girinos de todos os grupos do ensaio toxicológico, inclusive o grupo controle negativo, apresentaram alterações com ausência parcial ou total das fileiras de dentículos (Figura 8).

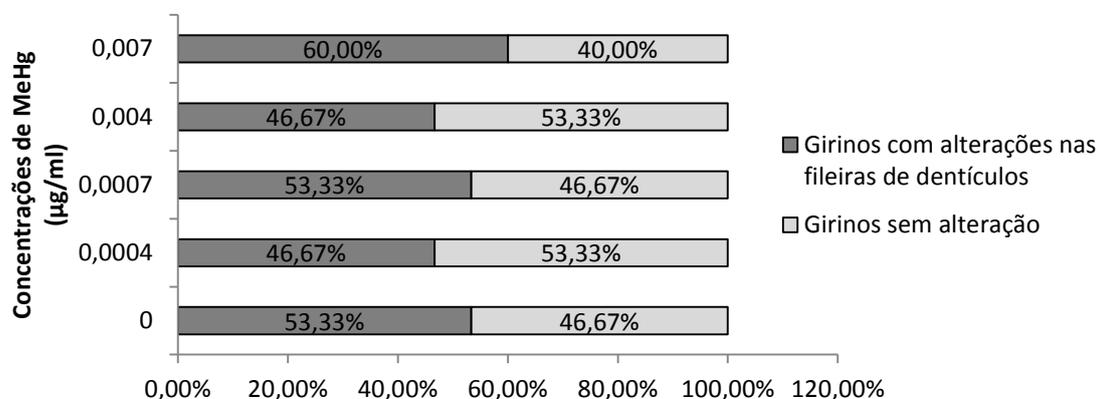


Figura 8 – Alterações nas fileiras dos dentículos labiais de girinos de *P. ehippifer* exposto a concentrações crescentes de MeHg.

Foram encontradas alterações na córnea dos animais recém-metamorfoseados. As córneas apresentavam-se com aspecto murcho ou estavam completamente ausentes. Para a análise os indivíduos foram classificados com córnea alterada ou com córnea normal.

Vinte e cinco por cento (25%) dos animais analisados no grupo controle negativo apresentaram alterações na córnea. Um aumento desta frequência foi observado em todos os tratamentos com MeHg (0,0004 µg/ml; 0,0007 µg/ml; 0,004 µg/ml; 0,007µg/ml). Quarenta e sete por cento (47%) dos animais do grupo de maior concentração (0,007µg/ml) apresentaram alterações na córnea, o que corresponde um aumento de praticamente o dobro de ocorrências das lesões em relação ao grupo controle negativo (Figura 9).

Alterações na formação dos dedos de animais recém-metamorfoseados foram encontradas somente para os animais da 1ª replicata, não ocorrendo nas demais replicatas (Figura 10).

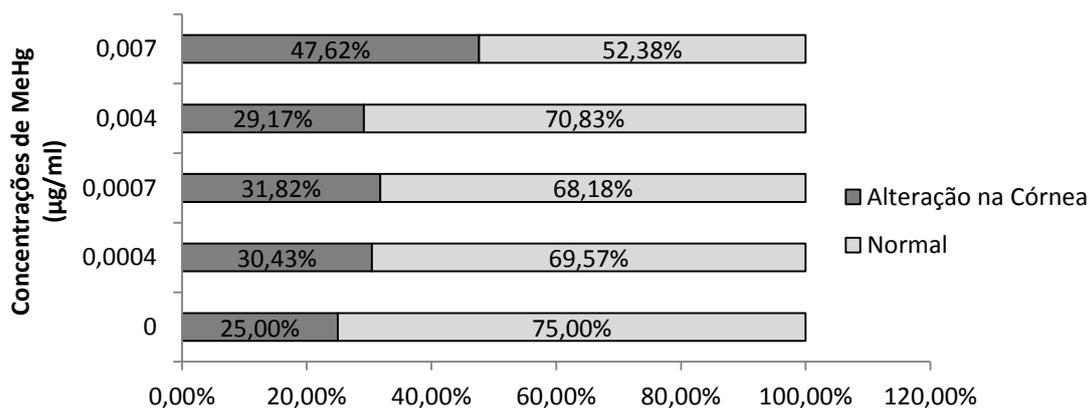


Figura 9 – Alterações na córnea em recém-metamorfoseados de *P. ephippifer* exposto a concentrações crescentes de MeHg.

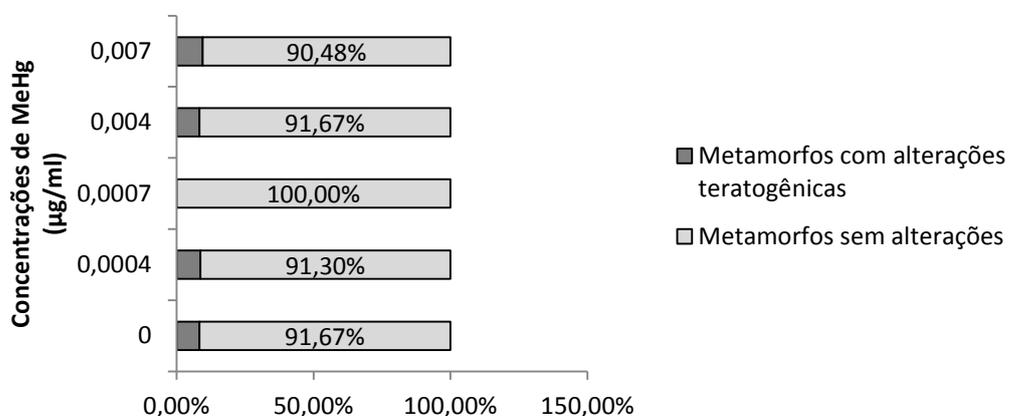


Figura 10 – Alterações da formação dos dedos de recém-metamorfoseados de *P. ephippifer* exposto a concentrações crescentes de MeHg.

5. 2. ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS DE *P. ephippifer* APÓS EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA AO MeHg

5. 2. 1 Desempenho locomotor dos girinos

Não se observou alteração no desempenho locomotor de girinos de *P. ephippifer* expostos ao MeHg. A velocidade média de fuga natatória e a velocidade alcançada no primeiro estímulo não diferiram estatisticamente entre os tratamentos ($P > 0,05$) (Tabela 4). Para a análise das distâncias percorridas na fuga natatória houve significância apenas entre os tratamentos com as concentrações de MeHg de 0,004 µg/ml e 0,007 µg/ml $H = 9,5261$, $P = 0,0492$. Contudo, não houve diferenças do controle com os demais tratamentos ($P > 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4 – Médias (\pm desvio padrão) da velocidade, distância percorrida e velocidade alcançada no primeiro estímulo dos girinos nos testes de desempenho físico de fuga natatória. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (pós-teste Dunn)

Concentrações de MeHg	Velocidade média da fuga ¹ (m/s)	Média das distâncias da fuga ² (m)	Velocidade média do primeiro estímulo ³ (m/s)
0,007 μ g/ml	0,140 \pm 0,132 ^a	0,151 \pm 0,119 ^a	0,142 \pm 0,01 ^a
0,004 μ g/ml	0,143 \pm 0,123 ^a	0,096 \pm 0,060 ^b	0,165 \pm 0,191 ^a
0,0007 μ g/ml	0,125 \pm 0,092 ^a	0,126 \pm 0,081 ^{ab}	0,135 \pm 0,069 ^a
0,0004 μ g/ml	0,147 \pm 0,085 ^a	0,121 \pm 0,078 ^{ab}	0,151 \pm 0,0701 ^a
0	0,152 \pm 0,118 ^a	0,131 \pm 0,121 ^{ab}	0,153 \pm 0,114 ^a

¹ Kruskal Wallis $H_{4,75} = 4.391$; $P = 0,3557$

² Kruskal Wallis $H_{4,75} = 9.5261$; $P = 0,0492$

³ Kruskal Wallis $H_{4,75} = 1.1608$; $P = 0,8845$

5. 2. 2 Desempenho locomotor dos recém-metamorfoseados

As análises do número de salto e distância total percorrida não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) (Figura 11 e 12).

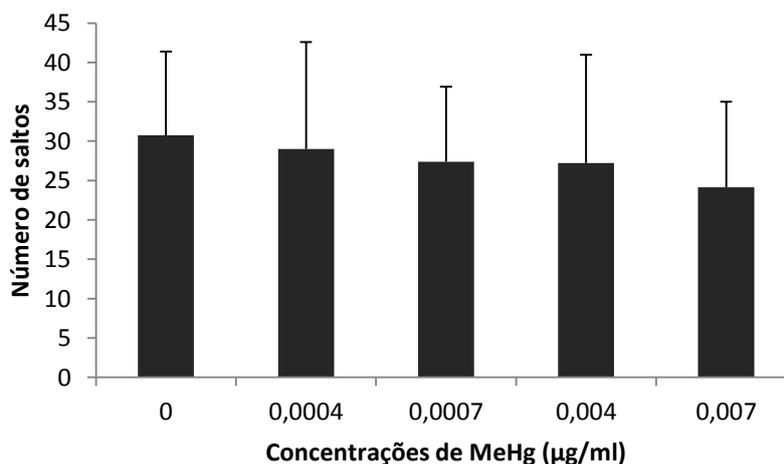


Figura 11 – Media do número de saltos executados pelos recém-metamorfoseados do ensaio toxicológico de MeHg (ANOVA $F_{4, 108} = 0.923$; $P = 0.453$).

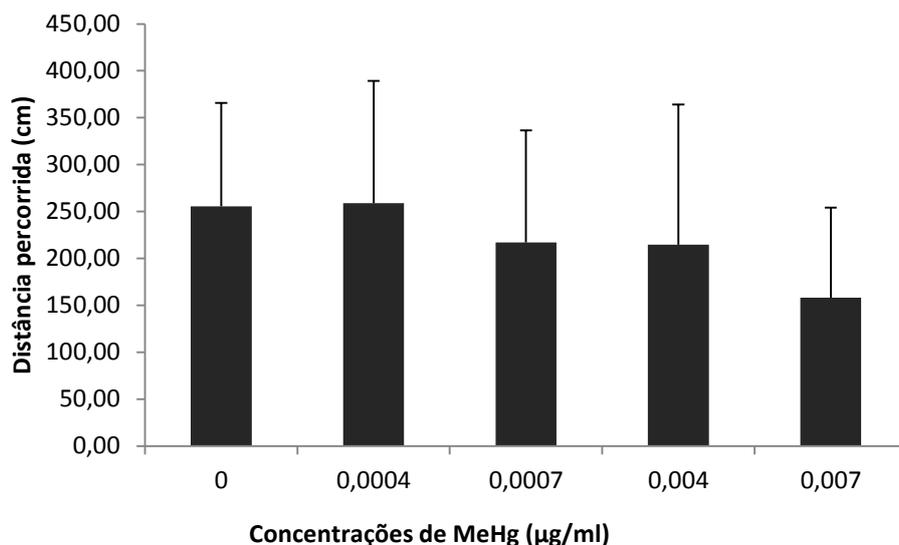


Figura 12 – Média do espaço total percorrido pelos recém-metamorfoseados do ensaio toxicológico de MeHg ao longo da simulação de fuga predatória (ANOVA $F_{4,105} = 2,4379$ $P = 0,0508$).

A distância de cada salto diferiu significativamente entre os tratamentos. Nos animais submetidos à concentração mais alta (0,007µg/ml), o comprimento do pulo foi menor que nos demais tratamentos ($H_{4,3122} = 7,615$; $P < 0,001$) (Figura 13).

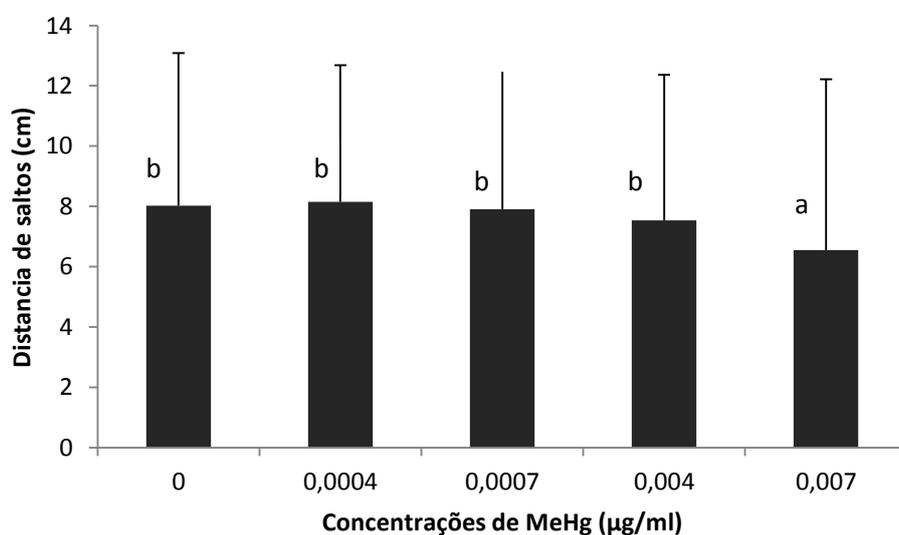


Figura 13 – Média da distância dos saltos dos recém-metamorfoseados do ensaio toxicológico de MeHg ao longo da simulação de fuga predatória (Kruskal Wallis $H_{4,3.164} = 76,128$ $P < 0,001$). Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (pós-teste Dunn).

5. 3 ALTERAÇÕES MORFOMÉTRICAS EM *P. ehippifer* APÓS EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA AO MeHg

5. 3. 1 Morfometria dos girinos

Entre os girinos dos grupos do ensaio toxicológico não foi encontrada diferença significativa para os registros das medidas morfométricas de comprimento total, comprimento parcial, altura da musculatura da cauda, largura da musculatura da cauda, diâmetro do olho esquerdo e direito, espaço entre os olhos e diâmetro da boca ($P > 0,05$) (Tabela 5). No entanto, houve diferença significativa para as medidas da altura da cauda ($F_{4,75} = 2,5271$; $P = 0,047$) (Tabela 5).

Tabela 5 – Média (desvio padrão) dos registros morfométricos (mm) dos girinos expostos ao MeHg ($\mu\text{g/ml}$). Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (pós-teste Bonferroni)

Medidas morfométricas (mm)	Concentrações de MeHg ($\mu\text{g/ml}$)				
	0	0.0004	0.0007	0.004	0.007
Comprimento total dos girinos ¹	21.0 ± 2.37	20.57 ± 1.43	21.01 ± 1.36	20.25 ± 2.02	21.39 ± 1.04
Comprimento parcial ²	8.14 ± 0.70	8.09 ± 0.59	7.89 ± 0.73	7.65 ± 1.12	7.73 ± 0.47
* Altura da cauda ³	4.27 ± 0.45 ^c	4.21 ± 0.35 ^{bc}	3.90 ± 0.63 ^{ab}	3.83 ± 0.65 ^a	3.86 ± 0.43 ^a
Altura da musculatura da cauda ⁴	2.01 ± 0.33	2.06 ± 0.42	1.85 ± 0.49	1.99 ± 0.45	2.01 ± 0.41
Largura da musculatura da cauda ⁵	1.81 ± 0.26	1.70 ± 0.31	1.60 ± 0.38	1.61 ± 0.22	1.71 ± 0.27
Diâmetro do olho esquerdo ⁶	1.23 ± 0.32	1.17 ± 0.22	1.09 ± 0.14	1.15 ± 0.21	1.18 ± 0.24
Diâmetro do olho direito ⁷	1.08 ± 0.31	1.11 ± 0.22	1.09 ± 0.15	1.10 ± 0.15	1.15 ± 0.17
Espaço entre os olhos ⁸	1.33 ± 0.17	1.19 ± 0.24	1.13 ± 0.23	1.11 ± 0.17	1.21 ± 0.20
Diâmetro do disco oral ⁹	1.45 ± 0.33	1.54 ± 0.36	1.43 ± 0.33	1.45 ± 0.32	1.51 ± 0.24

* - Dado significativo com valor de $P < 0,05$

¹ - Kruskal Wallis: $H_{4,15} = 5,637$; $P = 0,228$

- ² - Krukall Wallis: $H_{4,15}=3,5642$; $P = 0,4682$
³ - ANOVA $F_{4,75} = 2,5271$; $P = 0,047$
⁴ - ANOVA $F_{4,75} = 0,5403$; $P = 0,7098$
⁵ - ANOVA $F_{4,75} = 1,2402$; $P = 0,3013$
⁶ - ANOVA $F_{4,75} = 0,6389$; $P = 0,6396$
⁷ - Krukall Wallis: $H_{4,75} = 1,4416$; $P = 0,8369$
⁸ - ANOVA $F_{4,75} = 2,3879$; $P = 0,0583$
⁹ - ANOVA $F_{4,75} = 0,312$; $P = 0,8692$

5. 3. 2 Morfometria dos recém-metamorfoseados

Para os animais recém-metamorfoseado dos grupos do presente ensaio toxicológico, não foram encontradas diferenças significativas para os registros morfométricos no comprimento total dos recém-metamorfoseados, no comprimento dos fêmures esquerdo e direito, no comprimento das tíbias esquerda e direita, no diâmetro do olho esquerdo e direito e na medida da largura da mandíbula ($P > 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6 – Registros morfométricos dos recém-metamorfoseados (mm) expostos ao MeHg ($\mu\text{g/ml}$)

Medidas morfométricas (mm)	Concentrações de MeHg ($\mu\text{g/ml}$)				
	0	0.0004	0.0007	0.004	0.007
Comprimento total dos recém-metamorfoseados ¹	7.98 \pm 0.70	8.20 \pm 0.71	8.01 \pm 0.86	8.23 \pm 0.65	8.33 \pm 0.50
Comprimento dos fêmures esquerdos ²	3.46 \pm 0.54	3.49 \pm 0.46	3.33 \pm 0.45	3.29 \pm 0.49	3.41 \pm 0.43
Comprimento dos fêmures direitos ³	3.44 \pm 0.51	3.45 \pm 0.50	3.33 \pm 0.52	3.31 \pm 0.51	3.38 \pm 0.46
Comprimento das tíbias esquerdas ⁴	3.38 \pm 0.50	3.45 \pm 0.45	3.26 \pm 0.51	3.21 \pm 0.58	3.29 \pm 0.47
Comprimento das tíbias direitas ⁵	3.36 \pm 0.51	3.42 \pm 0.45	3.28 \pm 0.58	3.21 \pm 0.59	3.27 \pm 0.41
Diâmetro dos olhos esquerdos ⁶	1.34 \pm 0.15	1.31 \pm 0.11	1.41 \pm 0.24	1.31 \pm 0.13	1.32 \pm 0.15
Diâmetro dos olhos direitos ⁷	1.31 \pm 0.14	1.33 \pm 0.131	1.43 \pm 0.21	1.31 \pm 0.142	1.30 \pm 0.15
Largura das mandíbulas ⁸	2.32 \pm 0.25	2.36 \pm 0.18	2.26 \pm 0.30	2.30 \pm 0.32	2.32 \pm 0.20

- ¹ – ANOVA $F_{4,114} = 1,0490$ $P = 0,3860$
² - ANOVA $F_{4,114} = 0,7007$; $P = 0,5958$
³ - ANOVA $F_{4,114} = 0,3808$; $P = 0,8234$
⁴ - ANOVA $F_{4,114} = 0,8324$; $P = 0,5094$
⁵ - ANOVA $F_{4,114} = 0,6085$; $P = 0,6607$
⁶ – Krukall Wallis: $H_{4,114} = 4,7243$; $P = 0,3168$
⁷ - Krukall Wallis: $H_{4,114} = 8,215$ $P = 0,084$.
⁸ - Krukall Wallis: $H_{4,114} = 3,3553$; $P = 0,5002$

5. 4. ANÁLISE HISTOLÓGICA DE GIRINOS E RECÉM-METAMORFOSEADOS DE *P. ephippifer* EXPOSTOS AO MeHg NO ENSAIO TOXICOLÓGICO

5. 4. 1 Encéfalo de *P. ephippifer*

O sistema nervoso central dos anfíbios é composto pelo encéfalo e medula. O encéfalo dos girinos e recém-metamorfoseados são constituídos pelas áreas de telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo. O telencéfalo corresponde a área olfatória, o diencéfalo é constituído pelo epitálamo, tálamo e hipotálamo. O mesencéfalo corresponde ao *tectum* óptico (TO) e rombencéfalo onde encontra-se o cerebelo (Ce) e medula. As áreas correspondentes a região encefálica são mostradas na figura 14.

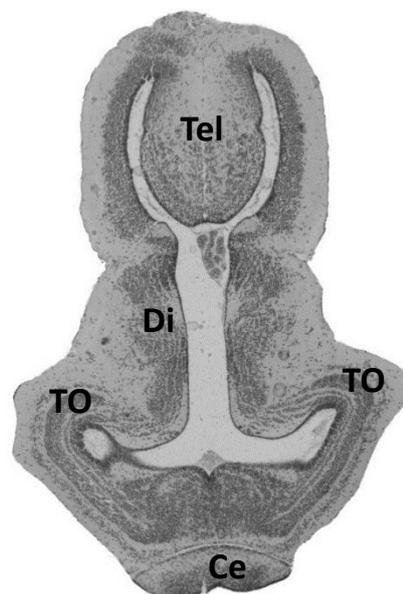


Figura 14 – Corte frontal do encéfalo do recém-metamorfoseado de *P. ephippifer*. O prosencéfalo é composto por telencéfalo (Tel) e diencéfalo (Di), o mesencéfalo constitui o *tectum* óptico (TO) e o rombencéfalo é onde encontra-se o cerebelo (Ce). Aumento de 400x.

O encéfalo é constituído por neurônios e células gliais de três tipos básicos: células ependimárias, astrócitos e oligodendrócitos. As áreas analisadas nesse estudo estão diretamente relacionadas com a performance locomotora e localização espacial: o *tectum* óptico e o cerebelo. O *tectum* óptico (Figura 15A) é constituído por neurônios (piramidais) organizados em três camadas: paraventricular, média e periférica. A camada paraventricular é a região mais próxima ao ventrículo e em contato direto com as células ependimárias que são células epiteliais colunares ou cúbicas ciliadas (Figura 15A).

A camada média fica após a camada paraventricular entre duas camadas constituídas por fibras nervosas. A camada periférica corresponde a região com maior concentração de células neuronais. Finalmente margeando o *tectum* óptico encontra-se uma camada molecular, composta por fibras nervosas, células da glia e poucos corpos de neurônios (Figura 15A).

O cerebelo (Figura 15B) foi constituído por uma camada densa de corpos neuronais formando a camada granulosa, logo acima desta camada encontram-se as grandes células de Purkinje, formando uma fina camada em volta da camada granulosa, essas células formam uma grande rede dendrítica que constitui a camada molecular. Essa por sua vez apresenta células da glia e alguns corpos de neurônios espalhados, acima desta camada encontra-se uma segunda camada de células, a camada grânulosa externa, esta é mais fina e bem próxima da camada de células ependimárias. O cerebelo é todo margeado pela superfície ependimária (Figura 15B).

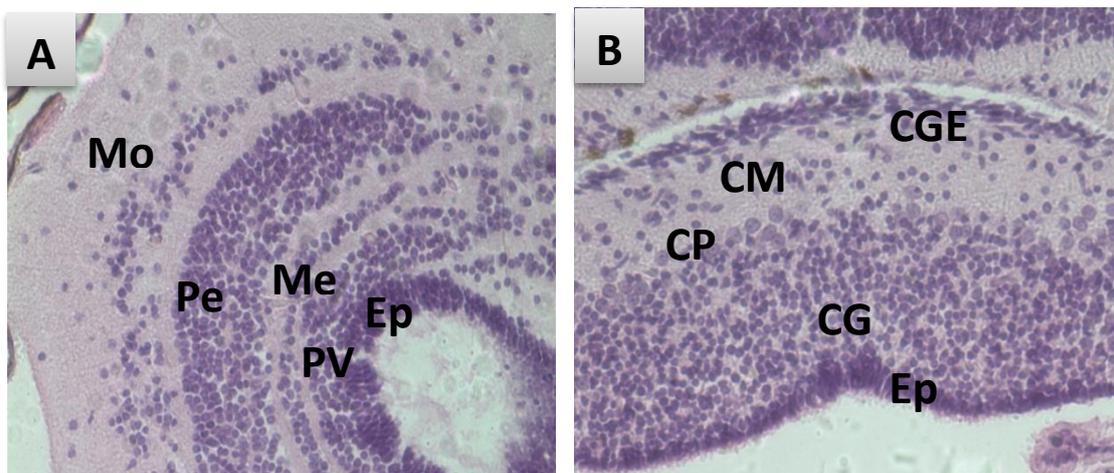


Figura 15 – Fotomicrografias do encéfalo de *P. ehippifer* em estágio G46. A: Área do *tectum* óptico, constituída por uma camada de células ependimárias (Ep), corpos de neurônios formando as camadas paraventricular (PV), média (Me) e Periférica (Pe) e por fim uma camada molecular (Mo) onde encontram-se células gliais e corpos

neuronal. **B:** Área do cerebelo, constitui-se de células endimárias (Ep), camada granulosa (CG), camada de células de Purkinje (CP), camada molecular (CM) e camada granulosa externa (CGE). Aumento de 400x.

As análises histopatológicas dos animais submetidos ao ensaio toxicológico mostraram que tanto girinos como recém-metamorfoseados apresentaram as áreas de *tectum* óptico íntegro quanto a presença de suas camadas celulares, apresentando a seguinte constituição: camada de células endimárias (Ep), camada paraventricular (PV), camada média (Me), camada Periférica (Pe) e por fim uma camada molecular (Mo).

Apesar da presença de todas as camadas celulares do *tectum* óptico, foram encontradas diferenças em relação a análise qualitativa morfológica das células. Girinos tratados com MeHg nas concentrações 0,007 µg/ml, 0,004 µg/ml, 0,0007 µg/ml e 0,0004 µg/ml apresentam uma frequência notável de células com núcleos picnóticos, acima de 5/campo e vários espaços intercelulares (Figura 16B-E). Para animais do grupo controle, foi achado uma menor frequência de células com núcleos picnóticos, sendo até 5 células com núcleos picnóticos por corte (Figura 16A).

As células com núcleos picnóticos apresentam, algumas características morfológicas notáveis, como: cor mais escura, devido o aumento da característica basofílica da célula, um núcleo bem condensado, com o corpo neuronal mais comprimido e com mais espaços extracelulares (Figura 16B-E e 17A -E).

Os mesmos achados para *tectum* óptico de girino repetiu-se em animais recém-metamorfoseados, ou seja, a integridade de camadas teciduais que compõem o *tectum* óptico e a presença de células com núcleos picnóticos, acima de 5/campo, por toda a extensão do corte do *tectum* óptico em animais expostos as concentrações de 0,007 µg/ml, 0,004 µg/ml, 0,0007 µg/ml e 0,0004 µg/ml de MeHg (Figura 17B-E). Para animais do grupo controle, a frequência de células com núcleos picnóticos de até 5 células / corte (Figura 17A).

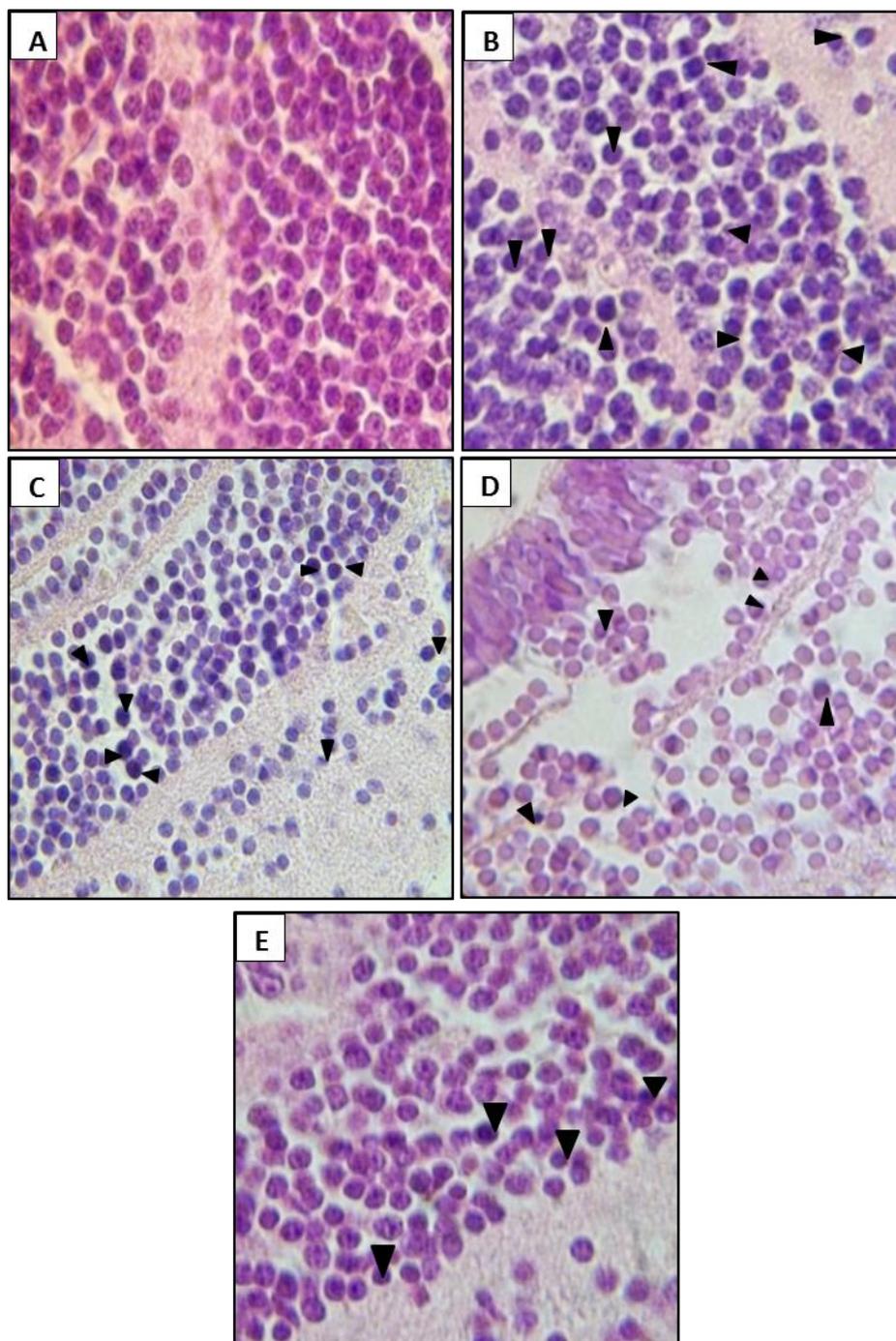


Figura 16 – Fotomicrografias de área do *tectum* óptico de girinos dos diferentes tratamentos de exposição ao MeHg. Células com núcleos picnóticos nas áreas de *tectum* óptico (ponta de seta). **A**: Controle negativo. **B**: Concentração 0,0004 µg/ml. **C**: Concentração 0,0007 µg/ml. **D**: Concentração 0,004 µg/ml. **E**: Concentração 0,007 µg/ml. Fotomicrografia = 1000x.

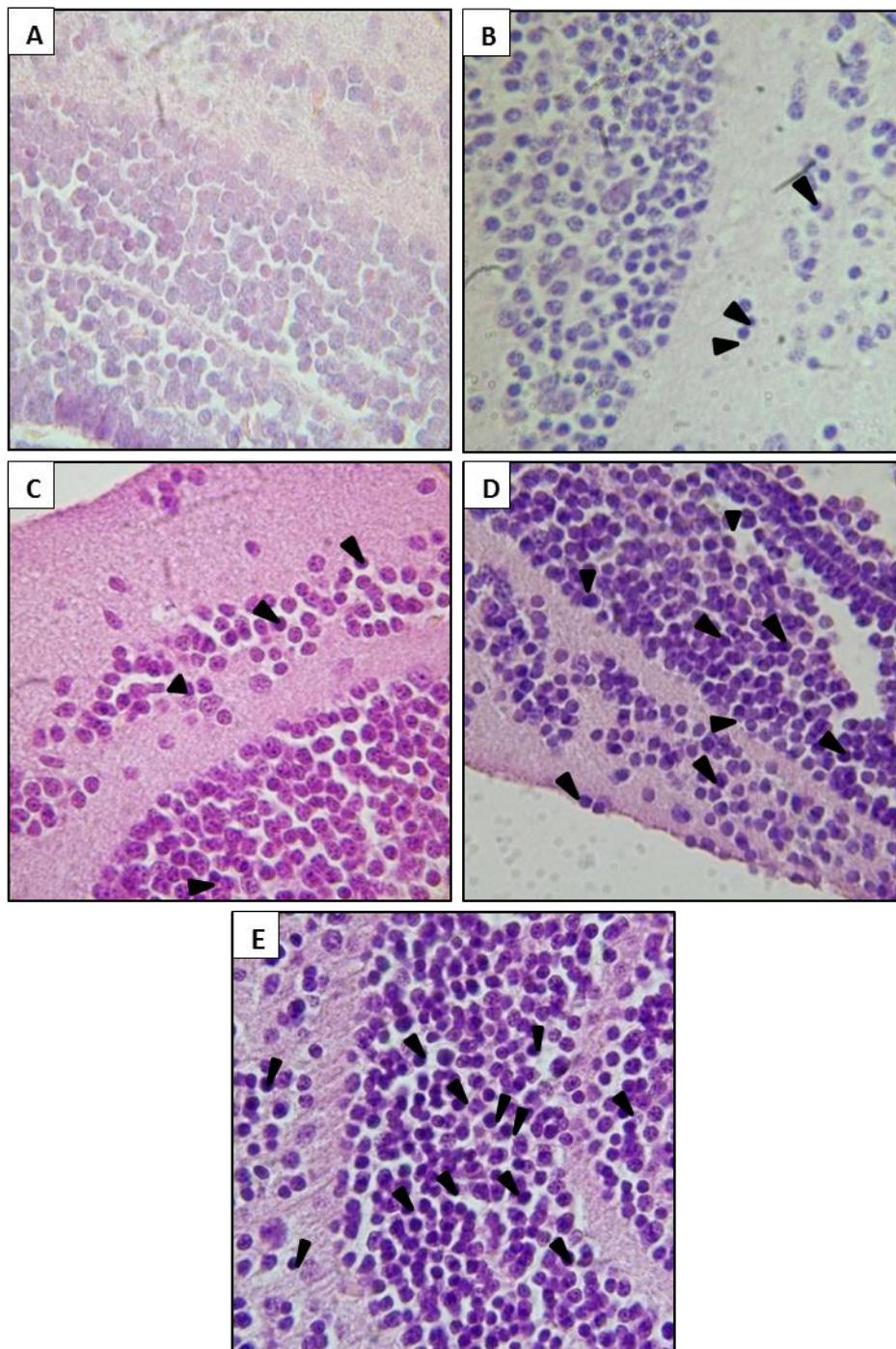


Figura 17 – Fotomicrografias da área do *tectum* óptico de recém-metamorfoseados dos diferentes tratamentos de exposição ao MeHg. Células com núcleos picnóticos nas áreas de *tectum* óptico (ponta de seta). A: Controle negativo. B: Concentração 0,0004 µg/ml. C: Concentração 0,0007 µg/ml. D: Concentração 0,004 µg/ml. E: Concentração 0,007 µg/ml. Fotomicrografias = 1000x.

A região do cerebelo, tanto para girinos como para os recém-metamorfoseados, dos ensaios toxicológicos confirmou-se a presença das camadas teciduais que o compõe: camada de células endimárias (Ep), camada granulosa (CG), camada de células de Purkinje (CP), camada molecular (CM) e camada granulosa externa (CGE).

Os achados histopatológicos foram similares aos encontrados no *tectum* óptico, para girinos e recém-metamorfoseados. Observou-se extensas áreas do cerebelo com as presenças de células com núcleos picnóticos para os animais expostos ao MeHg nas concentrações de 0,007 µg/ml; 0,004 µg/ml; 0,0007 µg/ml e 0,0004 µg/ml quando comparados ao tratamento controle negativo (Figura 18A-E e Figura 19A-E).

Nas análises de desempenho fisiológico, os animais recém-metamorfoseados foram os que apresentaram certa debilidade na sua performance locomotora. Para maiores esclarecimentos sobre o motivo que os levaram a tal debilidade realizou-se uma análise quantitativa do número de células de Purkinje e células com o núcleos picnóticos na região do cerebelo. O cerebelo é a área responsável pelo equilíbrio e coordenação motora e por esse motivo, essa região foi escolhida para as análises quantitativas.

O número das células de Purkinje dos recém-metamorfoseados submetidos aos ensaios toxicológicos não variou entre os tratamentos com concentrações crescentes de MeHg ($P > 0,05$) (Tabela 7). Entretanto, observou-se diferenças significativas quanto a frequência de células com núcleos picnóticos ($H_{4,35}=10,519$ $P = 0,0033$). O grupo controle diferiu do grupo das concentrações de 0,004 µg/ml e 0,007 µg/ml de MeHg, sendo essas as concentrações com as maiores frequências de células picnóticas (tabela 7).

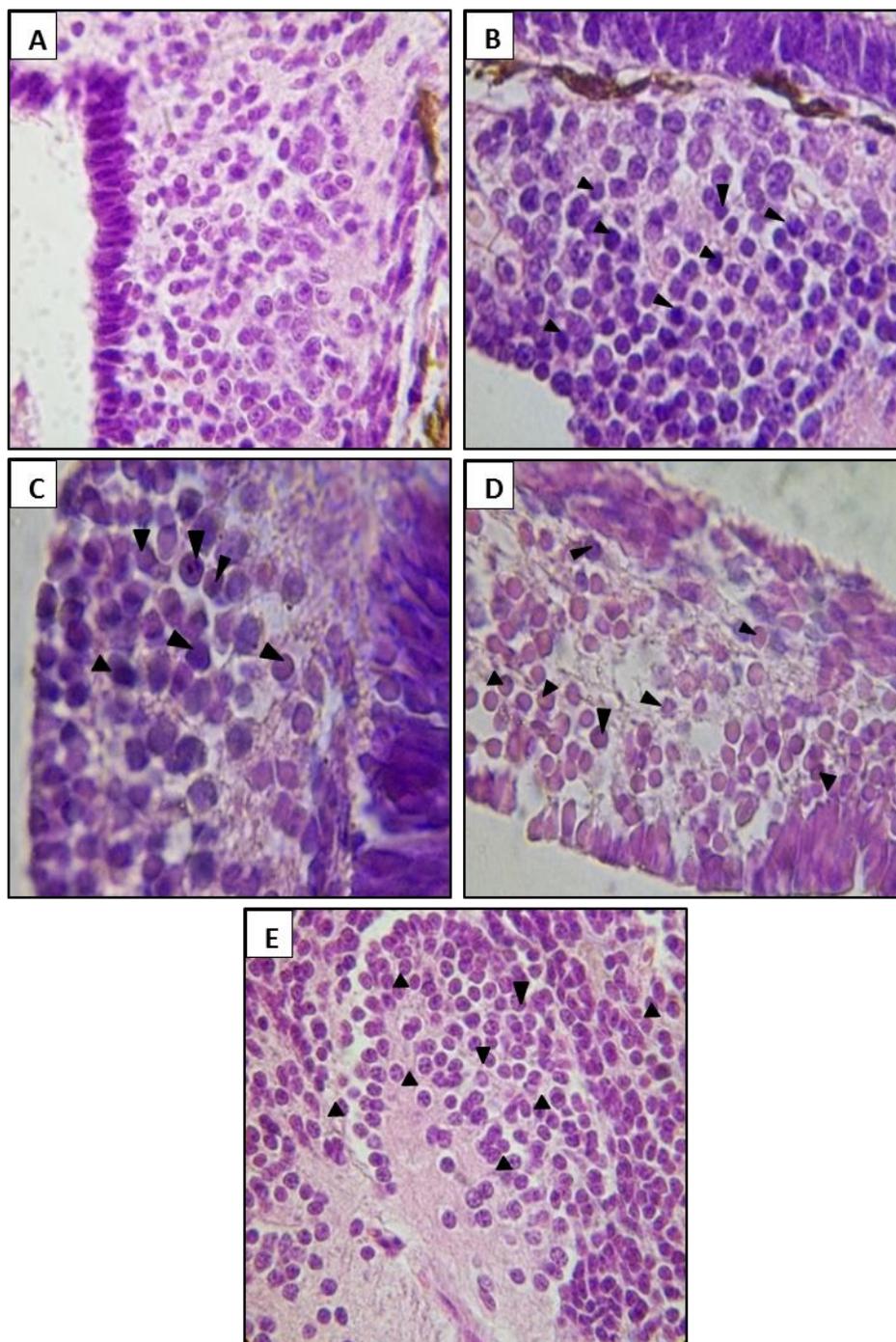


Figura 18 – Fotomicrografias da área do cerebelo de girinos dos diferentes tratamentos de exposição ao MeHg. Células com núcleos picnóticos nas áreas de cerebelo (ponta de seta). **A:** Controle negativo. **B:** Concentração 0,0004 µg/ml. **C:** Concentração 0,0007 µg/ml. **D:** Concentração 0,004 µg/ml. **E:** Concentração 0,007 µg/ml. Fotomicrografias = 1000x.

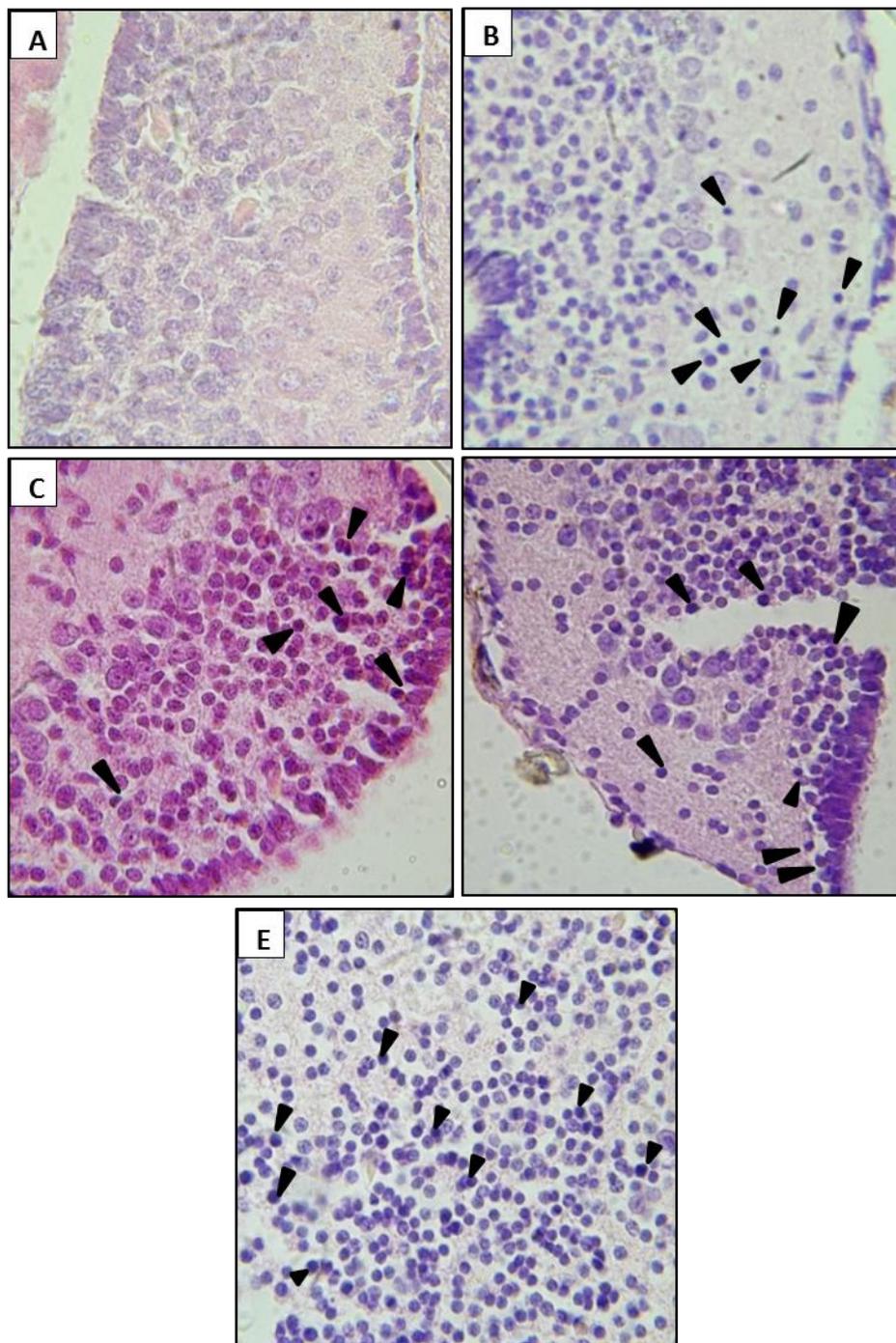


Figura 19 – Fotomicrografias da área do cerebelo de recém-metamorfoseados dos diferentes tratamentos de exposição ao MeHg. Células com núcleos picnóticos nas áreas do cerebelo (ponta de seta). **A:** Controle negativo. **B:** Concentração 0,0004 µg/ml. **C:** Concentração 0,0007 µg/ml **D:** Concentração 0,004 µg/ml. **E:** Concentração 0,007 µg/ml. Fotomicrografias = 1000x.

Tabela 7 – Média (desvio padrão \pm) de células com núcleos picnóticos e células de Purkinje no cerebelo de recém-metamorfoseados de *P. ehippifer* exposto ao ensaio toxicológico de MeHg. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (pós-teste Dunn)

Número de células (média)	Concentrações de MeHg ($\mu\text{g/ml}$)				
	0	0.0004	0.0007	0.004	0.007
Células com núcleos picnóticos ¹	7.08 ^b \pm 8.24	25.59 ^b \pm 29.88	18.19 ^b \pm 18.37	47.01 ^a \pm 45.40	56.60 ^a \pm 45.67
Células de Purkinje ²	48.25 \pm 7.34	44.52 \pm 12.72	40.52 \pm 19.60	40.22 \pm 12.25	43.12 \pm 18.20

¹ - Krukal Wallis: $H_{4,35}=13,376$; $P = 0,0096$

² - ANOVA $F_{4,35}= 0,3392$; $P = 0,8499$

5. 4. 2 Retina de *P. ehippifer*

A retina de girinos e de recém-metamorfoseados é composta histologicamente de várias camadas de células nervosas, a saber: 1) Camada de células bipolares; 2) Camada nuclear externa; 3) Camada plexiforme externa; 4) Camada nuclear interna; 5) Camada plexiforme interna e 6) Camada de células ganglionares da retina (Figura 20).

As análises histopatológicas da área da retina de *P. ehippifer* submetidos ao ensaio toxicológico de MeHg mostraram que os animais, tanto na sua fase larval (Figura 21), quanto na sua fase recém-metamórfica (Figura 22), não apresentaram danos na morfologia celular. Não foram registrados vacúolos intracelulares, nem a presença de células com núcleos picnóticos. Porém, foi observado que muitos animais apresentaram espaços intercelulares nas camadas nucleares interna e externa similar ao grupo controle negativo.

Nas análises morfométricas da retina, observou-se diferenças altamente significativas na largura da retina de recém-metamorfoseados. Os animais das maiores concentrações de MeHg (0,007 $\mu\text{g/ml}$ e 0,004 $\mu\text{g/ml}$) apresentaram a retina mais larga do que os animais dos demais tratamentos ($H_{4,440}= 49,8130$ $P < 0,0001$) (Tabela 8).

Quanto a largura de cada camada de células da retina (camada de células bipolares, camada nuclear externa, camada nuclear interna e camada das células ganglionares) foram analisadas separadamente, observou-se que as camadas de células bipolares mostraram-se mais largas nas concentrações de 0,007 $\mu\text{g/ml}$; 0,004 $\mu\text{g/ml}$ e

0,0007 $\mu\text{g/ml}$ de MeHg do que nas demais concentrações (0,0004 $\mu\text{g/ml}$ e 0 $\mu\text{g/ml}$) (Tabela 8). A camada nuclear interna e a camada das células ganglionares na concentração de 0,0007 $\mu\text{g/ml}$ de MeHg mostraram-se mais estreitas quando comparadas com os demais tratamentos.

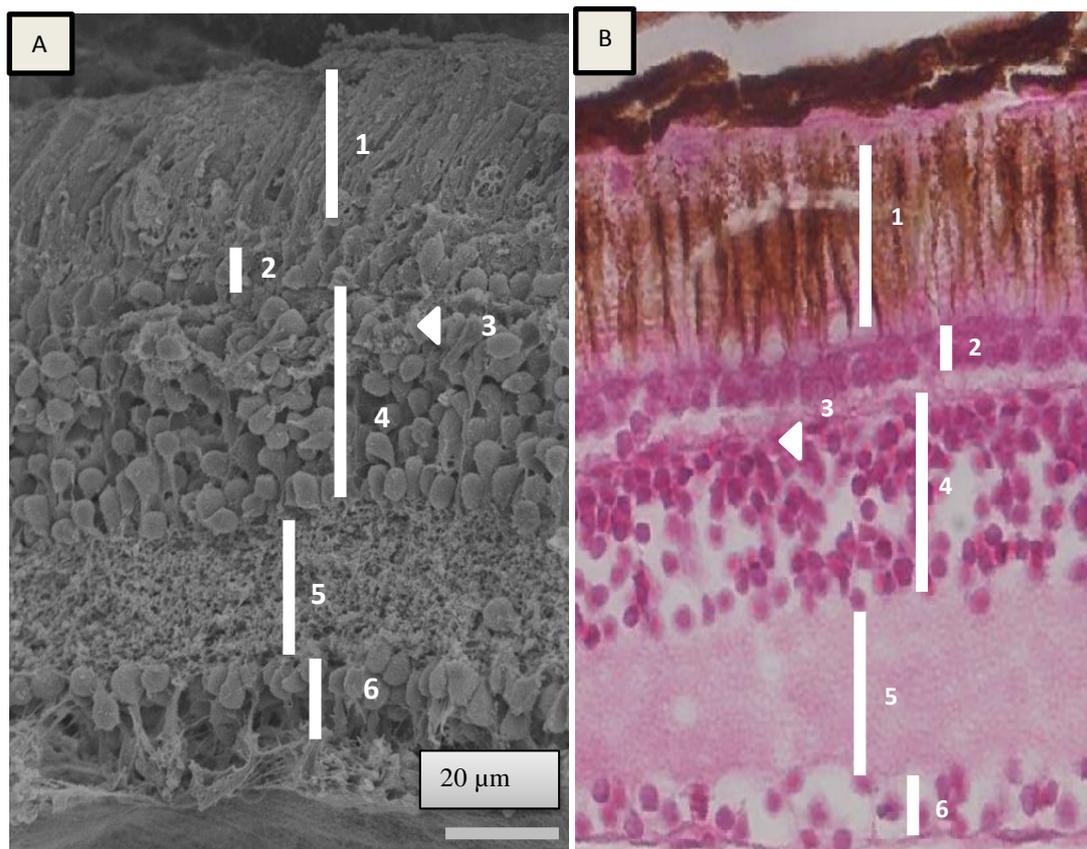


Figura 20 – Retina de *P. ephippifer*. A: Eletronmicrografia da área da retina. B: Fotomicrografia da retina 400X. 1: Camada de células bipolares; 2: Camada nuclear externa; 3: Camada plexiforme externa; 4: Camada nuclear interna; 5: Camada plexiforme Interna; 6: Camada de celulares ganglionares da retina.

Tabela 8: Média (desvio padrão \pm) das medidas da largura total e das camadas de celulares da retina de recém-metamorfoseados. Letras desiguais demonstram diferenças significativas. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (pós-teste Dunn)

Largura das camadas da retina de recém-metamorfoseados (mm)	Concentrações de MeHg ($\mu\text{g/ml}$)				
	0	0.0004	0.0007	0.004	0.007
Largura total ¹	125.1 \pm 28.37 ^c	136.0 \pm 40.83 ^c	120.3 \pm 18.14 ^c	147.3 \pm 36.28 ^b	144.2 \pm 29.19 ^a
Camada de células bipolares ²	22.54 \pm 9.36 ^c	21.21 \pm 8.84 ^c	26.38 \pm 9.99 ^a	28.77 \pm 12.50 ^b	26.88 \pm 12.51 ^a
Camada nuclear externa ³	9.63 \pm 4.15 ^a	9.22 \pm 3.90 ^a	8.43 \pm 3.07 ^a	9.10 \pm 3.36 ^a	9.48 \pm 3.2 8 ^a
Camada nuclear interna ⁴	40.70 \pm 10.24 ^a	43.30 \pm 16.14 ^a	36.37 \pm 9.65 ^b	45.44 \pm 11.51 ^a	42.59 \pm 15.08 ^a
Camada de células ganglionares ⁵	17.16 \pm 9.24 ^a	17.76 \pm 11.06 ^a	12.15 \pm 4.68 ^b	16.45 \pm 7.85 ^a	17.33 \pm 7.62 ^a

¹Kruskal-Wallis $H_{4,440} = 49,8130$ $P < 0,0001$.

²Kruskal-Wallis $H_{4,440} = 30,56$ $P < 0,0001$.

³Kruskal-Wallis $H_{4,440} = 5,7451$ $P > 0,0500$.

⁴Kruskal-Wallis $H_{4,440} = 34,0164$ $P < 0,0001$.

⁵Kruskal-Wallis $H_{4,440} = 33,8935$ $P < 0,0001$.

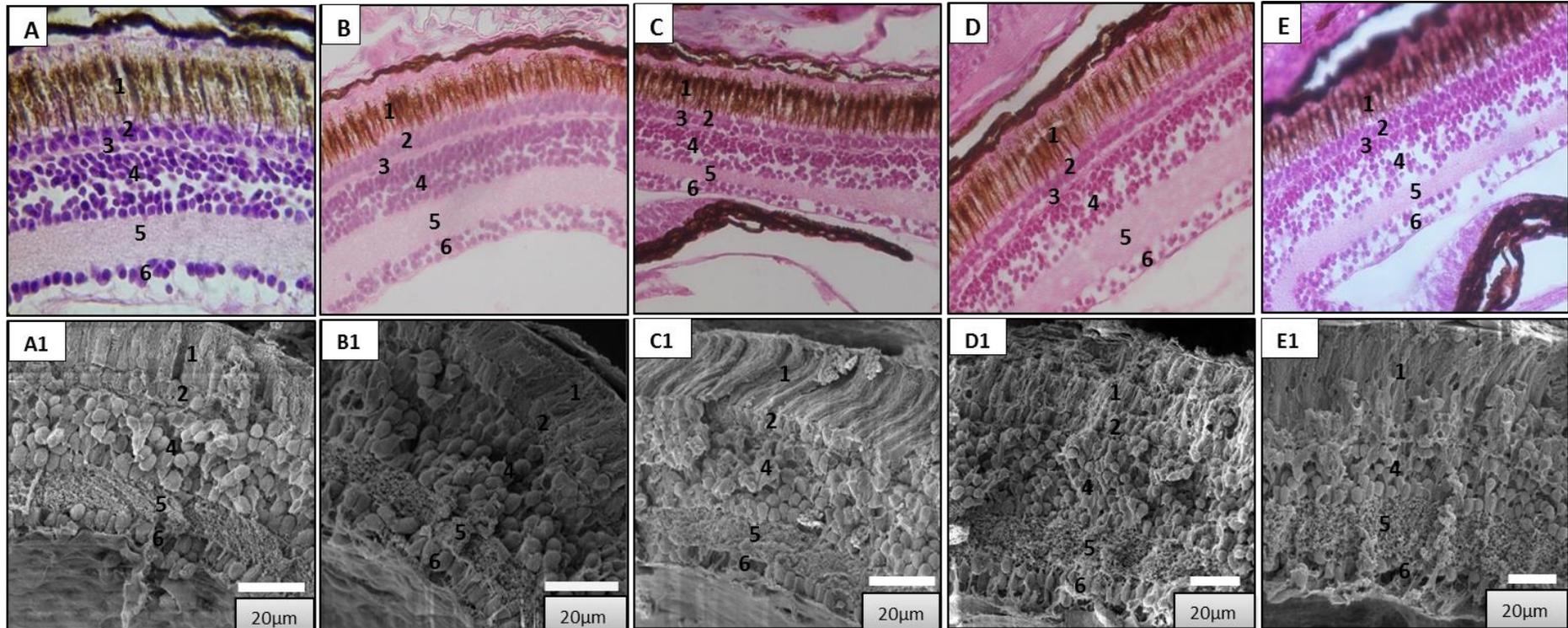


Figura 21 – Fotomicrografias de cortes da retina de girinos dos diferentes tratamentos do ensaio toxicológico ao MeHg. A: Grupo controle negativo. **B:** Concentração 0,0004 µg/ml. **C:** Concentração 0,0007 µg/ml. **D:** Concentração 0,004 µg/ml. **E:** Concentração 0,007 µg/ml. Fotomicrografias = 400x. **A1a E1:** Eletronmicrografias da retina dos girinos dos diferentes tratamentos do ensaio toxicológico de MeHg. **A1:** Grupo controle negativo. **B2:** Concentração 0,0004 µg/ml. **C1:** Concentração 0,0007 µg/ml. **D1:** Concentração 0,004 µg/ml. **E1:** Concentração 0,007 µg/ml. 1: Camada de células bipolares; 2: Camada nuclear externa; 3: Camada plexiforme externa; 4: Camada nuclear interna; 5: Camada plexiforme Interna; 6: Camada de celulares ganglionares da retina.

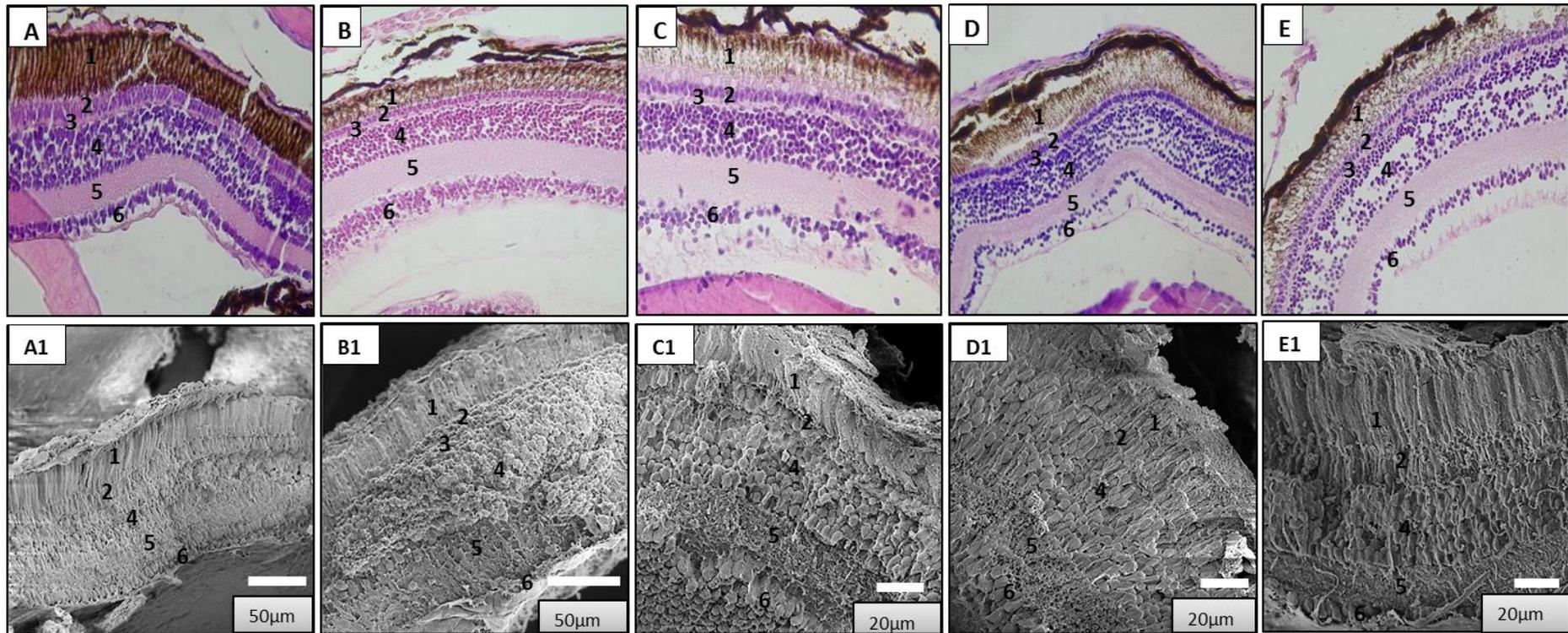


Figura 22 – Fotomicrografias da retina de recém-metamorfoseados dos diferentes tratamentos do ensaio toxicológico ao MeHg. A: Grupo controle negativo. **B:** Concentração 0,0004 µg/ml. **C:** Concentração 0,0007 µg/ml. **D:** Concentração 0,004 µg/ml. **E:** Concentração 0,007 µg/ml. Fotomicrografias = 400x. **A1 a E1:** Eletromicrografias da retina dos recém-metamorfoseados dos diferentes tratamentos do ensaio toxicológico de MeHg. **A1:** Grupo controle negativo. **B2:** Concentração 0,0004 µg/ml. **C1:** Concentração 0,0007 µg/ml. **D1:** Concentração 0,004 µg/ml. **E1:** Concentração 0,007 µg/ml. 1: Camada de células bipolares; 2: Camada nuclear externa; 3: Camada plexiforme externa; 4: Camada nuclear interna; 5: Camada plexiforme Interna; 6: Camada de celulares ganglionares da retina.

6 DISCUSSÃO

O MeHg é reconhecido como um agente teratogênico, em animais e humanos, produzindo efeitos morfológicos e comportamentais, tais como: malformação da medula espinhal, crescimento retardado do cerebelo, diminuição e atrofia das células do cérebro, alteração no comportamento de natação e coordenação motora, déficit de aprendizado e visual (CARDOSO et al., 2001; PRATI et al., 2002; SHIMAI & SATHO, 1985).

A larva do anfíbio é a fase de desenvolvimento do animal e por ser de vida livre encontra-se suscetível a agentes teratogênicos. Estudos com MeHg e cloreto de mercúrio (HgCl₂) têm mostrado que o metal pode ser o agente causador de alterações morfológicas e comportamentais nas larvas dos anfíbios. Chang et al. (1974) observaram distensão e inchaço em cavidades corporais de girinos de *Rana pipiens* expostos a 0,01 ppm de HgCl₂. Unrine et al. (2004) relataram escoliose, microftalmia, micromelia e ectromelia em girinos de *R. sphenoccephala* submetidos ao HgCl₂ na dieta. Prati et al. (2002) descreveram edema abdominal, severa flexura da cauda e microcefalia em girinos de *Xenopus laevis* nas concentrações de 0,125 µM e 0,4 µM de MeHg e Gibson (2006) relatou deformidades em 3 espécies de girinos expostos ao MeHg na dieta, como a lordose, edema no intestino, emagrecimento e inchaço.

No presente trabalho, os girinos foram expostos a 4 concentrações diferentes de MeHg. Verificou-se que a maior concentração de MeHg (0,007 µg/ml) pode ser um fator de risco para a população de anfíbios, aumentando de 25 % para 47% de chance do animal sofrer com malformações na córnea após a metamorfose. A visão é um sistema sensorial muito importante para o organismo. A maior parte das impressões do mundo e a localização espacial são baseadas na visão (KANDEL et al., 2014). Deficiência na visão em animais pode aumentar riscos de predação e dificuldades na captura de suas presas (MELA et al., 2012).

Ao longo da metamorfose os anfíbios sofrem várias conformações estruturais, e muitas delas dependem de processos mitóticos e processos apoptóticos (DUELMANN & TRUEB, 1986). Um dos mecanismos de ação do MeHg no interior da célula é a inibição do fuso mitótico levando a uma distribuição anormal dos cromossomos e poliploidia. Esta ação resulta da forte afinidade do MeHg pelos grupos sulfidrilas encontradas nas proteínas do fuso (CARDOSO et al., 2001). Células que estejam passando por este processo podem ter o seu ciclo celular alterado resultando em bloqueio do ciclo na fase S e G₂/M o que leva a uma diminuição na proliferação celular.

Malaquias (2015), em estudo com cultura de células gliais e exposição a baixa concentração de MeHg, observou uma mudança no perfil do ciclo celular com aumento da população celular nas fases S e G2/M. Essa mudança foi seguida de uma redução no número de células viáveis o que sugere um distúrbio na proliferação celular. É possível que este mecanismo esteja atuando no processo metamórfico da córnea dos anfíbios. Para muitos anfíbios anuros, a transição da larva para o adulto é acompanhada pela transição de um habitat aquático para o terrestre. Como consequência, a metamorfose nos olhos envolve um grande rearranjo e desenvolvimento de estruturas para adequação a visão terrestre. Ocorrem mudanças na posição dos olhos, na córnea, na retina e o desenvolvimento de novas estruturas oculares acessórias como as pálpebras e membrana nictitante (HOSKINS, 1990).

Durante o processo da metamorfose, a córnea, que nas larvas é composta de duas camadas, passa a ser formada apenas por uma, no recém-metamorfoseado. Ao longo da metamorfose ocorre a reestruturação da córnea onde se observa área com morte celular seguida de proliferação celular para a formação de um novo tecido (DUELMANN & TRUEB, 1986; HU et al., 2013). Este processo é mediado pelos hormônios tireoidianos que durante a metamorfose regulam o desenvolvimento dos olhos, membrana nictitante, músculos oculares e da própria córnea (KALTENBACH, 1953; HOSKINS, 1990). Assim, outra via de ação do MeHg poderia estar relacionada ao seu efeito sobre os hormônios tireoidianos. Kirubagaran & Joy (1994) verificaram que o MeHg inibiu a atividade da tireóide de “catfishs” expostos a uma concentração de 0,125 mg/L de MeHg, havendo redução dos níveis séricos de T3 e T4 nos animais tratados, quando comparados ao controle. Estudo com ratos demonstrou que o MeHg interfere no metabolismo destes hormônios interferindo na função da tireóide por provocar diminuição da captação do iodo, consequentemente diminuindo a síntese dos hormônios T3 e T4, o MeHg também interfere nos hormônios tireoidianos inibindo a enzima D3 (5-iodothyronine deiodinase) que é responsável pela conversão de T4 para T3 e T3 para as formas inativas (SOLDIN et al., 2008).

Os hormônios tireoidianos são vitais para o processo normal de metamorfose, além das alterações oculares citadas. Eles atuam na regressão da cauda, desenvolvimento dos membros e da mandíbula e mudanças em órgãos internos, particularmente nos que envolvem a respiração, a excreção e a digestão (DUELMANN & TRUEB, 1986). Alteração em sua síntese pode causar o aumento do tempo para

metamorfose, retenção de estruturas larvais nos adultos ou simplesmente impedir a metamorfose nesses animais (DUELMANN & TRUEB, 1986).

Outro efeito teratogênico avaliado no presente estudo foi a alteração de fileiras de denticulos. No entanto, os resultados do presente estudo demonstraram que tal alteração não é considerada a melhor variável de resposta a exposição ao MeHg, pois muitos são os fatores que podem causá-la, tais como: alteração microbiológica, pH, temperatura e qualidade do alimento (ALTIG, 2007).

As alterações encontradas na diminuição da quantidade de dedos em girinos e recém-metamorfoseados pode ser uma condição mais plausivelmente explicada pela própria expressão do patrimônio genético das populações afetadas, uma vez que foram encontrados poucos casos presentes em todas as concentrações da 1ª replicata do experimento.

No presente trabalho não foram encontradas diferenças significativas quanto ao tempo do surgimento da primeira metamorfose de grupos submetidos as concentrações crescentes de MeHg e o grupo controle negativo, sendo a primeira metamorfose encontrada entre o período do 19º ao 25º dia de exposição. Sendo assim, as concentrações de MeHg utilizadas por exposição na água não causam antecipação e nem atraso do clímax metamórfico da espécie. Apesar disso, foi observado que girinos expostos ao Hg na dieta podem sofrer alterações quanto a frequência em porcentagem de sucesso metamórfico (UNRINE et al., 2004).

Estudos comportamentais fornecem várias abordagens para se quantificar respostas de organismos contaminados (BROOMHALL, 2005; BRUNELLI et al., 2009; PELTZER et al., 2013). Muitas substâncias tóxicas, como o MeHg, podem contaminar os ecossistemas naturais em concentrações muito baixas, não causando mortalidade, mas prejudicando os animais, pois alteram seu comportamento natural trazendo prejuízos ecológicos. Nosso estudo não encontrou diferenças significativas na performance locomotora dos girinos de *P. ephippifer*. É possível que este fato esteja relacionado com as concentrações subcrônicas de MeHg utilizadas nestes experimentos que não foram suficientes para causar uma alteração significativa neste parâmetro. Como no presente estudo, Chen et al. (2007) não observaram nenhum efeito significativo em relação a velocidade de natação com girinos de *Rana pipens* expostos a concentrações subcrônicas de cobre (5-25 µg/L). Os efeitos deletérios só foram observados na concentração mais elevada (100µg/L), onde ocorreu uma redução na sobrevivência dos girinos (CHEN et al., 2007).

Sugere-se que o girino de *P. ephippifer*, com o passar do tempo, se torne mais resistente ao MeHg. Khangarot & Ray (1987) testando a sensibilidade a metais pesados de girinos de *Bufo melanostictus* e *Rana luteiventris* mostrou que tais espécies possuem uma variação na sensibilidade de acordo com o desenvolvimento larval: quanto mais avançado é o estágio de desenvolvimento, mais os girinos são resistentes às concentrações de metais pesados e, conseqüentemente, menos danos e alterações comportamentais são registrados.

Aronson (2011) também observou um aumento gradual na resistência de girinos de *Rhinella arenarum* expostos ao cobre, à medida que se aproximavam da metamorfose e Chen et al. (2007) observaram uma maior resistência dos girinos de *Rana pipens* aos efeitos teratogênicos do cobre em estágios mais avançados de desenvolvimento (G25 a G42) em comparação com os girinos de estágios mais atrasados (G19 a G25).

Quanto às análises do teste de desempenho locomotor dos recém-metamorfoseados, foi encontrada relação significativa quanto às distâncias dos saltos executados pelos animais ao longo da simulação de fuga predatória ($P < 0,001$). Os recém-metamorfoseados do grupo de maior concentração de MeHg ($0,007 \mu\text{g/ml}$) executaram em média saltos mais curtos em relação aos animais dos outros grupos. Isto demonstra uma debilidade na performance locomotora dos recém-metamorfoseados expostos a concentração de $0,007 \mu\text{g/ml}$ de MeHg.

Esta condição pode ser consequência de uma afecção nas estruturas neurais do anfíbio exposto. Sabe-se que o sistema nervoso central é o órgão alvo do MeHg (CARDOSO et al., 2001) e que alterações neste sistema poderiam comprometer a mobilidade desses animais através de danos na região responsável pela coordenação de movimentos, o cerebelo (CARVALHO, 2007).

O presente trabalho também demonstrou que uma porcentagem de animais recém-metamorfoseados do grupo de alta concentração de MeHg sofreu com alterações na córnea, comprometendo seriamente a visão desses animais. Como consequência, os mesmos animais exibiram debilidade na performance de fuga predatória.

Muitas espécies de anfíbios anuros tem a capacidade de acelerar o processo de metamorfose em resposta a alterações do habitat, contudo, um dos custos associados a este fenômeno é a redução do tamanho dos recém-metamorfoseados (NEWMAN, 1988). Nas análises morfométricas não foram encontradas diferenças entre os ensaios toxicológicos e o controle de girinos e recém-metamorfoseados. Unrine et al. (2004)

observaram um aumento no tamanho dos girinos em estágio 39 em grupos tratados com altas concentração de Hg na alimentação, porém encontrou recém-metamorfoseados com menor massa corporal, ressaltando que esses atingiram a metamorfose em intervalo de tempo mais curto. Os mesmos achados foram encontrados para os girinos de *Silurana tropicalis* (DAVIDSON et al., 2011). Em contrapartida, girinos de *Rana sylvatica* submetidos a concentrações subcrônicas de MeHg não apresentaram nenhuma relação da concentração de Hg com a duração do desenvolvimento de girino, tamanho para metamorfose e tempo de reabsorção da cauda (WADA et al., 2011). Tais resultados assemelham-se aos achados do presente trabalho, assim, é possível que as concentrações utilizadas não tenham sido capazes de causar alterações na morfometria do corpo de girinos e recém-metamorfoseados.

Nas análises histopatológicas de *tectum* óptico e cerebelo de girinos e recém-metamorfoseados, observou-se que tais áreas do encéfalo encontram-se íntegras quanto a presença de todas as camadas celulares e em todos os grupos do ensaio toxicológico. Em contraste, foram encontradas diferenças na morfologia de algumas células neuronais, no qual os animais, tanto girinos quanto recém-metamorfoseados tratados com MeHg apresentaram neurônios com núcleos picnóticos em todas as concentrações testadas. Além disso, foram encontrados muitos espaços extracelulares nas regiões de *tectum* óptico.

A presença de núcleos picnóticos é uma característica de células que estão em processo de morte celular. O MeHg pode ser um agente causador de apoptose, uma vez que este contaminante induz estresse oxidativo, gerando radicais livres que oxidam a cardiolipina, aumentando dessa maneira a permeabilidade mitocondrial e, como consequência disso, liberando o citocromo-C para citosol, desencadeando a morte celular (ROOS, 2011; SHENKER et al., 1999).

Observa-se adicionalmente que um dos efeitos do MeHg em células nervosas é a alteração nos canais de Cálcio (Ca⁺) via hiperestimulação de receptores NMPA (N-metil-D-aspartato). Este receptor, quando estimulado, permite que íons positivos (Ca⁺) fluam através da membrana plasmática para o interior da célula, levando a um aumento da concentração do Ca²⁺. Uma pequena variação na concentração de cálcio intracelular pode induzir as mitocôndrias a aumentarem a captação destes íons, o que leva a uma disfunção mitocondrial, elevação de radicais livres e morte celular por apoptose (BERRIDGE et al., 1998; ROOS, 2011). É possível que tais mecanismos estejam

atuando em conjunto e expliquem as quantidades massivas de células nervosas com núcleo picnótico nos animais expostos ao MeHg.

A presença de células com núcleos picnóticos nas áreas do sistema nervoso central de girinos foi também um dos principais achados dos trabalhos de Izaguirre et al. (2000) e Casco et al. (2006). Em ambas as pesquisas, os girinos foram expostos ao contaminante Cypermetrina e os autores observaram um aumento dose-dependente de células apoptóticas nos animais expostos ao contaminante.

A apoptose celular é considerada um evento normal para o controle de populações de células (ALBERTS et al., 2010). Entretanto, agentes tóxicos podem também induzir o processo apoptótico (CASCO et al., 2006; IZAGUIRRE et al., 2000; WAALKES, 2000). A quantidade massiva de células apoptóticas resulta em perda de populações celulares, resultando em perda ou dano de áreas, como observado no presente trabalho, onde observou-se danos cerebelares e no *tectum* óptico.

Bertossi et al. (2004) também encontraram danos cerebelares em animais em estágios iniciais submetidos a concentrações de MeHgCl. Tais autores observaram que embriões de galinha, submetidos a doses de 2,5µg/g por dia, apresentaram graves danos neuronais nas camadas granulares do cerebelo, neurônios de Purkinje e, principalmente, nos astrócitos. Além disto, foi observado que os vasos cerebelares se encontravam mais imaturos com pobres diferenciações nas barreiras endoteliais e, assim, com alta permeabilidade.

O cerebelo é tradicionalmente visto como a parte do sistema nervoso motor responsável pelo controle, coordenação, iniciação e regulação dos movimentos padrões (KANDEL et al., 2014; PAULIN, 1993; SENS & ALMEIDA, 2007). Sendo assim, disfunções cerebelares levam a déficits locomotores (PAULIN, 1997), levando a sintomas como desequilíbrio na marcha, descoordenação no movimento dos membros e alterações dos movimentos oculares (BUGALHO et al., 2006).

Neste estudo observou-se que animais recém-metamorfoseados do grupo de maior concentração de MeHg (0,007 µg/ml) apresentaram alterações significativas, tanto na performance locomotora ao longo da análise de fuga predatória, quanto nas análises de quantificação de células com núcleos picnóticos na área do cerebelo.

Em relação as análises comportamentais e danos neurológicos para girinos, observou-se resultados diferentes dos que foram encontrados para os recém-metamorfoseados. Não foram observadas diferenças comportamentais significativas nos girinos expostos a todas as concentrações de MeHg, no entanto, tais animais

apresentaram células com núcleos picnóticos nas áreas estudadas do encéfalo após exposição a todas as concentrações do metal. Tais achados demonstram que os danos causados nas áreas neurais do girino não são suficientes para levar a uma consequência locomotora. Uma das explicações para isso pode estar relacionada ao tempo de exposição ao MeHg, ou a concentração utilizada, que não foram suficientes para causar alterações na locomoção.

O mecanismo de regeneração do sistema nervoso talvez possa também ter contribuído para que os girinos não tenham sofrido debilidades locomotoras. Girinos anuros tem capacidade de regenerar algumas estruturas do corpo e até mesmo o próprio cérebro, habilidade esta que é perdida após a metamorfose (ENDO et al., 2007).

Foi observado que girinos antes do estágio G29 podem reparar lesões em áreas do ventrículo com células indiferenciadas, além de reconstituir o *tectum* óptico completamente no que diz respeito ao número de camadas do *tectum* e a sua espessura. Depois do estágio G30, o animal passa a regenerar apresentando irregularidades na espessura e no alinhamento das camadas do *tectum* óptico. A partir do estágio G42, o ventrículo não completa a regeneração até 90 dias após a lesão e não tem organização estratificada (ENDO et al., 2007).

Assim como o sistema nervoso central, a retina é também uma estrutura alvo do MeHg (KORBAS et al., 2013). As análises histopatológicas da área da retina de *P. ephippifer* submetidos ao ensaio toxicológico de MeHg demonstraram que tanto os girinos, quanto os recém-metamorfoseados não apresentaram danos na morfologia celular da retina. Da mesma forma, Liber (2011) não observou alterações morfológicas nas células bipolares ao avaliar o efeito das concentrações de 0,01, 0,05, 0,1 e 1 µg/g MeHg em peixes da espécie *Hoplias malabaricus*. As concentrações utilizadas no estudo de Liber (2011) são consideradas baixas em relação ao estudo de Bonci et al. (2006) mostrando que altas doses (2 µg/g e 6 µg/g) de MeHg injetadas intraperitonealmente em *Hoplias malabaricus* causam perda no número de células da retina por morte celular.

Mela et al. (2012) encontraram evidências significativas de danos nos fotorreceptores em *Hoplias malabaricus* expostos a doses inferiores (0,075 µg/g e 0,75 µg/g de MeHg/g) ao estudo de Bonci et al. (2006). Ambos os estudos descreveram o efeito do MeHg como sendo dose-dependente, ou seja, quanto maior a dose mais evidente é o efeito.

No presente estudo, observou-se que animais dos grupos de maiores concentrações de MeHg, 0,007 μ g/ml e 0,004 μ g/ml, apresentaram a camada das células bipolares mais espessa do que as dos demais grupos nos ensaios toxicológicos. Tal resultado foi intrigante, uma vez que a literatura mostra uma diminuição da densidade das células da retina como efeito do MeHg (BONCI et al., 2006). É possível que análises mais específicas, como imunohistoquímica, mapeamento da retina e microscopia eletrônica de transmissão sejam necessárias para que obtenha dados mais consistentes em relação a este efeito.

7 CONCLUSÃO

Os girinos de *P. ehippifer* suportam ambientes contaminados por MeHg sem sofrer alterações morfológicas anatômicas aparentes, porém, sofrem alterações em células nervosas do encéfalo, nas áreas de *tectum* óptico e cerebelo. Tais alterações no sistema nervoso dos girinos não chegaram a provocar debilidade na sua performance locomotora.

O MeHg apresenta potencial teratogênico para população de *P. ehippifer*, pois aumenta a ocorrência de anomalias nos recém-metamorfoseados.

Após sobreviverem durante todo o período larval em água contaminada por MeHg, os recém-metamorfoseados de *P. ehippifer* sofrem com danos no sistema nervoso central, devido a presença de uma massiva quantidade de células nervosas em processos apoptóticos nas áreas de *tectum* óptico e cerebelar.

Os recém-metamorfoseados de *P. ehippifer*, que passam seu período larval em água contaminada por MeHg na concentração de 0,007 μ g/ml (CI50%), sofrem alteração na performance locomotora, aumentando, assim, suas chances de serem predados facilmente.

Neste estudo foi verificada uma relação entre concentrações/efeito. Observou-se que as alterações teratogênicas, comportamentais e morfológicas aumentaram conforme as concentrações de MeHg, sendo os recém-metamorfoseados da maior concentração (0,007 μ g/ml) os únicos que apresentaram todas as alterações teratogênicas, comportamentais e morfológicas.

8 REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. ; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª Ed., Porto Alegre: Editora Artmed, 2010.

ALTIG, R. Comments on the descriptions and evaluations of tadpoles mouthpart anomalies. **Herpetological conservation and biology**, v. 2, n. 1, p.1 -4, Jan, 2007.

ARONSON, J. Sustainability science demands that we define our terms across diverse disciplines. **Landscape Ecology**, v. 26, p 457-460, 2011.

AULERICH, R. J.; TINGER, R. K.; IWAMOTO, S. Effects of dietary mercury on mink. **Archives of Environmental Contamination**. v. 2, n. 1, 1974.

AZEVEDO, B. F.; FURIERI, L. B.; PEÇANHA, F. M.; WIGGERS, G. A.; VASSALLO, P. F.; SIMÕES, M. R.; FIORIM J.; BATISTA, P. R.; FIORESI, M.; ROSSONI, L.; STEFANON, I.; ALONSO, M. J.; SALAICES, M.; VASSALLO D. V. Toxic effects of mercury on the cardiovascular and central nervous systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, n. 10, p. 1 - 11, 2012.

BAIRD, C. **Environmental chemistry**. 4. Ed. New York: Freeman and Company, 2008.

BANK, M. S.; CROCKER, J.; CONNERY, B.; AMIRBAHMAN, A. Mercury bioaccumulation in green frog (*Rana clamitans*) and bullfrog (*Rana catesbiana*) tadpoles from acadia national park, Maine, USA. **Environmental Toxicology and chemistry**, v. 26, n. 1, p. 118-125. 2007.

BASTOS, W. R. & LACERDA, L. D. A contaminação por mercúrio na bacia do rio madeira: uma breve revisão. **Geochemistry Brasil**. v. 18, n. 2, p. 099-114, 2004.

BERGERON, C. M.; HOPKINS, W. A.; BODINOF, C. M.; BUDISCHAK, A.; WADA, H.; UNRINE, J. M. Interactive effects of maternal and dietary mercury exposure have latent and lethal consequences for amphibian larvae. **Environmental Science & Technology**. v. 45, p. 3781-3787, 2011.

BERNTSSEN, M. H. G.; AATLAND, A.; HANDY, R. D. Chronic dietary Mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions and altered behavior in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. **Aquatic Toxicology**. v. 65, p. 55-72, 2003.

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; LIPP, P. Calcium – a life and death signal, **Nature**. v. 395, p. 645-648, Oct. 1998.

BERTOSSI, M.; GIROLAMO, F.; ERREDE, M.; VIRGINTINO, D.; ELIA, G.; AMBROSI, L.; RONCALI, L. Effects of methylmercury on the microvaculature of the developing brain, **Neurotoxicology**, [S.L.], v. 25, p. 849-857, mar, 2004.

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

BITENCOURT, P. E. R. Exposição aguda ao Metilmercúrio em ratos em desenvolvimento: mini-revisão. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 137-148, 2013.

BLAUSTEIN, A. R.; ROMANSIC, J. M.; KIESECKER, J. M.; HATCH, A. C. **Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines**. Diversity and Distributions A journal of conservation biogeography. 2003. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com> Acesso em 05 nov. 2015.

BONCI, D. M. O.; LIMA, S. M. A.; GROTZNER, S. R.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; HAMASSAKI, D. E.; VENTURA, D. F. Losses of immunoreactive parvalbumin amacrine and immunoreactive a protein kinase C bipolar cells caused by methylmercury chloride intoxication in the retina of the tropical fish *Hoplias malabaricus*. **Brazilian journal of medical and Biological research**, v. 39, p. 405-410, 2006.

BONSIGNORE, M.; SALVAGIO MANTA, D.; OLIVEIRA, E.; SPROVIERI, M.; BASILONE, G.; BONANNO, A.; FALCO, F.; TRAINA, A.; MAZZOLA, S. **Mercury in fishes from Augusta Bay (Southern Italy): Risk assessment and health implication**, Food and Chemical Toxicology. v. 56, p. 184-194. 2013.

BRABO, E. S.; SANTOS, E. O.; JESUS, I. M.; MASCARENHAS, A. F.; FAIAL, K. F. Níveis de mercúrio em peixes consumidos pela comunidade indígena de Sai Cinza na Reserva Munduruku, Município de Jacaraeacanga, Esta do Pará, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, (RJ), v. 15, n. 2, p. 325-331, 1999.

BRIDGES. C. M. Effects of a pesticide on tadpole activity and predator avoidance behavior. **Journal herpetology**, v. 33, n. 2, jun. 1997.

BRITSON, C.A. & THRELKELD, E. T. Abundance, metamorphosis, developmental, and behavioral abnormalities in *Hyla chrysoscelis* tadpoles following exposure to three

agricultural and methyl mercury in outdoor mesocosms. **Environmental Contamination and toxicology**, v. 61, p. 154-161, 1998.

BROOMHALL, S. D. Measuring chemical impacts on amphibians: Ecotoxicity and behavioral data in governmental regulation. **Applies herpetology**. v. 2, n. 3, p. 259-285. 2005.

BRUNELLI, E.; BERNABÓ, I.; BERG, C.; LUNDSTEDT-ENKEL, K.; BONACCI, A.; TRIPEPSI, S. Environmentally relevant concentrations of endosulfan impair development, metamorphosis and behaviour in *Bufo bufo* tadpoles. **Aquatic toxicology**. v. 91, p. 135–142, 2009.

BUGALHO, P.; CORREA, B.; VIANA-BAPTISTA, M. Papel do cerebelo nas funções cognitivas e comportamentais: Bases científicas e modelos de estudo. **Acta médica portuguesa**, v. 19, p. 257-268, 2006.

BURKE, J. N.; BERGERON, C. M.; TODD, B. D.; HOPKINS W. A. Effects of mercury on behavior and performance of northern two-lined salamanders (*Eurycea bislineata*). **Environmental pollution**, v. 158, p. 3546-3551, 2010.

CANO, T. M. Efeitos deletérios e teratogênicos da exposição ao mercúrio – Revisão de literatura. **Revista de medicina e saúde de Brasília**. v. 3, n. 3, p. 288-300, 2014.

CARDOSO, P. C. S.; LIMA, P. L.; BAHIA, M. O.; AMORIM, M. I. M.; BURBANO, R. R.; FARIAS, R. A. F. Efeitos biológicos do mercúrio e seus derivados em seres humanos: uma revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 15, n. 4, p. 51-58, 2001.

CARVALHO, M. C. **Efeitos neurotóxicos da exposição perinatal ao metilmercúrios em *Gallus domesticus***. 2007. f. Dissertação (Mestrado em Neurociências)-Centro de Ciências Biológicas da Universidade de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, 2007.

CASCO, V. H.; IZAGUIRRE, M. F.; MARÍN, L.; VERGARA, M. N.; LAJMANOVICH, R. C.; PELTZER, P. Apoptotic cell death in the central nervous system of *Bufo arenarum* tadpoles induced by cypermethrin, **Cell biological toxicology**, v. 22, n. , p. 199-211, jan, 2006.

CASTOLDI, A. F.; BARNI S. TURIN, I.; GANDINI, C.; MANZO, L. Early acute necrosis, delayed apoptosis and cytoskeletal breakdown in cultured cerebellar granule neurons exposed to methylmercury. **Journal of Neuroscience Research**, v. 59, p. 775-787, 2000.

CHANG, L. W.; REUHL, K. R.; DUDLEY JR, A. W. Effects of methylmercury chloride on *Rana pipiens* tadpoles. **Environmental Research**, v. 8, p. 82-91, 1974.

CHARBONNIER J. F. & VONESH J. R. Consequences of life history switch point plasticity for juvenile morphology and locomotion in the Túngara frog. **PeerJ**. v. 3, n. e1268, sep 2015.

CHEN, T. H.; JACKSON, G.; WILLIAM, K. Adverse effects of chronic copper exposure in larval northern Leopard frogs (*Rana pipiens*). *Environmental toxicology and chemistry*. v. 26, n. 7, p. 1470-1475. 2007.

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

CLARCKSON, T. W. & STRAIN, J. J. Nutritional factors may modify the toxic action of methyl Mercury in fish-eating populations. **American society for nutritional sciences**, v. 133, p. 1539-1543, 2003.

COELHO-SOUZA, S. A.; MIRANDA, M. R.; GUIMARÃES, J. R. D. A importância das macrófitas aquáticas no ciclo do mercúrio na bacia do rio Tapajós (PA). **Oecologia Brasiliensis**, v. 11 n. 2, p. 252-263, 2007.

COSTA, C. N.; MEURE, E. J.; BISSANI, C. A.; SELBACH, P. A. **Em contaminantes e poluentes do solo e do ambiente**, Meurer, E. J. ed: Evangraf; Porto Alegre, 2006.

CRUMP, M.L. Quantitative analysis of the ecological distribution of a tropical herpetofauna. **Occasional papers of the museum of natural History University of the Kansas**, v. 3, p. 1-62. 1971

DAVIDSON, M. A.; CROTEAU, M. C.; MILLAR, C. S.; TRUDEAU, V. L.; LEAN, D. R. S. Fate and developmental effects of dietary uptake of methylmercury in *Silurana tropicalis* tadpoles. **Journal of toxicology and environmental health**, v. 74, n.6, 2011.

DUELMANN, W. E. & TRUEB L. **Biology of amphibians**. NY: McGraw-hill Co., 1986.

EIJK, W. V. D. 2007. *Physalaemus ephippifer*. 1 fot. Disponível em: <http://picsr.com/photos/mafkees/page5>. Acesso em 20 de março de 2016.

ENDO, T.; YOSHINO, J.; KADO, K.; TOCHINAI, S. Brain regeneration in anuran amphibians. **Development growth differentiation**. v. 49, p. 121-129, 2007.

FROST, D. R. **Amphibian Species of the World 6.0: An Online Reference**, v. 2. 2000. Disponível em: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia>. Acesso em: 25 de julho de 2016.

GIBSON, J. C. W. **The effects of methylmercury ingestion on amphibian tadpoles**. 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado em toxicologia ambiental e química) Faculty of Science University of Ottawa. 2006.

GOSNER, K. L. A simplified table for staging anuran embryos larvae with notes on identification. **Herpetologica**. v. 16, p. 183-190. 1960.

GREEN, D. M. Perspectives on amphibians population declines: defining the problem and searching for answers. In: David M. Green. **Amphibians in Decline: Canadian Studies of a Global Problem**. 2. ed., Missouri. USA: Saint louis, 1997. cap. 29, p. 291-308.

HEINZ, G. H. & HOFFMAN, D. J. Methylmercury chloride and selenomethionine interactions on health and reproduction in mallards. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, p. 139-145, 1998.

HODL, W. An analysis of foam nest construction in the neotropical frog *Physalaemus ephippifer* (Leptodactylidae). **Copeia**. v. 1990, n. 2, p. 547-554, jun. 1990.

HOSKINS, S. G. Metamorphosis of the amphibian eye. **Journal of neurobiology**. v. 21, n. 7, p. 970-989, jun, 1990.

HOTHEM, R. L. & JENNINGS M. R. Mercury contamination in three species of anuran amphibians from the Cache Creek Watershed, California, USA. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 163, p. 433-448, 2010.

HU, W.; HAAMED, N.; LEE, J.; KINOSHITA, T.; OHNUMA, S.; The structure and development of *Xenopus laevis* cornea. **Experimental eye research**. v. 116, p. 109-128. 2013.

IZAGUIRRE, M. F.; LAJMANOVICH, R. C.; PELTZER, P. M.; SOLER, A. P.; CASCO, V. H. Cypermethrin-induced apoptosis in the telencephalon of *Phrynobatrachus biligonigerus* tadpole (Anura: Leptodactylidae). **Environmental contamination and toxicology**, v. 65, n. , p. 507-507, jul. 2000.

KALTENBACH, J. C. Local action of thyroxin on amphibian metamorphosis. **Journal Experimental Zoology**, v.122, p. 41-51, 1953.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M.; SIEGELBAUM, S. A.; HUDSPETH, A. J. . **Princípios de Neurociências**. 5. Ed. Porto alegre: AMGH, 2014.

KEHRIG, H. A. & MALM, O. Bioconcentração e biomagnificação de metilmercúrio na baía de Guanabara, Rio de Janeiro. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 377-384, 2011.

KHANGAROT, B. S. & RAY, P. K. Sensivity of toad tadpoles, *Bufo melanostictus* (Schneider), to heavy metals. **Bulletim of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 38, p. 523-527, 1987.

KIRUBAGARAN, R. & JOY, K. P. Effects of short-term exposure to methylmercury chloride and its withdrawal on serum levels of thyroid hormones in the catfish *Clarias batrachus*. **Bulletin of environmental contamination & toxicology**. v. 53, p. 166-170, 1994.

KORBAS, M.; LAI, B.; VOGT, S.; GLEBER, S. C.; KARUNAKARAN, C.; PICKERING, I. J.; KRONE, P. H.; GEORGE, G. N. Methylmercury targets photoreceptor outer segments. **ACS Chemical Biology**. v. 8, n. 10, p. 2256-2263. 2013.

LACERDA, L. D. Emissão de mercúrio para a atmosfera pela queima de gás natural no Brasil. **Química Nova**, vol. 30, No. 2, 366-369, 2007.

LAMEIRÃO, S. V. O. C. **O efeito do metilmercúrio nas células ganglionares da retina de tucunaré (*Cichla sp.*)**. 2008. 64 f. Tese (Doutorado em Neurociências e Biologia Celular)-Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará – UFPA, Belém, 2008.

LEFCORT, H.; MEGUIRE, R. A.; WILSON, L. H.; ETTINGER, W. F. Heavy Metals Alter the Survival, Growth, Metamorphosis, and Antipredatory Behavior of Columbia Spotted Frog (*Rana luteiventris*) Tadpoles. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 35, p. 447-456, 1998.

LIBER, A. M. P. **Análise de células bipolares PKC α -IR e células ganglionares da retina do peixe tropical *Hoplias malabaricus* intoxicado com baixas doses agudas de metilmercúrio.** 2011. 74f. Dissertação (Mestrado em psicologia)- Programa de neurociências e comportamento do instituto de psicologia da universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

LUI, K. & WHITTAKER, K. *Physalaemus ephippifer*. 2014. 1 fot. Disponível em: <http://amphibiaweb.org/species/3396> Acesso em 20 de julho de 2016.

MALAGUIAS, A. C. **Exposição à concentração subletal de metilmercúrio: genotoxicidade e alterações na proliferação celular.** 2015. 78f. Tese (Doutorado em Neurociências e Biologia celular) Programa de pós-graduação em Neurociências e biologia celular da Universidade Federal do Pará – UFPA, Belém, 2015.

MARR, C. L. & ROBERTSON, K. Methylmercury in biota downstream of Arivaca Lake, Arizona, USA. *Archives Environmental Contamination Toxicology*, v. 66, p. 327–340, 2014.

MCDIARMID, R. W. & ALTIG, R. **Tadpoles: the biology of anuran larvae.** (2008). 1 fot.

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

MIRANDA, M. R.; COELHO-SOUZA, S. A.; GUIMARÃES, J. R. D.; CORREIA, R. R. S.; OLIVEIRA, D. Mercúrio em sistemas aquáticos: fatores ambientais que afetam a metilação. *Oecologia Brasiliensis*, v. 11, n. 2, p. 240-251, 2007.

NAGASHIMA, K. A review of experimental methylmercury toxicity in rats: Neuropathology and evidence for apoptosis. *Toxicologic pathology*, v. 25, n. 6, p. 624-631, 1997.

NEWMAN, R. A. Adaptive plasticity development of scaphiopus couchii tadpoles in desert ponds. *Evolution*, v. 42, n. 4, p. 774-783, jul. 1988.

OLIVEIRA, L. C.; SERUDI, R. L.; BOTERO, W. G.; MENDONÇA, A. G. R.; SANTOS, A.; ROCHA, J. C.; NETO, F. S. C. Distribuição de mercúrio em diferentes solos da bacia do médio Rio Negro-AM: Influência da matéria orgânica no ciclo biogeoquímico do mercúrio. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 274-280, 2007.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; BELGER, L.; É PELLETIER; ROULEAU, C. Histopathological evidence on inorganic Mercury and methyl Mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Environmental research**. v. 90, n. 3, p. 217-225, 2002.

PASSOS, C. J. S. & MERGLER, D. Human mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 4, p. 503-520, 2008.

PAULIN, M. G. The role of the cerebellum in the motor control and perception. **Brain behavior Evolution**, v. 41, n. 1, p. 39-50, 1993.

PAULIN, M. G. Neural representations of moving systems. *International review of neurobiology*. v. 41, 1997.

PELTZER, P. M.; JUNGES, C. M.; ATTADEMO, A. M.; BASSÓ, A.; GRENÓN, P.; LAJMANOVICH, R. C. Cholinesterase activities and behavioral changes in *hypsiboas pulchellus* (Anura: Hylidae) tadpoles exposed to glufosinate ammonium herbicide. **Ecotoxicology**, v.22, n. 7, p. 1165-1173, sept 2013.

PRATI, M.; GORNATI, R.; BORACCHI, P.; BIGANZOLI, E.; FORTANER, S.; PIETRA, R.; SABBIONI, E.; BERNARDINI, G. A comparative study of the toxicity of Mercury dichloride and methylmercury, assayed by the frog embryo teratogenesis assay-xenopus (FETAX). **Atla**. v. 30, n. , p. 23-32, Jan. 2002.

ROCHA, C. A. M. **Avaliação da genotoxicidade do cloreto de metilmercúrio em duas espécies de peixes neotropicais**. 2009. 69 f. Tese (Doutorado em Neurociências e Biologia Celular) Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

ROOS, D. H. **Mecanismos de captação e toxicidade do metilmercúrio**: envolvimento do sistema glutamatérgico e do cálcio em fatias e mitocôndrias de ratos. 2011. 77 f. Tese (Doutorado em bioquímica toxicológica) Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

ROOS, D. H.; PUNTEL, R. L.; LUGOKENSKI, T. H.; INEU, R. P.; BOHRER, D.; BURGER, M. E.; FRANCO, J. L.; FARINA, M.; ASCHNER, M.; TOCHA, J. B. T.; BARBOSA N. B. V.; Complex methylmercury-cysteine alters Mercury accumulation in

diferente tissues of mice. **Basic & Clinical pharmacology & Toxicology**, v. 107, p. 789-792, 2010.

ROULET, M.; LUCOTTE, M.; CANUEL, R.; FARELLA, N. Spatio-temporal geochemistry of Mercury in Waters of the Tapajós and Amazon rivers, Brazil. **Limnology Oceanography**, v. 46, n.5, p.1141-1157, 2001.

SANTOS, F. L. O.; GATTI, R. M.; SOUZA, P. R. K. Presença de mercúrio em peixes e sua correlação com a intoxicação alimentar. **Revista Brasileira de Ciências da saúde**, v. 9, p. 37-41, 2006.

SENS, P. M. & ALMEIDA, C. I. R. Participação do cerebelo no processamento auditivo. **Revista brasileira de otorrinolaringologia**, v. 73, n. 2, p. 266-270, apr. 2007.

SHENKER, B. J.; GUO, T. L.; O-SULLIVAN, I.; SHAPIRO, I. M. Induction of apoptosis in human t-cells by methyl Mercury: temporal relationship between mitochondrial dysfunction and loss of reductive reserve. **Toxicology and applied pharmacology**. v. 157, p. 23-35, 1999.

SHIMAI, S. & SATHO, H. Behavioral teratology of methylmercury. **Journal toxicology science**. v. 10, p. 199-216. 1985.

SILVANO, D. L. & SEGALA, M. V. Conservation of Brazilian Amphibians. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 653-658, 2005.

SISINNO, C. L. S. & OLIVEIRA-FILHO, E. C. **Princípios de toxicologia ambiental: conceitos e aplicações**. Edição 1. Rio de Janeiro: Interciência, 2013. p. 39.

SOLDIN, O. P.; O'MARA, D. M.; ASCHNER, M. Thyroid hormones and methylmercury toxicity. **Biological trace element**. v. 126, n. 0, p. 1-12, 2008.

SOUZA, W. B. & SANTANA, G. P. O caso do mercúrio: Toxicidade dos organomercuriais. **Scientia Amazonia**, v. 2, n. 2, p. 20-28, 2013.

STUART, S. N.; CHANSON, J. S.; COX, N. A.; YOUNG, B. E.; RODRIGUES, A. S. L.; FISCHMAN, D. L.; WALLER, R. W. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science**, v. 306, n. 5702, p. 1783-1786, 2004.

TODD, B. D.; BERGERON, C. M.; HEPNER, M. J.; BURKE, J. N.; HOPKINS, W. A. Does maternal exposure to an environmental stressor affect offspring response to predators?. **Oecology**, v. 166, p. 283-290, 2011.

TOLEDO, L. F.; CARVALHO-E-SILVA, S. P.; SÁNCHEZ, C.; ALMEIDA, M. A.; HADDAD, C. F. B. A revisão do código florestal brasileiro: impactos negativos par a conservação dos anfíbios. **Biota Neotrópica**. v. 10, n. 4, p. 35-38 , 2010.

UNRINE, J. M.; JAGOE, C. H.; HOPKINS, W. A.; BRANT, H. A. Adverse effects of ecologically relevant dietary mercury exposure in Southern leopard frog (*Rana sphenocephala*) larvae. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 12, p. 2964–2970, 2004.

UNRINE, J. M.; JAGOE, C. H.; BRINTON, A. C.; BRANT, H. A.; GARVIN, N. T. Dietary mercury exposure and bioaccumulation in amphibian larvae inhabiting Carolina bay wetlands. **Environmental Pollution**, v. 135, p. 245-253 , 2005.

UNRINE, J. M.; HOPKINS, W. A.; ROMANEK, C. S.; JACKSON, B. P. Bioaccumulation of trace elements in omnivorous amphibian larvae: Implications for amphibian health and contaminant transport. **Environmental Pollution**. v.149, p. 182-192, 2007.

VIEIRA, W. L. S. & ARZABE, C. **Descrição do girino de *Physalaemus cicada* (Anura, Leiuperidae)**. Jun. 2008. 1fot.

WAALKES, M. P.; FOX, D. A.; STATES, J. C.; PATIERNO, S. R.; MCCABE JR, M. J. Metals and disorders of cell accumulation: modulation of apoptosis and cells proliferation. **Society of toxicology**. v. 56, p. 255-261. April, 2000.

WADA, H.; BERGERON, C. M.; ANNE MCNABB, F. M. TODD, B. D.; HOPKINS, A. Dietary mercury has no observable effects on thyroid-mediated processes and fitness-related traits in wood frogs. **Environmental Science & Technology**, v.45, p. 7915–7922, 2011.

WASSERMAN, J. C.; HACON, S. S.; WASSERMAN, M. A. O ciclo do mercúrio no ambiente amazônico. **Mundo & Vida**. v. 2, n. ½, p. 46-53, 2001.

WIENER, J. G.; KRABBENHOFT, D. P.; SCHEUHAMMER A. M. Ecotoxicology of Mercury. Chapter 16. **Handbook of Ecotoxicology**, 2ª ed. Lewis Publishers. CRC Press Company. Boca Raton, FL, p. 407-461. 2003. Disponível em:

www.book.google.com.br/books?id=6U3MBQAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false Acesso em: 10 outubro 2015.

WREN, C. D.; HUNTER, D. B.; LEATHERLAND, J. F.; STOKES, P. M. The effects of polychlorinated biphenyls and methylmercury, singly and in combination on mink. II: Reproduction and kit development. **Archives Environmental contamination and toxicology**. v. 16, p. 449-454, 1987.

ZACHEU, F. M. **Efeito de Metilmercúrio em células HeLa Transfectadas com ADAM23**. 2009. 48 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Área de concentração patologia)- Departamento de Patologia Básica, setor de Ciências Biológicas - UFPR, Curitiba, 2009.

ANEXO A



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 53433-1	Data da Emissão: 30/03/2016 11:52	Data para Revalidação*: 29/04/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Veronica Regina lobato de Oliveira Bahla	CPF: 370.440.792-53
Título do Projeto: Efeito do metilmercurio no desenvolvimento embrionário e metamorfose de physalaemus ephippifer (Anura, Leiperidae)	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ	CNPJ: 34.621.748/0001-23

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta dos animais para experimento	04/2016	06/2017
2	Padronização de técnicas de criação do animal modelo.	06/2016	09/2016
3	Realização da CI 50% e CL1%	10/2016	01/2017
4	Realização do ensaio toxicológico	02/2017	06/2017
5	Análises histológicas	07/2017	12/2017
6	Análise do teste do cometa	07/2017	12/2017
7	Análise de imunohistoquímica	07/2017	12/2017
8	Realização das análises de desempenho fisiológico	07/2017	12/2017
9	Identificação de efeitos teratogênicos	07/2017	12/2017
10	Análise dos resultados	11/2017	01/2018
11	Redação de relatórios e artigos	01/2018	03/2018

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	1)Consta no projeto ora Autorizado que os girinos serão mantidos no Biotério experimental do Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento/UFPa, coordenado pelo prof.Dr.Amaury Gouveia Jr.Tal biotério é cadastrado na CEUA/UFPa, devidamente credenciada junto Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal/MCTI. 2) O veterinário responsável técnico é Gerlane Nunes Noronha CRMV1731-PA.
---	---

Equipe

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 98344356





Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 53433-1	Data da Emissão: 30/03/2016 11:52	Data para Revalidação*: 29/04/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Veronica Regina lobato de Oliveira Bahia	CPF: 370.440.792-53
Título do Projeto: Efeito do metilmercúrio no desenvolvimento embrionário e metamorfose de physalaemus ephippifer (Anura, Leptodelephippidae)	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ	CNPJ: 34.621.748/0001-23

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Ailin Castelo Branco	Responsável pelas análises morfológicas e genotóxicas	513.399.432-04	5621985 ssp-PA	Brasileira
2	Marcelo de Oliveira Bahia	Responsável pelas análises genotóxicas	296.261.102-97	1655413 ssp-PA	Brasileira
3	Adriana Costa Guimarães	Colaboradora análises histológicas	635.568.802-10	2773797 ssp-PA	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SANTA BARBARA DO PARA	PA	Reserva Gunma	Fora de UC Federal
2	BELEM	PA	Belém	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Physalaemus ephippifer (*Qtde: 250)
2	Manutenção temporária (até 34 meses) de vertebrados silvestres em cativeiro	Physalaemus ephippifer

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Anfíbios)	Outras amostras biológicas
2	Método de captura/coleta (Anfíbios)	Puça, Peneira

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARA	colecção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 98344356

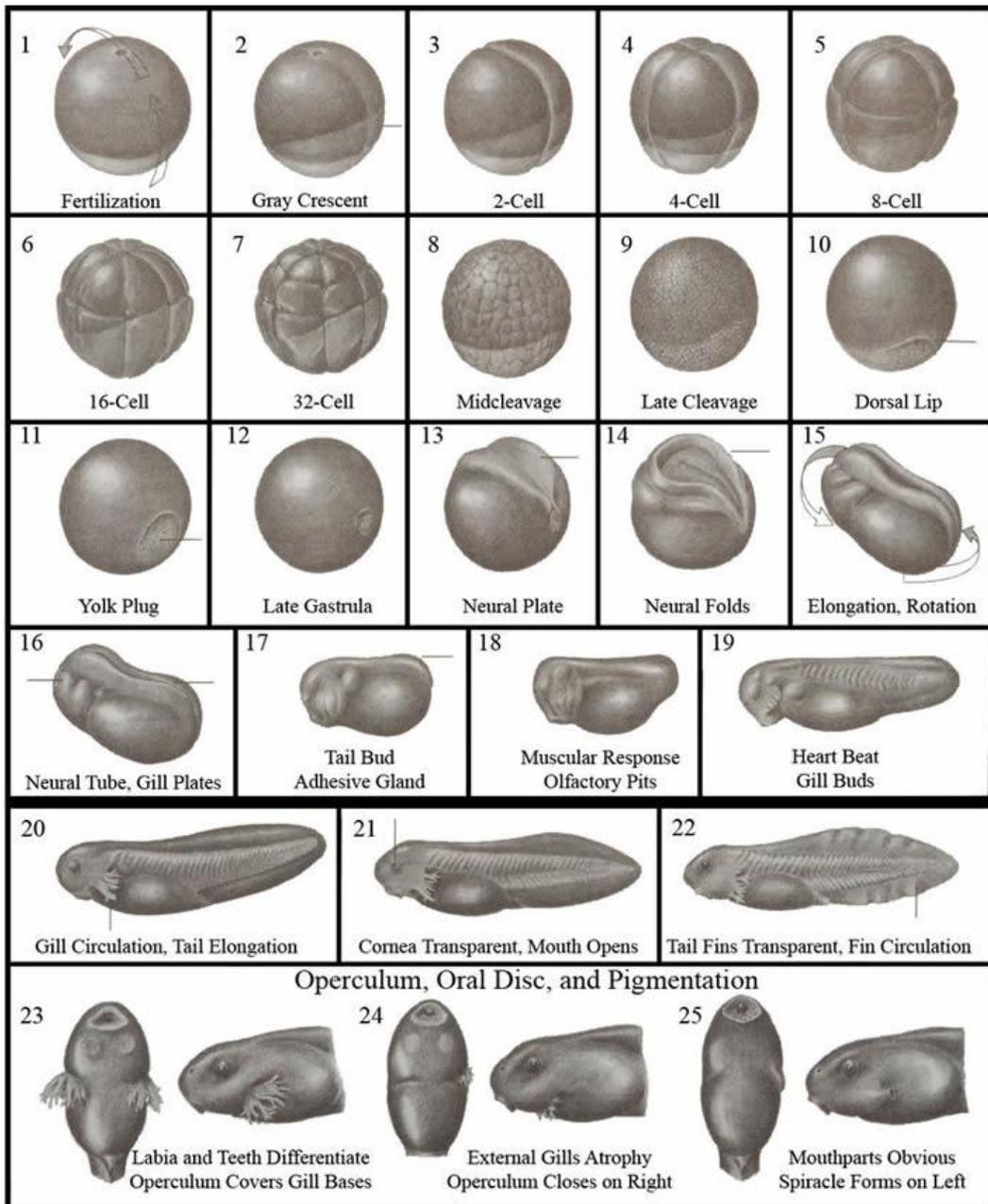


Página 2/3

ANEXO B

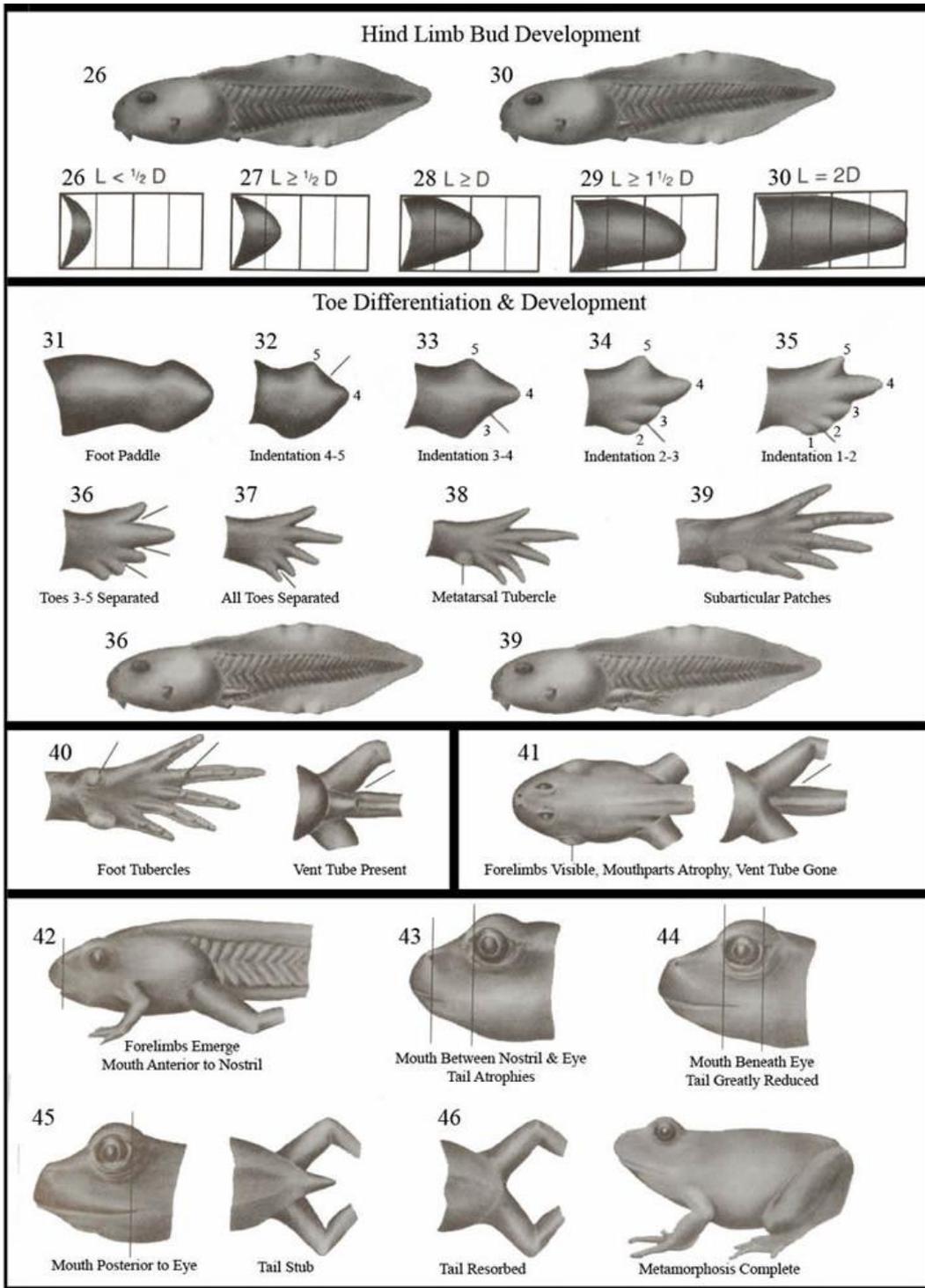
Tabela de Gosner (1960) retirada do site

<http://www.virginiaherpetologicalsociety.com/amphibians/amphibian-development/amphibian-development.htm> Acesso 25/10/2016.



Continua...

Continuação



ANEXO C



UFPA
Universidade Federal do Pará

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito do metilmercúrio no desenvolvimento embrionário e metamorfose de *Physalaemus ephippifer* (Anura, Leiuperidae)", protocolado sob o CEUA nº 6371061016, sob a responsabilidade de **Veronica Regina Lobato De Oliveira Bahia e equipe; Ailin Castelo Branco; Amaury Goveia Jr; Marcelo De Oliveira Bahia** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) em reunião de 24/11/2016.

We certify that the proposal "Effect of methylmercury in embryonic development and metamorphosis of *Physalaemus ephippifer* (Anura, Leiuperidae)", utilizing 225 Amphibians (males and females), protocol number CEUA 6371061016, under the responsibility of **Veronica Regina Lobato De Oliveira Bahia and team; Ailin Castelo Branco; Amaury Goveia Jr; Marcelo De Oliveira Bahia** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 11/24/2016.

Vigência da Proposta: de 09/2016 a 09/2017

Área: lcb-ufpa

Procedência: Biotério do núcleo teórico de pesquisa do comportamento

Espécie: Anfíbios

Gênero: Machos e Fêmeas

idade: 5 a 30 dias

N: 225

Linagem: Girinos

Peso: 1 a 2 g

Resumo: Nas últimas décadas vêm-se observando um declínio da população de anfíbios em diferentes regiões do mundo. Tal declínio pode estar relacionado com a contaminação do meio ambiente por metais pesados como mercúrio. A forma orgânica deste metal se encontra em ambientes aquáticos e é altamente lipossolúvel, podendo se acumular nos tecidos dos animais e exercer sua ação tóxica alterando todo o metabolismo do animal. Para as populações de anfíbios, que possuem um ciclo de vida com uma fase aquática e outra terrestre, a bioacumulação desses metais é estratégica, pois essas populações podem acumular esses metais, do meio aquático, e transportá-los para o meio terrestre. Em anfíbios, os poucos estudos existentes relatam os efeitos do metilmercúrio na fase de girino. Contudo, as fases da embriologia e da metamorfose são momentos críticos que as populações de anfíbios estão expostas a altas concentrações de metilmercúrio no ambiente e não são alvos destas pesquisas. Neste contexto, o nosso estudo tem como o objetivo de analisar os efeitos do metilmercúrio no desenvolvimento embrionário e na metamorfose de anfíbios, utilizando como ferramenta de investigação a microscopia óptica, eletrônica, imunohistoquímica e análises de genotoxicidades. Com os resultados pretendemos gerar mais conhecimentos sobre os efeitos do metilmercúrio nessas populações.

Belém do Pará, 21 de dezembro de 2016

Prof. Dr. Moisés Hamoy
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará