



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

LORENA ARAÚJO DA CUNHA

**Avaliação *in vivo* do potencial efeito protetor da Prolactina
contra danos causados pelo Metilmercúrio**

BELÉM

2022

LORENA ARAÚJO DA CUNHA

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO POTENCIAL EFEITO PROTETOR
DA PROLACTINA CONTRA DANOS CAUSADOS PELO
METILMERCÚRIO**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como um dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Neurociências e Biologia Celular .

Orientador: Rommel Mario Rodriguez Burbano

Coorientador: Carlos Alberto Machado da Rocha

BELÉM

2022

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

- C972a Cunha, Lorena Araújo da.
Avaliação in vivo do potencial efeito protetor da
Prolactina contra danos causados pelo Metilmercúrio /
Lorena Araújo da Cunha. — 2022.
89 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof. Dr. Rommel Mario Rodriguez
Burbano
Coorientador(a): Prof. Dr. Carlos Alberto Machado da
Rocha
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém,
2022.
1. Metilmerrcúrio. 2. Prolactina. 3. citotoxicidade. 4.
genotoxicidade. 5. danos histológicos. I. Título.

CDD 574.8765

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lorena Araújo da Cunha

Avaliação *in vivo* do potencial efeito protetor da Prolactina contra danos causados pelo Metilmercúrio

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como um dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Neurociências e Biologia Celular .

Aprovado em: 18/ 04/ 2022

Banca Examinadora

Prof. Dr.: Marcelo de Oliveira Bahia

Instituição: UFPA Assinatura: _____

Prof. Dr.: Rafael Rodrigues Lima

Instituição: UFPA Assinatura: _____

Prof. Dr.: Edivaldo Herculano Correa de Oliveira

Instituição: UFPA Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a todas as vítimas fatais dessa pandemia que ainda estamos vivenciando, em especial ao Amigo Mário Leal, veterinário que muito me ajudou na realização dos meus experimentos e que não teve a chance de concluir os seus.

AGRADECIMENTOS

Às minhas filhas, Morena Flor e Analu, por serem o maior motivo para eu seguir estudando e buscando realizar meus sonhos, para que elas possam me olhar como um exemplo de que podem crescer mulheres que irão fazer e seguir suas próprias escolhas.

Ao meu companheiro, Rodrigo, o melhor pai que minhas filhas poderiam ter, a pessoa que mais me incentivou a voltar para o doutorado e continua me incentivando a buscar ainda mais.

Aos meus pais, Francisco Marinho e Maria de Fátima, e a minha irmã, Luana Cunha, minha base de vida, de família, que me permitiram as melhores oportunidades para estudar e me tornar a pessoa que busco ser.

Ao meu orientador e amigo Carlos Rocha, que me trouxe para a pesquisa, me incentivou a continuar estudando e é um dos meus maiores exemplos de pesquisador e professor.

Ao professor Rommel Burbano, que aceitou me orientar e que sempre apoia e dá suporte para o desenvolvimento dessa e outras pesquisas.

Aos professores e alunos do Laboratório de Citogenética Humana da UFPA por me permitirem fazer parte dessa família, desde antes do mestrado.

À professora Bárbara Borges, que aceitou me orientar no início do curso de doutorado, até que o professor Rommel pudesse oficializar minha orientação.

Às professoras e amigas Patricia Danielle e Verônica Bahia, por abrirem seus laboratórios e compartilharem seus conhecimentos para que eu conseguisse realizar os experimentos desta pesquisa.

Ao professor Jofre Freitas e a Renata Silva do laboratório de Morfofisiologia Aplicada da UEPA, que me auxiliaram no desenvolvimento de algumas das técnicas necessárias para a realização do meu experimento.

À equipe do biotério da UEPA, que possibilitou meu aprendizado e o desenvolvimento do experimento com os animais.

À Laís e Gabriela, que me ajudaram muito na análise de parte dos dados dessa pesquisa.

Aos alunos Maik e Emmanuel, representando os alunos estagiários, que muito me ajudaram na realização do experimento.

Aos meus amigos, que são muito responsáveis pelo que sou e conquisto, em especial a Julielen, Camila, Ede, Jam, Adson, Felipe, Angélica, Julia, Adriana, Carol e Aline, que, de alguma forma, estão sempre comigo.

Aos amigos que o doutorado me trouxe, pessoas que entraram na minha vida nesse período, mas que parece que conheço desde sempre: Laís, Carla, Emerson e Ingrid.

RESUMO

Metais biodegradáveis, como o mercúrio, acumulam-se nos organismos vivos ao longo de suas vidas (bioacumulação) e também nas teias tróficas (biomagnificação), podendo atingir altas concentrações em humanos. A contaminação de humanos por mercúrio encontrado na água potável e nos alimentos pode ser comum, principalmente em comunidades ribeirinhas que dependem do pescado como principal fonte de proteína. Estudos *in vitro*, com linhagens celulares humanas expostas aos metilmercúrio mostraram que a prolactina possui propriedades citoprotetoras contra efeitos citotóxicos e mutagênicos deste metal, podendo atuar como fator comitogênico e inibidor de apoptose. O presente estudo investigou, *in vivo*, o potencial protetor da prolactina contra os efeitos tóxicos do metilmercúrio em mamíferos, utilizando o camundongo (*Mus musculus*) como modelo. Biomarcadores de genotoxicidade (ensaio cometa e teste do micronúcleo) e de estresse oxidativo (peroxidação lipídica e atividade das enzimas CAT e SOD), juntamente com análises histológicas (em amostras de tecidos hepático, renal e encefálico) e bioquímicas (parâmetros renais e hepáticos e dosagem de Hg e PRL no sangue), foram utilizados para verificar o potencial protetor da prolactina em camundongos expostos ao metilmercúrio. Foi observada, de maneira mais expressiva, uma redução nas alterações dos parâmetros bioquímicos renais e hepáticos e dos efeitos mutagênicos na presença da prolactina, em comparação com os efeitos isolados do metal. Quando a prolactina foi usada junto com o metal, também foi observado uma diminuição dos danos histológicos e um aumento da atividade da enzima SOD. Os resultados do estudo indicam que a prolactina possui efeitos protetores contra impactos tóxicos do metilmercúrio.

Palavras-chave: Metilmercúrio, Prolactina, citotoxicidade, genotoxicidade, estresse oxidativo, danos histológicos

ABSTRACT

Biodegradable metals, such as mercury, accumulate in living organisms throughout their lives (bioaccumulation) and also in food webs (biomagnification), and can reach high concentrations in humans. Human contamination by mercury found in drinking water and food can be common, especially in riverine communities that depend on fish as their main source of protein. *In vitro* studies with human cell lines exposed to methylmercury showed that prolactin has cytoprotective properties against cytotoxic and mutagenic effects of this metal, and can act as a co-mitogenic factor and apoptosis inhibitor. The present study investigated, *in vivo*, the protective potential of prolactin against the toxic effects of methylmercury in mammals, using the mouse (*Mus musculus*) as a model. Biomarkers of genotoxicity (comet assay and micronucleus test) and oxidative stress (lipid peroxidation and activity of CAT and SOD enzymes), together with histological (in liver, kidney and brain tissue samples) and biochemical (renal and hepatic and measurement of Hg and PRL in the blood), were used to verify the protective potential of prolactin in mice exposed to methylmercury. It was observed, in a more expressive way, a reduction in the alterations of the renal and hepatic biochemical parameters and of the mutagenic effects in the presence of prolactin, in comparison with the isolated effects of the metal. When prolactin was used together with the metal, a decrease in histological damage and an increase in SOD enzyme activity were also observed. The study results indicate that prolactin has protective effects against toxic impacts of methylmercury.

Keywords: Methylmercury, Prolactin, cytotoxicity, genotoxicity, oxidative stress, histological damage

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Camundongos machos em gaiolas no biotério da UEPA	24
Figura 2 -	Camundongos fêmeas em gaiolas no biotério da UEPA	24
Figura 3 -	Marcação na cauda do camundongo	25
Figura 4 -	Gavagem	26
Figura 5 -	Obtenção das amostras de órgãos e tecidos	27
Figura 6 -	Obtenção da medula óssea do fêmur para a realização do teste de micronúcleo	33
Figura 7 -	Nível sérico de Mercúrio em cada grupo de tratamento, machos (imagem A) e fêmeas (imagem B)	36
Figura 8 -	Nível sérico de Prolactina em cada grupo de tratamento, machos (imagem A) e fêmeas (imagem B)	37
Figura 9 -	Índice de dano de cada grupo de tratamento, machos (imagem A) e fêmeas (imagem B)	38
Figura 10 -	EPCMN em cada grupo de tratamento, machos (imagem A) e fêmeas (imagem B)	39
Figura 11 -	Comparação entre os níveis de peroxidação lipídica, no fígado dos machos (imagem A) e das fêmeas (imagem B)	42
Figura 12 -	Comparação entre os níveis de peroxidação lipídica, no rim dos machos (imagem A) e das fêmeas (imagem B)	43
Figura 13 -	Comparação da atividade da Catalase no fígado dos machos (imagem A) e das fêmeas (imagem B) de cada grupo de tratamento	43
Figura 14 -	Comparação da atividade da Catalase no rim dos machos (imagem A) e das fêmeas (imagem B) de cada grupo de tratamento	44
Figura 15 -	Comparação da atividade da SOD entre os grupos de tratamento, no fígado dos machos (imagem A) e das fêmeas (imagem B)	45
Figura 16 -	Comparação da atividade da SOD entre os grupos de tratamento, no rim dos machos (imagem A) e das fêmeas (imagem B)	45

Figura 17 -	Análise histopatológica do rim	50
Figura 18 -	Grau de dano tecidual (GDT) no rim em cada grupo de tratamento, machos (imagem A) e fêmeas (imagem B)	52
Figura 19 -	Análise histopatológica do fígado	55
Figura 20 -	Grau de dano tecidual (GDT) no fígado em cada grupo de tratamento. Machos (imagem A) e fêmeas (imagem B)	56
Figura 21 -	Nível sérico de Ureia em cada grupo de tratamento, machos (imagem A) e fêmeas (imagem B)	59
Figura 22 -	Nível sérico de Creatinina em cada grupo de tratamento, machos (imagem A) e fêmeas (imagem B)	60
Figura 23 -	Nível sérico de AST em cada grupo de tratamento, machos (imagem A) e fêmeas (imagem B)	61
Figura 24 -	Nível sérico de ALT em cada grupo de tratamento, machos (imagem A) e fêmeas (imagem B)	62
Figura 25 -	Análise histopatológica do encéfalo.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN), média e desvio padrão (DP), em cada grupo de tratamento, em cada gênero.....	39
Tabela 2 - Frequência das alterações no tecido renal, em cada grupo de tratamento, fêmeas e machos.....	49
Tabela 3 - Frequência das alterações no tecido hepático, em cada grupo de tratamento, fêmeas e machos.....	54
Tabela 4 - Alterações observadas no encéfalo, em cada grupo de tratamento, fêmeas e machos.....	66
Tabela 5 - Média de massa, em mg, de cada grupo nos dias de tratamento especificados, machos.....	70
Tabela 6 - Média de massa, em mg, de cada grupo nos dias de tratamento especificados, fêmeas.....	71

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 MERCÚRIO	13
1.1.1 A problemática do mercúrio na Amazônia	15
1.2 PROLACTINA	17
1.2.1 Efeitos protetores da PRL	18
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 METODOLOGIA	24
3.1 TRATAMENTOS	25
3.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	28
3.3 BIOENSAIOS DE GENOTOXICIDADE.....	28
3.3.1 Ensaio cometa	29
3.3.2 Teste do micronúcleo	29
3.4 BIOENSAIOS ENZIMÁTICOS	31
3.4.1 Preparo das amostras	31
3.4.2 Quantificação de proteína – Método Bradford	31
3.4.3 Peroxidação Lipídica	32
3.4.4 Atividade da Catalase (CAT)	32
3.4.5 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)	33
3.5 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS HISTOLÓGICAS	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 DOSAGEM DE MERCÚRIO E DE PROLACTINA	35
4.2 BIOENSAIOS DE GENOTOXICIDADE	37
4.3 BIOENSAIOS ENZIMÁTICOS	42
4.3.1 Peroxidação Lipídica	42
4.3.2 Atividade da Catalase (CAT)	43
4.3.3 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)	44
4.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO RIM E DO FÍGADO	48
4.5 ANÁLISE DOS PARÂMETROS RENAIIS E HEPÁTICOS.....	59

4.5.1 Ureia	59
4.5.2 Creatinina	60
4.5.3 Aminotransferase de Aspartato (AST)	61
4.5.4 Aminotransferase de Alanina (ALT)	61
4.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO ENCÉFALO	65
4.7 MASSA CORPORAL	69
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
REFERÊNCIAS	73
APÊNDICE 1	86
ANEXO 1	87
ANEXO 2	88

1 INTRODUÇÃO

Em âmbito mundial, tem-se encontrado forte relação entre a exposição a xenobióticos e o desenvolvimento de diversos efeitos nocivos à saúde. É crescente a preocupação com o efeito mutagênico e carcinogênico de agentes genotóxicos em populações expostas ocupacionalmente, acidentalmente ou por estilo de vida, pelo fato de que a ação de mutágenos por vezes se manifesta somente após muitos anos, no aumento da incidência de cânceres ou malformações congênitas, caracterizando os chamados efeitos cumulativos, o que tem contribuído para que a exposição a agentes genotóxicos seja um dos principais problemas de saúde pública (FLORES & YAMAGUCHI, 2008).

No meio aquático, os metais são oriundos de fontes naturais como lavagem geológica de solos e rochas, diretamente expostos à água, e por meio de fontes antrópicas como efluentes domésticos e industriais, pelo processo de mineração, pela aplicação de pesticidas na agricultura (EBRAHIMPOUR & MUSHRIFAH, 2008) e através de precipitação em áreas com poluição atmosférica (PEREIRA *et al.*, 2006).

Entre os ecossistemas, os aquáticos são os que acabam, de uma forma ou de outra, servindo como depositários temporários ou finais de grande variedade e quantidade de poluentes e contaminantes provenientes de descargas antropogênicas (CAMPANELLI, 2012). A mensuração apenas destes contaminantes no ambiente não traz respostas sobre os efeitos adversos que estas substâncias vêm causando nos organismos vivos presentes nestes ambientes. Desta forma, no monitoramento dos corpos d'águas devem ser incluídas ferramentas biológicas que tragam respostas sobre o estresse e os efeitos que estes poluentes vêm causando, possibilitando o estabelecimento de relações de causa-efeito (FREIRE *et al.*, 2008).

Em acréscimo, a principal fonte de exposição ao homem para os metais pesados contaminantes ocorre pelo consumo de alimentos, principalmente por pescado, contendo elementos não essenciais tóxicos como o arsênio, o cádmio, o chumbo, o cromo e o mercúrio (IKEM & EGIEBOR, 2005). A maioria das comunidades ribeirinhas apresenta uma dieta alimentar pouco variada e muito pobre em verduras e legumes, e com um consumo elevado de peixe como principal fonte proteica (DOLBEC *et al.*, 2001).

Por outro lado, estudos de suplementação hormonal com finalidades terapêuticas e profiláticas há muito despertam grande interesse nos pesquisadores

(LANDSBERG, 2005). É relevante dizer que a suplementação deve ser dada a níveis fisiológicos uma vez que níveis elevados podem ser tóxicos (LANDSBERG, 2005). Entretanto, muitos estudos têm demonstrado ou ao menos sugerido ações protetoras da prolactina em diversas situações (BURGOS *et al.*, 2004; WAHLBERG *et al.*, 2013; HSIEH *et al.*, 2015; GARCÍA *et al.*, 2016; NARDELLI *et al.*, 2018; RIVERO-SEGURA *et al.*, 2019; ARNOLD *et al.*, 2020), inclusive contra efeitos do mercúrio (SANTOS, 2008; JESUS, 2012; SILVA-PEREIRA *et al.*, 2014).

1.1 MERCÚRIO

O mercúrio é um metal de aspecto argênteo, inodoro, representado pelo símbolo Hg, que, normalmente, é encontrado em três estados de oxidação: 0, +1 e +2. Ele é um elemento químico de transição, de caráter metálico, com elevado peso molecular (PM = 80) e alta densidade. Por esse motivo é classificado como um metal pesado, que em sua forma elementar se apresenta como um líquido denso, prateado, nas condições normais de temperatura e pressão (SCHROEDER & MUNTHE, 1998). O mercúrio é um xenobiótico e corresponde a um dos contaminantes órgãos-específicos mais largamente difundidos e deletérios (BJØRKLUND *et al.*, 2017).

O mercúrio metálico ou mercúrio elementar (Hg⁰) é utilizado em grande escala na indústria, com emprego na confecção de termômetros, amálgama dental, purificação do ouro explorado pelo garimpo, além de uma variedade de outros produtos de uso industrial e doméstico. O mercúrio inorgânico pode ser formado a partir do mercúrio metálico ou pela conversão de formas orgânicas de mercúrio a forma inorgânicas (Hg²⁺ e Hg⁺). Independente da fonte (natural ou artificial) o mercúrio emitido é inorgânico, principalmente como vapor metálico (WAGNER *et al.*, 2010).

O Hg inorgânico poderá ser metilado por dois processos diferentes em condições aeróbias e anaeróbias: processo biológico, através de bactérias e fungos em presença de metilcobalamina; e o processo abiótico ou químico, por três vias principais: (a) Reação de transmetilação; (b) Radiação ultravioleta na reação com compostos orgânicos doadores do grupo metila e (c) Reação com os ácidos fúlvico e úmico. O processo da metilação do mercúrio e sua bioacumulação na cadeia alimentar aquática está na dependência de inúmeros fatores, como a temperatura, pH, quantidade de bactérias presentes no meio, tipo de sedimento ou solo, concentração

de sulfeto, condições de oxirredução do meio, bem como da sazonalidade (BISINOTI & JARDIM, 2004).

Os efeitos mutagênicos de Hg e seus compostos organomercuriais afetam particularmente a tubulina (subunidade de microtúbulos), levando a desorganização do citoplasma e interferindo nas fibras do fuso, os quais por sua vez afetam a divisão celular. Os efeitos do mercúrio de uma forma geral são prejudiciais para a polimerização da tubulina, o que leva a uma contração dos cromossomos em metáfase, atraso no movimento anafásico e na divisão centromérica (THEIR *et al.*, 2003) e também pode levar a anomalias cromossômicas como as poliploidias (SILVA-PEREIRA *et al.*, 2005).

Acrescenta-se a esses efeitos, a produção de radicais livres, que pode causar dano permanente ao DNA (EHRENSTEIN *et al.*, 2002; MANZOLLI *et al.*, 2015). Os compostos de mercúrio induzem a um colapso geral dos mecanismos antioxidantes na célula através da ligação a grupos sulfidríla da glutathione peroxidase, uma grande selenoenzima com propriedades antioxidantes. Os resultados desse colapso favorecem a peroxidação de lipídios, seguida da perda de integridade da membrana e, finalmente, necrose celular, que pode ser indicado por uma diminuição no índice mitótico (NASCIMENTO *et al.*, 2008).

Várias publicações corroboram a ideia de que o sistema nervoso central representa um importante alvo de mercúrio (PINHEIRO *et al.*, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2008; FUJIMURA *et al.*, 2011; ACHATZ *et al.*, 2021) e órgãos endócrinos podem também acumular concentrações elevadas de mercúrio. Estudos realizados em seres humanos e em modelos animais demonstraram que os indivíduos expostos a diferentes formas de mercúrio mostram uma concentração de mercúrio significativa na glândula pituitária (FALNOGA *et al.*, 2000).

A Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC: International Agency for Research on Câncer) classifica, desde 1993, o metilmercúrio no grupo 2B, indicando-o como possível carcinogênico para humanos (IARC, 2020). Metais como o mercúrio, pelo fato de não serem biodegradáveis, acumulam-se nos organismos ao longo de suas vidas (bioacumulação) e ao longo das cadeias alimentares (biomagnificação ou magnificação trófica), podendo atingir elevadas concentrações ao chegar ao homem (ROCHA, 2009).

A contaminação humana pelo mercúrio presente na água e nos alimentos é de extrema importância, haja vista ter sido responsável por trágicos episódios de

intoxicação, como os ocorridos em Minamata (Japão), nas décadas de 50 e 60, e no Iraque na década de 70 (ALMEIDA *et al.*, 2006).

1.1.1 A problemática do mercúrio na Amazônia

Os primeiros estudos sobre a problemática da presença do mercúrio em vários compartimentos dos ecossistemas na Bacia Amazônica, os quais datam de mais de duas décadas, reconhecem duas principais fontes como responsáveis por essa contaminação: os garimpos de ouro e a agricultura do tipo corte e queima (SAMPAIO *et al.*, 2006). O rejeito de mercúrio no sistema aquático, proveniente de operações de mineração e pela lixiviação de solos após desflorestamentos, é considerado a maior contribuição para a contaminação na Bacia Amazônica (AMORIM *et al.*, 2000; CRESPO-LOPEZ, *et al.*, 2021)

A liberação de mercúrio das atividades de garimpos de ouro contribuiu para aumentar localmente suas concentrações, mas para toda a Amazônia essas cargas seriam quase insignificantes, considerando-se os níveis elevados em solos distantes das áreas de garimpo. Um processo razoável que pode explicar essas observações no solo é que horizontes B funcionam como uma esponja que acumula mercúrio durante um período de tempo geológico, liberando-o de volta ao ciclo por ocasião de erosões e incêndios florestais (WASSERMAN *et al.*, 2003). Ainda hoje, essa dinâmica do mercúrio envolvendo o desmatamento e a queima é uma importante fonte de contaminação ambiental e conseqüentemente dos seres vivos nos ecossistemas amazônicos (CRESPO-LOPEZ *et al.* 2021)

O principal meio de exposição do homem ao mercúrio ainda é o consumo de peixe (CRESPO-LOPEZ *et al.* 2021). No Brasil, estudos demonstram que várias espécies de peixes carnívoros da Amazônia apresentam altos níveis de metilmercúrio (MeHg) (MALM, 1998; PINHEIRO *et al.*, 2003). Neste contexto, estudos epidemiológicos apontam para déficits neurológicos em comunidades pesqueiras que possuem uma dieta baseada no consumo de peixes (GRANDJEAN *et al.*, 1997; CLARKSON *et al.*, 2003). Trabalhos realizados na bacia do rio Tapajós, utilizando peixes, encontraram em áreas de mineração valores que iam de 0,02 até 2,75 mg/kg, e para peixes de rios não expostos, os valores variaram de abaixo do limite até 0,10 mg/kg (SANTOS *et al.*, 2000; BISINOTI & JARDIM, 2004).

De acordo com Organização Mundial de Saúde (OMS), desde 2003 foi estabelecido uma ingestão semanal tolerável de 1,6 µg/ Kg de peso corporal de MeHg, o que corresponde a uma ingestão de, aproximadamente, 96 µg por semana, para um adulto de 60 Kg. Essa dose tolerável considera, principalmente, a segurança para o feto em desenvolvimento, já que é nesta fase que o indivíduo parece ser mais sensível aos efeitos deste metal. Para a ingestão de mercúrio total, 2µg/ Kg de peso é a dose diária tolerável (OMS, 2021).

Após a absorção, o metilmercúrio é distribuído para todos os tecidos do corpo. Sua excreção se dá via fezes, urina e leite materno. A dieta alimentar, constituída de peixes representa a principal fonte de exposição do homem a este tipo mercurial. Deste modo, a preocupação com os possíveis agravos a saúde relacionados à ação tóxica desse metal na região é crescente, uma vez que, este é o principal tipo de alimentação preferido pelos ribeirinhos, especialmente aqueles residentes nas áreas próximas de atividades garimpeiras da Amazônia, (SANTOS *et al.*, 2000).

É importante caracterizar o impacto da mineração do ouro e consequente exposição crônica ao MeHg para as comunidades dessas áreas; um estudo recente associou essa exposição a piora das condições de saúde mental do povo Munduruku, que vive em áreas cronicamente expostas ao MeHg devido a atividade garimpeira ilegal na região (ACHATZ *et al.*, 2021).

Em estudo que avaliava a presença de Hg em diversos tipos de peixes, em ambiente contaminado, observou-se que o metal se concentrava mais intensamente à medida que se subia na cadeia trófica: os peixes herbívoros apresentavam 6,64 ppm; os peixes que se alimentavam de invertebrados, 12,4 ppm; os onívoros, 26,6 ppm; e os piscívoros, 40,2 ppm (BOENING, 2000). O homem torna-se um dos principais afetados pela intoxicação mercurial quando usufrui do rio poluído para diversas atividades, como a alimentação, pois os peixes que apresentam os maiores níveis de MeHg, como o tucunaré e a traíra, são os mais consumidos pelo homem (LEBEL *et al.*, 1998).

Os hábitos alimentares das comunidades amazônicas e suas consequências a saúde, além da complexidade desses ecossistemas e do ciclo biogeoquímico do Hg em florestas tropicais, explicam o interesse da comunidade científica em avaliar o impacto da contaminação de mercúrio.

1.2 PROLACTINA

A prolactina (PRL) é um hormônio proteico, da mesma família que hormônio do crescimento e lactogênios placentários; é produzido e secretado principalmente pelos lactótrofos da adenohipófise (SOARES JR & GADERLHA, 2004). Além da hipófise, o cérebro, a placenta, o útero, a glândula mamária, células imunocompetentes, células linfóides da medula óssea e glândulas sudoríparas são locais onde a síntese e a secreção de PRL já foram observadas. A PRL secretada pela hipófise atua de maneira endócrina em células alvo que apresentem os receptores de prolactina em sua membrana plasmática, já a PRL produzida em outros órgãos pode atuar de maneira autócrina ou parácrina; assim, muitas funções da PRL podem ser ativadas sem que a sua concentração no sangue seja alterada (BOLE-FEYSOT *et al.*, 1998; IGNACAK *et al.*, 2012; MARANO & BEN-JONATHAN, 2014).

Em humanos, a PRL é codificada por um gene no cromossomo 6, composto por cinco éxons e cinco íntrons, com 10kb de comprimento. Após processamento, a PRL apresenta 199 aminoácidos. Este hormônio, além de estimular a produção de leite pelas glândulas mamárias (lactogênese), atua também na mamogênese e na galactopoiese, e possui outras mais de 300 atividades biológicas, atuando inclusive na homeostase, ao regular o sistema imunológico, o equilíbrio osmótico e a angiogênese; também tem efeito no crescimento e na proliferação celular e como neurotransmissor (BOLE-FEYSOT *et al.*, 1998; FREEMAN *et al.*, 2000; IGNACAK *et al.*, 2012).

A PRL está envolvida no equilíbrio osmótico (de água e eletrólitos) em todas as classes de vertebrados; nos mamíferos, receptores de PRL estão presentes em células dos rins e em outros órgãos envolvidos nesse processo. Muitos efeitos da PRL estão associados a proliferação celular. Na pele, estimula a proliferação de melanócitos e queratinócitos; pode ter influência no crescimento de hepatócitos, induzindo diversos genes relacionados ao crescimento celular nas células do fígado. O aumento da mucosa intestinal, do músculo liso vascular, a proliferação de células β no pâncreas, de astrócitos e de várias células do sistema imune já foram associados a PRL (BOLE-FEYSOT *et al.*, 1998; MARANO & BEN-JONATHAN, 2014).

O hormônio PRL ativa vias de transdução de sinal a partir da ativação de seu receptor. O receptor de PRL está constitutivamente associado a proteínas Janus quinase 2 (JAK2). Quando ativada, JAK2 fosforila resíduos de tirosina em proteínas-alvo, incluindo o próprio receptor e as proteínas Stat 1, Stat 2 e principalmente Stat 5.

Essas proteínas dimerizam-se e translocam-se até que o sinal chegue ao núcleo, ativando promotores dos genes responsivos a PRL. Além da via JAK/Stat, outras vias podem ser ativadas pelos receptores de PRL, como a via Ras/Raf/MAP quinase, que pode estar relacionada aos efeitos proliferativos desse hormônio (BOLE-FEYSOT *et al.*, 1998; SOARES JR & GADERLHA, 2004; SILVA-PEREIRA *et al.*, 2014).

Todas essas funções desempenhadas pela PRL e as vias de sinalização ativadas podem estar relacionadas aos efeitos protetores que esse hormônio apresenta em diversos tecidos e situações experimentais.

1.2.1 Efeitos protetores da PRL

Diversos estudos evidenciam o efeito protetor da PRL, efeitos neuroprotetor, antiapoptótico e citoprotetor já foram observados.

A neuroproteção contra a excitotoxicidade provocada pela manutenção da estimulação dos receptores glutamatérgicos foi avaliada, em cultura primária de neurônios do hipocampo de ratos Wistar, por Vergara-Castañeda *et al.* (2016), Rivero-Segura *et al.* (2017) e Rivero-Segura *et al.* (2019), estes autores observaram que a presença da PRL induzia efeitos como a manutenção da homeostase intracelular de Ca^{2+} e da atividade mitocondrial; a redução na ativação de caspase-3 e da apoptose; a indução da translocação nuclear de NF- κ B e regulação positiva da expressão da proteína Bcl-2; também foi observada a estimulação da defesa antioxidante da superóxido dismutase (SOD) e uma diminuição dos produtos de peroxidação lipídica; além da expressão do receptor de PRL nas células utilizadas.

Estudos *in vivo* também já foram realizados para avaliar os efeitos neuroprotetores da PRL; a excitotoxicidade do ácido cainico (KA), um agonista do glutamato, foi induzida em ratos Wistar fêmeas adultas e a PRL atenuou a gravidade de convulsões e os danos celulares induzidos pelo KA (TEJADILLA *et al.*, 2010; MORALES *et al.*, 2014).

Mödersheim *et al.* (2007), demonstraram ação da PRL no fornecimento de um suporte trófico para as células gliais, participação na imunorregulação cerebral e formação da cicatriz glial em lesões de isquemia por hipóxia no cérebro de ratos jovens. Um efeito protetor da PRL em isquemia por hipóxia também foi sugerido por Tani *et al.* (2018), que observaram em amostras de autópsia e culturas de sangue e fluido cérebro espinhal níveis maiores de PRL quando essa era a causa da morte.

Os efeitos antiapoptóticos da PRL já foram analisados em muitos estudos que utilizaram a linhagem celular Nb2, que é proveniente de linfoma de rato e é dependente de PRL e outros lactogênios para sua proliferação, a PRL está relacionada a expressão de vários genes que podem promover o crescimento celular através da supressão de mecanismos apoptóticos e estimulação da progressão do ciclo celular nessas células (LAVOIE *et al.*, 1995; LEFF *et al.*, 1996; KRUMENACKER *et al.*, 1998; FERNÁNDEZ *et al.*, 2003).

LaVoie *et al.* (1995), consideraram, além do hormônio, agonistas e antagonistas das vias de sinalização já atribuídas a PRL e observaram que um inibidor de tirosina fosfatase reduziu significativamente a fragmentação de DNA, sugerindo que a fosforilação da tirosina pode estar relacionada ao efeito antiapoptótico da PRL. Leff *et al.* (1996), verificaram um aumento na expressão do gene *bcl-2* e uma redução na expressão de *bax* influenciados pela ação do hormônio nessas células. No estudo de Krumenacker *et al.* (1998), a PRL reduziu a apoptose e observou-se um aumento da transcrição de *bcl-2* e *pim-1*. Sugere-se que estes genes podem ter um papel importante nas ações antiapoptóticas da PRL. Fernández *et al.* (2003), observaram que a PRL reduziu a atividade da caspase 3.

A regulação desses genes pela PRL também foi avaliada por Ploszaj *et al.* (1998); eles usaram a linhagem celular HC11 (células epiteliais mamárias de camundongo) e observaram um aumento da expressão de *bcl-2* e da quantidade de proteína Bcl-2, além de uma redução de transcritos de *bax* relacionados a PRL. Esses estudos sugerem que essa estimulação da expressão de *bcl-2* e supressão de *bax* pode ser um importante mecanismo para a ação da PRL contra apoptose.

As células β pancreáticas são usadas em muitos estudos sobre a ação da PRL, o principal efeito identificado nesse modelo celular é o antiapoptótico. Wailemann *et al.* (2018) e Terra *et al.* (2019), utilizando culturas celulares primárias de ilhotas pancreáticas humanas e de camundongos e a linhagem MIN6 (derivada de insulinoma de camundongo) observaram que o hormônio inibiu a morte celular e associaram essa ação a proteína HSPB1, que se mostrou diretamente relacionada com o aumento da razão Bcl2/Bax, inibindo as cascatas de apoptose tanto da via extrínseca quanto da via intrínseca. Terra *et al.* (2019), também observaram uma redução na degradação de proteínas, relacionada ao aumento da ação de enzimas de dismutação de radicais peróxido, quando o hormônio estava presente.

O efeito antioxidante da PRL nas células β , também foi observado por Marmantini (2019), que utilizou a linhagem celular INS-1E de insulinoma de rato e verificaram um aumento na sobrevivência dessas células e da produção das enzimas superóxido dismutase 2 e catalase, induzidos pelo hormônio. Os autores sugerem que a PRL ativa receptores ativados por proliferadores de peroxissoma, que estão envolvidos na transcrição de enzimas antioxidantes.

A suplementação do meio de cultura com PRL foi usada no cultivo de ilhotas pancreáticas e observou-se um aumento na quantidade de células β viáveis em cultura com PRL. Também foi realizado o transplante dessas ilhotas para camundongos diabéticos e foi observada uma reversão do quadro hiperglicêmico induzido. Esses resultados demonstram que a PRL melhora a viabilidade e sobrevivência específica de células β *in vitro* e *in vivo*, evidenciando uma proteção que a PRL pode exercer em ilhotas pré-transplante (YAMAMOTO *et al.*, 2008).

Um estudo *in vivo* realizado por Park *et al.* (2011), identificou um aumento na proliferação e neogênese de células β em ratos diabéticos tratados com PRL. Esses autores observaram uma potencialização da fosforilação do transdutor de sinal ativador de transcrição 5 (STAT5). Um outro transdutor desta mesma família, o transdutor STAT3 também foi identificado como mediador da ação antiapoptótica da PRL em células β de ratos, por Nardelli *et al.* (2018), neste estudo, a PRL alterou a expressão de proteínas pró e anti-apoptóticas da cascata da quinase c-Jun N-terminal (JNK), a partir da fosforilação da proteína quinase AKT, impedindo a ativação de JNK; além disso, foi observado a inibição parcial de NF- κ B. Esses efeitos promovem uma maior sobrevivência dessas células.

A indução da proliferação celular e/ou efeitos antiapoptóticos também estão relacionados a ação protetora da PRL em outros tecidos ou órgãos. Hilfiker-Kleiner *et al.* (2007) e Hsieh *et al.* (2015) identificaram efeitos cardioprotetores, a partir da preservação da angiogênese e da função dos cardiomiócitos, relacionados a ativação dos transdutores de sinal Stat 3 e Stat 5, respectivamente. Hsieh *et al.* (2015), também observaram um aumento das proteínas envolvidas na proliferação e sobrevivência celular, como IGF-I, PI3a, AKT fosforilado, Bcl-2, c-Myc, ciclinas D1, E e A; esses fatores moleculares aumentados podem estar relacionados a via ativada pela PRL.

Efeito protetor da PRL no tecido gástrico foi observado por Drago *et al.* (1985) e Fujikawa *et al.* (2000), em ratos Wistar (submetidos ao estresse em câmara fria e a privação de alimento) e ratos Sprague-Dawley (submetidos ao estresse de contenção

de água), respectivamente, e em ambos, o tratamento com PRL reduziu ou impediu a formação de lesões gástricas observadas nos animais que não receberam esse tratamento, demonstrando a ação protetora desse hormônio.

Os estudos de Wu *et al.* (2018), Adán *et al.* (2013) e Ledesma-Colunga *et al.* (2017), demonstraram uma ação da PRL na inibição da resposta inflamatória; o primeiro observou uma redução na expressão de TNF- α e IL-1 β , além da diminuição da apoptose, inibindo a via NF-kB no núcleo pulposo de discos intervertebrais em processo de degeneração após a aplicação de PRL. Os outros dois estudos avaliaram a ação da PRL na artrite inflamatória, também observando uma redução na expressão de citocinas pró-inflamatórias e consequentes efeitos pró-apoptóticos, relacionados a ativação da via JAK2/Stat3. Os autores sugerem que a PRL pode atrasar o início e diminuir a gravidade dos sintomas da artrite inflamatória.

Ações antioxidantes e antiapoptóticas da PRL foram avaliadas no epitélio pigmentar da retina por García *et al.* (2016) e Arnold *et al.* (2020), em ratos de diferentes idades. O receptor de PRL foi identificado e este hormônio foi caracterizado como um fator trófico para as células desse tecido, seus resultados demonstraram a necessidade da PRL para o bom funcionamento das células fotorreceptoras e o possível valor terapêutico desse hormônio contra os distúrbios da retina relacionados a idade. García *et al.* (2016), também utilizaram a linhagem celular humana ARPE-19 (células do epitélio pigmentar da retina) a presença desse hormônio reduziu os danos causados pelo peróxido de hidrogênio e os níveis de espécies reativas de oxigênio nessas células, esse efeito foi relacionado a ação da PRL inibindo o aumento de Ca²⁺ induzido pela desacetilase SIRT2, mediado pelo receptor TRPM2, esses dois fatores são considerados alvos da ação antioxidante deste hormônio.

A ação da PRL sobre as células do sistema imune foi observada por Guzmán *et al.* (2008) quando avaliaram o efeito protetor deste hormônio contra os efeitos da exposição a luz UV, observou-se que a exposição a luz UV induziu uma diminuição no número de linfócitos T gama delta e nos animais que receberam o tratamento com PRL esse efeito foi diminuído; a PRL também reduziu o número de células de Langerhans morfológicamente alteradas.

Esse efeito imunomodulados da PRL também está relacionado a um papel antiparasitário deste hormônio, observado em alguns estudos. Di Carlo *et al.* (1993) e Meli *et al.* (1996) identificaram o efeito protetor de PRL contra a infecção por *Salmonella typhimurium*. Filipin *et al.* (2011) e Filipin *et al.* (2019) observaram, *in vivo*,

o efeito da PRL na doença de Chagas. Dzitko *et al.* (2010), Dzitko *et al.* (2012) e Mohammadpour *et al.* (2019) identificaram o efeito deste hormônio na proliferação e penetração nas células hospedeiras do *Toxoplasma gondii*. Os resultados observados, confirmam o papel imunorregulatório da PRL.

A ação protetora da PRL contra os efeitos do Metilmercúrio (MeHg) foi analisada por Santos (2008), em cultivo glial de córtex de ratos. No tratamento conjugado, observou-se que a PRL atenuou os efeitos induzidos pelo metal, aumentando a viabilidade celular, reduzindo alterações morfológicas características da citotoxicidade do MeHg, induzindo a proliferação celular e a liberação de Interleucina-1 β .

Jesus (2012), utilizou a linhagem de linfócitos de primatas B95-A para investigar a ação de PRL sobre os efeitos de MeHg, avaliou a viabilidade celular e a resposta imune dessas células, considerando a concentração do fator de necrose tumoral alfa (TNF α) no sobrenadante do cultivo. A PRL foi capaz de prevenir a diminuição da viabilidade celular causada pelo MeHg e de reverter a liberação da citocina pró-inflamatória TNF α , protegendo as células contra os efeitos tóxicos do mercúrio.

Também foi identificada a ação citoprotetora da PRL *in vitro* em linhagens celulares humanas submetidas a efeitos citotóxicos e mutagênicos do MeHg. Silva-Pereira *et al.* (2014) avaliaram o efeito citoprotetor da PRL em cultura de linfócitos e na linhagem HL-60; observaram a influência do MeHg na cinética do ciclo celular e a ação da PRL sobre esse efeito. A PRL reduziu a indução de poliploidias causada pelo MeHg, evidenciando ação desse hormônio contra o efeito mutagênico do mercúrio; a partir da análise do índice mitótico, observaram uma redução na citotoxicidade causada pelo metal, revelando a ação do hormônio como fator co-mitogênico e inibidor de apoptose.

Considerando as ações protetoras já observadas, inclusive contra os efeitos do metilmercúrio; somando-se a isto, o fato de que este hormônio não está relacionado ao desenvolvimento do câncer de mama, como já foi imaginado (GOODMAN & BERCOVICH, 2008); avaliar a prolactina como uma alternativa de proteção, se mostra interessante.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar *in vivo* o potencial protetor da prolactina contra danos causados pelo metilmercúrio.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Demonstrar *in vivo* ações tóxicas do MeHg em mamífero;
- Analisar as enzimas antioxidantes para verificar a ação protetora da prolactina contra a ação citotóxica do MeHg;
- Verificar a ação protetora da prolactina contra a ação genotóxica do MeHg;
- Verificar a ação protetora da prolactina contra danos aos tecidos renais e hepáticos, analisando a histopatologia e parâmetros séricos.
- Identificar danos encefálicos causados pelo MeHg e a presença ou ausência destes nos tratamentos com a prolactina.

3 METODOLOGIA

60 camundongos (*Mus musculus*) saudáveis, adultos jovens de ambos os sexos foram obtidos do biotério do Instituto Evandro Chagas e mantidos no biotério da Universidade do Estado do Pará – UEPA, 5 animais por gaiola, machos e fêmeas em espaços separados (Figura 1 e 2), em ambiente com temperatura de 22°C (\pm 3°C), num ciclo de 12h claro/12h escuro, recebendo água e ração (OECD, 2016).



Figura 1: Camundongos machos em gaiolas no biotério da UEPA.



Figura 2: Camundongos fêmeas em gaiolas no biotério da UEPA.

Esses animais também receberam uma marcação em suas caudas (Figura 3) para correta identificação de cada um em sua gaiola, essa marcação era reforçada sempre que necessário. Toda a manipulação e tratamento dos animais foram realizados no biotério da UEPA.



Figura 3: Marcação na cauda do camundongo.

3.1 TRATAMENTOS

Os animais foram divididos em seis grupos de 10 animais cada, 5 de cada sexo, conforme as doses de metilmercúrio e prolactina; já que, de acordo com OECD (2016), em estudos de micronúcleos devem ser usados um mínimo de 5 animais de cada sexo por grupo de tratamento. Após o período de aclimatação, os animais, receberam os tratamentos com CH_3HgCl (Sigma-Aldrich®) e PRL (Sigma-Aldrich®), ambos diluídos em água destilada (solução-mãe) e solução salina 0,9% (solução de uso), nas concentrações descritas no Quadro 1, por um período de 45 dias (PARK *et al.*, 2011; RIZZETTI, 2012; MANZOLLI, *et al.*, 2015).

A concentração de mercúrio foi escolhida com base em estudos de Barcelos *et al.* (2011 e 2012) e Manzolli *et al.* (2015), que consideram $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ de MeHg uma concentração capaz de induzir danos ao DNA e alterações no estado redox da célula, e são esses tipos de lesões induzidas para a avaliação do potencial citoprotetor da prolactina que são objetivo do presente estudo. As concentrações testadas de

prolactina foram escolhidas com base no estudo de Park *et al.* (2011), que observaram com essas concentrações, um aumento do nível sérico de prolactina e um aumento da proliferação das células β em ratas diabéticas.

Quadro 1: Descrição dos tratamentos com cloreto de metilmercúrio e prolactina.

Grupo de Tratamentos	MeHg ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$)	PRL ($\mu\text{g}/\text{kg}/12\text{h}$)
CN	-	-
MeHg	30	-
PRL 25	-	25
PRL 250	-	250
MeHg + PRL25	30	25
MeHg + PRL250	30	250

Todo dia, antes do primeiro tratamento do dia, os animais eram pesados, para, a partir da média da massa de cada gaiola, serem preparadas as soluções de uso de cada tratamento. Os camundongos receberam o metilmercúrio por gavagem (Figura 4). Em relação à prolactina, o tratamento foi feito por injeção subcutânea (CAMARGO *et al.*, 2017). Nos animais que receberam os dois tratamentos, a prolactina foi administrada simultaneamente ao tratamento com metilmercúrio e 12 horas depois, de acordo com a dose e o tempo indicados no quadro acima. O grupo CN (grupo controle negativo) recebeu injeção subcutânea de solução salina 0,9% durante o mesmo período de tratamento dos outros grupos (12h/12h).



Figura 4: Gavagem

Ao final dos tratamentos todos os animais foram anestesiados para a realização da punção cardíaca, em seguida foram submetidos a eutanásia por deslocamento cervical (quando necessário) e as amostras de órgãos/tecidos para a realização dos bioensaios foram obtidas (Figura 5): sangue para a análise bioquímica, amostras de fígado e rim para os bioensaios enzimáticos; rim, encéfalo e fígado para análise histológica e amostras do fígado e da medula óssea para os bioensaios de genotoxicidade, ensaio cometa e teste de micronúcleo respectivamente.



Figura 5: Obtenção das amostras após a eutanásia

Os bioensaios enzimáticos e a preparação das lâminas para análise histológica foram realizados no Laboratório de Morfofisiologia Aplicada a Saúde da UEPA, a preparação das lâminas do Teste de Micronúcleo, no Laboratório de Citogenética da UEPA e o Ensaio Cometa no Laboratório de Citogenética Humana da Universidade Federal do Pará – UFPA.

O lixo biológico referente à carcaça dos animais e quaisquer outros que foram produzidos em decorrência da realização do projeto, foram acondicionados em sacos plásticos hermeticamente fechados e devidamente identificados até a sua devida coleta no Biotério da UEPA.

O estudo seguiu os preceitos da legislação nacional para utilização e criação de animais para experimentação (Lei Federal nº 11.794, de 2008) e os Princípios Éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo realizado de acordo com a diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA (CONCEA, 2013), e foi submetido à aprovação do

comitê de ética em pesquisa em uso de animais da UEPA (CEUA/UEPA), sob o protocolo nº16/2017 e parecer favorável (Anexo 1).

3.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As amostras de sangue foram analisadas para determinação dos níveis séricos de ureia, creatinina, aminotransferase de aspartato (AST) ou TGO, aminotransferase de alanina (ALT) ou TGP, mercúrio e PRL. Ureia, creatinina, AST e ALT foram mensuradas através do método enzimático colorimétrico por kit comercial (Labtest – Brasil). O mercúrio total foi determinado seguindo os procedimentos descritos por Yasutake *et al.* (2005); o sangue foi hemolisado por água destilada (1:50) e os níveis totais de Hg nos homogenatos (100µL) e sangue hemolisado (100µL) foram determinados pelo método de amálgama de ouro por combustão de oxigênio usando um analisador de mercúrio de absorção atômica MD-A (<https://mercuryanalyser.com/index.html>). Os níveis plasmáticos de prolactina foram estudados com ELISA (Mouse Prolactin DuoSet; R&D Systems), este kit de desenvolvimento DuoSet ELISA contém os componentes básicos necessários para o desenvolvimento de ELISAs para medir a Prolactina de camundongo natural e recombinante.

3.3 BIOENSAIOS DE GENOTOXICIDADE

Parte do fígado coletado foi fragmentado com auxílio de uma pinça e um bisturi, em 1ml de solução de tripsina/edta a 0,25%, após poucos minutos de fragmentação, foi acrescentado soro fetal bovino (SBF) para neutralizar o efeito da tripsina. Após decantação desse material, o sobrenadante foi coletado para a realização do ensaio cometa (TICE *et al.*, 2000).

O estudo da frequência de micronúcleo foi realizado em células da medula óssea obedecendo a critérios recomendados pelo guia de teste de Micronúcleos em eritrócitos de Mamíferos (OECD, 2016) e por Ribeiro *et al.* (2003).

3.3.1 Ensaio cometa

Também conhecido como SCGE (single cell gel electrophoresis), o ensaio cometa é uma técnica rápida e sensível de análise e quantificação de danos ao DNA de células individuais. Assim, pode ser usada na pesquisa de câncer, avaliação de genotoxicidade e efetividade da quimioprevenção. A imagem que é obtida lembra um “cometa” com cabeça e cauda distintas. Esta técnica foi desenvolvida por Östling & Johansson em 1984, porém Singh e colaboradores a modificaram em 1988, como o ensaio cometa alcalino. A cabeça é composta de DNA intacto, enquanto a cauda consiste de DNA danificado ou fragmentado. Conseqüentemente, a extensão da migração do DNA reflete a extensão dos danos (FAIRBAIRN *et al.*, 1995).

Da amostra coletada, 15 µL foram misturados e homogeneizados em 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão e espalhada em lâmina de microscopia pré-coberta com agarose de ponto de fusão normal. As células foram lisadas (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10, 1% Triton-X e 10% DMSO) por cerca de 24 horas a 4°C e depois postas em uma cuba horizontal de eletroforese, contendo uma solução alcalina gelada (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH > 13, 4°C) por 20 minutos para relaxar as fitas de DNA. A corrente elétrica utilizada foi de 300 mA e voltagem de 34 V. Depois as lâminas foram neutralizadas (5 min em água destilada gelada) e fixadas (5 min em etanol absoluto), coradas com brometo de etídio (20 µg/mL) e analisadas com o auxílio do microscópio de fluorescência.

Foram analisados 100 nucleoides de cada animal de cada grupo de tratamento para determinar a extensão do dano causado sobre o DNA. Para isto, fez-se uso de uma escala visual composta de 5 classes de acordo com a extensão de DNA migrado durante a eletroforese (zero a quatro). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnet, com nível de significância de 5%.

3.3.2 Teste do micronúcleo

Micronúcleos (MN) são pequenos corpúsculos compostos por material cromossômico. Após a separação das cromátides no processo de mitose, dois núcleos são reconstituídos, um em cada pólo. A membrana nuclear é refeita ao redor destes dois conjuntos de cromossomos. Mas, se um cromossomo inteiro ou um fragmento cromossômico acêntrico não se integra ao novo núcleo, este também pode

constituir um pequeno núcleo individual, chamado micronúcleo (VILLELA *et al.*, 2003). Assim, este teste detecta tanto eventos aneugênicos (alterações no número de cromossomos do genoma, devido a erros na distribuição destes durante o processo de divisão celular), quanto eventos clastogênicos (quebras que produzem alterações na estrutura dos cromossomos).

Para o bioensaio, após a eutanásia do animal cortou-se a pele que cobre a perna e retira-se o fêmur; foram cortadas as extremidades do fêmur para expor o canal da medula; a agulha de uma seringa de 1ml, previamente preenchida com soro fetal bovino (SBF), foi inserida firmemente na abertura do fêmur, injetando-se o soro, de modo a empurrar a medula para dentro de um tubo de seringa (Figura 6), previamente marcado com o código do animal; a suspensão foi centrifugada, por 5 minutos, a 1000 rpm, e o sobrenadante descartado com o auxílio da pipeta de Pasteur. O sedimento foi ressuspendido em 0,5 mL de SBF para a preparação dos esfregaços.



Figura 6: Obtenção da medula óssea do fêmur para a realização do teste de micronúcleo

Duas ou três gotas foram pingadas em lâmina bem limpa; com o auxílio de uma lamínula foi feita a extensão, que secou ao ar, em temperatura ambiente. Após a secagem e fixação em etanol absoluto por 10 minutos, a lâmina foi corada com corante Leishman para diferenciar eritrócitos policromáticos (EPC), eritrócitos normocromáticos (ENC) e eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) (OECD 2016; RIBEIRO, *et al.*, 2003; PASSOS 2013). As lâminas para o escore de MN foram

observadas ao microscópio sob ampliação de 1000X. Foram analisados, em teste cego, 1.000 eritrócitos por lâmina e, assim, 2.000 por animal. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Dunnet, com nível de significância de 5%.

3.4 BIOENSAIOS ENZIMÁTICOS

3.4.1 Preparo das amostras

As amostras de fígado e de rim de cada animal foram coletadas, pesadas e homogeneizadas na proporção de 1:10 (0,1g da amostra para 1000 µL de solução salina a 0,9%, com auxílio de homogeneizador. Os homogeneizados foram transferidos a microtubos e centrifugados. Amostras do sobrenadante foram aliquotadas em microtubos e armazenadas a -80° C para posterior realização das análises bioquímicas. Alíquotas foram guardadas para a análise da peroxidação lipídica e para os testes de atividade das enzimas Catalase (CAT) e Superóxido Dismutase (SOD).

3.4.2 Quantificação de proteína – Método Bradford

O método de Bradford foi utilizado para estimar a concentração de proteína através de análise espectrofotométrica. O método é baseado na reação colorimétrica entre a proteína no interior da amostra e a solução de Bradford (Blue Coomassie 0,01%, etanol 4,75%, ácido fosfórico 8,5%) em ambientes escuros e frios. Foi adicionado 20 µl do lisado em 1 mL de solução de Bradford; esta mistura foi homogeneizada e deixada para reagir durante 5 minutos. Em seguida, 200 µL da mistura foram analisados em duplicatas e lidos a 595 nm no espectrofotômetro. A concentração de proteína da amostra é estimada por equivalência de albumina (absorbância 0,66 a 280 nm). Os resultados são expressos em mg/mL. A quantificação de proteína é considerada para o cálculo da peroxidação lipídica e das atividades das enzimas analisadas.

3.4.3 Peroxidação Lipídica

Para se determinar a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que são os produtos resultantes da peroxidação lipídica, foi utilizado o método de Winterbourn *et al.*, (1985) modificado para análise em espectrofotometria.

O método baseia-se na alteração da coloração da amostra (plasma) quando a mesma é colocada para reagir com o TBARS a 1 % na temperatura de 90 a 100 °C e em meio ácido. Em tubos de propileno de 1,5 ml, foram colocados 10 µL de butil-hidroxi-tolueno (BHT) (solução etanóica a 2 %), 200 µL de ácido clorídrico (HCl) 25%, 200 µL de solução de TBARS (1%) dissolvido em solução aquosa de NaOH a 0,05N e 200 µL de amostra. Foi feito um branco com todas as soluções colocando-se, no lugar da amostra, solução salina 0,9%.

Posteriormente, os tubos contendo a mistura foram incubados em banho fervente (100 °C) durante 15 minutos e resfriados em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se 618 µL de butanol em cada tubo e agitados em vórtex até que houvesse a transferência total da coloração rósea da camada inferior para a superior. A mistura foi centrifugada por 5 minutos a 12000 rpm até que a fase do butanol (sobrenadante) tornou-se límpida. Foram retirados 200 µl de sobrenadante, e as amostras foram distribuídas em duplicata em uma placa de 96 poços. A placa foi introduzida em um espectrofotômetro, onde mediu-se a absorbância ao comprimento de onda de 532 nm.

A amplificação da peroxidação durante o ensaio foi prevenida pela adição de um antioxidante (BHT) (BROWN & KELLY, 1996). A concentração de TBARS foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do MDA ($\epsilon = 1,56 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{mL}^{-1}$). Concentração de TBARS = Absorbância/1,56 x diluições (WINTERBOURN *et al.*, 1985).

3.4.4 Atividade da Catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase foi determinada seguindo o método de Aebi (1984), que consiste em mensurar a atividade desta enzima por meio da decomposição de peróxido de hidrogênio exógeno, gerando oxigênio e água, através de espectrofotometria. A velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio é mensurada em 240 nm durante 20 s. Utiliza-se a solução de peróxido de hidrogênio

(H₂O₂) 10 mM em tampão fosfato mM pH 7,0 preparada e titulada no dia da análise. Para isso, foi adicionado 2 mL desta solução na cubeta, com acréscimo de 20µL da amostra, em seguida, é feita a leitura da queda da absorbância. Os valores são expressos em mmol.min⁻¹.mL⁻¹

3.4.5 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida espectrofotometricamente em 550 nm, de acordo com o método de Flohé (1987) adaptado. A enzima em questão catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. O procedimento técnico consiste, inicialmente no preparo das seguintes soluções: (a) tampão fosfato de sódio 50mM adicionados em 0.1mM de EDTA, Citocromo C e Xantina; (b) EDTA adicionado de Xantina Oxidase. Em seguida, sob temperatura de 25°C, foi realizado o ensaio que consiste no meio de reação adicionado a cubeta e, logo em seguida, a amostra. O procedimento relacionado ao branco é variável tanto na quantidade de solução a quanto na quantidade de solução b. A leitura espectrofotométrica total tem a duração de 8 minutos. Os valores são expressos em USOD.mL⁻¹.

3.5 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS HISTOLÓGICAS

Os órgãos retirados para análise histopatológica (rins, fígado e encéfalo) foram analisados quanto à coloração e a presença de hemorragias e/ou outras alterações. Em seguida foram fixados em formol a 10% e posteriormente processados para análise histológica.

As amostras de tecidos foram processadas seguindo a sequência padronizada de procedimentos histológicos, foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90%, 95% e 100%) e, após a infiltração do tecido em xilol (diafanização ou clarificação), foram incorporadas em blocos de parafina; em seguida foram seccionados em cortes de 5µm de espessura e os cortes corados com hematoxilina e eosina para então serem analisados através de um aumento de 400X (PROPHET *et al.*, 1995; GEYIKOGLU *et al.*, 2013; ÇANAKÇI *et al.*, 2016).

Para as amostras de rim e fígado foram analisadas 4 lâminas de cada animal, e para as amostras de encéfalo, duas lâminas (apenas para uma caracterização qualitativa do tecido). Cada lâmina com dois cortes, que foram divididos em quadrantes. As análises dos tecidos renal e hepático consideraram a frequência das alterações observadas por quadrante. Os danos aos tecidos foram agrupados de acordo com a frequência de ocorrência; 0: sem anormalidade, 0+: as anormalidades são muito raras, +: baixa frequência de anormalidades, ++: frequência moderada de anormalidades e +++: alta frequência de anormalidades.

Também foi calculado o grau de dano tecidual (GDT), as alterações histopatológicas em cada órgão foram classificadas de acordo com a fase do dano: fase I refere-se a danos citológicos e teciduais reversíveis que não afetem a funcionalidade do órgão; fase II indica danos citológicos e teciduais que possuam uma moderada reversibilidade e que não alteram a funcionalidade do órgão; fase III refere-se a danos citológicos e teciduais irreversíveis que levam a uma disfunção do órgão. GDT foi quantificado nos órgãos examinados usando a fórmula: $GDT = (1 \times \Sigma FI) + (10 \times \Sigma FII) + (100 \times \Sigma FIII)$. ΣFI , ΣFII , e $\Sigma FIII$ calculado pelo número total de danos histopatológicos observados em cada fase (ALNOAIMI *et al*, 2021).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os grupos iniciaram o período de aclimatação com 5 animais de cada gênero. Dentre os machos, ao longo de todo o período de tratamento foi observado um comportamento agressivo em alguns indivíduos de cada grupo, assim que o animal que estava apresentando esse comportamento era identificado, ele era retirado da gaiola do grupo e colocado em uma gaiola individual; alguns animais ficaram machucados por conta desse comportamento agressivo e destes, alguns não resistiram. Dessa forma, ao final do período de tratamento, o grupo controle possuía apenas 3 animais vivos e o grupo que recebeu MeHg + PRL na maior concentração possuía apenas 4 indivíduos. O grupo controle das fêmeas já iniciou o experimento com apenas 4 animais.

4.1 DOSAGEM DE MERCÚRIO E DE PROLACTINA

A determinação de Hg no sangue é um importante indicador da exposição ao mercúrio orgânico (MAGNO, 2009). O nível de mercúrio no sangue dos animais que participaram do experimento foi avaliado e observamos um aumento significativo ($p < 0,01$) deste metal no sangue dos animais que receberam MeHg (sozinho ou no tratamento conjugado com PRL) quando comparados aos animais que não receberam o metal (grupo controle e animais que receberam apenas PRL). Nos animais que receberam o tratamento conjugado (MeHg + PRL) observamos uma redução significativa de mercúrio sérico, quando comparados com o grupo que recebeu apenas MeHg (Figura 7).

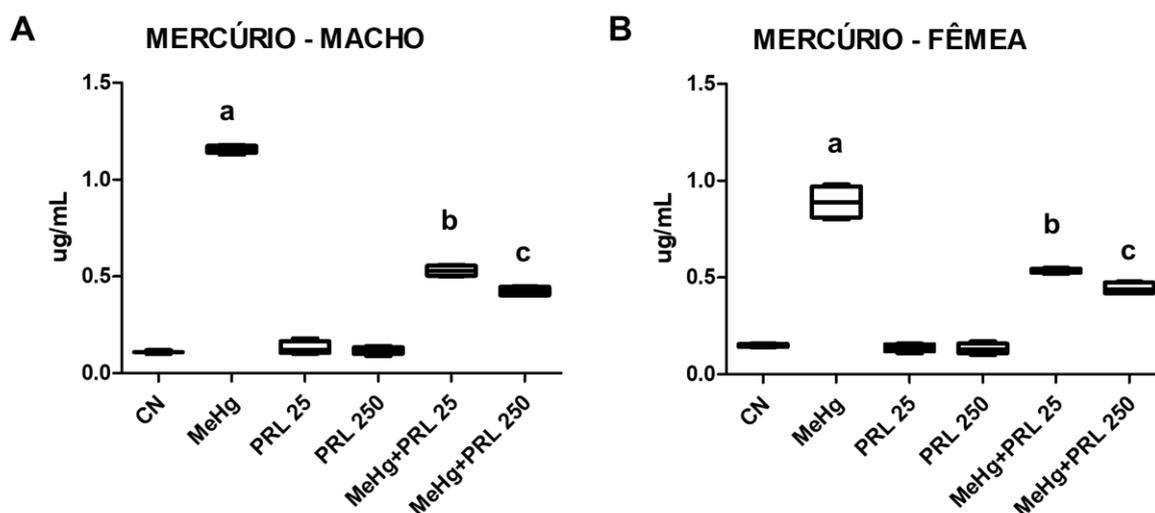


Figura 7: Nível sérico de Mercúrio em cada grupo de tratamento, machos (imagem A) e fêmeas (imagem B). **a:** diferença estatisticamente significativa do grupo MeHg, comparado com todos os outros grupos de tratamentos; **b:** diferença estatisticamente significativa do grupo MeHg + PRL 25, comparado com todos os outros grupos de tratamentos; **c:** diferença estatisticamente significativa do grupo MeHg + PRL 250, comparado com os outros grupos de tratamentos. **a, b e c** . ($p < 0,01$), ANOVA com pós teste Tukey.

Assim como nossa análise, outros autores já consideraram esse parâmetro. Diversos estudos *in vivo*, determinaram o nível do Hg nos animais após a exposição experimental, observando um aumento significativo de Hg no sangue dos animais expostos, inclusive em um nível maior do que a quantidade do metal acumulada em outros tecidos (fígado, rim, cérebro, cabelos etc), quando avaliados (PASSOS *et al.*, 2008; BARCELOS *et al.*, 2011; GROTTTO *et al.*, 2011a; GROTTTO *et al.*, 2011b; BRACELOS *et al.*, 2012; PAULA *et al.*, 2016).

Nossos resultados também demonstraram uma redução de Hg no sangue dos animais que receberam o tratamento conjugado com PRL.

O nível sérico de PRL foi medido e, em ambos os sexos, observou-se uma diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo controle com todos os outros grupos de tratamento ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) apenas quando comparado o grupo que recebeu o tratamento conjugado de MeHg junto com a PRL na maior concentração e o grupo controle nos machos). Os animais que receberam apenas MeHg tiveram uma redução significativa de PRL quando comparados aos do grupo controle. Dos animais que receberam o tratamento conjugado, no grupo que recebeu a maior concentração de PRL, observamos um aumento significativo do nível sérico

deste hormônio quando comparados aos animais que receberam apenas MeHg; também observamos uma redução significativa deste hormônio no sangue quando comparamos os grupos que receberam o tratamento conjugado com os grupos que receberam apenas a PRL nas respectivas concentrações (Figura 8).

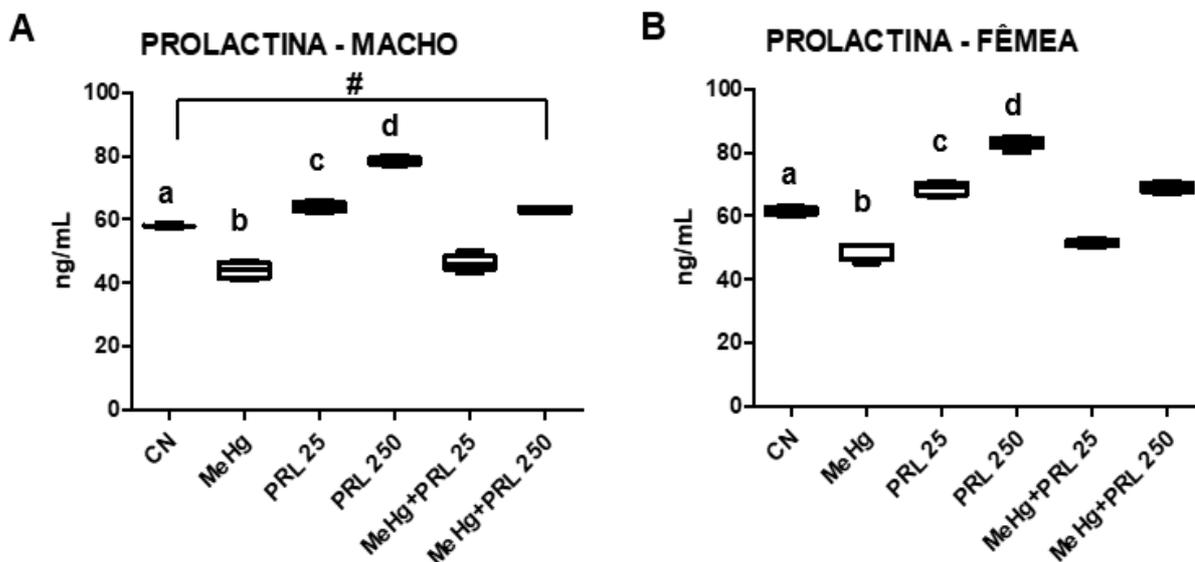


Figura 8: Nível sérico de Prolactina em cada grupo de tratamento, machos (imagem A) e fêmeas (imagem B). **a:** diferença estatisticamente significativa do grupo controle, comparado com todos os outros grupos de tratamentos; **b:** diferença estatisticamente significativa do grupo MeHg, comparado com todos os outros tratamentos (menos com o grupo MeHg + PRL25, com o qual não houve diferença estatística); **c:** diferença estatisticamente significativa do grupo que PRL 25, comparado com o grupo MeHg+PRL 25; **d:** diferença estatisticamente significativa do grupo PRL 250, comparado com o grupo MeHg+PRL 250. **a, b, c e d** ($p < 0,01$), **#** diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e MeHg+PRL 250, nos machos ($p < 0,05$). ANOVA com pós teste Tukey.

4.2 BIOENSAIOS DE GENOTOXICIDADE

A partir do ensaio cometa não foi observada uma diferença estatística entre os índices de danos encontrados nos grupos CN e MeHg. Porém observamos uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) na redução dos índices de danos nos animais pertencentes aos grupos que receberam apenas PRL nas duas concentrações, quando comparados aos outros grupos de tratamento. Os animais que receberam o tratamento conjugado apresentaram índices de danos semelhantes aos do controle e aos que receberam apenas MeHg (figura 9). Nessas condições de

estudo não conseguimos provar um efeito protetor da PRL contra os efeitos genotóxicos do MeHg.

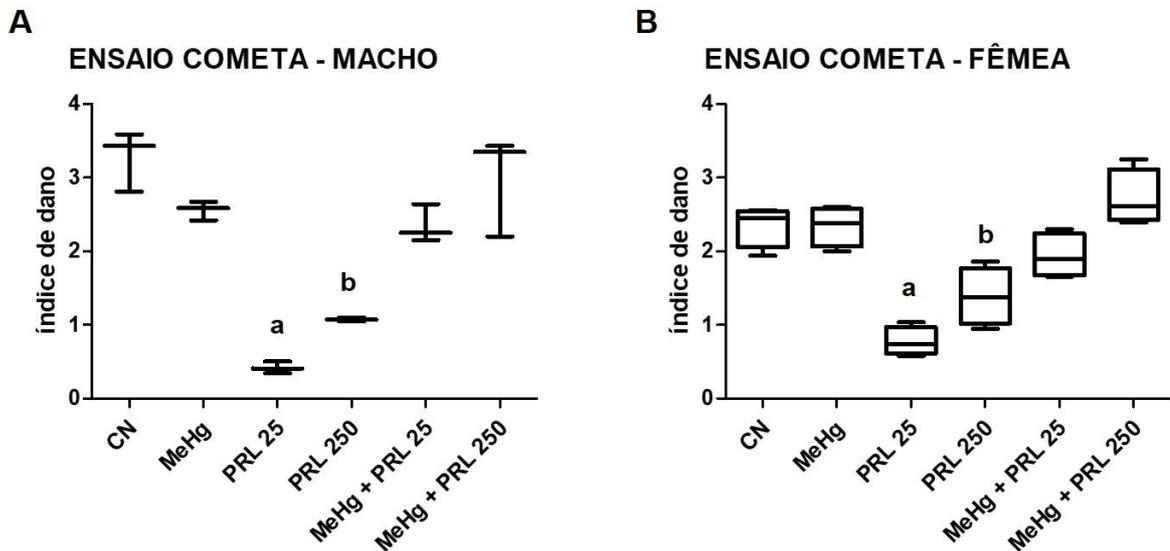


Figura 9: Índice de dano de cada grupo de tratamento, machos (imagem A) e fêmeas (imagem B). **a:** diferença estatisticamente significativa do grupo PRL25, comparada a todos os outros grupos de tratamentos; **b:** diferença estatisticamente significativa do grupo PRL250, comparada a todos os outros grupos de tratamentos. **a e b** ($p < 0,01$), ANOVA com pós teste Tukey.

O Teste do Micronúcleo mostrou um aumento significativo ($p < 0,01$) na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) no grupo que recebeu apenas o MeHg quando comparado ao grupo controle, evidenciando o potencial mutagênico deste metal. O tratamento conjugado, com as duas concentrações de PRL, reduziu significativamente ($p < 0,01$) a frequência de EPCMN.

Os animais que receberam apenas a PRL não apresentaram diferença significativa na frequência de EPCMN quando comparados aos animais do grupo CN, em nenhuma das concentrações testadas. Nesse contexto, a PRL não apresenta um efeito mutagênico e apresenta um efeito protetor às ações mutagênicas do MeHg. (tabela 1; figura 10).

Tabela 1: Quantidade de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN), média e desvio padrão (DP), em cada grupo de tratamento, em cada gênero.

TRATAMENTO	ANIMAL	EPCMN	MÉDIA ± DP
CN	3 Machos	10	3,3 ± 2,08
	4 Fêmeas	9	2,3 ± 2,22
MeHg	5 Machos	87	17,4 ± 3,36
	5 Fêmeas	88	17,6 ± 5,77
PRL 25	5 Machos	5	1,0 ± 0,71
	5 Fêmeas	5	1,0 ± 1,22
PRL 250	5 Machos	4	0,8 ± 0,84
	5 Fêmeas	7	1,4 ± 1,14
MeHg + PRL 25	5 Machos	7	1,4 ± 1,14
	5 Fêmeas	8	1,6 ± 0,89
MeHg + PRL 250	4 Machos	7	1,8 ± 0,50
	5 Fêmeas	8	1,6 ± 0,89

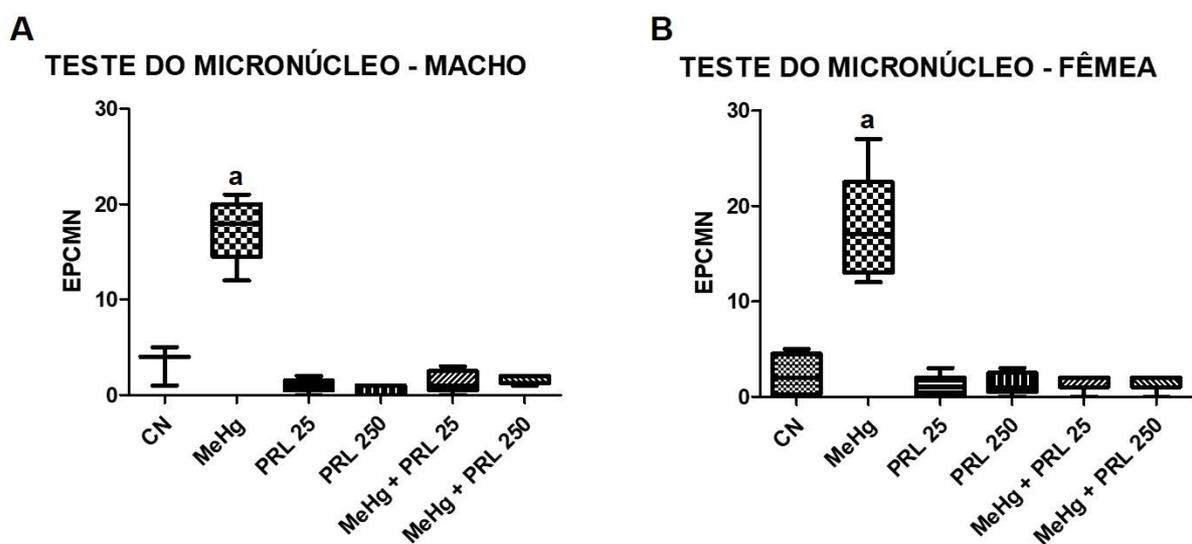


Figura 10: EPCMN em cada grupo de tratamento, machos (imagem A) e fêmeas (imagem B). a: diferença estatisticamente significativa do grupo MeHg, comparada a todos os outros tratamentos. a ($p < 0,01$), ANOVA com pós teste Tukey.

Também foi avaliada a toxicidade para medula óssea dos camundongos de cada tratamento, considerando a razão entre a quantidade de eritrócitos policromáticos e o total de eritrócitos (policromáticos + normocromáticos) e observamos que nenhum tratamento se apresentou tóxico para a medula.

Os efeitos genotóxicos do MeHg foram demonstrados através do teste do Micronúcleo, que, de acordo com Ribeiro *et al.* (2003), utiliza eritrócitos policromáticos

retirados da medula óssea de camundongos para mostrar o efeito do agente químico testado, sendo um aumento significativo de eritrócitos micronucleados a evidência da genotoxicidade da substância testada.

Em nossas condições de estudo, observou-se um importante efeito genotóxico de MeHg caracterizado pelo aumento de EPCMN. Muitos estudos já demonstraram o efeito genotóxico deste metal. Lopes-Poleza (2004) e Rocha *et al.* (2011a e 2011b) realizaram o teste do micronúcleo em peixes expostos ao metilmercúrio, e tanto em uma exposição subcrônica, como numa exposição aguda (respectivamente), considerando, além de células micronucleadas, células com outras anormalidades morfonucleares, o metal apresentou efeitos genotóxicos.

In vitro, o teste do micronúcleo com o bloqueio de citocalasina B para a análise de células binucleadas já foi utilizado para analisar este efeito tóxico do MeHg. Linhagens celulares (neoplásicas e não neoplásicas) foram expostas a baixas concentrações de MeHg, em um curto período de tempo e observou-se um aumento significativo de células com MN, além de outras alterações como pontes nucleares, brotos e apoptose (CRESPO-LOPEZ *et al.*, 2016; SILVA, 2017). O teste do micronúcleo com bloqueio de citocalasina B foi realizado por Galeano-Páez *et al.* (2020) no sangue coletado de populações humanas expostas através da dieta a esse metal, demonstrando o efeito genotóxico do mercúrio.

A genotoxicidade do Hg também já foi demonstrada através do ensaio cometa, com um importante aumento da cauda dos nucleoides observados, caracterizando quebras na molécula de DNA, esses estudos foram realizados *in vitro* (CRESPO-LOPEZ *et al.*, 2016; SILVA, 2017) e *in vivo*, com ratos (BARCELOS *et al.*, 2011; GROTTTO *et al.*, 2011a; BARCELOS *et al.*, 2012; BHOWMIK & PRATA, 2015), peixes (LOPES-POLEZA 2004; ROCHA *et al.*, 2011b) e girinos (SANTOS, 2019). Nossos resultados do ensaio cometa não nos permitiram caracterizar a genotoxicidade do MeHg a partir desse parâmetro, pois não observamos diferenças significativas de índice de danos entre os grupos controle e que recebeu MeHg.

Essa diferença em nossos resultados, entre o teste de MN e o ensaio cometa, pode estar relacionada à ação aneugênica do metal. Sousa (2018), por exemplo, conseguiu evidenciar *in vitro* este efeito aneugênico a partir da realização do teste do MN com FISH, identificando a formação de MN com a perda de cromossomos inteiros do núcleo principal, e, assim como em nossos estudos, não observaram um aumento de quebras cromossômicas a partir do ensaio cometa, em uma das linhagens

utilizadas. A autora relaciona estes achados a diversidade de efeitos tóxicos que o mercúrio pode induzir em diferentes tipos de tecidos e células.

Aberrações cromossômicas e poliploidias também já foram considerados como parâmetros para caracterizar a genotoxicidade do mercúrio (SILVA-PEREIRA *et al.*, 2005; SILVA-PEREIRA *et al.*, 2014; BHOWMIK & PRATA, 2015)

Esses estudos indicam que o efeito genotóxico observado pode estar relacionado a ações deste metal como: a produção de espécies reativas de oxigênio que, por sua vez, induzem quebras na molécula de DNA, ou a interação direta do metal com a molécula de DNA, modificando sua estrutura e conseqüentemente causando quebras, além de um comprometimento da integridade de microtúbulos envolvidos na orientação da divisão celular.

Nossos resultados demonstraram um efeito protetor da PRL contra esses efeitos genotóxicos induzidos pelo MeHg, reduzindo significativamente o número de EPCMN na medula óssea dos animais que receberam o tratamento conjugado (MeHg + PRL), em ambos os gêneros. Silva-Pereira *et al.* (2014), observaram uma redução dos efeitos genotóxicos induzidos por MeHg na linhagem HL-60 (leucemia) e linfócitos humanos, quando essas células eram tratadas com PRL. Jesus 2012, também observou o efeito protetor da PRL contra efeitos citotóxicos do MeHg na linhagem B95-A (linfócito de primata), onde a presença do hormônio inibiu a redução da viabilidade celular provocada pelo metal.

Esse efeito protetor da PRL pode estar relacionado à ativação de vias de sinalização, a partir da interação deste hormônio com seu receptor, como a vias JAK-Stat e MAPK; essas vias de sinalizações relacionam-se a transcrição de ciclinas, a ativação de nucleotídeos de guanina, de enzimas de desintoxicação e organização do citoesqueleto, o que pode inibir os danos diretos ou indiretos ao DNA e a apoptose (LAPENSEE E BEM-JONATHAN, 2010; SILVA-PEREIRA *et al.*, 2014).

4.3 BIOENSAIOS ENZIMÁTICOS

4.3.1 Peroxidação Lipídica

A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi avaliada em amostras do fígado e rim dos animais, para caracterizar a peroxidação lipídica nas células desses órgãos. No fígado dos machos não foi observada diferença estatisticamente significativa entre nenhum dos grupos de tratamento; nas fêmeas, apenas o grupo que recebeu MeHg junto com PRL na menor concentração apresentou um aumento significativo, comparado aos outros grupos (Figura 11). Com relação a análise feita em amostras do rim dos animais, nos machos, apenas o grupo que recebeu MeHg junto com PRL na menor concentração apresentou uma redução significativa com relação ao grupo controle; enquanto que nas fêmeas, não houve diferença estatística (Figura 12).

Nessas condições experimentais não conseguimos provar um efeito citotóxico do MeHg, comparado ao controle e nem uma ação da PRL contra estes danos.

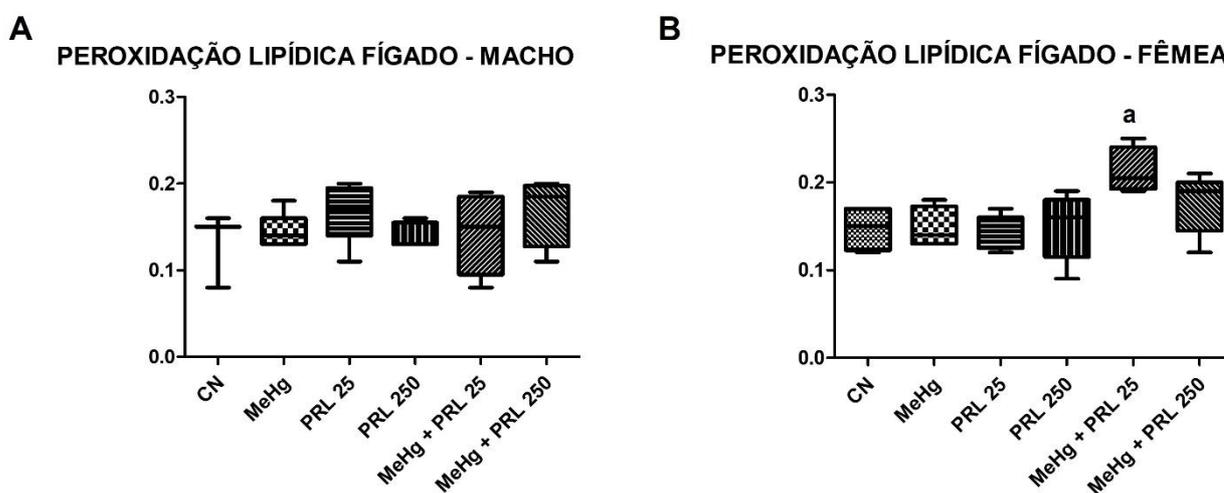


Figura 11: Comparação entre os níveis de peroxidação lipídica, no fígado dos machos (imagem A) e das fêmeas (imagem B). **a:** diferença estatisticamente significativa do grupo MeHg + PRL25, comparado com os outros tratamentos (fêmeas). **a** ($p < 0,05$), ANOVA com pós teste Tukey.

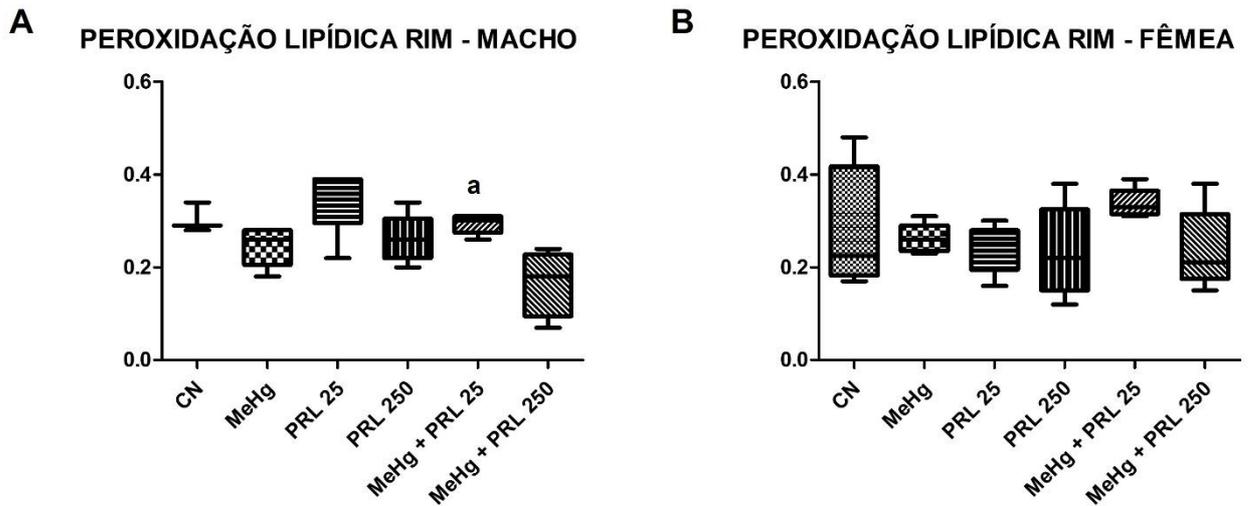


Figura 12: Comparação entre os níveis de peroxidação lipídica, no rim dos machos (imagem A) e das fêmeas (imagem B). **a:** diferença estatisticamente significativa do grupo MeHg + PRL250, comparado com o grupo controle (machos). **a** ($p < 0,05$), ANOVA com pós teste Tukey.

4.3.2 Atividade da Catalase (CAT)

A avaliação da atividade da enzima catalase não demonstrou diferença estatisticamente significativa em nenhum grupo de tratamento, em nenhum dos gêneros e em nenhum dos órgãos analisados (fígado e rim) (Figuras 13 e 14).

Nestas condições experimentais não conseguimos definir um efeito do MeHg e da PRL na ação da enzima catalase

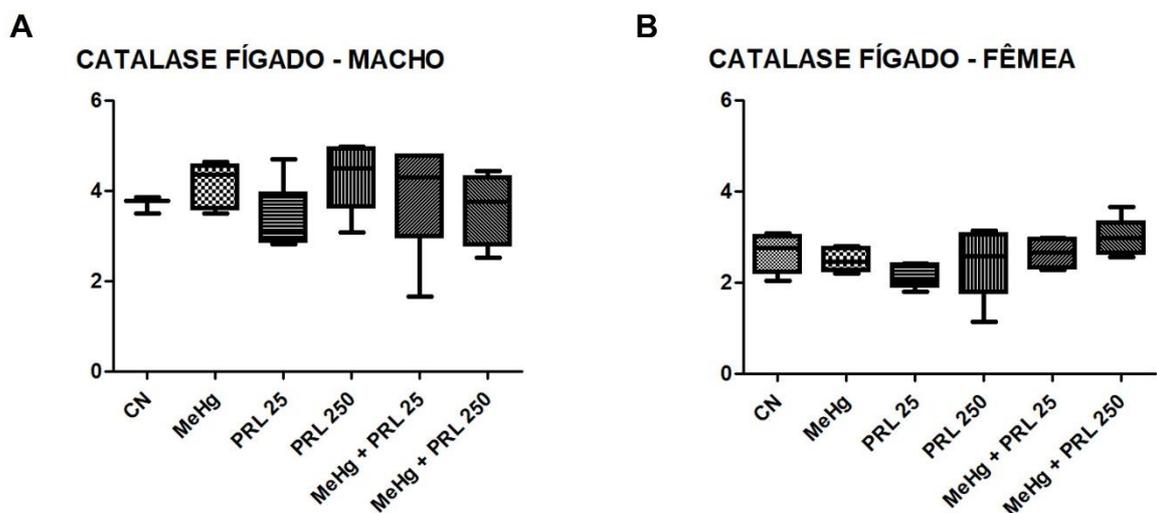


Figura 13: Comparação da atividade da Catalase no fígado dos machos (imagem A) e das fêmeas (imagem B) de cada grupo de tratamento.

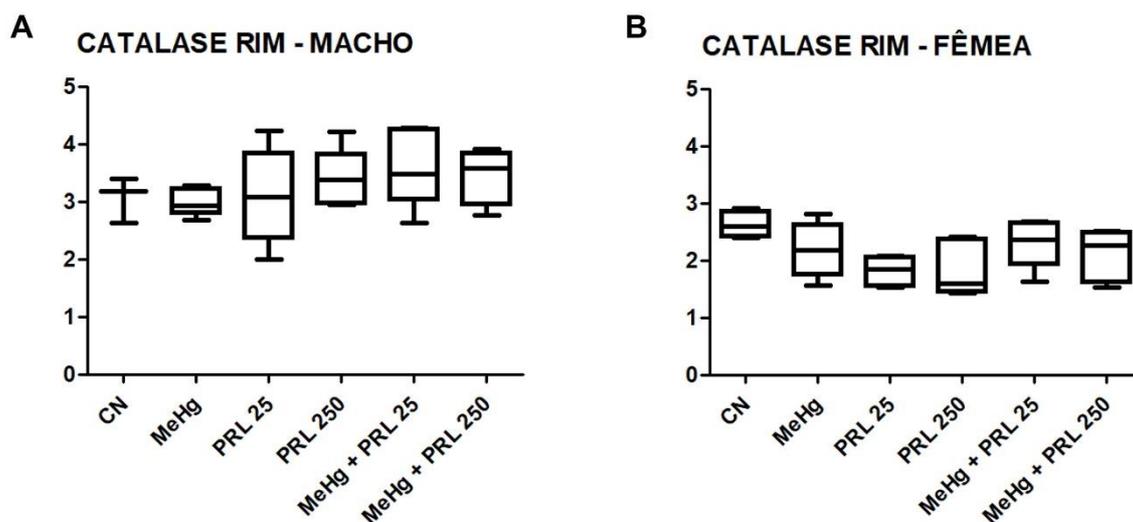


Figura 14: Comparação da atividade da Catalase no rim dos machos (imagem A) e das fêmeas (imagem B) de cada grupo de tratamento.

4.3.3 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida em amostras do fígado e do rim dos animais. Nas amostras de fígado, em ambos os sexos, observamos um aumento desta atividade em todos os grupos tratados quando comparados ao grupo controle, mas apenas no grupo que recebeu o tratamento conjugado de MeHg e PRL na maior concentração, este aumento foi estatisticamente significativo ($p < 0,01$). Nos machos, a diferença significativa foi entre este grupo (MeHg + PRL250) e os grupos controle e que recebeu apenas MeHg. Nas fêmeas, a atividade da SOD foi estatisticamente maior quando comparada com os grupos controle, o que recebeu apenas MeHg e o que recebeu apenas PRL na mesma concentração (Figura 15).

A avaliação da atividade da SOD no rim se mostrou mais sensível, demonstrando uma maior variação entre os grupos, com os grupos que receberam o tratamento conjugado (MeHg e PRL nas duas concentrações) apresentando uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) quando comparados aos outros grupos, em ambos os gêneros. Nas fêmeas também observamos diferença estatística entre o grupo controle e o grupo que recebeu apenas MeHg (Figura 16).

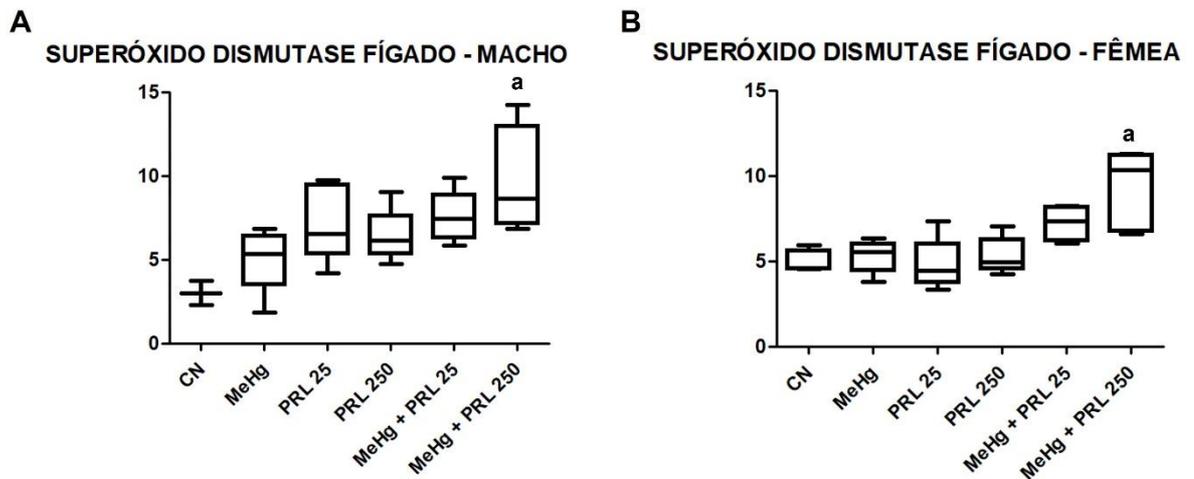


Figura 15: Comparação da atividade da SOD entre os grupos de tratamento, no fígado dos machos (imagem A) e das fêmeas (imagem B). Na imagem A, **a**: diferença estatisticamente significativa do grupo MeHg + PRL250, comparado com o grupo controle e o grupo que recebeu apenas MeHg; na imagem B, **a**: diferença estatisticamente significativa do grupo MeHg + PRL250, comparado com os grupos controle, que recebeu apenas MeHg e que recebeu apenas PRL na mesma concentração (nas fêmeas). **a** ($p < 0,01$), ANOVA com pós teste Tukey.

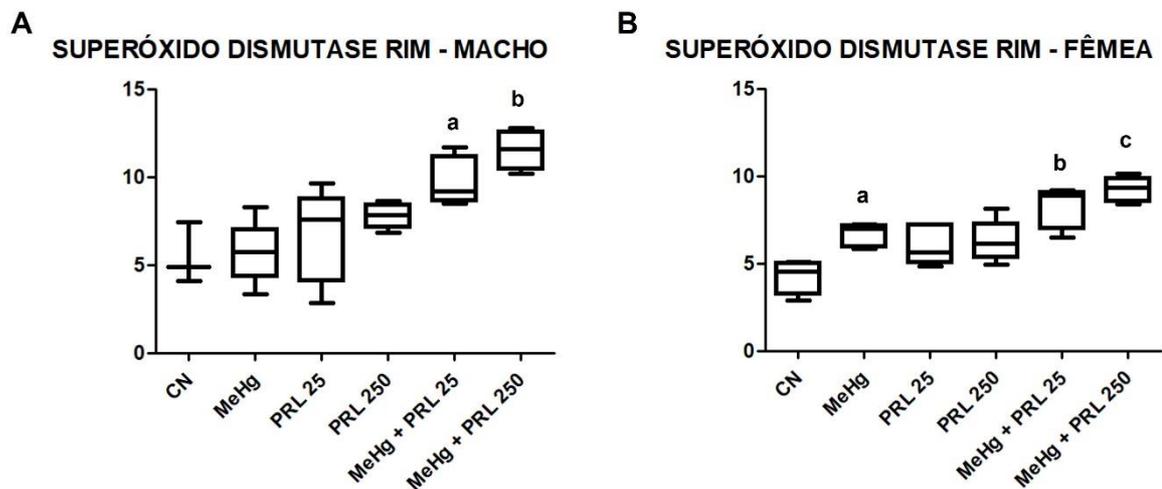


Figura 16: Comparação da atividade da SOD entre os grupos de tratamento, no rim dos machos (imagem A) e das fêmeas (imagem B). Na imagem A, **a**: diferença estatisticamente significativa do grupo MeHg + PRL250, comparado com os grupos controle e o que recebeu apenas MeHg; **b**: diferença estatisticamente significativa do grupo MeHg + PRL250, comparado com os grupos controle, que recebeu apenas MeHg e que recebeu apenas PRL na mesma concentração. Na imagem B, **a**: diferença estatisticamente significativa do grupo MeHg comparada ao grupo controle; **b**: diferença estatisticamente significativa do grupo MeHg + PRL250, comparada com os grupos controle e que recebeu apenas PRL na mesma concentração; **c**: diferença estatisticamente significativa do grupo MeHg + PRL250, comparada com os grupos controle, que recebeu apenas MeHg e que recebeu apenas PRL na mesma concentração. **a**, **b** e **c** ($p < 0,01$), ANOVA com pós teste Tukey.

No presente estudo, não foi possível caracterizar a citotoxicidade do MeHg a partir da peroxidação lipídica e nem o efeito deste metal na atividade da enzima catalase, assim como um possível efeito antioxidante da PRL a partir desses parâmetros. Entretanto, os resultados observados na análise da ação da enzima SOD demonstram algumas diferenças na atividade desta enzima, comparando os grupos de tratamento. Diversos estudos já avaliaram os efeitos do mercúrio a partir do estresse oxidativo que provoca, pelos mesmos parâmetros (peroxidação lipídica e atividade de enzimas antioxidantes) que avaliamos.

Costa-Malaquias *et al.* (2014), analisaram danos oxidativos induzidos pelo metilmercúrio na linhagem celular C6 de glioma de rato e, assim como em nossos achados, não observaram diferença significativa entre o grupo controle e o grupo tratado com MeHg com relação a peroxidação lipídica. Para esses autores, essa não diferença pode estar relacionada a um alto nível de peroxidação lipídica no grupo controle, em virtude de condições de cultivo celular.

De forma semelhante à observada em nossas condições de estudo, Belém-filho (2015) não identificou um aumento na peroxidação lipídica em amostras do sangue de ratas Wistar expostas a uma baixa concentração de MeHg. Além da peroxidação lipídica, este autor avaliou outros parâmetros bioquímicos oxidativos, como a atividade das enzimas CAT e SOD. Apesar da concentração utilizada e o tempo de tratamento serem semelhantes aos de nosso estudo, as observações das atividades dessas enzimas foram opostas ao que observamos em nossos resultados; nos animais que receberam MeHg, a atividade da enzima CAT foi muito aumentada em relação ao grupo controle, enquanto que na avaliação da SOD não se observou alteração na atividade enzimática. Os autores acreditam que não observaram diferenças na atividade da SOD, devido ao fato desta enzima atuar de diferentes maneiras em diferentes tecidos.

A avaliação da atividade oxidante do mercúrio demonstra resultados ainda bem divergentes; enquanto nos estudos citados acima, assim como em nossos resultados, não houve um aumento na peroxidação lipídica, em vários outros o aumento deste dano oxidativo é um importante efeito do metal. Franco (2009), Wagner *et al.* (2010) e Jindal *et al.* (2010), identificaram, *in vivo*, um aumento significativo da peroxidação lipídica em amostras dos animais expostos ao mercúrio, caracterizando a citotoxicidade do metal. Esses autores também avaliaram a atividade de enzimas antioxidantes; Franco (2009) associou a neurotoxicidade observada em camundongos

expostos ao MeHg à inibição da enzima glutathione peroxidase; também observou um aumento da atividade da glutathione reduzida nos filhotes expostos por via lactacional.

Wagner *et al.* (2010), observou uma redução significativa na atividade da glutathione peroxidase no encéfalo e no rim de ratos Wistar expostos ao MeHg; já a atividade da SOD não foi alterada. Jindal *et al.* (2010), observaram uma redução na atividade das enzimas glutathione reduzida e SOD; esses autores relacionam a inibição de enzimas pelo mercúrio, principalmente das enzimas que contém grupo sulfidril, à capacidade que o metal possui de se ligar a esse grupamento.

Grotto *et al.* (2011b) e Souza *et al.* (2016), utilizaram a mesma concentração de MeHg, 140 µg/Kg/dia, durante 100 e 60 dias de tratamento, respectivamente, e também observaram diferentes resultados com relação a enzima SOD; enquanto para os primeiros a atividade da enzima se manteve inalterada, para Souza *et al.* (2016), o tratamento com o MeHg aumentou a expressão desta enzima, indicando o aumento no estresse oxidativo provocado pelo metal. Essa variação nos resultados, pode estar relacionada ao tecido utilizado para as análises. Grotto *et al.* (2011b) avaliaram amostras de sangue, enquanto Souza *et al.* (2016) utilizaram o cérebro. Grotto *et al.* (2011b) também observaram uma redução significativa nas atividades de CAT e glutathione peroxidase.

Em humanos, o status oxidativo foi avaliado em populações consumidoras de pescado de diferentes regiões geográficas do estado do Pará e os indivíduos da região mais próxima de antigas áreas de garimpo foram os que apresentaram maior quantidade de mercúrio total no sangue, chegando a níveis maiores que o limite de tolerância estabelecido pela OMS. Nesses indivíduos também foi observada uma redução na quantificação de glutathione, quando comparada à análise das amostras dos indivíduos das outras regiões. Houve um aumento na peroxidação lipídica nesses indivíduos, mas não tão evidente quanto a redução da atividade da enzima (OLIVEIRA, 2014).

Toda essa variedade de resultados indica que a avaliação dos parâmetros da bioquímica oxidativa, embora muito importante para caracterizar a toxicidade do mercúrio, deve considerar outros fatores, como o tecido analisado, tipo mercurial, dose e tempo de tratamento, entre outros.

Nossos resultados mostraram um aumento na atividade da SOD, inclusive nos grupos que receberam PRL e de maneira significativa ($p < 0,01$) nos grupos que receberam o hormônio junto com o metal. Esse aumento também caracteriza uma

ação antioxidante da PRL. Alguns estudos demonstram o aumento da expressão de enzimas antioxidantes estimulado por esse hormônio; Marmantini (2019), utilizando cultura de células β pancreáticas da linhagem INS-1E, observou o aumento no conteúdo proteico de enzimas antioxidantes, inclusive a SOD e a ativação do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR). Mansano (2018), utilizando uma linhagem de insulinoma murino, demonstraram uma expressão diferencial da proteína HSPB1, que tem sua ativação aumentada também devido ao estresse oxidativo, sendo caracterizada como um mediador do efeito da PRL.

4.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO RIM E DO FÍGADO

Com análise histológica dos rins dos camundongos foram observados cortes com cápsula renal íntegra, túbulos dispersos por todo o parênquima e glomérulos arredondados, com cápsula de Bowman íntegra. Algumas alterações foram observadas em todos os grupos, com diferentes frequências, em ambos os gêneros (Tabela 2 e Figura 17).

Tabela 2: Frequência das alterações no tecido renal, em cada grupo de tratamento, fêmeas e machos.

	FÊMEAS						MACHOS					
	<i>CN</i>	<i>MeHg</i>	<i>PRL 25</i>	<i>PRL 250</i>	<i>MeHg/PRL 25</i>	<i>Mehg/PRL 250</i>	<i>CN</i>	<i>MeHg</i>	<i>PRL 25</i>	<i>PRL 250</i>	<i>MeHg/PRL 25</i>	<i>Mehg/PRL 250</i>
Glomérulos hipertrofiados	++	+++	++	+++	+++	+++	0+	+++	++	++	++	++
Túbulos edemaciados	+++	+++	0+	0+	++	+++	+++	+++	0	++	+++	+++
Descamação nos túbulos	+	++	0	0	+	+	++	++	0	+	+	+++
Degeneração hidrópica	0	++	0+	0+	+++	++	0	+++	0	++	+++	++
Degeneração hialina de vasos	0	+++	+++	+++	+++	+++	0+	+++	+++	+++	+++	+++

(0) não detectada, (0+) raramente detectada, (+) com frequência baixa, (++) com frequência moderada e (+++) com frequência alta.

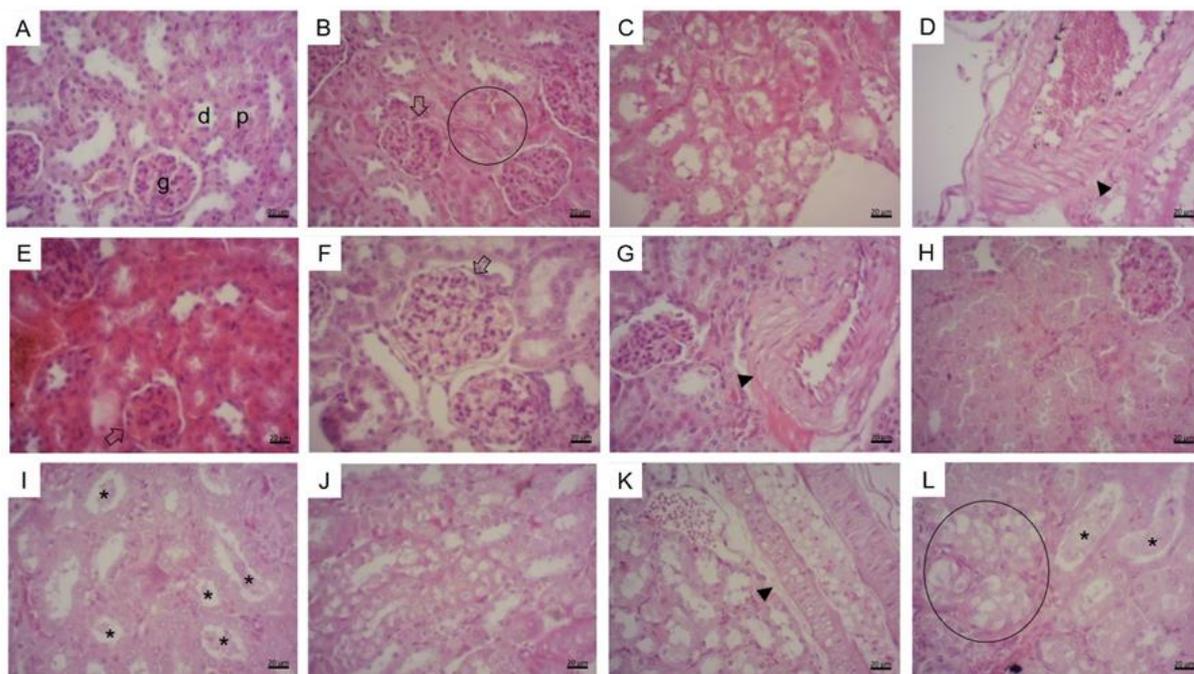


Figura 17: Análise histopatológica do rim. **A** fêmea do grupo controle - parênquima renal normal, glomérulo (g), túbulo proximal (p), túbulo distal (d). **B** fêmea do grupo MeHg - glomérulo hipertrofiado (seta), túbulos edemaciados (círculo). **C** macho do grupo MeHg -área com células em degeneração hidrópica. **D** macho do grupo MeHg - vaso com degeneração hialina na camada média (cabeça de seta). **E** macho do grupo PRL25 - glomérulo hipertrofiado (seta). **F** fêmea do grupo PRL25 - glomérulo hipertrofiado (seta). **G** fêmea do grupo PRL250 - vaso com degeneração hialina na camada média (cabeça de seta). **H** macho do grupo PRL250 - túbulos edemaciados. **I** macho do grupo MeHg+PRL25 - descamação de células necróticas nos túbulos (asteriscos). **J** macho do grupo MeHg+PRL25 - área com células em degeneração hidrópica. **K** fêmea do grupo MeHg+PRL250 - vaso com degeneração hialina na camada média (cabeça de seta). **L** macho do grupo MeHg+PRL250 - descamação de células necróticas nos túbulos (asteriscos), área com células em degeneração hidrópica (círculo).

Glomérulos hipertrofiados foram observados em todos os grupos de tratamento. Nas fêmeas, a frequência dessa alteração foi moderada ou alta. Porém nos grupos controle, PRL 25 e PRL 250, a maioria dos quadrantes, apresentava apenas de 1 a 3 glomérulos alterados; enquanto que no grupo que recebeu apenas o metal e no grupo que recebeu o metal junto com a maior concentração de PRL, foram observados mais de 10 glomérulos hipertrofiados na maioria dos quadrantes analisados, chegando a 30 glomérulos alterados em um quadrante, no grupo de tratamento conjugado.

Nos machos, glomérulos hipertrofiados são raros no grupo controle, e apenas no grupo que recebeu só o metal é uma alteração de frequência alta (chegando a cerca de 27 glomérulos em um quadrante); sendo uma alteração de

frequência moderada nos grupos que receberam apenas PRL e o tratamento conjugado.

A degeneração hidrópica é uma alteração que não foi observada no grupo controle de ambos os gêneros. Tanto nos machos, como nas fêmeas, essa alteração foi mais frequente nos grupos que receberam apenas o metal do que nos grupos que receberam apenas PRL. Nos machos, essa foi uma alteração observada em menor frequência no grupo que recebeu MeHg junto com PRL na maior concentração do que no grupo que recebeu apenas o metal.

Uma outra alteração muito frequente, observada em todos os grupos de tratamento, com exceção do controle das fêmeas, é a degeneração hialina na parede dos vasos sanguíneos; os grupos que receberam MeHg, sozinho ou em conjunto com a PRL, apresentaram uma frequência alta dessa alteração. No grupo que recebeu apenas o metal, de ambos os gêneros, todos os quadrantes observados, apresentavam vasos com essa alteração. Enquanto que os grupos com tratamento conjugado, apesar de muito frequente, é uma alteração que não foi observada em 100% dos quadrantes.

Além da análise da frequência das alterações, também avaliamos o grau de dano tecidual (GDT). Para essa avaliação, os danos observados no tecido renal foram classificados de acordo com a reversibilidade em: reversíveis (fase I) ou de reversibilidade moderada (fase II) (ALNOAIMI *et al*, 2021) (Quadro 2).

Quadro 2: Classificação dos danos observados no tecido renal.

DANO NO TECIDO	CLASSIFICAÇÃO
Glomérulos hipertrofiados	FASE I
Túbulos edemaciados	FASE I
Descamação nos túbulos	FASE I
Degeneração hidrópica	FASE II
Degeneração hialina de vasos	FASE II

Todos os grupos de tratamento, em ambos os gêneros, inclusive os grupos que receberam apenas PRL, apresentam um GDT significativamente maior ($p < 0,01$) que o observado no grupo CN. Apesar de se observar uma redução no índice de dano tecidual nos grupos com tratamento conjugado quando comparado

ao grupo que recebeu apenas MeHg, essa redução não é estatisticamente significativa; apenas no grupo de fêmeas que recebeu a maior concentração de PRL junto com MeHg, o índice de dano se aproxima do observado no grupo que recebeu apenas PRL na respectiva concentração, indicando uma possível proteção (Figura 18).

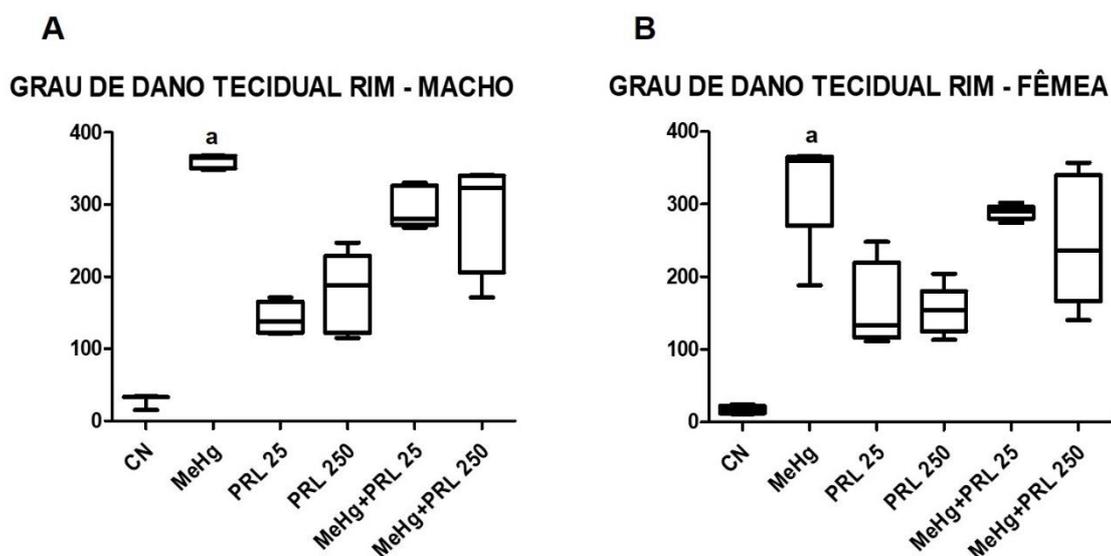


Figura 18: Grau de dano tecidual (GDT) no rim em cada grupo de tratamento, machos (imagem A) e fêmeas (imagem B). **a:** diferença significativa entre o grupo MeHg e os grupos CN, PRL 25 e PRL 250. **a** ($p < 0,01$), ANOVA com pós teste Tukey.

De maneira geral, os cortes histológicos do fígado dos camundongos apresentavam hepatócitos com limites bem definidos, citoplasma granuloso, núcleo em forma esférica e centralizado; sinusoides íntegros; boa visualização de veia centrolobular e espaço porta. Foram identificadas alterações nos indivíduos de todos os grupos de tratamento, de ambos os gêneros, inclusive nos grupos controles. Alterações como vasos sanguíneos congestionados, áreas com hepatócitos hipertrofiados e células com núcleos picnóticos, foram observadas em cortes do fígado de indivíduos de todos os grupos, em maior ou menor frequência (Tabela 3 e Figura 19).

Nessas condições de estudo, observamos que tanto MeHg quanto PRL causam alterações no tecido hepático, mas algumas dessas alterações, como

hepatócitos hipertrofiados, presença de infiltrado inflamatório e alterações no ou ao redor do espaço porta, tendem a ser menos frequentes quando os animais são tratados com o metal e o hormônio conjuntamente. O aumento no número de vasos ao redor do espaço porta e uma deformação da tríade são alterações raras, observadas apenas nos grupos que receberam individualmente MeHg ou PRL na menor concentração. As fêmeas que receberam apenas o MeHg apresentaram cortes com áreas com células anucleadas, caracterizando cariólise avançada e essa alteração não foi observada em nenhum outro grupo de fêmeas.

Tabela 3: Frequências das alterações no tecido hepático, em cada grupo de tratamento, fêmeas e machos.

	FÊMEAS						MACHOS					
	CN	MeHg	PRL 25	PRL 250	MeHg/ PRL 25	MeHg/ PRL 250	CN	MeHg	PRL 25	PRL 250	MeHg/ PRL 25	MeHg/ PRL 250
Hepatócitos hipertrofiado	0+	0+	+	0+	0+	0+	0+	+	+	++	0+	0+
Infiltrado inflamatório	0	+	++	++	0+	0+	0+	+	+	+	0+	0+
Picnose	+++	+	+++	+	0+	++	+++	++	+++	+	+	+
Tumefação hidrópica	0	0+	++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	++
Cariólise	0	0+	0	0	0	0	0+	0+	0+	0	0	0
Fibrose ao redor dos vasos da tríade	0	0	0	0+	0	0	0	0	0	0	0	0
Vacuolização próximo a vasos da tríade	0	0	0	0+	0+	0	0	0	0	0	0+	0
Espessamento dos vasos da tríade	0	++	++	++	0+	+	0	++	+	+	0+	+
Aumento do nº de vasos ao redor da tríade	0	0+	0+	0	0	0	0	0+	0+	0	0	0
Tríade deformada	0	0+	0+	0	0	0	0	0+	0+	0	0	0

(0) não detectada, (0+) raramente detectada, (+) com frequência baixa, (++) com frequência moderada e (+++) com frequência alta.

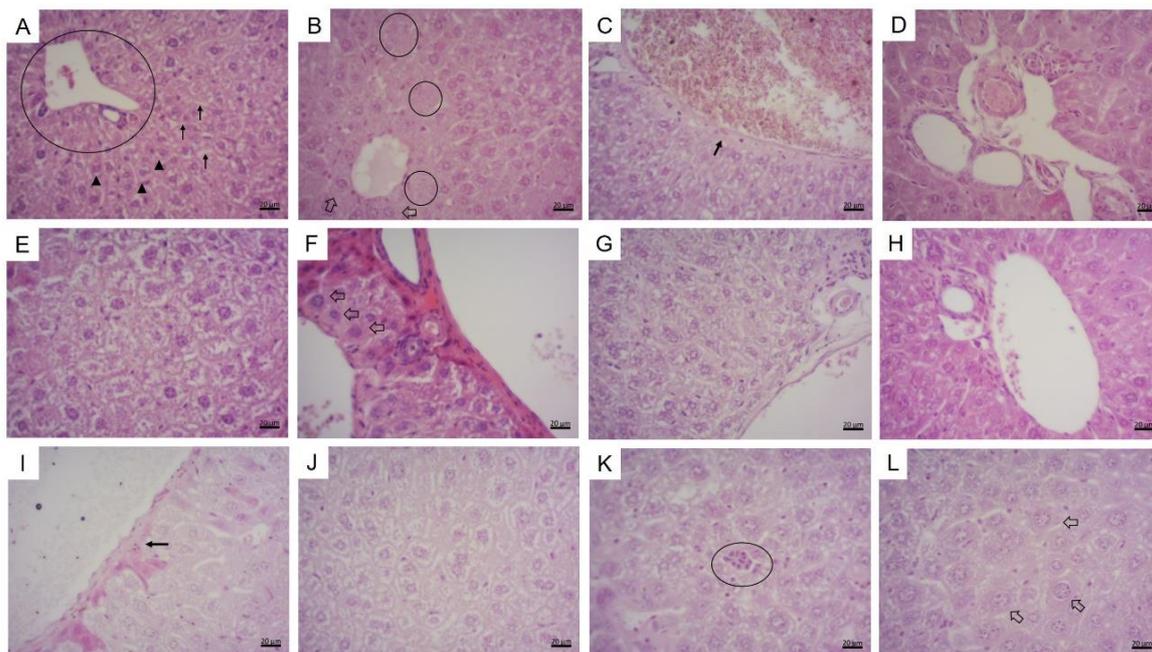


Figura 19: Análise histopatológica do fígado. **A** fêmea do grupo controle negativo - tecido hepático normal, espaço porta (círculo), sinusoides (setas) e hepatócitos (cabeças de seta). **B** macho do grupo MeHg - hepatócitos edemaciados (setas) e áreas com células em cariólise (círculos). **C** macho do grupo MeHg - espessamento da parede da veia da tríade (seta). **D** macho do grupo MeHg - tríade com aumento no número de estruturas. **E** macho do grupo PRL25 - área com tumefação hidrópica. **F** fêmea do grupo PRL25 - hepatócitos edemaciados (setas). **G** fêmea do grupo PRL250 - área com tumefação hidrópica. **H** macho do grupo PRL250 - tecido hepático normal. **I** macho do grupo MeHg+PRL25 - espessamento da parede da veia da tríade (seta). **J** fêmea do grupo MeHg+PRL25 - área com tumefação hidrópica. **K** macho do grupo MeHg+PRL250 - infiltrado inflamatório. **L** fêmea do grupo MeHg+PRL250 - hepatócitos edemaciados (setas).

O grau de dano tecidual no tecido hepático também foi calculado a partir da classificação dos danos observados (Quadro 3) e mostrou um aumento significativo nos grupos que receberam apenas MeHg e apenas PRL 25, em ambos os gêneros, quando comparados a todos os outros grupos de tratamento. Não houve diferença estatística no grau de dano tecidual entre o grupo CN e os grupos que receberam tratamento conjugado (Figura 20). Pode-se observar que, no tratamento conjugado, as alterações teciduais induzidas tanto pelo metal, quanto pelo hormônio, tendem a reduzir.

Quadro 3: Classificação dos danos observados no tecido renal.

DANO NO TECIDO	CLASSIFICAÇÃO
Hepatócitos hipertrofiado	FASE I
Infiltrado inflamatório	FASE I
Picnose	FASE II
Tumefação hidrópica	FASE II
Cariólise	FASE II
Fibrose ao redor dos vasos da tríade	FASE I
Vacuolização próximo a vasos da tríade	FASE I
Espessamento dos vasos da tríade	FASE I
Aumento do nº de vasos ao redor da tríade	FASE I
Tríade deformada	FASE I

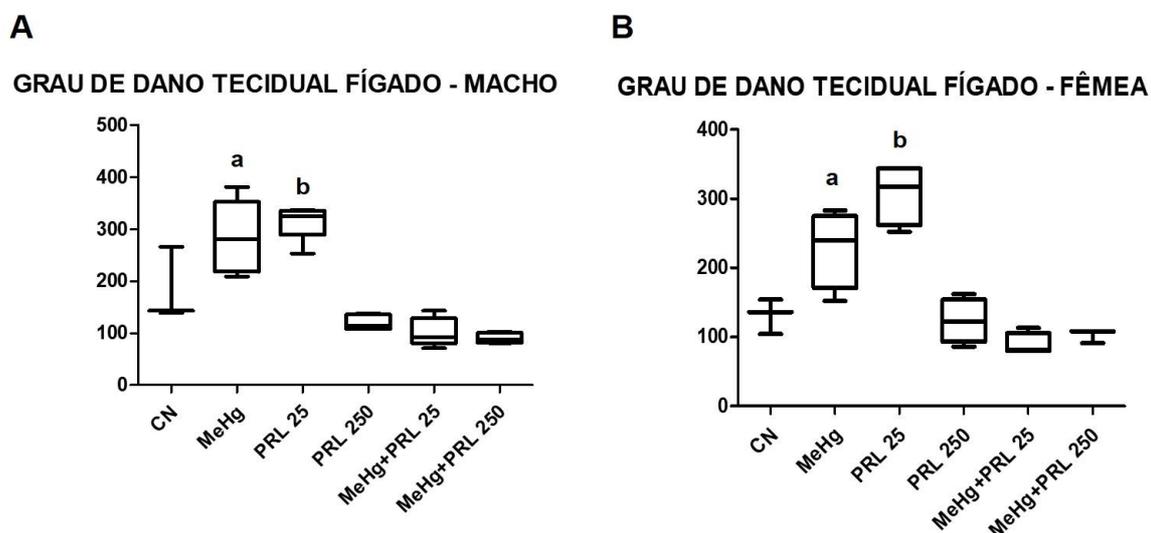


Figura 20: Grau de dano tecidual (GDT) no fígado em cada grupo de tratamento. Machos (imagem A) e fêmeas (imagem B). **a** diferença significativa entre o grupo MeHg e todos os outros grupos de tratamento (com exceção do grupo PRL25); **b** diferença significativa entre o grupo PRL25 e todos os outros grupos de tratamento (com exceção do grupo MeHg). **a** e **b** ($p < 0,01$), ANOVA com pós teste Tukey.

As análises das amostras de tecido hepático e renal demonstraram que tanto MeHg quanto PRL nas duas concentrações causam diferentes danos nesses tecidos; porém alguns desses danos são mais frequentes e intensos nos animais que receberam MeHg. Garcia *et al* (2016) utilizaram MeHg em um protocolo experimental de toxicidade em ratos Wistar juvenis e observaram entre outras alterações, danos importantes no tecido renal como glomérulos hiper celularizados, infiltrado inflamatório e degeneração de túbulos renais. A maior frequência desses

danos foi observada imediatamente após o período de tratamento (30 dias); nos animais que foram avaliados após 62 dias do término do tratamento, a degeneração observada foi revertida e algumas outras alterações foram observadas, mas em menor frequência. Os autores atribuem isso ao fato de que apenas cerca de 10% do MeHg é excretado pelo trato urinário.

Os efeitos na função renal causados pelo MeHg foram avaliados, *in vitro* e *in vivo*, por Khan et al (2017); eles observaram danos teciduais que sugeriram a toxicidade renal desse metal; lesões nas células epiteliais tubulares e glomerulares, redução e distorção dos glomérulos e perda da estrutura tubular (como da borda em escova dos túbulos proximais), foram observados. Essa toxicidade foi confirmada com a avaliação da expressão de marcadores moleculares de nefrotoxicidade precoce, identificando o aumento na expressão de proteínas como metaloproteínas que podem afetar a estrutura do citoesqueleto e dos componentes de adesão, caracterizando os danos tubulares observados.

Oliveira *et al* (2016) avaliaram os efeitos agudos do tratamento com HgCl₂ em ratas Wistar virgens, grávidas e lactantes. As análises histológicas desse estudo revelaram efeitos nos tecidos renais e hepáticos, principalmente das ratas virgens; nas amostras de rins observaram uma redução significativa do diâmetro glomerular, além de uma dilatação da cápsula de Bowman, degeneração tubular e inflamação. Degeneração dos hepatócitos, alteração na veia central e infiltrado inflamatório foram os achados nas amostras de tecido hepático. Para os autores, a entrada de HgCl₂ associado a cisteína nas células tubulares renais e nos hepatócitos levou às alterações observadas; a não observação de lesões significativas nos rins e fígado das ratas grávidas ou lactantes pode estar relacionada à maior facilidade de excreção do metal devido ao metabolismo mais acelerado nesses animais.

Cloreto de mercúrio também foi usado por Hazelhoff *et al* (2018) para avaliar os danos no fígado de ratos Wistar e observaram desorganização do parênquima hepático, além de áreas de fibrose nas amostras analisadas. As observações foram bem mais frequentes nas fêmeas. Os autores associaram essa maior frequência ao maior acúmulo do metal nas células do fígado das fêmeas, quando comparado com as amostras de fígado dos machos.

O tecido hepático também foi parâmetro usado por Yahyazedeh *et al* (2017) para caracterizar a ação tóxica do vapor de mercúrio em ratas Wistar; achados

histológicos como aumento de vasos sanguíneos, sinusóides dilatados, tecido conjuntivo perivascular aumentado e extensa degeneração de hepatócitos, foram observados após 45 dias de tratamento.

Em humanos, efeitos renais foram indicados por Albers *et al* (2020) na apresentação de um caso raro da Doença de Minamata. Um homem de 40 anos foi atacado com uma injeção contendo mercúrio orgânico. Após 10 meses do ataque, o paciente morreu e a autópsia revelou, além de danos no tecido nervoso, um acentuado edema nos rins, caracterizando danos renais.

Em nossos resultados, alterações semelhantes e distintas às dos estudos citados foram observadas nas amostras de rim e fígado dos animais. Alterações distintas nos glomérulos foram observadas mesmo quando foi utilizado o mesmo tipo de metal (MeHg); Garcia *et al* (2016), por exemplo, observaram hiperplasticidade, enquanto Khan *et al* (2017) observaram redução nos glomérulos; nossos resultados demonstram uma hipertrofia glomerular. Essas divergências podem estar relacionadas à concentração e ao tempo de tratamento, que foram distintos, pois utilizamos uma concentração muito menor e os animais foram tratados por um maior período.

A PRL também provocou danos nos tecidos analisados. Poucos estudos avaliam os efeitos deste hormônio na histologia de rim e fígado. Muitos estudos consideram parâmetros bioquímicos destes órgãos para avaliar o efeito da utilização do hormônio e alguns desses estudos são citados na discussão dos nossos resultados das análises bioquímicas. Szulc-Musioł *et al* (2018) avaliaram os efeitos da PRL acrescentada em solução de preservação de fígado de coelhos e, além dos parâmetros bioquímicos, também analisaram por microscopia de luz e eletrônica amostras do tecido hepático. Danos como hepatócitos vacuolizados, mitocôndrias irregulares e sinusóides com danos nas membranas celulares foram observados, entretanto em baixa frequência quando a PRL foi utilizada, caracterizando uma proteção e não uma indução de danos, como observamos em nossos experimentos.

4.5 ANÁLISE DOS PARÂMETROS RENAIS E HEPÁTICOS

O sangue coletado dos animais foi analisado para caracterizar o funcionamento dos rins, a partir da dosagem de ureia e creatinina, e do fígado, a partir da dosagem de AST e ALT.

4.5.1 Ureia

Foi observado um aumento significativo no nível de ureia no sangue dos camundongos que receberam apenas metilmercúrio quando comparados com os do grupo controle, em ambos os sexos; também observou-se uma diferença estatística deste grupo (MeHg) com todos os outros grupos de tratamento. Não houve diferença estatística entre os animais do grupo controle e os que receberam apenas PRL, nas duas concentrações. Os animais que receberam o tratamento conjugado apresentaram um nível sérico de ureia estatisticamente maior que os animais do grupo controle, porém esse nível é significativamente menor que o dos animais que receberam apenas o mercúrio (Figura 21).

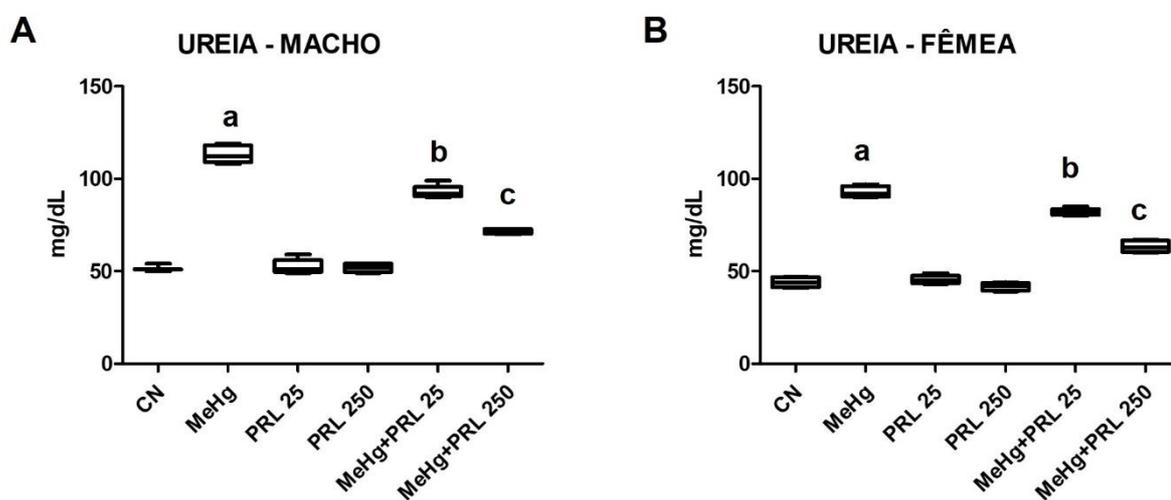


Figura 21: Nível sérico de Ureia em cada grupo de tratamento, machos (imagem A) e fêmeas (imagem B). **a:** diferença estatisticamente significativa do grupo MeHg, comparado com todos os outros tratamentos; **b:** diferença estatisticamente significativa do grupo MeHg + PRL 25, comparado com todos os outros tratamentos; **c:** diferença estatisticamente significativa do grupo MeHg + PRL 250, comparado com todos os outros tratamentos. **a, b e c** ($p < 0,01$), ANOVA com pós teste Tukey.

4.5.2 Creatinina

O nível sérico de creatinina nos animais de ambos os sexos que receberam MeHg foi estatisticamente maior ($p < 0,01$) que em todos os outros grupos de tratamento. Não houve diferença significativa entre os grupos controles e os que receberam apenas PRL nas duas concentrações. Nos animais machos que receberam o tratamento conjugado, o nível de creatinina no sangue foi maior que no grupo controle, mas apenas no grupo que recebeu a menor concentração de PRL é que essa diferença foi estatisticamente significativa; já nas fêmeas essa diferença foi estatisticamente significativa nos dois grupos. Apesar de ser maior que nos grupos controles, o nível sérico de creatinina nos animais que receberam os dois tratamentos (nas duas concentrações e em ambos os sexos), foi estatisticamente menor ($p < 0,01$) que nos animais que receberam apenas MeHg (Figura 22).

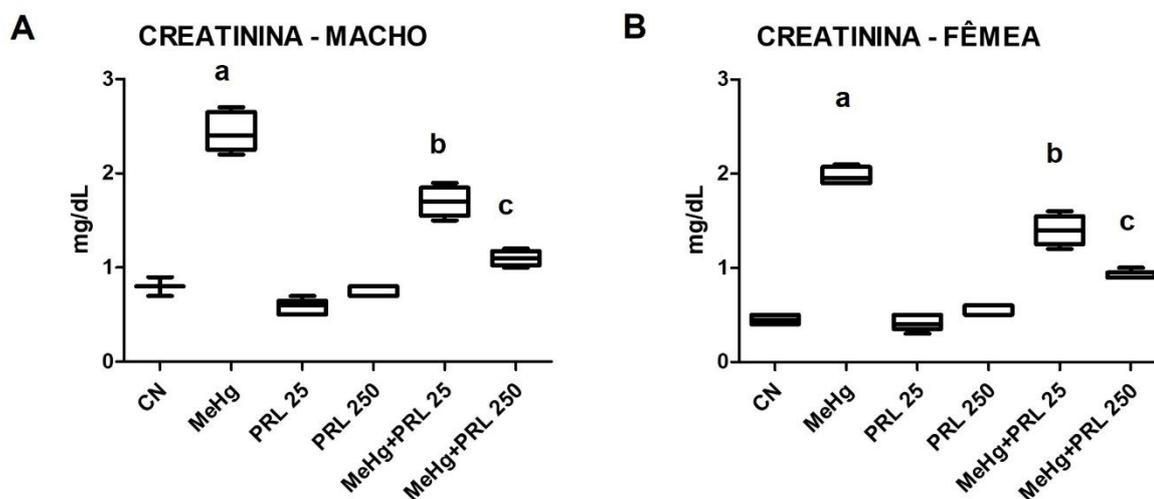


Figura 22: Nível sérico de Creatinina em cada grupo de tratamento, machos (imagem A) e fêmeas (imagem B). **a:** diferença estatisticamente significativa do grupo MeHg, comparado com todos os outros grupos de tratamentos; **b:** diferença estatisticamente significativa do grupo MeHg + PRL 25, comparado com todos os outros grupos de tratamentos; **c:** diferença estatisticamente significativa do grupo MeHg + PRL 250, comparado com os outros grupos de tratamentos (com exceção nos machos, com o grupo controle, com o qual não houve diferença estatística). **a, b e c** ($p < 0,01$), ANOVA com pós teste Tukey.

4.5.3 Aminotransferase de Aspartato (AST)

Nos animais de ambos os sexos que receberam MeHg foi observado um aumento estatisticamente significativo de AST sérico quando comparado com todos os outros grupos de tratamento. Não houve diferença significativa entre os grupos controles e os que receberam apenas PRL nas duas concentrações. Nos animais machos e fêmeas que receberam o tratamento conjugado, o nível de AST no sangue foi significativamente maior que no grupo controle. Apesar de ser maior que nos grupos controles, o nível sérico de AST nos animais que receberam os dois tratamentos (nas duas concentrações e em ambos os sexos), foi estatisticamente menor que nos animais que receberam apenas MeHg (Figura 23).

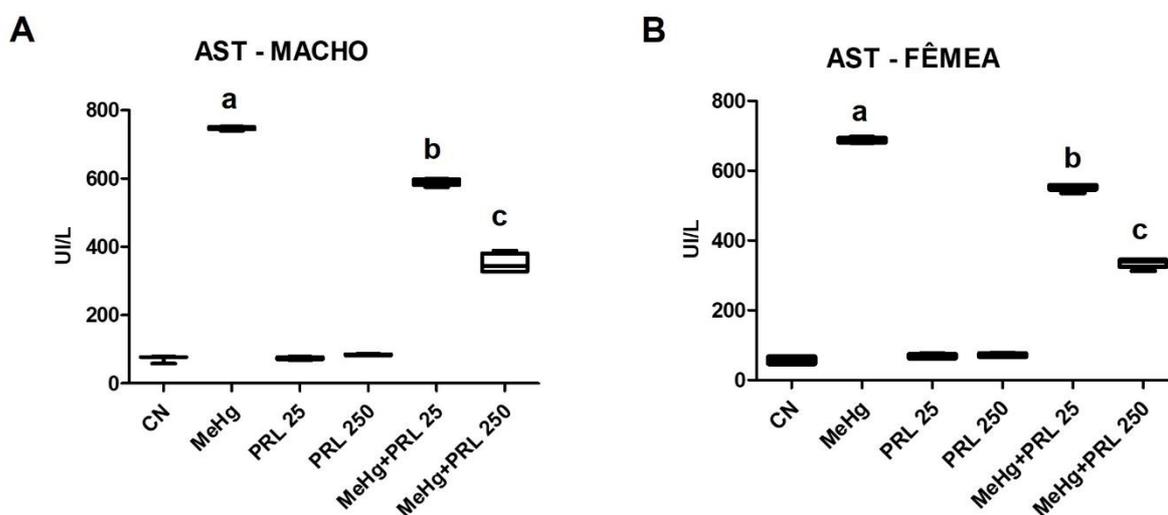


Figura 23: Nível sérico de AST em cada grupo de tratamento, machos (imagem A) e fêmeas (imagem B). **a:** diferença estatisticamente significativa do grupo MeHg, comparado com todos os outros grupos de tratamentos; **b:** diferença estatisticamente significativa do grupo MeHg + PRL 25, comparado com todos os outros grupos de tratamentos; **c:** diferença estatisticamente significativa do grupo MeHg + PRL 250, comparado com os outros grupos de tratamentos. **a, b e c** ($p < 0,01$), ANOVA com pós teste Tukey.

4.5.4 Aminotransferase de Alanina (ALT)

O nível sérico de ALT nos animais de ambos os sexos que receberam MeHg foi significativamente maior quando comparado com todos os outros grupos de tratamento. Não houve diferença significativa entre os grupos controles e os que receberam apenas PRL nas duas concentrações. Nos animais que receberam o

tratamento conjugado, o nível de ALT no sangue foi significativamente maior que no grupo controle, em ambos os sexos. Apesar de ser maior que nos grupos controles, o nível sérico de ALT nos animais que receberam os dois tratamentos (nas duas concentrações e em ambos os sexos), foi estatisticamente menor que nos animais que receberam apenas MeHg (Figura 24).

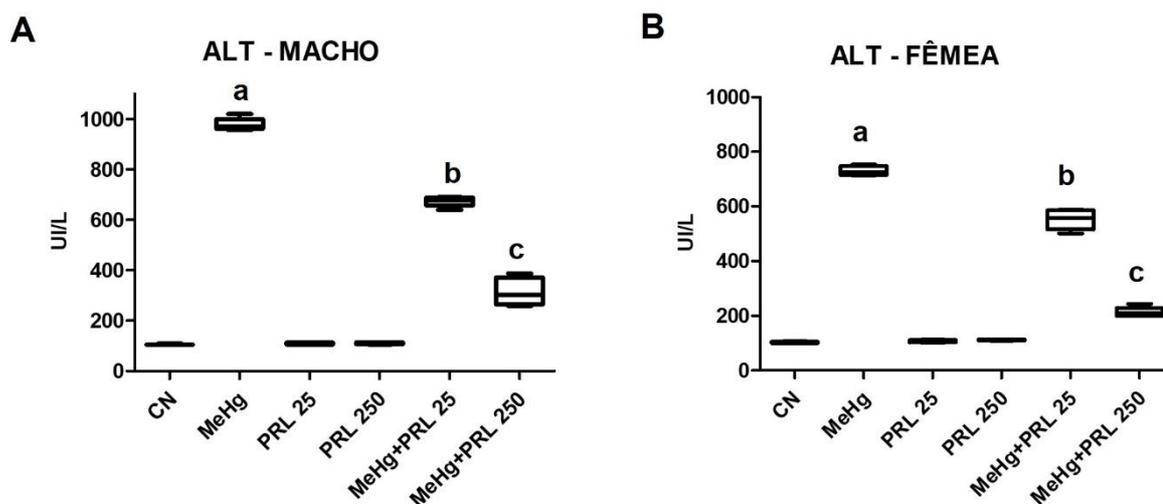


Figura 24: Nível sérico de ALT em cada grupo de tratamento, machos (imagem A) e fêmeas (imagem B). **a:** diferença estatisticamente significativa do grupo MeHg, comparado com todos os outros grupos de tratamentos; **b:** diferença estatisticamente significativa do grupo MeHg + PRL 25, comparado com todos os outros grupos de tratamentos; **c:** diferença estatisticamente significativa do grupo MeHg + PRL 250, comparado com os outros grupos de tratamentos. **a, b e c** ($p < 0,01$), ANOVA com pós teste Tukey.

As análises bioquímicas foram realizadas no sangue coletado dos camundongos para caracterizar o funcionamento dos rins e do fígado de cada animal após todo o período de tratamento. Marcadores renais e hepáticos também foram avaliados por Peixoto e Pereira (2007) em ratos Wistar recém-nascidos, expostos ao mercúrio inorgânico ($HgCl_2$) e o metal também alterou o nível desses marcadores; assim como observado em nossos resultados, houve um aumento nos níveis séricos de ureia e creatinina no sangue dos animais tratados com mercúrio. Entretanto, os níveis de ALT se mostraram reduzidos no sangue dos animais tratados com o metal.

Oliveira (2016) também utilizou o tratamento com mercúrio inorgânico em ratas Wistar em diferentes estágios reprodutivo (virgens, grávidas e lactantes),

observando resultados semelhantes aos de Peixoto e Pereira (2016), aumento dos níveis de ureia e creatina e de AST e uma redução nos níveis de ALT. Silva (2010) e Paula *et al* (2016) também observaram alterações no metabolismo hepático de ratos Wistar provocadas pelo mercúrio; entretanto, o que eles constataram foi um aumento significativo de ALT no fígado e no sangue, respectivamente.

Khan *et al* (2017) avaliaram os efeitos de MeHg na função renal. Além do dano tecidual e de parâmetros moleculares relacionados a esses danos, eles observaram um aumento significativo no nível sérico de creatina nos animais tratados com o metal.

Esses estudos ratificam nossos resultados, que demonstram alterações nos níveis de marcadores renais e hepáticos, em resposta à exposição ao mercúrio; todos os parâmetros bioquímicos analisados se mostraram aumentados nos animais que receberam MeHg. A redução de ALT observada por Peixoto e Pereira (2007) e Oliveira (2016), entretanto, difere do que observamos; os autores sugerem que essa redução se relaciona à interação do mercúrio com o grupo -SH da enzima ALT. Essa diferença de resultados observada pode estar relacionada ao tipo de mercúrio utilizado, além do tempo de exposição, já que a exposição em ambos foi aguda, enquanto em nosso experimento foi subcrônica e em uma concentração bem menor.

Esses marcadores também são utilizados para avaliar os efeitos metabólicos do mercúrio em primatas; Magno (2009) quantificou a atividade de ALT, AST, ureia e creatinina em macacos machos *Cebus apella* expostos ao MeHg, mas não observou diferenças significativas na dosagem de nenhum desses marcadores nos animais expostos, quando comparados aos animais controle. O autor sugere que alterações significativas poderiam ser observadas em um tempo maior de exposição ou com a utilização de doses mais elevadas. Em nossos resultados observamos alterações significativas nesses parâmetros, mesmo utilizando uma dose 50 vezes menor e em menos da metade do tempo de exposição.

Todos esses resultados, incluindo os do presente estudo, demonstram que os marcadores renais e hepáticos são parâmetros adequados para a avaliação dos efeitos tóxicos do mercúrio, mostrando-se alterados nos organismos expostos, como observado em nossos resultados. Além disso, o aumento significativo dos níveis desses marcadores observados em nossos animais expostos ao MeHg foi

diminuído nos animais que receberam o tratamento conjugado com PRL, de maneira dose dependente.

Alguns estudos demonstram uma redução das transaminases relacionada à PRL; Dolinska *et al.* (2011) e Szulc-Musiół *et al.* (2018) avaliaram os efeitos da PRL acrescentada em solução de preservação de fígado (fluidos utilizados para a lavagem e armazenamento do órgão retirado de doadores), utilizando fígado de porco e coelho, respectivamente. Segundo Dolinska *et al.* (2011), na isquemia hepática e hipóxia os hepatócitos danificados têm sua permeabilidade comprometida, aumentando os níveis de marcadores como ALT e AST liberados no sangue ou na solução de preservação. Acrescentando o hormônio PRL na solução de preservação, os autores observaram uma redução significativa das transaminases nesses fluidos, demonstrando uma redução na liberação dessas enzimas pelos órgãos analisados, o que caracteriza uma ação da PRL no atraso do processo degenerativo dos hepatócitos.

Ryszka *et al.* (2016), utilizaram rins suínos para avaliar os efeitos da PRL acrescentada em solução de preservação, e assim como observado no fígado, a PRL induziu uma redução significativa na liberação de transaminases (ALT e AST) após a reperfusão desses órgãos, caracterizando uma influência estabilizadora deste hormônio às membranas celulares, diminuindo efeitos como o inchaço dos órgãos a serem transplantados, após o período de preservação nesses fluidos acrescentados com PRL.

De acordo com Ryszka *et al.* (2016), a deficiência de ATP provocada pela isquemia sofrida por esses órgãos a serem doados, compromete a bomba de sódio e potássio, promovendo um acúmulo de Na⁺ no interior da célula e uma liberação de K⁺ para fora da mesma, mudando o potencial de membrana e permitindo a entrada de mais íons Na⁺ e conseqüente aumento do fluxo de água para o interior das células. Olazabal *et al.* (2009) explicam que a PRL reduz esses danos provocados pela hipóxia por, através de seu metabolismo, aumentar monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) e reduzir monofosfato cíclico adenosina (AMPc), e dessa maneira aumenta o nível de K⁺ intracelular, diminuindo o nível de Na⁺, restabelecendo o controle osmótico da célula.

Ainda considerando o efeito da PRL nos níveis dos parâmetros hepáticos, Yang *et al.* (2020), avaliaram a relação deste hormônio com os parâmetros

metabólicos em mulheres com a síndrome do ovário policístico. Nessas mulheres, o nível de PRL se mostra reduzido, e o que foi observado pelos autores é que em níveis baixos de PRL pode ocorrer danos nas células do fígado, caracterizados por um aumento nos níveis de ALT e AST.

Esses estudos ratificam o que observamos em nossos resultados, uma redução dos parâmetros bioquímicos (ALT, AST, ureia e creatinina) quando os animais foram expostos a um tratamento conjugado, e quanto maior a dose de PRL, maior a redução do nível desses parâmetros, retornando a níveis semelhantes ao nível do grupo controle, caracterizando um efeito protetor desse hormônio contra a toxicidade do MeHg no fígado e rins dos camundongos expostos.

4.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO ENCÉFALO

No encéfalo foi realizada uma análise histológica qualitativa, observando as características de cada região; foram analisados cortes transversais do encéfalo com amostras do cerebelo e do córtex cerebral. No cerebelo, de maneira geral, o córtex apresentou a camada granulosa, células de Purkinje e camada molecular. As células de Purkinje apresentavam o corpo celular visível e núcleo evidente; no grupo controle de ambos os gêneros, essas células, assim como as células das camadas granulosa e molecular do cerebelo, não apresentaram alterações aparentes. No córtex dos hemisférios cerebrais dos animais do grupo controle (machos e fêmeas) encontram-se neurônios piramidais, com corpo celular evidente e sem alteração nuclear, além de capilares sanguíneos bem definidos. A tabela e figura abaixo apresentam as principais alterações observadas nas amostras de encéfalo (Tabela 4 e Figura 25).

Tabela 4: Alterações observadas no encéfalo, em cada grupo de tratamento, fêmeas e machos.

		FÊMEAS						MACHOS					
		CN	MeHg	PRL 25	PRL 250	MeHg/ PRL 25	MeHg/ PRL 250	CN	MeHg	PRL 25	PRL 250	MeHg/ PRL 25	MeHg/ PRL 250
CEREBELO	Células de Purkinje com núcleos condensados		X		X	X	X		X			X	X
	Células de Purkinje hipertrofiadas						X						X
	Picnose na camada granulosa		X			X			X			X	X
	Cariólise na camada granulosa		X										
	Maior número de células da neuroglia na camada molecular						X						X
CÓRTEX CEREBRAL	Neurônios piramidais em apoptose		X		X		X		X		X	X	X
	Fibras nervosas mais espessas (depósito hialino)			X	X	X	X			X	X	X	
	Proliferação de capilares sanguíneos				X	X				X		X	X
	Infiltrado inflamatório									X			

X indica a presença da alteração.

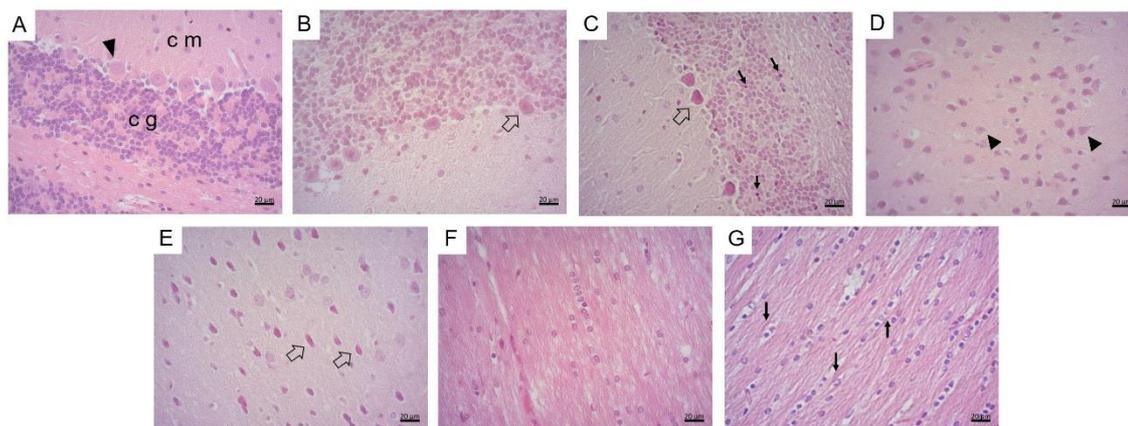


Figura 25: Análise histopatológica do encéfalo. **A** fêmea do grupo controle negativo – córtex cerebelar sem alterações aparentes, células de Purkinje (cabeças de seta), camada granulosa (c g) e camada molecular (c m). **B** macho do grupo MeHg - célula de Purkinje com núcleo condensado (seta). **C** fêmea do grupo MeHg - células com núcleo em picnose na camada granulosa (seta). **D** fêmea do grupo controle negativo - neurônios piramidais no córtex cerebral (cabeças de seta). **E** macho do grupo MeHg - neurônios piramidais com núcleos hiperconcorados (setas). **F** macho do grupo MeHg – fibras nervosas. **G** macho do grupo PRL25 – fibras nervosas mais espessas (setas).

As alterações induzidas pelo mercúrio são observadas principalmente no cerebelo, onde foi identificada a presença de células de Purkinje com núcleos condensados, possivelmente células apoptóticas; além de células com núcleo em picnose também na camada granulosa; nas fêmeas expostas ao metal, também foi observado núcleos em cariólise na camada granulosa do cerebelo. No córtex cerebral, os animais do grupo MeHg apresentaram neurônios piramidais com núcleos hiperconcorados; esses achados demonstram que o principal efeito do metal no encéfalo desses animais está relacionado à indução de morte celular.

Nos animais que receberam apenas PRL, as alterações cerebelares quase não foram observadas, apenas as fêmeas que receberam a maior concentração do hormônio apresentaram algumas células de Purkinje com núcleo mais condensado; já no córtex cerebral, poucos neurônios piramidais com o núcleo mais condensado foram observados em ambos os gêneros, desse mesmo grupo. Entretanto, o tratamento com o hormônio pode ter induzido alguns outros achados; nas fêmeas que receberam a maior concentração da PRL foi observado o aumento em espessura (indicando um depósito hialino) e em número de fibras na região do córtex cerebral; também verificou-se um aumento na proliferação de capilares sanguíneos. Esses achados foram os mesmos nos machos que receberam a PRL

em menor concentração; também foi observada a presença de infiltrado inflamatório apenas nesse grupo de machos.

No tratamento conjugado, utilizando o metal e o hormônio, observamos uma redução dessas alterações que, mesmo presentes em alguns casos, foram observadas em menor proporção nos animais de cada grupo. Apenas o grupo que recebeu o metal junto com o hormônio na maior concentração apresentou algumas células de Purkinje hipertrofiadas e um maior número de células da neuroglia na camada molecular do cerebelo.

A ação do mercúrio no sistema nervoso central já é bem documentada. Muitos estudos avaliam essa ação a partir de análises comportamentais (FRANCO, 2009; BELÉM-FILHO, 2015), inclusive em humanos (GRANDJEAN *et al.*, 1997; BRUMATTI *et al.*, 2021). Não realizamos análises comportamentais, mas nossos resultados sugerem alterações no tecido encefálico dos animais expostos, Grotto *et al* (2011a e 2011b) também identificaram alterações histológicas, caracterizadas por um aumento de infiltrado inflamatório no encéfalo de ratos Wistar expostos ao MeHg.

No presente estudo, os achados mais significativos caracterizam sinais de morte celular, principalmente no cerebelo dos camundongos expostos; de maneira semelhante, Tu *et al* (2021) observaram evidentes alterações e sinais de morte nas células de Purkinje do cerebelo de ratos expostos ao MeHg durante o desenvolvimento embrionário e a lactação; estas células foram observadas em um arranjo irregular, com espaço pericelular aumentado, núcleos condensados e, em algumas células, ausentes. Segundo os autores, essas alterações podem estar relacionadas ao estresse oxidativo e sobrecarga de Ca^{2+} induzidos pelo mercúrio, refletindo em deficiência cognitiva e da função cerebelar.

O grupo MeHg também apresentou sinais de morte nas células da camada granular do cerebelo, uma ação neurotóxica já caracterizada. Alguns estudos relacionam essa ação a alterações da homeostase de Ca^{2+} , com um intenso influxo desse íon (LIMKE *et al*, 2004; YUAN & ARTCHISOR, 2007).

A ação do MeHg em células do tecido nervoso também já foi avaliada *in vitro*. Santos (2008) observou em células gliais do córtex cerebral de ratos neonatos uma redução na viabilidade celular e o aumento de alterações morfológicas como núcleos em picnose. Assim como no presente estudo, o efeito protetor da PRL foi

avaliado e a autora observou a redução dos efeitos induzidos pelo metal quando as células eram tratadas com o hormônio, aumentando a viabilidade celular, além de aumentar a proliferação das células, indicando a PRL como um agente citoprotetor em cultura primária de glia.

A ação neuroprotetora da PRL já é bem caracterizada; *in vitro*, muitos estudos com cultura primária de neurônios hipocâmpais já foram desenvolvidos, sendo o efeito antiapoptótico a principal observação; a prevenção contra morte celular está relacionada à ação antioxidante deste hormônio e também à redução da sobrecarga de Ca^{2+} intracelular e do nível das caspases (VERGARA-CASTAÑEDA *ET AL.*, 2016; RIVERO-SEGURA *ET AL.*, 2017; RIVERO-SEGURA *ET AL.*, 2019).

A avaliação *in vivo* da ação da PRL no sistema nervoso foi realizada por Morales *et al.* (2014), observando uma redução dos efeitos excitotóxicos do ácido caínico no hipocampo de ratas. Oláh (2018), também realizou estudos *in vivo*, utilizando ratas mães, e relacionou a PRL à ativação de neurônios em diversas áreas do encéfalo desses animais.

Assim como nos estudos citados, nossos resultados mostram indícios de uma ação neuroprotetora da PRL, quando observamos uma redução dos efeitos induzidos pelo MeHg, principalmente os sinais de morte celular. Entretanto os outros efeitos observados, que parecem ser induzidos pelo hormônio precisam ser melhor caracterizados. Estudos com colorações específicas, diferenciais ou até mesmo de imunohistoquímica podem ser importantes para que sejam melhor entendidos os efeitos observados.

4.7 MASSA CORPORAL

A administração de substâncias com efeitos tóxicos pode levar a diversas mudanças no corpo e comportamento do animal. Entre os roedores, pode-se destacar a apatia, má condição de pelagem e redução nos consumos de água e ração, levando a uma alteração da massa corporal. Esses efeitos podem ser utilizados como parâmetros em avaliações toxicológicas, podendo indicar o efeito até de modo precoce, que determinada substância pode promover (PIRES JR *et al.*, 2012). Nesse sentido, o acompanhamento da massa corporal dos

camundongos deste estudo foi realizado para, além de orientar o preparo das soluções de tratamento nas concentrações desejadas, avaliar se o metilmercúrio e/ou a prolactina seriam capazes de induzir variação na massa dos animais e se ocorreria alguma mudança quando em co-tratamento. Não foi observada uma grande variação na massa dos animais em nenhum dos grupos de tratamento.

Durante todo o período de tratamento, nos machos, os grupos que tiveram uma maior variação nas médias da massa de um dia para o outro foram o grupo que recebeu apenas o MeHg, observando-se uma redução de 3.06g do 25º para o 26º dia, e o grupo que recebeu o tratamento conjugado de MeHg com PRL na menor concentração, com uma redução de 3.6g do primeiro para o segundo dia de tratamento; nos outros grupos a variação de massa de um dia para o outro não chegou a 2g.

Entre as fêmeas, o grupo que recebeu apenas PRL na menor concentração e o grupo que recebeu o tratamento conjugado de MeHg com PRL na maior concentração, foram os que tiveram maior variação de um dia para o outro, uma redução de 2.18g (do primeiro para o segundo dia) e um aumento de 2.10g (do 17º para o 18º dia), respectivamente; os outros grupos não tiveram variação maior que 1,5g ao longo de todo o tratamento.

As tabelas a seguir (Tabela 5 e Tabela 6) mostram a média da massa do 1º e último dia de tratamento e do dia da eutanásia (46º dia), além das médias mínimas e máximas que cada grupo atingiu ao longo do tratamento e a diferença entre essas médias (amplitude).

Tabela 5: Média de massa, em gramas, de cada grupo nos dias de tratamento especificados, machos.

GRUPO	1º DIA	45º DIA	46º DIA	MÍNIMA - DIA	MÁXIMA - DIA	AMPLITUDE
CN	41.36	43.97	43.70	41.36 - 1º	44.73 - 38º	3.37
MeHg	44.56	45.90	45.56	41.12 - 25º	46.34 - 15º	5.22
PRL 25	46.26	47.38	47.26	44.44 - 17º	48.28 - 43º	3.84
PRL 250	43.40	46.68	46.64	43.40 - 1º	46.68 - 45º	3.28
MeHg + PRL 25	45.80	47.42	47.50	41.58 - 2º	47.50 - 46º	5.92
MeHg + PRL 250	42.28	47.35	47.85	40.70 - 4º	48.08 - 44º	7.38

Tabela 6: Média de massa, em gramas, de cada grupo nos dias de tratamento especificados, fêmeas.

GRUPO	1º DIA	45º DIA	46º DIA	MÍNIMA - DIA	MÁXIMA - DIA	AMPLITUDE
CN	34.03	36.50	36.68	31.85 - 12º	36.68 - 46º	4.83
MeHg	36.20	38.86	38.80	33.54 - 15º	39.00 - 44º	5.46
PRL 25	32.38	33.82	33.76	29.36 - 10º	34.66 - 42º	5.30
PRL 250	37.20	38.78	38.56	34.16 - 17º	39.36 - 41º	5.20
MeHg + PRL 25	35.10	37.06	36.26	32.12 - 18º	37.28 - 44º	5.16
MeHg + PRL 250	35.08	36.88	36.22	32.08 - 17º	37.52 - 43º	5.44

A variação de massa corporal é um parâmetro amplamente analisado e associado a efeitos tóxicos provocados por xenobióticos (PIRES JR *et al.*, 2012; LEMOS *et al.*, 2015), entretanto, em nossas condições experimentais, o MeHg não demonstrou variação significativa quando comparado ao controle durante todo o período de tratamento (45 dias). Outros trabalhos corroboram a ausência de variação significativa de massa corporal de animais tratados com MeHg, o que pode ser uma particularidade do próprio elemento traço ou das concentrações testadas (GROTTO *et al.*, 2011a; GHIZONI *et al.*, 2018)

Em tratamento individual e conjugado, a prolactina também não demonstrou nenhuma variação significativa, embora seja notório um aparente aumento, o que é coerente visto que alguns trabalhos relacionam a hiperprolactinemia (relacionada a prolactinoma) ao aumento da massa corporal (SILVA *et al.*, 2010; DORKNIC *et al.*, 2002; SHIBLI-RAHHAL e SCHLECHT, 2009).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas condições do presente estudo, mesmo utilizando uma baixa concentração de MeHg, foi possível identificar um aumento sérico e reproduzir alguns efeitos tóxicos induzidos pelo metal, uns de forma mais evidente que outros. Os parâmetros que melhor caracterizaram esses efeitos tóxicos foram a análise genotóxica, principalmente a partir do teste do micronúcleo e a análise bioquímica dos marcadores hepáticos e renais.

Os efeitos da PRL também foram evidenciados, inclusive sua ação protetora contra danos causados pela exposição ao MeHg. A ação protetora da PRL contra a ação genotóxica evidenciada no teste do MN, mostrou-se altamente significativa.

A PRL, também reduziu significativamente os danos hepáticos e renais. Mesmo que essa redução não tenha sido tão explícita na análise histopatológica de fígado e rim, ao considerarmos os marcadores bioquímicos, observamos, além do não comprometimento do funcionamento desses órgãos pela PRL, uma efetiva ação protetora desse hormônio contra o MeHg.

Os resultados da análise dos marcadores bioquímicos, da avaliação histopatológica em tecidos hepáticos e renais e do teste do MN compõem o artigo "*In vivo* evaluation of the potential protective effects of prolactin against damage caused by methylmercury", que já foi aceito para publicação na revista "Brazilian Journal of Medical and Biological Research" (Anexo 2).

A ação neuroprotetora desse hormônio foi observada em nossas análises. Apesar de pouco evidente, indícios de morte celular demonstram essa ação, porém, a mesma, precisa ser melhor caracterizada.

Deve-se considerar a necessidade de mais estudos, como análises moleculares avaliando, por exemplo, a expressão do receptor da PRL nos tecidos investigados e a expressão de transdutores das vias metabólicas ativadas por esse hormônio. Para melhor caracterizar o efeito da PRL, tanto a sua ação protetora aqui observada, como seus possíveis efeitos tóxicos devem ser alvos na continuidade da pesquisa, na perspectiva de propor, no futuro, a prolactina como alternativa para prevenir os danos causados pelo mercúrio, principalmente em populações mais expostas ao metal.

REFERÊNCIAS

- ACHATZ, R. W., VASCONCELLOS, A. C. S., PEREIRA, L., VIANA, P. V. S., BASTA, P. C. Impacts of the Goldmining and Chronic Methylmercury Exposure on the Good-Living and Mental Health of Munduruku Native Communities in the Amazon Basin. **Int J Environ Res Public Health**, v. 18, n. 17, 8994. 2021
- ADÁN, N. *et al.* Prolactin promotes cartilage survival and attenuates inflammation in inflammatory arthritis. **J Clin Invest**, v. 123, n. 9, p. 3902-3913. 2013.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-126. 1984
- ALBERS, A., GIES, U., RAATSCHEN, H.J., KLINTSCHAR, M. Another umbrella murder? – A rare case of Minamata disease. **Forensic Sci Med Pathol**, v. 16, p. 504-509. 2020.
- ALMEIDA, S. S. *et al.* Concentrações de Mercúrio Total em Peixes Consumidos pela População Amazônica. **III Encontro da ANPPAS**, Brasília-DF. 2006
- ALNOAIMI, F., DANE, H., ŞIŞMAN, T. Histopathologic and genotoxic effects of deltamethrin on marsh frog, *Pelophylax ridibundus* (Anura: Ranidae). **Environ Sci Pollut Res**, v. 28, p. 3331–3343. 2021.
- AMORIM, M. I. M., *et al.* Cytogenetic damage related to low levels of methylmercury contamination in the Brazilian Amazon. **An Acad Bras Cien**, v. 72, n. 4, 497-507. 2000
- ARNOLD, E., THÉBAULT, S., AROÑA, R. M., ESCALERA G. M., CLAPP, C. Prolactin mitigates deficiencies of retinal function associated with aging. **Neurobiol Aging**, v. 85, p. 38-48. 2020.
- BARCELOS, G. R. M., *et al.* Bixin and Norbixin Protect Against DNA-Damage and Alterations of Redox Status Induced by Methylmercury Exposure In Vivo. **Environ Mol Mutagen**, v. 53, p. 535-541. 2012.
- BARCELOS, G. R. M., *et al.* Protective properties of quercetin against DNA damage and oxidative stress induced by methylmercury in rats. **Arch Toxicol**, v. 85, n. 9, p. 1151-1157. 2011.
- BELÉM-FILHO, I. J. A. **Efeitos neurocomportamentais e no estresse oxidativo da exposição concomitante ao metilmercúrio e etanol em ratas da adolescência à fase adulta**. 117 p. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas), Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará. 2015.
- BISINOTI, M. C., JARDIM, W. F. O comportamento do metilmercúrio (metilHg) no ambiente. **Quim Nova**, v. 27, n. 4, p. 593-600. 2004.
- BOENING, D.W. Ecological effects, transport and fate of mercury: a general review. **Chemosphere**, v. 40, p. 1335-1351. 2000.

BOLE-FEYSOT, C., GOFFIN, V., EDERY, M., BINART, N., KELLY, P. A. Prolactin (PRL) and its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice. **Endocr Rev**, v. 19, n. 3, p. 225-268. 1998.

BHOWMIK, N., PRATA, M. Assessment of genotoxicity of inorganic mercury in rats in vivo using both chromosomal aberration and comet assays. **Toxicol Ind Health**, v. 31, n. 7, p. 588-594. 2015.

BROWN, R.K., KELLY, F.J. Peroxides and other products. In: PUNCHARD, N. A., KELLY, F. J. (Ed.). **Free Radicals: a practical approach**. New York, IRL Press, 1996.

BRUMATTI, L. V., *et al.* Impact of Methylmercury and Other Heavy Metals Exposure on Neurocognitive Function in Children Aged 7 Years: Study Protocol of the Follow-up. **J Epidemiol**, v. 31, n. 2, p. 157-163. 2021.

BURGOS, M. G. P. A.; BION, F. M.; CAMPOS, F. Lactação e álcool: Efeitos clínicos e nutricionais. **Arch Latinoam Nut**, v. 54, n. 1, 2004.

BJØRKLUND, G. ; DADAR, M.; MUTTER, J.; AASETH, J. The toxicology of mercury: Current research and emerging trends. **Environ Res**, v. 159, p. 545-554. 2017.

CAMARGO, A. C. L. **Papel da Prolactina durante desenvolvimento prostático em ratos: avaliação da morfogênese glandular, proliferação e diferenciação das células epiteliais**. 64 p. Dissertação (mestrado em Biologia Geral e Aplicada), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. 2017.

CAMPANELLI, L.C. **Zoneamento (Geo)Ambiental Analítico da Bacia Hidrográfica do Rio do Monjolinho – São Carlos (SP)**. 184 p. Dissertação (mestrado em Engenharia Urbana), Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos. 2012.

CLARKSON, T. W., MAGOS, L., MYERS, G. J. The toxicology of mercury—current exposures and clinical manifestations. **N Engl J Med**, v. 349, p. 1731-1737. 2003.

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de experimentação animal. **Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos – DBCA**. 2013.

CRESPO-LOPEZ, M. E., *et al.* Is Low Non-Lethal Concentration of Methylmercury Really Safe? A Report on Genotoxicity with Delayed Cell Proliferation. **PLoS One**, v. 11, n. 9, e0162822. 2016.

CRESPO-LOPEZ, M. E. *et al.* Mercury: What can we learn from the Amazon? **Environ Int**, v. 146, 106223. 2021.

COSTA-MALQUIAS, A., ALMEIDA, M. B., MONTEIRO, J. R. S., MACCHI, B. M., NASCIMENTO, J. L. M., CRESPO-LOPEZ, M. E. Morphine protects against methylmercury intoxication: a role for opioid receptors in oxidative stress? **PLoS One**, v. 9, n. 10, e110815. 2014.

ÇANAKÇI, E., ÖZMEN, S. A., ÇOLAK, M. F., KÜRSAS, H. Histopathologic comparison of dexmedetomidine's and thiopental's cerebral protective effects on focal cerebral ischemia in rats. **Braz J Anesthesiol**, v. 66, n. 6, p. 583-593. 2016

DI CARLO, R., MELI, R., GALDIERO, M., NUZZO, I., BENTIVOGLIO, C., CARRATELLI, C. R. Prolactin protection against lethal effects of *Salmonella typhimurium*. **Life Sci**, v. 53, n. 12, p. 981-989. 1993.

DRAGO, F., CONTINELLA, G., CONFORTO, G., SCAPAGNINI, U. Prolactin inhibits the development of stress-induced ulcers in the rat. **Life Sci**, v. 36, n. 2, p. 191-197. 1985.

DOLBEC, J., MERGLER, D., LARRIBE, F., ROULET, M., LEBEL, J., LUCOTTE, M. Sequential analysis of hair mercury levels in relation to fish diet of an Amazonian population, Brazil. **Sci Total Environ**, v. 271, n. 1-3, p. 87-97. 2001.

DOKNIC, M. *et al.* Dopaminergic tone and obesity: an insight from prolactinomas treated with bromocriptine. **Eur J Endocrinol**, v. 147, n. 1, p. 77-84. 2002.

DOLIŃSKA, B., *et al.* Prolactin (PRL) reduces the release of transaminases from the isolated pig liver. **Ann Transplant**, v. 16, n. 2, p. 98-102. 2011.

DZITKO, K., GATKOWSKA, J., PŁOCIŃSKI, P., DZIADEK, B., DŁUGOŃSKA, H. The effect of prolactin (PRL) on the growth of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vitro. **Parasitol Res**, v. 107, p. 199-204. 2010.

DZITKO, K., LAWNICKA, H., GATKOWSKA, J., DZIADEK, B., KOMOROWSKI, J., DŁUGOŃSKA, H. Inhibitory effect of prolactin on *Toxoplasma* proliferation in peripheral blood mononuclear cells from patients with hyperprolactinemia. **Parasite Immunol**, v. 34, n. 6, p. 302-311. 2012.

EBRAHIMPOUR, M., MUSHRIFAH, I. Heavy metal concentrations (Cd, Cu and Pb) in five aquatic plant species in Tasik Chini, Malaysia. **Environ Geol**, v. 54, p. 689-698. 2008

EHRENSTEIN, C. *et al.* Methyl mercury uptake and associations with the induction of chromosomal aberrations in Chinese hamster (CHO) cells. **Chem Biol Interact**, v. 141, p. 259-274. 2002.

FAIRBAIRN, D. W., OLIVE, P. L., O'NEILL, K. L. The Comet assay: a comprehensive review. **Mutat Res**, v. 339, p. 37-59. 1995.

FALNOGA, I., TUSEK-ZNIDARIC, M., HORVAT, M., STEGNAR, P. Mercury, selenium, and cadmium in human autopsy samples from Idrija residents and mercury mine workers. **Environ Res**, v. 84, p. 211-218. 2000

FRANCO J. L. **O sistema antioxidante da glutatona como alvo molecular na neurotoxicidade induzida por mercúrio: efeitos protetores de compostos naturais**. 144 p. Tese (doutorado em Neurociências), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina. 2009.

FERNÁNDEZ, M. L., IGLESIAS, M. M., BIRON, V. A., WOLFENSTEIN-TODEL, C. Protective effect of prolactin and placental lactogen on NO-induced Nb2 lymphoma cell apoptosis. **Arch Biochem Biophys**, v. 416, n. 2, p. 249-256. 2003.

FILIPIN, M. D. V., BRAZÃO, V., SANTELLO, F. H., CAETANO, L. C., TOLDO, M. P. A., PRADO JR, J. C. Prolactin: Does it exert an up-modulation of the immune response in *Trypanosoma cruzi*-infected rats? **Vet Parasitol**, v. 181, n. 2-4, p. 139-145. 2011.

FILIPIN, M. D. V. *et al.* Does Prolactin treatment trigger immunoendocrine alterations during experimental *T. cruzi* infection? **Cytokine**, v. 121, 154736. 2019.

FLOHÉ L. Die unerwünschte Sauerstoffaktivierung dokumentiert am Beispiel bestimmter Entzündungen: der Weg zur Anwendung der Superoxiddismutase. In: Elstner E.F., Bors W., Wilmanns W. (eds) **Reaktive Sauerstoffspezies in der Medizin**. Springer, Berlin, Heidelberg. 1987

FLORES, M., YAMAGUCHI, U. M. Teste de Micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Saud Pesq**, v. 1, n. 3, p. 337-340. 2008

FREEMAN, M. E., KANYICKA, B., LERANT, A., NAGY, G. Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. **Physiol Ver**, v. 80, n. 4, p. 1523-1631. 2000.

FREIRE, M. M., SANTOS, V. G., GINUINO, I. S. F, ARIAS, A. R. L. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecol Bras**, v. 12, n. 3, p. 347-353. 2008.

FUJIKAWA, T. *et al.* Subcutaneously administered prolactin and 20K hGH, not rGH or 22K hGH, prevent restraint stress-induced gastric ulcers in rats. **Endocr J**, v. 47, p. S49-S52. 2000.

FUJIMURA, M., USUKI, F., KAWAMURA, M., IZUMO, S. Inhibition of the Rho/ROCK pathway prevents neuronal degeneration in vitro and in vivo following methylmercury exposure. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 250, p. 1-9. 2011.

GALEANO-PÁEZ, C. *et al.* Dietary exposure to mercury and its relation to cytogenetic instability in populations from “La Mojana” region, northern Colombia. **Chemosphere**, v. 265, 129066. 2020.

GARCIA, M. S., CONSTANTINO, D. H., SILVA, A. P., PEROBELLI, J. E. Fish pollutants MeHg and Aroclor cause permanent structural damage in male gonads and kidneys after prepubertal exposure. **Int J Exp Pathol**, v. 97, n. 5, p. 360-368. 2016.

GARCÍA, R.M. *et al.* Prolactin protects retinal pigment epithelium by inhibiting sirtuin 2-dependent cell death. **EbioMedicine**, v. 7, p. 35-49. 2016

GHIZONI, H. *et al.* Effects of perinatal exposure to n-3 polyunsaturated fatty acids and methylmercury on cerebellar and behavioral parameters in mice. **Food Chem Toxicol**, v. 120, p. 603-615. 2018.

GEYIKOGLU, F., TURKEZ, H., BAKIR, T. O., CICEK, M. The genotoxic, hepatotoxic, nephrotoxic, haematotoxic and histopathological effects in rats after aluminium chronic intoxication. **Toxicol Ind Health**, v. 29, n. 9, p. 780-791. 2013

GOODMAN G, BERCOVICH D. Prolactin does not cause breast cancer and may prevent it or be therapeutic in some conditions. **Med Hypotheses**, v. 70, n. 2, p. 244- 251. 2008.

GRANDJEAN, P. *et al.* Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. **Neurotoxicol Teratol**, v. 19, p. 417-428. 1997.

GROTTO, D. *et al.* Evaluation of toxic effects of a diet containing fish contaminated with methylmercury in rats mimicking the exposure in the Amazon riverside population. **Environ Res**, v. 111, p. 1074-1082. 2011a.

GROTTO, D. *et al.* Evaluation of protective effects of fish oil against oxidative damage in rats exposed to methylmercury. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 74, p. 487-493. 2011b.

GUZMÁN, E. A., LANGOWSKI, J. L., GUZMAN, A., MULLER, H. K., WALKER, A. M., OWEN, L. B. S179D Prolactin Diminishes the Effects of UV Light on Epidermal Gamma Delta T Cells. **Mol Cell Endocrinol**, v. 280, n. 1-2, p. 6-12. 2008.

HACON, S. *et al.* An overview of mercury contamination research in the Amazon basin with an emphasis on Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 24, n. 7, p. 1479-1492. 2008

HAZELHOFF, M. H., TORRES, A. M. Gender differences in mercury-induced hepatotoxicity: Potential Mechanisms. **Chemosphere**, v. 202, p. 330-338. 2018.

HILFIKER-KLEINER, D. A. *et al.* Cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. **Cell**, v. 128, n. 3, p. 589-600. 2007.

HSIEH, D. J. *et al.* Prolactin protects cardiomyocytes against intermittent hypoxia-induced cell damage by the modulation of signaling pathways related to cardiac hypertrophy and proliferation. **Int J Cardiol**, v. 15, n. 181, p. 255-266. 2015.

IARC. **Agents Classified by the IARC Monographs**, v.1-129. 2021

IKEM, A., EGIEBOR, N.O. Assesment of trace elements in canned fishes (mackerel, tuna, salmon, sardines and herrings) marketed in Georgia and Alabama (United States of America). **J Food Comp Anal**, v. 18, p. 771-787. 2005.

IGNACAK, A., KASZTELNIK, M., SLIWA, T., KORBUT, R. A., RAJDA, K., GUZIK, T. J. Prolactin - not only lactotrophin a "new" view of the "old" hormone. **J Physiol Pharmacol**, v. 63, n.5, p. 435-443. 2012.

JESUS, M. I. **Avaliação do efeito protetor da Prolactina em Linfócitos expostos a ação do Matilmercúrio**. 57 p. Dissertação (mestrado em Neurociências e Biologia Celular), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará. 2012.

JINDAL, M., GARG, G.R., MEDIRATTA, P.K., FAHIM, M. Protective role of melatonin in myocardial oxidative damage induced by mercury in murine model. **Hum Exp Toxicol**, v. 30, n. 10, p. 1489-1500. 2011

KHAN H. *et al.* Mercury Exposure Induces Cytoskeleton Disruption and Loss of Renal Function through Epigenetic Modulation of MMP9 Expression. **Toxicol**, v. 386, p. 28-39. 2017.

KRUMENACKER, J. S. *et al.* Prolactin-regulated apoptosis of Nb2 lymphoma cells: pim-1, bcl-2, and Bax expression. **Endocrine**, v. 9, n. 2, p. 163-170. 1998.

LANDSBERG, G. Therapeutic agents for the treatment of cognitive dysfunction syndrome in senior dogs. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 29, p. 471-479. 2005.

LAPENSEE, E. W., BEN-JONATHAN, N. Novel roles of prolactin and estrogens in breast cancer: resistance to chemotherapy. **Endocr Relat Cancer**, v. 17, n. 2, p. R91-R107. 2010.

LAVOIE, H., WITORSC, R. J. Investigation of intracellular signals mediating the anti-apoptotic action of prolactin in Nb2 lymphoma cells. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 209, n. 3, p. 257-269. 1995.

LEBEL, J., MERGLER, D., BRANCHES, F., LUCOTTE, M., AMORIM, M., LARRIBE, F., DOLBEC, J. Neurotoxic Effects of Low-Level Methylmercury Contamination in the Amazoniam Basin. **Environ Res**, v. 79, p. 20-32. 1998.

LEDESMA-COLUNGA, M. G., *et al.* Prolactin blocks the expression of receptor activator of nuclear factor κ B ligand and reduces osteoclastogenesis and bone loss in murine inflammatory arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 19, n. 1, p. 93. 2017.

LEFF, M. A., BUCKLEY, D. J., KRUMENACKER, J. S., REED, J. C., MIYASHITA, T., BUCKLEY, A. R. Rapid modulation of the apoptosis regulatory genes, bcZ-2

and bax by prolactin in rat Nb2 lymphoma cells. **Endocrinol**, v. 137, n. 12, p. 5456-5462. 1996.

LEMOS, D. C. S. *et al.* Toxicidade aguda em camundongos BALB/c expostos a efluentes de curtume. **Multi-Sci J**, v. 1, n. 3, p. 56-63. 2015.

LIMKE, T. L., BEARSS, J. J., ATCHISON, W. D. Acute exposure to methylmercury causes Ca²⁺ dysregulation and neuronal death in rat cerebellar granule cells through an M3 muscarinic receptor-linked pathway. **Toxicol Sci**, v. 80, n. 1, p. 60-68. 2004.

LOPES-POLEZA, S. C. G. **Avaliação do efeito do metilmercúrio (CH₃Hg⁺) em *Hoplias malabaricus* através da frequência de Aberrações Cromossômicas e dos ensaios Cometa e Micronúcleo.** 70 p. Dissertação (mestrado em Genética), Universidade Federal do Paraná. 2004.

MAGNO, I. M. N. **Avaliação dos marcadores de injúria miocárdica induzida pela exposição ao metilmercúrio em modelos experimentais de primatas do novo mundo (*Cebus Apella*).** 105 p. Tese (Doutorado em Doenças Tropicais), Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará. 2009.

MALM, O. Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon. **Environ Res**, v. 77, n. 2, p. 73-78. 1998.

MANSANO, R. A. W. **Mecanismos moleculares mediadores da citoproteção de células Beta pancreáticas induzidos por prolactina.** 227 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Instituto de Química, Universidade de São Paulo. 2008.

MANZOLLI, E. S. *et al.* Protective effects of the flavonoid Chrysin against Methylmercury-induced genotoxicity and alterations of antioxidant status, in vivo. **Oxid Med Cell Longev**, 602360. 2015.

MARANO, R. J., BEN-JONATHAN, N. Minireview: Extrapituitary Prolactin: An Update on the Distribution, Regulation, and Functions. **Mol Endocrinol**, v. 28, n. 5, p. 622-633. 2014.

MARMENTINI, C. **Prolactina aumenta a expressão de enzimas antioxidantes e ativa o receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR) em células INS-1E.** 104 p. Dissertação (Mestrado em Biociências e Saúde), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 2019

MELI, R., RASO G. M., BENTIVOGLIO C., NUZZO, I., GALDLERO, M., DI CARLO, R. Recombinant human prolactin induces protection against *Salmonella typhimurium* infection in the mouse: role of nitric oxide. **Immunopharmacol**, v. 34, n. 1, p. 1-7. 1996.

MÖDERSCHEIM, T. A. E. *et al.* Prolactin is involved in glial responses following a focal injury to the juvenile rat brain. **Neurosci**, v. 145, n. 3, p. 963-973. 2007.

MORALES, T., LORENSON, M., WALKER, A.M., RAMOS, E. Both prolactin (PRL) and a molecular mimic of phosphorylated PRL, S179D-PRL, protect the hippocampus of female rats against excitotoxicity. **Neurosci**, v. 31, n. 258, p. 211-217. 2014.

MOHAMMADPOUR, A., KESAVARZ, H., MOHEBALI, M., SALIMI, M., TEIMOURI, A., SHOJAEI, S. The Relation of Serum Prolactin Levels and *Toxoplasma* Infection in Humans. **Int J Gen Med**, v. 12, p. 7-12. 2019.

NARDELLI, T. R. *et al.* Prolactin protects against cytokine-induced beta cell death by NFkB and JNK inhibition. **J Mol Endocrinol**, v. 61, n. 1, p. 25-36. 2018.

NASCIMENTO, J. *et al.* Methylmercury neurotoxicity and aclimatação defenses. **Ind J Med Res**, v. 128, p. 373–382. 2008.

OECD. Test Guideline 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. In **Guideline for the Testing of Chemicals**. 2016.

OLÁH, S. *et al.* Prolactin-induced and neuronal activation in the brain of mother mice. **Brain Struct Funct**, v. 223, n. 7, p. 3229-3250. 2018.

OLAZABAL, I. M., MUNOZ, J.A., RODRÍGUEZ-NAVAS, C., ALVAREZ, L., DELGADO-BAEZA, E., GARÍA-RUIZ, J.P. Prolactin's Role in the Early Stages of Liver Regeneration in Rats. **J Cell Physiol**, v. 219, p. 626-633. 2009.

OLIVEIRA, C.S.B. **Marcadores oxidantes e antioxidantes em populações expostas ao mercúrio em diferentes regiões geográficas do estado do Pará, Amazônia brasileira**. 101 p. Dissertação (mestrado em doenças tropicais), Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará. 2014.

OLIVEIRA, V.A. **Toxicidade do mercúrio em ratas virgens, gestantes e lactantes: efeito protetor do zinco e da N-acetilcisteína**. 116 p. Tese (doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica), Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria. 2016.

OLIVERIA, V.A., FAVERO, G., STACCHIOTTI, A., GIUGNO, L., BUFFOLI, B., OLIVEIRA, C.S., LAVAZZA, A., ALBANESE, M., RODELLA, L.F., PEREIRA, M.E., REZZANI, R. Acute Mercury Exposition of Virgin, Pregnant, and Lactating Rats: Histopathological Kidney and Liver Evaluations. **Environ Toxicol**, v. 32, n. 5, p. 1500-1512. 2016.

OMS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Exposição ao mercúrio: um grave problema de saúde pública, segunda edição. **Prevenção de doenças através de ambientes saudáveis**. 2ª ed. 2021.

PARK, S., KIM, D.S., DAILY, J.W., KIM, S.H. Serum prolactin concentrations determine whether they improve or impair β -cell function and insulin sensitivity in diabetic rats. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 25, n. 6, p. 564-574. 2011.

PASSOS, T. S. **Efeitos quimiprotetivos do flavonóide Hesperidina contra mutagenicidade induzida por Cisplatina em medula óssea de camundongos**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo. 2013

PAULA, E.S., CARNEIRO, M.F.H., GROTO, D., HERNANDES, L.C., ANTUNES, L.M.G., BARBOSA JR, F. Protective effects of niacin Against methylmercury-induced genotoxicity and alterations in antioxidant status in rats. **J Toxicol Environ Health A**, v. 79, n. 4, p.174-183. 2016.

PEREIRA, M. O., CALZA, C., ANJOS, M. J., LOPES, R. T., ARAÚJO, F. G. Metal concentrations in surface sediments of Paraíba do Sul River (Brazil). **J Radioanalyt Nuclear Chem**, v. 269, n. 3, p. 707-709. 2006.

PEIXOTO, N. C., PEREIRA, M. E. Effectiveness of ZnCl₂ in protecting against nephrotoxicity induced by HgCl₂ in newborn rats. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 66, n. 3, p. 441-446. 2007.

PINHEIRO, M. C. N. *et al.* Mercury pollution and childhood in Amazon riverside villages. **Environ Int**, v. 33, n. 1. p. 56-61. 2007.

PINHEIRO, M. C. N., HARADA, M., YASODA, E., NAKANISHI, J., OIKAWA, T., VIEIRA, J. L. F. Toxicological and epidemiological data on human exposure to mercury in the Tapajós River basin: 1994–1998. **Environ Sci**, v. 10, p. 99-105. 2003.

PIRES JR, H. B. *et al.* Avaliação da toxicidade aguda do extrato hexânico de frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae) em camundongos. **Ci Anim Bras**, v. 13, n. 4, p. 512–519, 2012.

PLOSZAJ, T. *et al.* Antiapoptotic action of prolactina is associated with up-regulation of Bcl-2 and down-regulation of Bax in HC11 mouse mammary epithelial cells. **Apoptosis**, v. 3, n. 4, p. 295-304. 1998.

PROPHET, E.B., MILLS, B., ARRINGTON, J. B., SOBIN, L. H. **Métodos Histotecnológicos**. Washington: Instituto de Patologia de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de America. 1995.

RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M. F., MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. 1ª ed. Canoas: Ulbra. 2003.

RYSZKA, F., DOLINSKA, B., CZYZ, K., JELINSKA, M., STRABEL, A., BOCHENSKA, J. Effect of Recombinant Human Prolactin Addition to Biolasol Solution on Biochemical Indicators in Perfundates of Porcine Kidneys. **Transplant Proc**, v. 48, n. 5, p.1824-1828. 2016.

RIVERO-SEGURA, N. A. *et al.* Prolactin prevents mitochondrial dysfunction induced by glutamate excitotoxicity in hippocampal neurons. **Neurosci Lett.** v. 701, p. 58-64. 2019.

RIVERO-SEGURA, N. A. *et al.* Prolactin-induced neuroprotection against glutamate excitotoxicity is mediated by the reduction of $[Ca^{2+}]_i$ overload and NF- κ B activation. **PLoS One**, v. 12, n. 5, p. 1-16. 2017.

RIZZETTI, D. A. **Efeito do tratamento antioxidante sobre a reatividade vascular da artéria aorta e estresse oxidativo de ratos expostos cronicamente ao cloreto de mercúrio (HgCl₂)**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Pama. 2012.

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

ROCHA, C. A. M., CUNHA, L.A., PINHEIRO, R.H.S., BAHIA, M.O., BURBANO, R.M.R. Studies of micronuclei and other nuclear abnormalities in red blood cells of *Colossoma macropomum* exposed to methylmercury. **Genet Mol Biol**, v. 34, n. 4, p. 694-697. 2011a.

ROCHA, C. A. M., CAVALCANTI, B., PESSOA, C.Ó., CUNHA, L.A., PINHEIRO, R.H.S., BAHIA, M.O., RIBEIRO, H., CESTARI, M., BURBANO, R.M.R. Comet Assay and Micronucleus Test in Circulating Erythrocytes of *Aequidens tetramerus* Exposed to Methylmercury. **In Vivo**, v. 25, n. 6, p. 929-934. 2011b.

SAMPAIO, S. D., LUCOTTE, M., ROULET, M., POIRIER, H., MERGLER, D., CROSSA, M. Mercúrio nos peixes do rio Tapajós, Amazônia brasileira. **InterfacEHS**, v. 1, n. 1, 1-31. 2006.

SANTOS, A.C.M. **Efeitos protetores da Prolactina em cultivo glial de córtex de ratos expostos ao metilmercúrio**. 67 p. Dissertação (mestrado em Neurociências e Biologia Celular) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará. 2008.

SANTOS, T.S. **Efeito genotóxico do metilmercúrio na larva de *Physalaemus ephippifer* (Steindachner, 1864) (Anura: Leptodactylidae)**. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Biologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará. 2019.

SANTOS, E. C. *et al.* Mercury exposures in riverside Amazon communities in Pará, Brazil. **Environ Res**, v. 84, n.2, p. 100-107. 2000.

SCHROEDER, W.H., MUNTHE, J. Atmospheric Mercury – An overview. **Atm Env**, v. 32, n. 5, p. 809-822. 1998.

SHIBLI-RAHHAL, A., SCHLECHTE, J. The effects of hyperprolactinemia on bone and fat. **Pituitary**, v. 12, n. 2, p. 96-104. 2009.

SILVA, L.M. **Efeitos do mercúrio sobre a atividade das enzimas alanina aminotransferase, lactato desidrogenase e glicose 6-fosfatase de ratos jovens**. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica), Universidade Federal de Santa Maria. 2010.

Silva, L. S. C. **Efeito Mutagênico do Metilmercúrio *In Vitro*: Análise por meio do Teste do Micronúcleo e Ensaio Cometa**. 27 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Biologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará. 2017.

SILVA-PEREIRA, L. C. *et al.* Cytotoxicity and genotoxicity of low doses of mercury chloride and methylmercury chloride on human lymphocytes in vitro. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n. 6, p. 901-907. 2005.

SILVA-PEREIRA, L.C. *et al.* Protective Effect of Prolactin against Methylmercury-Induced Mutagenicity and Cytotoxicity on Human Lymphocytes. **Int J Environ Res Public Health**, v. 11, p. 9822-9834. 2014.

SOARES JR, J. M. S., GADELHA, M. Fisiologia da Prolactina. **DXD0403 EMC HIPERPR**, n 1, 192188. 2004.

SOUSA, A. H. **Genotoxicidade do Metilmercúrio: Avaliação *in vitro* dos danos em células do Sistema Nervoso Central**. 97 p. Dissertação (Mestrado Epidemiologia e Vigilância em Saúde), Instituto Evandro Chagas, Pará. 2018.

SOUZA, V. C. O. , MARCO, K. C. , LAURE, H. J. , ROSA, J. C. , BARBOSA JR, F. A brain proteome profile in rats exposed to *methylmercury* or thimerosal (ethylmercury). **J Toxicol Environ Health A**, v. 79, n. 12, p. 502-512. 2016.
SZULC-MUSIOŁ, B., DOLINSKA, B., JASIK, K., RYSZKA, F. Effect of Prolactin on Biochemical and Morphological Parameters of Rabbit Liver in Warm Ischemia. **Transplant Proc**, v. 50, n. 7, p. 2229-2234. 2018.

TANI, N., IKEDA, T., WATANABE, M., TOYOMURA, J., OHYAMA, A., ISHIKAWA, T. Prolactin selectively transported to cerebrospinal fluid from blood under hypoxic/ischemic conditions. **PLoS One**, v. 13, n. 6, e0198673. 2018.

TEJADILLA, D., CERBÓN, M., MORALES, T. Prolactin reduces the damaging effects of excitotoxicity in the dorsal hippocampus of the female rat independently of ovarian hormones. **Neurosci**, v. 169, n. 3, p. 1178-1185. 2010.

TERRA, L. F. *et al.* Heat shock protein B1 is a key mediator of prolactin-induced beta-cell cytoprotection against oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 134, p. 394-405. 2019.

THEIR, R. *et al.* Interaction of metal salts with cytoskeletal motor protein systems. **Toxicol Lett**, v. 140-141, p. 75-81. 2003.

TICE, R. R. *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen**, v. 35, n. 3, p. 206-221. 2000

TU, R., ZHANG, C., FENG, L., WANG, H., WANG, W., LI, P. Impact of selenium on cerebellar injury and mRNA expression in offspring of rat exposed to methylmercury. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 15, n. 223, 112584. 2021.

VERGARA-CASTAÑEDA, E. Prolactin mediates neuroprotection against excitotoxicity in primary cell cultures of hippocampal neurons via its receptor. **Brain Res**, v. 1636, p. 193-199. 2016.

VILLELA, I. V. *et al.* Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental. In: SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J. A. P. (org). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance. 2003.

WAGNER, C. *et al.* Comparative study of quercetin and its two glycoside derivatives quercitrin and rutin against methylmercury (MeHg)-induced ROS production in rat brain slices. **Arch Toxicol**, v. 84, n. 2, p. 89-97. 2010.

WAILEMANN, R. A. M., TERRA, L. F., OLIVEIRA, T. C. O., SANTOS, A. F., GOMES, V. M., LABRIOLA, L. Heat shock protein B1 is required for the prolactin-induced cytoprotective effects on pancreatic islets. **Mol Cell Endocrinol**, 477, 39-47. 2018.

WAHLBERG, J., TILLMAR, L., EKMAN, B., LINDAHL, T.L., LANDBERG, E. Effects of prolactin on platelet activation and blood clotting. **Scand J Clin Lab Invest**, v. 73, n. 3, p. 221-228. 2013.

WASSERMAN, J. C., HACON, S., WASSERMAN, M. A. Biogeochemistry of mercury in the Amazonian environment. **Ambio**, v. 32, n. 5, p. 336-342. 2003.

WINTERBOURN, C. C., GUTTERIDGE, J. M., HALLIWELL, B. Doxorubicin dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O₂. **J Free Radic Biol Med**, v. 1, n. 1, p. 43-49. 1985.

WU, X. *et al.* Prolactin inhibits the progression of intervertebral disc degeneration through inactivation of the NF- κ B pathway in rats. **Cell Death Dis**, v. 9, n. 98, p. 1-11. 2018.

YAMAMOTO, T. *et al.* Prolactin Supplementation to Culture Medium Improves BetaCell Survival. **Transplantation**, v. 89, n. 11, p. 1328-1335. 2008.

YANG, H. *et al.* The Association Between Prolactin and Metabolic Parameters in PCOS Women: A Retrospective Analysis. **Front Endocrinol**, v. 11, 263. 2020.

YAHYAZEDEH, A., ALTUNKAYNAK, B. Z., AKGÜL, N., AKGÜL, H. M. A histopathological and stereological study of liver damage in female rats caused by mercury vapor, **Biotech Histochem**, v. 92, n. 5, p. 338-346. 2017.

YASUTAKE, A., NAGANO, M., NAKANO, A. Simple method for methylmercury estimation in biological samples using atomic absorption spectroscopy. **J Health Sci**, v. 51, n. 2, p. 220-223. 2005.

YUAN, Y., ATCHISON, W. D. Methylmercury-induced increase of intracellular Ca²⁺ increases spontaneous synaptic current frequency in rat cerebellar slices. **Mol Pharmacol**, v. 71, n. 4, p. 1109-1121. 2007.

APÊNDICE 1

Tabela A: Marcadores renais e hepáticos, mercúrio e prolactina no sangue. Média \pm desvio padrão de cada grupo de tratamento, machos.

	UREIA (mg/dL)	CREATININA (mg/dL)	AST (UI/L)	ALT (UI/L)	Hg (μg/mL)	PRL (μg/mL)
CN	51.7 \pm 2.1	0.8 \pm 0.1	71.0 \pm 11.3	106.0 \pm 2.6	0.11 \pm 0.001	58.0 \pm 1.0
MeHg	113.2 \pm 4.7 ^a	2.44 \pm 0.2 ^a	748.0 \pm 4.7 ^a	978.4 \pm 24.8 ^a	1.158 \pm 0.019 ^a	44.0 \pm 2.55 ^a
PRL 25	52.4 \pm 4.0	0.58 \pm 0.084	74.0 \pm 3.4	109.2 \pm 4.0	0.132 \pm 0.033	64.0 \pm 1.58 ^d
PRL 250	51.8 \pm 2.3	0.74 \pm 0.055	83.6 \pm 2.1	110.2 \pm 3.8	0.118 \pm 0.019	78.6 \pm 1.14 ^e
MeHg + PRL 25	92.8 \pm 3.6 ^b	1.7 \pm 0.158 ^b	589.6 \pm 9.7 ^b	674.0 \pm 20.6 ^b	0.530 \pm 0.025 ^b	46.4 \pm 2.51
MeHg + PRL 250	71.5 \pm 1.3 ^c	1.1 \pm 0.082 ^c	351.3 \pm 28.4 ^c	312.8 \pm 56.6 ^c	0.425 \pm 0.024 ^c	63.25 \pm 0.95

Os resultados foram analisados com ANOVA one-way, pós teste Tukey. **a**: diferença estatisticamente significativa do grupo tratado apenas com MeHg para todos os outros grupos. **b** e **c**: diferença estatisticamente significativa dos grupos que receberam tratamento conjugado para todos os outros grupos. **d** e **e**: diferença estatisticamente significativa do nível de PRL nos grupos que foram tratados apenas com o hormônio para os grupos que receberam o tratamento conjugado.

Tabela B: Marcadores renais e hepáticos, mercúrio e prolactina no sangue. Média \pm desvio padrão de cada grupo de tratamento, fêmeas.

	UREIA (mg/dL)	CREATININA (mg/dL)	AST (UI/L)	ALT (UI/L)	Hg (μg/mL)	PRL (μg/mL)
CN	44.0 \pm 2.9	0.45 \pm 0.06	57.0 \pm 11.0	102.5 \pm 3.1	0.15 \pm 0.008	61.75 \pm 1.26
MeHg	92.8 \pm 3.1 ^a	1.975 \pm 0.96 ^a	686.8 \pm 7.4 ^a	729.5 \pm 17.6 ^a	0.89 \pm 0.084 ^a	49.25 \pm 2.88 ^a
PRL 25	45.4 \pm 2.3	0.42 \pm 0.084	69.0 \pm 6.8	107.0 \pm 4.5	0.138 \pm 0.019	68.6 \pm 2.07 ^d
PRL 250	41.6 \pm 2.1	0.56 \pm 0.05	72.0 \pm 5.3	111.6 \pm 2.1	0.134 \pm 0.027	83.0 \pm 1.87 ^e
MeHg + PRL 25	82.0 \pm 1.9 ^b	1.4 \pm 0.158 ^b	553.4 \pm 9.8 ^b	552.4 \pm 36.8 ^b	0.536 \pm 0.011 ^b	51.0 \pm 1.14
MeHg + PRL 250	63.4 \pm 3.0 ^c	0.92 \pm 0.045 ^c	336.0 \pm 13.4 ^c	213.0 \pm 18.1 ^c	0.446 \pm 0.028 ^c	69.0 \pm 1.58

Os resultados foram analisados com ANOVA one-way, pós teste Tukey. **a**: diferença estatisticamente significativa do grupo tratado apenas com MeHg para todos os outros grupos. **b** e **c**: diferença estatisticamente significativa dos grupos que receberam tratamento conjugado para todos os outros grupos. **d** e **e**: diferença estatisticamente significativa do nível de PRL nos grupos que foram tratados apenas com o hormônio para os grupos que receberam o tratamento conjugado.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS

PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO ANIMAIS

Protocolo nº 16/2017

Título do Projeto de Pesquisa: **Avaliação in vivo do potencial antioxidante e antígenotóxico da prolactina contra danos causados pelo mercúrio**

Pesquisador Responsável: Anderson Bentes de Lima
Instituição: Universidade do Estado do Pará

Data do Parecer: 11/08/2017

PARECER

O Comitê de Ética no Uso de Animais da UEPA apreciou o protocolo em tela e verificou que foram atendidas todas as exigências da Lei Federal 11.794, sendo respeitados os Princípios Éticos da Experimentação Animal do CONCEA. O referido projeto utiliza 60 camundongos *Mus musculus*, com 40 dias e peso de 30g a 40g para fins de pesquisa, tratando-se de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata, sendo 30 camundongos do sexo masculino e 30 do sexo feminino, originários da Seção de Criação e Produção de Animais de Laboratório (SACPA) do Instituto Evandro Chagas. Desse modo, após as avaliações o CEUA-UEPA, manifesta-se pela sua aprovação.

O projeto será desenvolvido no período de 01/2018 a 12/2018.

Parecer: APROVADO

Liberado para o início da pesquisa sendo obrigatória a entrega neste CEUA do relatório semestral e a conclusão ao final da pesquisa. Comunicar por escrito, toda e qualquer modificação no projeto.

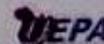
Belém, 11 de agosto de 2017

Prof. Dr. Anderson Bentes de Lima
CCBS / UEPA
Mat. 57233093/1

Anderson Bentes de Lima
Prof. Dr. Anderson Bentes de Lima
Coord. do CEUA/CCBS/UEPA



Universidade do Estado do Pará - UEPA - Campus II / CCBS
Comitê de Ética em Uso de Animais - CEUA, End.: Trav. Perebeui nº 2623 - Marco - CEP: 66087-670
Belém/Pará. Fone: (91) 3276-3387, e-mail: ceuauepa2017@gmail.com



ANEXO 2

Brazilian Journal of Medical and Biological Research



***In vivo* evaluation of the potential protective effects of prolactin against damage caused by methylmercury**

Journal:	<i>Brazilian Journal of Medical and Biological Research</i>
Manuscript ID	11976.R1
Manuscript Type:	Full Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Cunha, Lorena; Universidade Federal do Pará, Laboratory of Human Cytogenetics Bonfim, Laís; Universidade Federal do Pará, Laboratory of Human Cytogenetics Lima, Gabriella; Universidade Federal do Pará, Multidisciplinary Laboratory of Animal Morphophysiology Silva, Renata; Universidade do Estado do Para, Laboratory of Applied Morphophysiology in Public Health Silva, Luciana; Universidade do Estado do Para, Laboratory of Applied Morphophysiology in Public Health Lima, Patrícia; Universidade do Estado do Pará, Laboratory of Cytogenetics Oliveira-Bahia, Verônica; Universidade Federal do Pará, Multidisciplinary Laboratory of Animal Morphophysiology Freitas, Jofre; Universidade do Estado do Pará, Laboratory of Applied Morphophysiology in Public Health Burbano, Rommel ; Hospital Ophir Loyola, Laboratório de Biologia Molecular Rocha, Carlos ; Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Pará, Diretoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Inovação (DPI)
Keywords:	mercury, prolactin, histological evaluation, biochemical parameters, genotoxicity
Special Sections:	Biomedical Sciences/Cell Biology

SCHOLARONE™
Manuscripts

<https://mc04.manuscriptcentral.com/bjmbbr-scielo>